

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DETERMINAÇÃO DO VALOR NUTRICIONAL,
PROPRIEDADES FERMENTATIVAS E EFEITOS SOBRE
A MICROBIOTA DE UMA FONTE PROTEICA
UNICELULAR NA DIETA DE GATOS

Autor: Lucas dos Santos Castro
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Joyce Sato

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DETERMINAÇÃO DO VALOR NUTRICIONAL,
PROPRIEDADES FERMENTATIVAS E EFEITOS SOBRE
A MICROBIOTA DE UMA FONTE PROTEICA
UNICELULAR NA DIETA DE GATOS

Autor: Lucas dos Santos Castro
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Joyce Sato

“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
Fevereiro – 2025

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

C355d

Castro, Lucas Dos Santos

Determinação do valor nutricional, propriedades fermentativas e efeitos sobre a microbiota de uma fonte proteica unicelular na dieta de gatos / Lucas Dos Santos Castro. - Maringá, PR, 2025.

91 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos.

Coorientadora: Profa. Dra. Joyce Sato.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2025.

1. Nutrição animal. 2. Proteína microbiana. 3. Cães e gatos - Nutrição. 4. *Pet food*. 5. Proteína alternativa. I. Vasconcellos, Ricardo Souza, orient. II. Sato, Joyce, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.085



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DETERMINAÇÃO DO VALOR NUTRICIONAL,
PROPRIEDADES FERMENTATIVAS E EFEITOS SOBRE A
MICROBIOTA DE UMA FONTE PROTEICA UNICELULAR
(PEKILO®) NA DIETA DE GATOS

Autor: Lucas dos Santos Castro
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADO em 26 de fevereiro de 2025.

Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha

Prof. Dr. Luciano Trevizan

Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Orientador

“.... Ninguém nunca se apaixonou sem ser um pouco corajoso... ”.

- Shepard – Mass Effect 3 (2012).

“... Todos esses momentos serão perdidos no tempo, como lágrimas, na chuva...”.

- Roy Batty – Blade Runner (1994).

“ ... Quão importante é na vida não necessariamente ser forte, mas se sentir forte”.

- Christopher McCandless (1992).

“...O fracasso não é o fim. É uma parte necessária do caminho. A esperança sempre sobreviverá naqueles que continuam a lutar”.

- Eno Cordova – Jedi: Fallen Order (2019).

Ao

meu pai e minha mãe, que
foram tudo que eu
sempre precisei e
nunca me deixaram
faltar nada

À

minha irmã Yasmine, por nunca
me deixar sentir sozinho
mesmo há distância

À

minha namorada Mayara, pelo
companheirismo e incentivo
incondicional ao longo desta jornada

À

minha tia Nair, pelo apoio e compreensão
sempre

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Newton e Lucia (*in memoriam*), que sempre me deram amor e suporte incondicional, além de ótima educação para poder estar aqui. Mãe sei que você não pode estar aqui para ver, mas espero que esteja com orgulho do seu filhinho, te amo muito.

À minha tia Nair e à minha avó Edwirges (*in memoriam*), pelo carinho, acolhimento e cuidado ao longo de todos esses anos, vocês foram e são tudo que eu sempre preciso nos momentos mais necessários.

À minha irmã Yasmine, por sempre me proteger e ajudar sempre que necessário, desde a infância até os dias de hoje. Mesmo à distância, nunca deixou de cuidar de mim como seu irmãozinho. Sua presença e apoio significam tudo para mim.

À minha amada Mayara, pelo companheirismo incondicional, pelo apoio constante, inclusive durante as noites de coleta e os dias incessantes de escrita, e por estar sempre ao meu lado, acreditando em mim e nos meus sonhos, te amo muito.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Vasconcellos, pela orientação dedicada, paciência e pelo valioso conhecimento compartilhado, fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação

Aos meus amigos Maria, Jonathan e Luiz, por estarem ao meu lado em diversos momentos, oferecendo apoio, companheirismo e tornando essa jornada mais leve e especial. A amizade de vocês foi fundamental para enfrentar os desafios e celebrar as conquistas ao longo deste caminho.

Aos meus amigos de pós-graduação, Uilquer, Diego e Amanda, pela parceria ao longo de toda essa trajetória. Seja nos momentos de descontração e alegria, ou nos desafios e estresses das disciplinas e atividades, tornando essa caminhada mais leve.

Ao meu primeiro orientador, Prof. Dr. Jairo Pinheiro, sempre muito atencioso, ensinou muito sobre o mundo da pesquisa nos anos que fui seu aluno de iniciação científica, agradeço por toda paciência e pelos puxões de orelha.

Ao Prof. Dr. Oscar e à Patrícia, pela disponibilidade e dedicação em colaborar na condução e realização das análises para o desenvolvimento desta dissertação.

À Fábrica de Ração da Unesp/Botucatu e a todos os funcionários, pela dedicação e apoio na produção das dietas indispensáveis para o desenvolvimento do meu projeto.

À minha coorientadora Joyce Sato, por me impulsionar a esse novo desafio e sempre me auxiliar nas necessidades da pós-graduação.

Aos técnicos do Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal (LANA), Ulisses e Oswaldo, pelo indispensável auxílio na realização das análises.

À equipe do Centro de Ensino e Estudos Nutricionais em Felinos (CEENUFEL), pela valiosa ajuda na condução dos experimentos e pela parceria ao longo deste trabalho.

À empresa de consultoria estatística, *Strategic Way*, em especial a Stéfane, por todo auxílio na análise e interpretação estatística dos dados.

À Imunova, pelo suporte essencial na análise de microbiota e pela valiosa contribuição na interpretação dos resultados, fundamentais para o avanço deste experimento.

A todos os gatos do gatil, em especial Kim, Cabeça, Chun-li, Osama, Blue, Alice, Gambit e Mumu, por serem a base do estudo e permanecerem do início ao fim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado ao longo desses dois anos.

À FS Bioenergética, pela oportunidade e financiamento do projeto.

À Special Dog Company pela manutenção dos animais do laboratório.

E, por fim, à Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pelo suporte institucional e pela oportunidade de realizar esta pesquisa, essenciais para a concretização deste trabalho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Lucas dos Santos Castro, filho da Sra. Lúcia dos Santos Castro e do Sr. Newton de Oliveira Castro Júnior, nasceu na cidade e estado do Rio de Janeiro, no dia 17 de novembro de 1997.

Em 2012, ingressou no curso técnico de Análises Clínicas pela Escola Técnica Estadual Juscelino Kubitschek (ETEJK/FAETEC/RJ), concluindo-o em 2014. Em 2016, iniciou a graduação em Zootecnia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Durante a formação com bolsa de Iniciação Científica do CNPq, PIBIC, UFRRJ, sob a orientação do professor Dr. Jairo Pinheiro da Silva, de 2017 a 2021, desenvolvendo pesquisas sobre alterações em moluscos infectados por larvas de helmintos, com ênfase nas interações. De 2021 a 2022, realizou Iniciação Científica voluntária na área de nutrição de cães e gatos sob orientação da professora Dra. Joyce Sato. Em setembro de 2022, concluiu a graduação em Zootecnia, obtendo o diploma pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Em março de 2023, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de mestrado, na Universidade Estadual de Maringá, com foco na área de Produção Animal, com ênfase em Nutrição de Animais de Companhia. Submeteu-se à banca examinadora de defesa de dissertação em fevereiro de 2025.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE EQUAÇÕES.....	14
LISTA DE ABREVIACÕES.....	15
I – INTRODUÇÃO.....	16
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.1. Importância da Proteína para Gatos	18
1.2. Agricultura Celular	20
1.3. <i>Single Cell Protein</i> - Proteína Microbiana.....	24
1.4. <i>Paecilomyces variotii</i>	31
1.5. <i>Pekilo Process</i>	33
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
II – OBJETIVOS.....	43
III – DETERMINAÇÃO DO VALOR NUTRICIONAL, PROPRIEDADES FERMENTATIVAS E EFEITOS SOBRE A MICROBIOTA DE UMA FONTE PROTEICA UNICELULAR NA DIETA DE GATOS.....	44
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
1. INTRODUÇÃO.....	47
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
2.1. Experimento 1	48
2.1.1. Animais e instalações.....	48
2.1.2. Dietas experimentais.....	49
2.1.3. Protocolo experimental	50
2.1.4. Digestibilidade aparente dos nutrientes, energia metabolizável e características fecais.....	51
2.2. Experimento 2	52
2.2.1. Animais e instalações.....	52
2.2.2. Dietas experimentais.....	53
2.2.3. Protocolo experimental	54
2.2.4. Digestibilidade aparente dos nutrientes, energia metabolizável e características fecais.....	54
2.2.5. Produtos de fermentação.....	55

2.2.6.	Microbiota fecal.....	56
2.3.	Teste de preferência.....	57
2.4.	Análise estatística	58
3.	RESULTADOS.....	59
3.1.	Animais	59
3.2.	Experimento 1	59
3.3.	Experimento 2	60
4.	DISCUSSÃO.....	66
5.	CONCLUSÃO	79
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
8.	APÊNDICES.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação dos impactos ambientais estimados da produção de 1 quilograma de produtos cárneos nos Estados Unidos	23
Tabela 2. Composição dos principais grupos de microrganismos utilizados como Single Cell Protein (% matéria seca).....	24
Tabela 3. Composição nutricional dos ingredientes incluindo P. variotii, farinha de peixe, concentrado de proteína de soja (CPS) e farelo de glúten de trigo (FGT).....	33
Tabela 4. Composição química (% na matéria seca) do ingrediente teste (FS Bioenergética, Mato Grosso do Sul, Brasil).....	49
Tabela 5. Composição das dietas experimentais do experimento 1.....	50
Tabela 6. Composição das dietas experimentais do experimento 2.....	53
Tabela 7. Consumo e características fecais do experimento 1.	59
Tabela 8. Coeficiente de digestibilidade aparente e energia metabolizável do ingrediente	60
Tabela 9. Características fecais, coeficiente de digestibilidade aparente e energia metabolizável de gatos alimentados com níveis crescentes de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta	60
Tabela 10. Produtos de fermentação em gatos alimentados com níveis crescentes de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta.....	61
Tabela 11. Razão de ingestão das dietas, Controle, 8% e 16% de inclusão do ingrediente.....	66
Tabela 12A. Abundância relativa dos principais filos bacterianos em amostras fecais de gatos alimentados com níveis crescentes de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta	88
Tabela 13A. Abundância relativa das principais famílias bacterianas em amostras fecais de gatos alimentados com níveis crescentes de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta	88
Tabela 14A. Abundância relativa dos principais gêneros bacterianos em amostras fecais de gatos alimentados com níveis crescentes de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura geral dos aminoácidos em pH neutro (arquivo pessoal).....	18
Figura 2. Principais marcos na agricultura celular. Adaptado de Eibl et al. (2021).	22
Figura 3. Representação esquemática da agricultura celular (RISCHER et al., 2020).....	23
Figura 4. Fluxograma para produção de proteínas microbianas – Adaptado de Adedayo et al. (2011).....	26
Figura 5. Alfa-diversidade estimada pelos parâmetros Chao1 (A), ASVs Observadas (B), Índice de Fisher (C), Índice de Simpson (D), Shannon (E) e Evenness Pielou (F) da microbiota intestinal de gatos submetidos a dietas com diferentes níveis de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%).	62
Figura 6. Análise de beta-diversidade (PCoA) para microbiota intestinal de gatos submetidos a dietas com diferentes níveis de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%).	63
Figura 7. Distribuição da abundância relativa (%) dos principais filos bacterianos na microbiota intestinal de gatos submetidos a diferentes tratamentos com níveis crescentes de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta.....	64
Figura 8. Distribuição da abundância relativa (%) das principais famílias na microbiota intestinal de gatos submetidos a diferentes tratamentos com níveis crescentes de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta.....	65
Figura 9. Distribuição da abundância relativa (%) das principais espécies na microbiota intestinal de gatos submetidos a diferentes tratamentos com níveis crescentes de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta	65

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Necessidade energética em manutenção em gatos adultos saudáveis.....	51
Equação 2. Coeficiente de digestibilidade do ingrediente pelo método de substituição. Adaptado de MATTERSON et al. (1965) e CARCIOFI (2019).	51
Equação 3. Cálculo de coeficiente de digestibilidade aparente para nutrientes (FEDIAF, 2021). 52	
Equação 4. Cálculo de energia metabolizável para gatos (FEDIAF, 2021).....	52
Equação 5. Cálculo de razão de ingestão.	58

LISTA DE ABREVIACÕES

SCP – (do inglês) *Single Cell Protein*
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
TPOMW – *Two-Phase Olive Mill Waste*
ZNC – Extrato de ZhiNengCong
EFIFO – *Fish in Fish out*
UEM – Universidade Estadual de Maringá
LANA – Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animais
ECC – Escore de condição parcial
FEDIAF – *European Pet Food Industry Federation*
FMVZ – Faculdade de Médica Veterinária e Zootecnia
UNESP - Universidade Estadual Paulista
DIC – Delineamento inteiramente ao acaso
CDA – Coeficiente de digestibilidade aparente
AOAC – *Association of the Official Analytical Chemists*
EM – Energia metabolizável
AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta
AGCCR – Ácidos graxos de cadeia ramificada
AGV – Ácidos graxos voláteis
ASV – Variantes de sequências de amplicons
PCoA – Análise de coordenadas principais
QIIME – *Quantitative insights into microbial ecology*
GTDB – Banco de dados de taxonomia de genomas bacterianos
PERMANOVA – *Permutational Multivariate Analysis of Variance*
EPM – Erro padrão da média
PFM – Proteína fermentada de milho
DDGS – *Dried Distillers Grains with Solubles*
HPDDGS – *High Protein Dried Distillers Grains with Solubles*
BDY – Brewery Distillery Yeast - levedura seca de cervejaria
TGI – Trato gastrointestinal

I – INTRODUÇÃO

O mercado *pet* tem crescido e expandido consideravelmente nos últimos 20 anos. Considerada uma área importante para a economia com faturamento de 46,8 bilhões de reais em 2023, o segmento *pet food* corresponde a 78% do total de faturamento de todo o segmento *pet* no Brasil (ABINPET, 2024).

Com o aumento da população mundial e a ampliação do conceito de sustentabilidade para a alimentação humana e animal, diversas alternativas vêm sendo pesquisadas para mitigar os impactos ambientais da produção de alimentos para animais. Entre essas alternativas, destacam-se a busca por novas fontes de proteínas, como o aproveitamento de coprodutos e subprodutos industriais, a produção de proteínas a partir de insetos, microalgas, fungos, bactérias, leveduras e outros organismos unicelulares (BAJIC´ *et al.*, 2022).

Dentre as novas formas de produção alimentar, a agricultura celular foi desenvolvida com o objetivo de reduzir o impacto ambiental, utilizando biotecnologia para o cultivo de células de plantas, animais ou outros microrganismos. Essa abordagem permite crescimento mais eficiente, com menor impacto ambiental em comparação com a agricultura convencional (RISCHER *et al.*, 2020).

A “proteína unicelular”, em inglês *single cell protein* (SCP), tem sido estudada com possível alternativa à proteína animal e vegetal. Os microrganismos utilizados (fungos, leveduras, microalgas e bactérias) possuem rápido crescimento quando comparados a organismos mais complexos, e sem a necessidade de desenvolver tecidos de suporte, em alguns casos, sendo possível utilizar fontes não comestíveis (resíduos industriais, agrícolas) em seu cultivo (NYSSÖLÄ *et al.*, 2022).

Os fungos e leveduras possuem destaque dentre os principais microrganismos utilizados como SCP, principalmente por muitos dos organismos produzirem uma biomassa com níveis entre 30-50% de proteína, perfil de aminoácidos adequado e ser fonte de vitaminas do complexo B (RITALA *et al.*, 2017).

Além disso, possuem alta densidade celular e crescimento acelerado. Certos fungos possuem capacidade de utilizar diversos componentes orgânicos para desenvolver biomassa, sendo uma vantagem em potencial para as indústrias que possuem resíduos de produção possam gerar economia circular (NYSSÖLÄ *et al.*, 2022).

Uma das principais SCP conhecidas pela indústria é produzida pela biomassa do fungo filamentoso *Paecilomyces variotti*. O processo foi inicialmente desenvolvido na Finlândia pelas indústrias de papel e madeira nos anos 90, onde eram utilizados substratos de licor de resíduos sulfíticos e hidrolisados de madeira para fermentação em biodigestores e produção da biomassa microbiana (RITALA *et al.*, 2017).

Dentre as principais características da SCP em estudo estão os altos teores de proteína, possuindo de 50-60% na matéria seca, perfil de aminoácidos adequado e baixo teor de gordura, sendo uma característica interessante para a produção de proteínas com menor teor de oxidação. (LAKSESVELA E SLAGSVOLD, 1974). Além disso, possui a presença de betaglucanas (10-15%), reconhecida pelo efeito imunoestimulante (BAJPAI, 2017; HOOFT *et al.*, 2025).

A utilização de proteínas provindas de microrganismos (SCPs) apresentam grande potencial, embora a aplicação em cães e gatos ainda seja reduzida. Dessa forma, o desenvolvimento de novos ingredientes, como a proteína em estudo, pode ampliar as possibilidades de substituição das proteínas de origem animal em dietas para pets. Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de uma fonte proteica unicelular na dieta de gatos, por meio da análise da digestibilidade do ingrediente isolado e de dietas com diferentes níveis de inclusão, bem como as características fecais, produtos da fermentação, microbiota fecal e palatabilidade.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Importância da Proteína para Gatos

As proteínas são macromoléculas complexas constituídas por sequências de aminoácidos interligados por ligações peptídicas. Elas possuem funções estruturais, enzimáticas, de transporte, sinalização celular, entre outras (NELSON & COX, 2018).

Já os aminoácidos são moléculas orgânicas que funcionam como os blocos estruturais das proteínas. Como é possível observar na Figura 1, cada aminoácido é composto por um grupo amina (-NH_3^+), um grupo carboxila (-COO^-) e uma cadeia lateral (R) específica, que determina as propriedades químicas (MARZZOCO & TORRES, 2007).

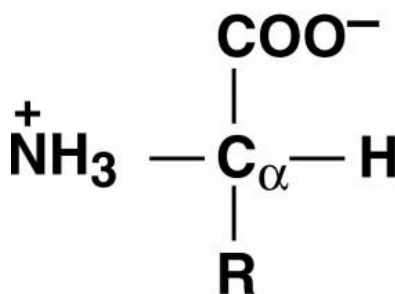


Figura 1. Representação da estrutura geral dos aminoácidos em pH neutro (arquivo pessoal).

Os humanos e animais utilizam as proteínas como importante fonte de nitrogênio e aminoácidos essenciais, sendo estas, indispensáveis para a síntese de novas proteínas estruturais (queratina, actina e miosina) e funcionais (enzimas) que desempenham papéis fundamentais no crescimento, na reparação tecidual e na manutenção do metabolismo (RITALA *et al.*, 2017).

Os ancestrais selvagens dos gatos (*Felis silvestris*) eram carnívoros estritos, ou seja, consumiam presas com alto teor de proteínas, gordura moderada e poucos carboidratos. Já os gatos domésticos (*Felis catus*) passaram por adaptações metabólicas ao longo dos anos, adquirindo maior flexibilidade em relação à dieta (VERBRUGGHE & BAKOVIC, 2013; VERBRUGGHE & HESTA, 2017).

No entanto, quando comparados a outros animais, especialmente onívoros, gatos possuem maiores exigências em nutrientes considerados essenciais, como por exemplo taurina, arginina, e o ácido araquidônico, vitaminas A, E entre outros (MORRIS *et al.*, 2002; ZORAN, 2002).

Ao contrário do que se acreditava no passado, os gatos, assim como os cães, são capazes de consumir dietas onívoras devido à flexibilidade metabólica adquirida ao longo da evolução (VERBRUGGHE & HESTA, 2017).

Eles possuem a capacidade de metabolizar carboidratos, os quais podem exercer efeito poupador de proteína, assim, na presença de carboidratos na dieta, a necessidade de utilizar proteínas como substrato para a gliconeogênese é reduzida. No entanto, essa flexibilidade metabólica não elimina a exigência de suprir as necessidades mínimas de proteína alimentar (LAFLAMME *et al.*, 2022).

Enzimas do ciclo da ureia, como *carbamoil-fosfato sintetase I* e *argininosuccinato sintetase*, mantêm alta atividade nos gatos, promovendo a eliminação constante de nitrogênio, independentemente da ingestão proteica. Essa atividade de moderada a alta proporciona proteção essencial contra a toxicidade da amônia, especialmente após uma dieta rica em proteínas, garantindo a segurança metabólica dos gatos (GREEN *et al.*, 2008).

Outra peculiaridade no metabolismo proteico dos felinos é que apresentam alto nível basal de oxidação proteica, o que significa que a degradação de aminoácidos ocorre continuamente, sem depender da quantidade de proteína da dieta. Esse processo alimenta a gliconeogênese, essencial para suprir a demanda de glicose de tecidos dependentes, como o cérebro e músculos (EISERT, 2010).

A deficiência de aminoácidos em gatos pode resultar em série de complicações a saúde, incluindo perda de massa muscular, comprometimento imunológico e disfunções metabólicas (HAYES, 1982; STRIEKER *et al.*, 2006).

A deficiência em taurina em gatos pode levar a condições graves e irreversíveis. Entre as consequências mais comuns estão a degeneração retina, que pode resultar em cegueira, e cardiomiopatia dilatada, comprometendo a função cardíaca. Além disso, falhas no funcionamento do sistema nervoso também podem ocorrer pela insuficiência de taurina, evidenciando a importância da taurina em dietas adequadas para a saúde dos felinos (HAYES, 1982; SCHULLER-LEVIS *et al.*, 1990).

Devido aos possíveis problemas que a ausência de aminoácidos pode gerar em gatos, a escolha de fontes proteicas de qualidade é vital na alimentação dos gatos. As proteínas de origem animal destacam-se pela alta digestibilidade e biodisponibilidade, desempenhando papel fundamental na nutrição de cães e gatos (FRANÇA *et al.*, 2013).

No entanto, a composição pode variar dependendo da origem do material, especialmente nos teores de umidade, cinzas e aminoácidos, o que pode influenciar a

digestibilidade do alimento ou ingrediente (ABINPET, 2019).

Por outro lado, as fontes de proteína de origem vegetal são amplamente utilizadas na indústria pet, especialmente em alimentos extrusados, pois apresentam menor variação na composição bromatológica e auxiliam tanto no custo quanto na produção dos alimentos (ABINPET, 2019).

Entretanto, algumas fontes vegetais contêm fatores antinutricionais (inibidores de enzimas, lectinas, taninos e fitatos) que podem reduzir a disponibilidade de nutrientes. Para mitigar esses efeitos, são necessários processos como o tratamento térmico, que, apesar de reduzir a concentração de antinutrientes, também pode diminuir a disponibilidade de nutrientes essenciais, como a taurina, metionina e vitaminas, tornando necessária a suplementação (ZORAN, 2002; FRANÇA *et al.*, 2013).

O interesse por fontes alternativas e sustentáveis de proteína tem crescido significativamente na última década. Nesse contexto, as proteínas unicelulares ou microbianas surgem como solução inovadora, capaz de atender às demandas nutricionais ao mesmo tempo que reduzem o impacto ambiental (RITALA *et al.*, 2017).

1.2. Agricultura Celular

Embora a produção global de alimentos tenha se mantido próxima ao crescimento da população, devido ao desenvolvimento acelerado e o aumento nos padrões de vida em países desenvolvidos as projeções futuras indicam que a demanda alimentar global, em específico proteica, deverá aumentar em 60% até 2050 (ALEXANDRATOS & BRUINSMA, 2012).

Paralelamente a esse crescimento, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a população mundial deverá atingir 9,7 bilhões de pessoas, o que intensificará ainda mais a pressão sobre os sistemas alimentares convencionais (BAJIC' *et al.*, 2022).

A produção pecuária desempenha papel primordial em suprir as necessidades nutricionais de alimentação humana e animal. Entretanto, a necessidade de grandes áreas e uso de recursos naturais gera preocupação, pois a disponibilidade de terras para uso agrícola é limitada e vem sendo reduzida com o passar dos anos, tendo apenas 2% de todas as terras agrícolas disponíveis, cobrindo 40% da superfície total (RISCHER *et al.*, 2020).

A proteína animal é importante fonte de nutrientes para o crescimento e desenvolvimento de seres humanos e animais. No entanto, à medida que a demanda

global por carne aumenta, a produção tradicional enfrenta desafios para atender a essa procura de maneira sustentável. A pecuária convencional apresenta taxa de conversão de proteína vegetal em proteína animal estimada em aproximadamente 15% indicando um consumo maior de insumos vegetais em relação à proteína animal produzida (POST, 2014).

Além disso, a produção de carne pode estar associada a diversos impactos ambientais, como a emissão de gases de efeito estufa, a geração de resíduos agrícolas, a erosão do solo, a possível contaminação de recursos hídricos e a eutrofização, entre outros fatores ambientais (MONTGOMERY, 2007; WITHERS *et al.*, 2014).

A produção e o consumo de proteínas vegetais têm sido amplamente estudados como alternativa para diversificar as fontes proteicas e reduzir os impactos ambientais da produção animal. Embora, à primeira vista, as culturas vegetais pareçam menos impactantes, algumas, como a soja, exigem grandes áreas de cultivo e alto consumo de água (RISCHER *et al.*, 2020). Além disso, devido aos altos volumes de produção e às perdas ao longo da cadeia, as culturas para consumo humano representam cerca de um terço do impacto ambiental da agricultura (EIBL *et al.*, 2021)

Diante do desafio de atender à crescente demanda global por proteínas, há crescente interesse na diversificação das fontes proteicas, incluindo alternativas que possam complementar a produção convencional de maneira sustentável e eficiente. Nesse contexto, proteínas alternativas têm ganhado destaque, abrangendo opções como proteínas microbianas, proteínas à base de insetos, carnes cultivadas em laboratório, substitutos vegetais e alternativas promissoras (MATTICK, 2018).

A agricultura celular entra em cenário com uma abordagem inovadora no campo da produção alimentar. Com base na utilização de biotecnologia para o cultivo controlado de células provenientes de plantas, animais ou microrganismos, a produção foi desenvolvida com o intuito de minimizar os impactos ambientais associados aos métodos tradicionais de produção, oferecendo alternativa mais eficiente e sustentável em comparação à agricultura convencional (RISCHER *et al.*, 2020).

O termo “Agricultura Celular” foi utilizado pela primeira vez em 2015 pela pesquisadora Isha Datar, tendo como definição a “produção de bens agrícolas com culturas de células animais ou vegetais ou microrganismos em vez de usar animais ou plantas cultivadas” (NYSSÖLÄ *et al.*, 2022).

Embora o termo seja recente, o estudo e as descobertas sobre a agricultura celular remontam ao início do século XX. A Figura 2 apresenta marcos importantes dessa

trajetória, como a descoberta da totipotência das células vegetais (1902), os primeiros cultivos *in vitro* de células e tecidos animais (1912), a produção de DNA bacteriano recombinante (1973), o lançamento do primeiro produto acelular comercialmente disponível (Quorn®, 1985) e os primeiros projetos de cultivo de tecidos *in vitro* para alimentação nos anos 2000, entre outros (EIBL *et al.*, 2021).

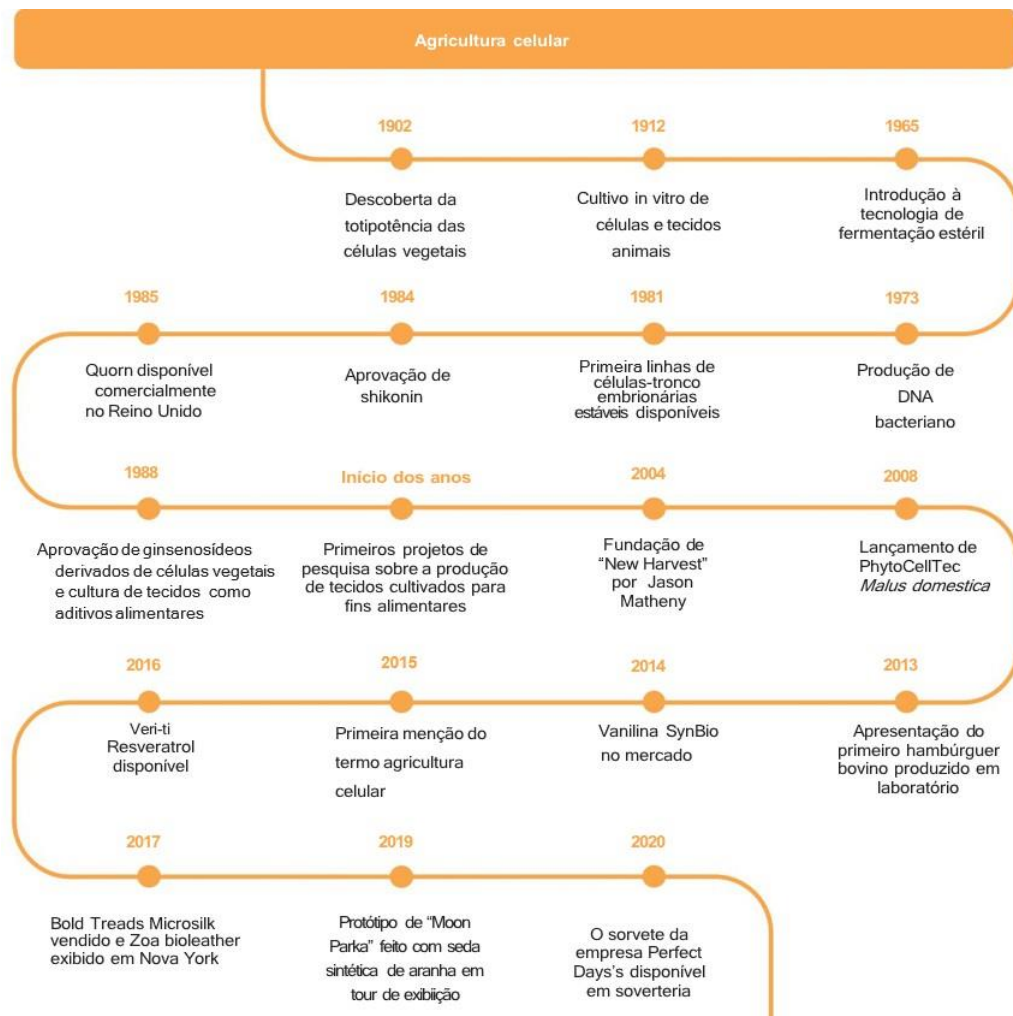


Figura 2. Principais marcos na agricultura celular. Adaptado de Eibl *et al.* (2021).

A agricultura celular utiliza três organismos hospedeiros principais (Figura 3), que são as células animais, plantas e microrganismos para a produção de produtos celulares e acelulares por meio de biotecnologia avançada, como fermentação, cultivo celular e engenharia genética (RICHER *et al.*, 2020). Os produtos celulares são obtidos diretamente das células dos hospedeiros e incluem alimentos, como carne cultivada *in vitro*, que replica as características sensoriais e nutricionais da carne convencional; cosméticos à base de células-tronco vegetais, usados em tratamentos regenerativos; e materiais, como alternativas ao couro.



Figura 3. Representação esquemática da agricultura celular (RISCHER *et al.*, 2020).

Já os produtos acelulares, gerados a partir de substâncias sintetizadas ou secretadas pelos organismos (ovalbumina, vanilina, celulasas, paclitaxel, etc.), combinam propriedades naturais com uma produção mais limpa (ITO & MATSUDOMI, 2005; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2011 MOHAMMADI *et al.*, 2019). Essa abordagem versátil não apenas atende à crescente demanda por sustentabilidade e ética, mas também oferece soluções inovadoras para setores diversos, como alimentação, saúde, moda e cosméticos (RISCHER *et al.*, 2020).

A análise comparativa realizada por Mattick (2018) avaliou os impactos ambientais associados à produção de 1 kg de carne bovina, suína, de frango e carne cultivada nos Estados Unidos, considerando quatro categorias principais: uso do solo, consumo de energia, emissões de gases de efeito estufa e potencial de eutrofização.

Tabela 1. Comparação dos impactos ambientais estimados da produção de 1 quilograma de produtos cárneos nos Estados Unidos.

Categoria de impacto	Carne bovina	Carne suína	Aves	Cultivadas
Uso do solo (m ² /ano)	92–113	15,8–18,3	9,5	5,5 (2–8)
Energia (MJ)	78,6–92,6	16,0–19,6	26,6	106 (50–359)
Emissões de gases com efeito de estufa (kg de carne produzida / CO ₂ -eq)	30,5–33,3	4,1–5,0	2,3	7 (4–25)
Potencial de eutrofização (kg PO ₄ -eq)	214–245	26,2–34,3	6,4	8 (4–14)

Adaptado de Mattick (2018).

Conforme apresentado na Tabela 1, a carne bovina apresentou os maiores valores em uso de solo (92–113 m²/ano), emissões de gases (30,5–33,3 kg de carne

produzida / CO₂-eq) e potencial de eutrofização (214–245 kg PO₄-eq). Por outro lado, as carnes cultivadas apresentaram menor uso de solo (5,5 m²/ano) e potencial de eutrofização (8 kg PO₄-eq), embora exibam um consumo de energia relativamente alto (106 MJ), demonstrando vantagens e desafios distintos em relação as outras formas de produção analisadas.

A agricultura celular apresenta desafios na implementação em grande escala. A escolha entre o tamanho dos biorreatores, modo de processo, consumo de meio de cultura e energia impactam na qualidade e na viabilidade de produção. Além disso, outro desafio apresentado é a dificuldade de reproduzir características sensoriais (sabor, textura e cor) da carne convencional para carne *in vitro*, características importantes para o interesse dos consumidores em novos produtos (EIBL *et al.*, 2021).

Outro ponto a considerar nos produtos desenvolvidos a partir da agricultura celular são os aspectos de segurança e regulatórios para a indústria alimentícia e farmacêutica, principalmente preocupações com a presenças de possíveis toxinas produzidas a partir de biomassas microbianas, como fungos e bactérias (EIBL *et al.*, 2021; NYSSÖLÄ *et al.*, 2022).

1.3. Single Cell Protein - Proteína Microbiana

Boland *et al.* (2013) destacaram que o aumento da demanda por carne e proteínas lácteas exige não apenas melhorias significativas nos sistemas de produção animal, mas também a exploração e aceitação de novas fontes de proteínas, tanto para a alimentação animal quanto para o consumo humano direto, a fim de atender de forma sustentável a essa crescente necessidade global.

Com isso, as proteínas unicelulares (do inglês *Single Cell Proteins* – SCP) tem crescido como um dos principais segmentos da agricultura celular. As SCP referem-se à biomassa de microrganismos ou proteínas extraídas que podem ser utilizadas como fonte nutricional tanto para animais quanto para humanos (LEGER *et al.*, 2021).

Essas alternativas proteicas possuem a capacidade de utilizar substratos ricos ou não convencionas para gerar a biomassa, possuindo um conteúdo que pode variar de 60-82% de proteica (Tabela 2) dependendo do microrganismo utilizado, além de possuir bons níveis de aminoácidos essenciais e outras funcionalidades, além de conter ácidos nucleicos (SHARIF *et al.*, 2020).

Tabela 2. Composição dos principais grupos de microrganismos utilizados como *Single Cell*

Protein (% matéria seca).

Composição (% Matéria Seca)	Fungos	Algas	Leveduras	Bactérias
Proteína	30-35	40-60	45-55	50-65
Gordura	2-8	7-20	2-6	1-3
Cinzas	9-14	8-10	5-10	3-7
Ácidos nucleicos	7-10	3-8	6-12	8-12

Adaptado de Miller & Litsky (1976) / Nasser (2011).

O termo foi introduzido pela primeira vez em 1968 em uma reunião no Instituto de Tecnologia de Massachussetts, Estados Unidos, quando os cientistas estavam em busca de uma terminologia adequada (SAEED *et al.*, 2016). Todavia, as primeiras pesquisas com proteína microbiana tiveram destaque inicial no final do século 19 pelo pesquisador Max Delbrück, que estudaram o potencial uso do levedo de cervejaria como um suplemento alimentar na produção animal (SUMAN *et al.*, 2015).

A pesquisa de Delbrück teve grande impacto durante a primeira guerra mundial (1914-1918). Com a escassez de alimentos criada pelo conflito global, os pesquisadores alemães utilizaram cepas de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em melaço como suplemento proteico, conseguindo cortar metade dos custos com importação de proteína durante o conflito (ULGADE & CASTRILLO, 2002).

O interesse no uso de leveduras como fonte de proteína foi mantido durante a segunda guerra mundial (1939-1945), tendo como principais espécies utilizadas *Candida auris* (anteriormente *Candida arborea*) e *Candida utilis*, sendo incorporada inicialmente na alimentação dos exércitos, e posteriormente a população (ULGADE & CASTRILLO, 2002).

Como é possível observar na Imagem 4, a produção de biomassa proteica é formada a partir de um processo de fermentação. O processo pode ser conduzido de duas formas principais: fermentação submersa e fermentação em estado semissólido (NASSERI *et al.*, 2011). Na fermentação submersa o substrato é mantido em estado líquido, contendo os nutrientes essenciais para o crescimento dos microrganismos. Este tipo de fermentação é um processo contínuo, em que ocorre a coleta da biomassa, centrifugação e posteriormente secagem, tendo como vantagem a facilidade de purificação do produto (BAJIC' *et al.*, 2022).

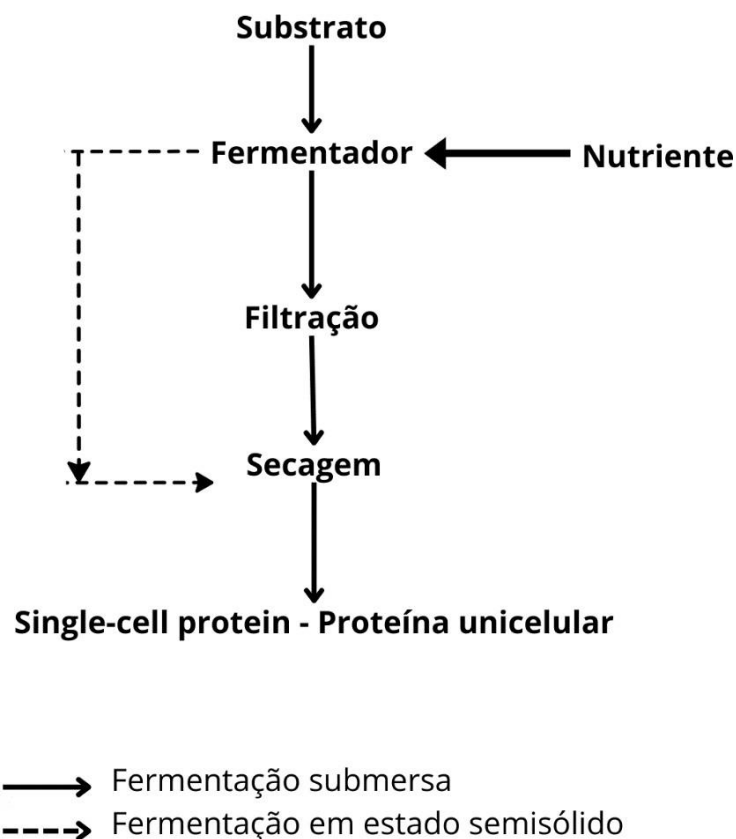


Figura 4. Fluxograma para produção de proteínas microbianas – Adaptado de Adedayo *et al.* (2011).

Já para a fermentação em estado semissólido o meio fornece nutrientes para os microrganismos e atua como âncora celular, sendo considerada econômica pois requer menos recursos e mais adequada para substratos sólidos, como resíduos agroindustriais. No entanto, alguns nutrientes podem não estar presentes nos substratos ou estar presentes em quantidades abaixo da média (BAJIC *et al.*, 2022).

Após o cultivo a biomassa é separada de acordo com o microrganismo utilizado sendo as leveduras e bactérias geralmente recuperadas por centrifugação, enquanto os fungos filamentosos por filtração e depois secadas (SHARIF *et al.*, 2020).

Entre as principais fontes utilizadas para a produção de proteínas microbianas destacam-se as bactérias, algas, cianobactérias, leveduras e fungos, cada uma com características específicas que as tornam adequadas para diferentes aplicações.

As proteínas derivadas de bactérias possuem características interessantes para a produção industrial, possuindo tempos de geração extremamente curtos, com a duplicação da massa celular ocorrendo entre 20 minutos e 2 horas, dependendo da espécie (SAEED *et al.*, 2016). Esses microrganismos são capazes de crescer em variedade de matérias-primas, desde carboidratos simples, como açúcares e amidos, até

hidrocarbonetos líquidos e gasosos, como metanol, etanol e metano (SUMAN *et al.*, 2015).

O SCP bacteriano varia de 50-80% de proteína na matéria seca e com um bom teor de aminoácidos essenciais compatível ou maior do que preconizado pela FAO (do inglês - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000). Entretanto, assim como os fungos, o conteúdo da biomassa bacteriana é alto em ácidos nucleicos (8-12%), sendo necessário processamento adicional para retirada (NASSERI *et al.*, 2011).

Durante a década de 1970, o grupo *Imperial Chemical Industries* desenvolveu uma das primeiras SCP's para consumo animal, denominada *Pruteen*. A bactéria *Methylophilus methylotrophus* utiliza como substrato metanol, entretanto, a nova proteína não pode competir com os preços de outras fontes do mercado e a produção foi descontinuada anos depois (RITALA *et al.*, 2017).

As algas e cianobactérias utilizam energia da luz solar para converter dióxido de carbono e água em materiais orgânicos para funções celulares. Tem como principais características um teor proteico alto (60-70%), crescimento rápido, além de fornecer outros nutrientes importantes como ácidos graxos, vitaminas, sais e clorofila, além disso, possui um teor de ácidos nucleicos considerado baixo, perto de 3-8% (NASSERI *et al.*, 2011).

A *Spirulina* (*Arthrospira máximos* e *Arthrospira platensis*), juntamente com *Chlorella*, são os principais produtos utilizados para consumo humano e animal, são amplamente utilizados como suplementos alimentares (SOUSA *et al.*, 2008).

O estudo de Safafar *et al.*, (2016) avaliou o cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella vulgaris* em águas residuais industriais enriquecidas com amônia, visando determinar o impacto do meio de crescimento e da duração do cultivo na composição nutricional da biomassa. *C. pyrenoidosa* apresentou o maior teor de proteínas ($65,2\% \pm 1,30\%$ MS) em 67% de água residual industrial, enquanto *C. vulgaris* acumulou altas concentrações de luteína ($7,14 \pm 0,66$ mg/g MS) em água residual industrial após 16 dias de cultivo, constatando que o uso *Chlorella* em águas residuais é uma estratégia sustentável para biorremediação e produção de biomassa rica em proteínas, carotenoides e aminoácidos, com aplicações potenciais na alimentação aquática.

Contudo, existem algumas limitações para o uso da proteína de algas e cianobactérias. Podendo citar os altos níveis de clorofila e a presença de parede celular, além do risco de contaminação biológica e mineral em cultivos externos. É necessário

que o produto passe por uma etapa de rompimento dessas paredes celulares por métodos químicos (solventes orgânicos ou ácidos), enzimáticos (celulases), físicos e mecânicos como mobilidade de esferas e homogeneização de alta pressão (BAJIC' *et al.* 2022).

As proteínas celulares derivadas de leveduras apresentam diversas vantagens que as tornam promissoras para aplicações biotecnológicas e nutricionais. As principais espécies de destaque são *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Pichia pastoris* e *Yarrowia lipolytica* possuem alto teor proteico, variando entre 45% e 55%, tempo de multiplicação rápido (40 minutos a 3 horas), além de serem ricas em vitaminas do complexo B (SUMAN *et al.*, 2015).

As leveduras destacam-se pela capacidade de crescer em substratos variados, incluindo resíduos agroindustriais, como cascas de laranja e bagaço de cana, e o cultivo em pH ácido facilita a colheita. Adicionalmente, elas têm maior teor de lisina em comparação com as bactérias, embora apresentem menor concentração de metionina (BAJIC' *et al.* 2022).

Tropea *et al.* (2022) avaliaram a utilização de múltiplos resíduos alimentares como peixes, cascas de abacaxi, banana, maçã e cítricos, como substrato complexo para a produção de SCP com *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados obtidos para proteína foram de 40,19%, adequado para uso em rações animais, 14,46% de gordura, 1,08% de cinzas e 6,29% de lignina, enquanto os açúcares solúveis e insolúveis reduziram-se de 20,5% para 6,10% e de 19,15% para 2,14%, respectivamente. Destacando o potencial do uso simultâneo de múltiplos resíduos na produção sustentável de proteínas de levedura.

Em um estudo feito por Carranza-Méndez *et al.* (2022), que avaliou o uso de cascas de laranja como fonte de carbono para a produção de *Candida utilis* por fermentação submersa alcançando 13,42 g/L de biomassa e consumo de 81% de açúcares totais e 89% de açúcares redutores. Após otimização das condições de fermentação, obteve-se 15,71 g/L de biomassa e 6,22% de proteína total, reforçando o potencial das leveduras com o aproveitamento de resíduos agroindustriais.

Por último, as proteínas provenientes da biomassa fúngica, em principal os fungos *Fusarium venenatum*, *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus niger*, possuem características interessantes para produção e consumo humano e animal. Dentre elas é possível citar a capacidade de converter uma gama de compostos orgânicos complexos em biomassa rica em proteína, com um teor que varia entre 30% e 50% na matéria seca (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000). Além disso, oferecem vitaminas do complexo B, fibras ricas em glucanos e contribuem para melhorar características funcionais dos

alimentos, como textura e capacidade de emulsificação (RITALA *et al.*, 2017).

Por um outro lado, os fungos possuem alto teor de ácidos nucleicos (7-10%) na biomassa, além de serem relativamente pobres em metionina e cisteína (NASSERI *et al.*, 2011). Outro fator importante é a possível produção de micotoxinas e possíveis reações alérgicas ao consumo de micoproteínas (BAJIC' *et al.*, 2022).

Na União Europeia, três cepas fúngicas/leveduras são aceitas para uso alimentar. A primeira é *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente consumida antes de 1997 e conhecida como levedura de cerveja ou de fermentação. A segunda é a micoproteína derivada de *Fusarium venenatum*, comercializada sob a marca Quorn®. A terceira é *Yarrowia lipolytica*, aprovada pelo Regulamento de Novos Alimentos (UE 2017/2470) para uso restrito em suplementos alimentares (AMARA & EL-BAKY, 2022).

Em 1985, a empresa *Marlow Foods* utilizou a micoproteína do fungo filamentoso *Fusarium venenatum* para desenvolver o produto denominado Quorn® como alternativa a proteína produzida de modo convencional. Amplamente aceito no mercado europeu, tornou-se uma das principais marcas de substitutos de carne no mundo, atendendo tanto a consumidores vegetarianos quanto àqueles que buscam opções alimentares mais sustentáveis e saudáveis (RITALA *et al.*, 2017).

Na Finlândia, entre as décadas de 1970 e 1980, foi desenvolvido um processo inovador chamado “pekilo process” que utilizava açúcares presentes no licor de sulfito proveniente de efluentes de fábricas de papel para produzir proteína de célula única (SCP), destinada principalmente à ração animal. Entretanto, com o fechamento das fábricas de celulose, sem os substratos disponíveis, a produção foi encerrada (ULGADE & CASTRILLO, 2002).

Em 2014, Liu *et al.* (2014) desenvolveram um processo de fermentação em duas etapas para converter resíduos de processamento de amido de batata em proteína unicelular como alimento para animais. Na primeira etapa, usaram uma cepa mutante de *Aspergillus niger* (*Aspergillus niger* H3) com maior produtividade de celulase e após o tratamento a taxa de degradação da celulose do resíduo de batata atingiu 80,5%, resultando em 11,87% para 2,19% de celulose na biomassa. O teor de proteína foi de 6,24% para 38,21%, assim como a proteína verdadeira indo de 2,83% para 24,86%. Demonstrando que o uso de *A. niger* com *Bacillus licheniformis* solucionou o problema do resíduo e resultou em uma proteína de alta qualidade.

Em 2017, AboSiada *et al.* (2017) investigaram o enriquecimento proteico de alguns resíduos agroindustriais, utilizando fermentação em estado sólido com

Trichoderma reesei. Foram testados cinco resíduos (cascas de tomate, manga, laranja, maçã e banana) em pH 5. Após a fermentação, os teores de proteína bruta aumentaram de 23,35% para 78,17% em cascas de tomate, de 21,88% para 30,05% em manga, de 24,13% para 28,84% em laranja, de 16,19% para 19,82% em maçã e de 9,5% para 14,06% em banana, destacando o potencial uso do fungo *T. reesei* no desenvolvimento fontes proteicas sustentáveis a partir de resíduos industriais.

Para Bajic' *et al.* (2022) a produção de proteínas microbianas oferece múltiplas vantagens que a torna uma alternativa promissora à proteína convencional. Dentre os benefícios é possível citar o uso de resíduos agroindustriais, como melaço e licor de sulfito, a redução de custos de produção e promove de subprodutos de baixo valor, além de contribuir para a mitigação da poluição ambiental (NASSERI *et al.*, 2011; BAJIC' *et al.*, 2022).

A eficiência na produção é outro destaque, uma vez que os microrganismos utilizados possuem ciclos curtos de duplicação e um alto teor de proteína em base seca (30%-80%), dependendo do organismo e do substrato utilizado (SUMAN *et al.*, 2015; BAJIC' *et al.*, 2022).

Além disso, o cultivo de biomassa requer espaço reduzido e consumo de água consideravelmente menor em comparação com a agricultura convencional. O uso de biorreatores favorece o controle do processo de produção, levando a maior quantidade de biomassa/proteína para consumo humano e animal (SAEED *et al.*, 2016; BAJIC' *et al.*, 2022).

Apesar dos benefícios supracitados, a produção de SCP possui limitações e desafios. O elevado custo de substratos e energia eleva o custo de produção, além da necessidade de pré-tratamento e processos adicionais, como a redução de ácidos nucleicos, impactam a viabilidade econômica (NASSERI *et al.*, 2011; ADEDAYO *et al.*, 2011). A presença de ácidos nucleicos é comum na biomassa das SCP's e o consumo pode aumentar o ácido úrico no organismo, levando à formação de cálculos renais (ADEDAYO *et al.*, 2011).

A parede celular na biomassa de certas espécies de microrganismos é indigestível para os animais monogástricos, sendo necessários tratamentos adicionais para remoção ou inativação (SHARIF *et al.*, 2020). Além disso, existem riscos associados com a contaminação de micotoxinas e endotoxinas por fungos e bactérias, (SAEED *et al.*, 2016). Por fim a aceitação pública, por causa de preconceitos em relação ao uso de microrganismos como alimento e a possíveis problemas de sabor e digestibilidade, que

limitam a adoção global (SUMAN *et al.*, 2015).

1.4. *Paecilomyces variotii*

Os fungos filamentosos desempenham importante papel como fonte proteica microbiana devido à capacidade de produzir biomassa proteica de boa qualidade (30-50% proteína) em ampla escala através da transformação de substratos ricos e da indústria e pecuária em biomassa (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000).

Além disso, estudos recentes voltados à biotecnologia demonstram a capacidade desses fungos produzirem ampla gama de metabólitos secundários, como enzimas, vitaminas, promotores de crescimento (HERRERA BRAVO DE LAGUNA *et al.*, 2015).

Neste cenário, espécies do gênero *Paecilomyces* destacam-se, pela versatilidade e potencial de aplicação em setores como agricultura, medicina e indústria alimentícia (MORENO-GAVÍRA *et al.*, 2021). Particularmente, *Paecilomyces variotii* é um fungo frequentemente encontrado no ar e no solo em áreas tropicais, é conhecido pela capacidade de produção de enzimas extracelulares, resistir a temperaturas adversas (termotolerante), capacidade de crescer em condições de baixo oxigênio e variedade de efluentes industriais altamente poluentes, como melaço, hidrolisados de madeira, licor de sulfito usado e vinhaça. (BAJPAI, 2017; URQUHART *et al.*, 2018).

O gênero *Paecilomyces* foi descrito em 1907 por Bainier, sendo inicialmente reconhecido pela semelhança com *Penicillium*, mas com características morfológicas distintas, como conidióforos verticilados e fialídeos alongados (LI *et al.*, 2020). Estudos subsequentes ampliaram o entendimento da filogenia deste grupo, revelando a natureza polifilética que conecta espécies de *Paecilomyces* a gêneros como *Cordyceps* e *Torrubiella* (MORENO-GAVÍRA *et al.*, 2020b).

De acordo com Herrera Bravo de Laguna *et al.* (2015), o *Paecilomyces variotii* destaca-se pela capacidade de crescer rapidamente em ampla gama de substratos e pela produção de enzimas termoestáveis como tanases, fitases, celulasas, xilanases, quitinases, amilases e pectinases. Essas enzimas apresentam propriedades físico-químicas promissoras, como estabilidade em amplas faixas de temperatura e pH que as tornam interessantes para diversas aplicações industriais.

Em um estudo realizado por Giannoutsou *et al.* (2012) foi utilizado resíduo de moinho de azeite em duas fases (*Two-Phase Olive Mill Waste, TPOMW*) como substrato em fermentação em estado sólido com *Paecilomyces variotii*. Após a adição de melaço ao substrato resultou em aumento de 46% no conteúdo proteico do produto fermentado

após 10 dias, passando de 14,75% para 21,65%. Além disso, a fermentação produziu um perfil de aminoácidos significativamente melhorado, incluindo a síntese de lisina (2,7 mg/g MS), destacando que a fermentação do resíduo de moinho de azeite (TPOMW) associado com *P.variotii* gera melhoras as características do resíduo, abrindo margem para a utilização na alimentação animal.

Em um estudo focado na produção de enzimas, Madeira *et al.* (2012) utilizaram *Paecilomyces variotii* para produção simultânea de tanase e fitase por fermentação em estado sólido, utilizando bagaço de laranja como substrato. Como resultados, a atividade máxima de tanase ocorreu após 96 horas de fermentação, com 59% de umidade e 3% de ácido tânico, enquanto a atividade de fitase atingiu 350 U/gds após 72 horas, sob 66% de umidade e 5,8% de ácido tânico. O processo reduziu em 7% a necessidade de ácido tânico suplementar e aumentou em dez vezes a capacidade antioxidante do bagaço de laranja.

Além do uso das enzimas, a aplicação do *Paecilomyces variotii* em forma de extrato, também conhecido como ZNC (ZhiNengCong) vem sendo amplamente utilizado como promotor de crescimento e proteção de plantas.

Como exemplo, o estudo feito por Moreno-Gavira *et al.* (2020a) avaliou o uso do ZNC como promotor de crescimento em tomates e pimentões em que demonstrou alta capacidade de produção de sideróforos e ácido indol acético, mas baixa habilidade de solubilizar fósforo. Em testes laboratoriais com sementes de tomate tratadas com *P. variotii* apresentaram aumento significativo na taxa de germinação (89% vs. 75% do controle), comprimento de raiz (4,41 cm vs. 3,73 cm) e índice de vigor das sementes (686,7 vs. 498,7).

Em outro estudo de ZHANG *et al.* (2024) focado na avaliação da função bioestimulante da ZNC em mudas de maçã (*Malus hupehensis* e *Malus domestica* 'Royal Gala'), a aplicação de ZNC na concentração de 20 ng/mL, aumentou o peso fresco e seco das plantas, o comprimento das raízes (22,9%) e a área de absorção radicular (21,9%), além de melhorar a fotossíntese, com elevação de 29,4% no teor de clorofila total. Além disso, em condições de deficiência nutricional, ZNC reduziu os níveis de osmoprotetores (prolina -22,17%, proteínas solúveis -9,23%) e espécies reativas de oxigênio (ROS) em até 44%, demonstrando que o uso do extrato é uma alternativa sustentável para reduzir o uso de fertilizantes químicos e pesticidas.

Os β -glucanos são componentes bioativos com propriedades imunomoduladoras e grande potencial para aplicações em alimentos funcionais e rações (HOOFT *et al.*, 2024). O gênero *Paecilomyces* apresenta alto teor de β -glucanos, variando entre 10-24%

da matéria seca, valores superiores aos encontrados em *Basidiomycetes* e leveduras (KYANKO *et al.*, 2012).

Além disso, esses β -glucanos, que compõem cerca de 46% da fibra alimentar total da espécie, exibem propriedades imunológicas que os tornam valiosos como modificadores de resposta biológica, contribuindo para a saúde animal e humana (KYANKO *et al.*, 2012; BAJPAI, 2017).

Em um estudo feito por Kyanko *et al.* (2012) investigou o conteúdo de fibra alimentar e β -glucanos, capacidade de absorção e retenção de água em fungos filamentosos. O gênero *Paecilomyces* apresentou elevado conteúdo de fibra alimentar total (51,7%) e β -glucanos (23,8%). *P. variotii* obteve resultados para capacidade de absorção e de retenção de água (em micélios úmidos) de 6 g de água/g MS e 43,2 g de água/g MS respectivamente. Esses resultados indicam que a biomassa de *P. variotii* possui resultados promissores, sendo um ingrediente rico em proteínas e β -glucanos, além de características possíveis de melhorar propriedades de hidratação em sistemas alimentícios para uso humano e animal

1.5. *Pekilo Process*

O *Paecilomyces variotii* é um fungo filamentoso amplamente reconhecido pelas características versáteis e aplicáveis na biotecnologia. Entre as principais utilidades estão a produção de enzimas extracelulares, o estímulo ao crescimento de plantas e o uso como fungicida (HASSAN *et al.*, 2023).

Além disso, destaca-se pela capacidade de transformar resíduos industriais em biomassa fúngica de alto valor nutricional, reduzindo significativamente o impacto ambiental, representando não apenas um avanço no âmbito tecnológico, mas também na promoção da sustentabilidade (TOLEDO MERANTE *et al.*, 2012).

O processo de Pekilo (do inglês *Pekilo process*) é um processo de fermentação aeróbia contínua no qual o *P. variotii* é cultivado em substrato gerando uma biomassa contendo a cerca de 55-60% de proteína, uma composição de aminoácidos considerada adequada quando comparada com outras fontes como farinha de peixes e farelo de soja (Tabela 3), além de ser uma fonte de vitaminas do complexo B, dentre outras (HOOFT *et al.*, 2025).

Tabela 3. Composição nutricional dos ingredientes incluindo *P. variotii*, farinha de peixe, concentrado de proteína de soja (CPS) e farelo de glúten de trigo (FGT).

Nutrientes (% MS)	<i>P. variotii</i> Pekilo®	Farinha Peixe ^a	CPS ^b	FGT ^c
Matéria seca	92,52	91,97	92,03	91,77
Proteína bruta	62,51	75,18	61,0	82,78
Gordura	0,75	7,7	1,51	0,58
Cinzas	9,23	17,88	7,37	0,58
Energia bruta (MJ/kg MS)	21,0	20,5	20,3	23,5
ENN + Fibra Bruta ^d	27,51	0,0	30,11	16,07
Minerais (g/kg MS)				
Enxofre	6,4	8,5	4,2	6,6
Fósforo	20,9	24,5	8,4	1,9
Cálcio	12,5	46,2	4,1	0,4
Magnésio	0,9	2,7	4,1	0,2
Potássio	3,4	13,5	23,9	0,8
Sódio	0,1	14,4	0,1	0,0
Aminoácidos essenciais (g/kg MS)				
Arginina	26,2	36,0	35,6	20,7
Histidina	13,7	18,3	17,4	19,2
Isoleucina	21,1	26,9	26,6	27,4
Leucina	33,4	46,5	42,6	50,6
Lisina	33,8	54,8	27,4	12,1
Metionina	7,5	14,3	6,1	10,8
Fenilalanina	15,2	19,1	20,2	33,0
Treonina	19,9	25,3	22,0	16,3
Valina	20,6	25,1	21,9	23,6
Triptofano	5,3	5,8	6,5	5,3
Aminoácidos não essenciais (g/kg MS)				
Alanina	23,9	36,5	21,4	17,3
Ácido aspártico	30,7	51,7	50,2	17,3
Glicina	18,2	37,1	19,0	20,4
Ácido glutâmico	51,8	92,4	102,8	290,1
Cisteína	3,3	5,1	7,2	13,2
Tirosina	17,5	13,8	14,4	18,4
Prolina	19,2	25,8	26,2	87,3
Serina	16,9	20,3	23,6	29,2
Soma dos aminoácidos	372,8	549,0	484,6	706,8

Fonte: Adaptado de Hooft *et al.*, 2024.

^a LT-farinha de peixe, Norsildmel AS, Bergen, Noruega.

^b Concentrado de Proteína de Soja, Hamlet Protein A/S, Horsens, Dinamarca.

^c Farelo de glúten de Trigo, Lantmannen Reppe AB, Lidköping, Suécia.

^d ENN (extrato não nitrogenado) + fibra bruta = 1000 – (proteína bruta + bruto lipídio + cinza bruta).

O desenvolvimento do processo de produção desta SCP teve início em 1963, na

Finlândia, em resposta à crise global de proteína prevista para as décadas de 1960 e 1970. O pesquisador Otto Gadd observou que fungos como o *Aspergillus niger* conseguiam crescer no licor de sulfito residual da indústria de papel. No entanto, essa espécie foi posteriormente descartada em favor do *Paecilomyces variotii*, por causa da alta eficiência de crescimento, facilidade de separação do licor e ausência de toxicidade (BAJPAI, 2017; ENIFER, 2023). O nome "Pekilo®" foi então atribuído ao produto, e o processo foi patenteado em 1970 (ENIFER, 2023).

A primeira planta comercial entrou em operação na fábrica de celulose da *United Paper Mills* em Jämsänkoski no início dos anos 1970, utilizando os resíduos da indústria de papel (licor sulfito) para a produção da proteína microbiana, sendo considerado um marco para a produção das SCP's no mundo (AMARA & EL-BAKY, 2023). Entretanto, em 1980, com as mudanças no processo industrial nas fábricas de produtos de papel, substituiu o uso do sulfito pelo sulfato, tornaram o licor de sulfito um resíduo obsoleto na produção do Pekilo® levando à descontinuidade e fechamento da fábrica (HALME & TIUSSA, 1983).

Em 1982, em Mänttä na Finlândia, uma segunda fábrica foi construída adaptando o processo utilizando resíduo de etanol como substrato principal, mas a descontinuidade das fábricas de celulose somada as reduções na demanda global por fontes alternativas de proteína levaram ao declínio na produção de proteína em 1990 (ENIFER, 2023).

Entre 1970 e 1985, estudos investigaram o uso da proteína de *Paecilomyces variotii* para alimentação humana e animal. Laksessvela e Slagsvold (1974) analisaram seu uso em dietas para pintinhos, avaliando a suplementação com metionina e sulfatos. Pintinhos alimentados com dieta exclusivamente vegetal apresentaram crescimento inferior ($p < 0,01$) em comparação com aqueles que consumiram dieta contendo farinha de peixe. A adição de metionina ou seu análogo hidroxilado melhorou significativamente o ganho de peso ($p = 0,01 - 0,05$) e a eficiência alimentar ($p = 0,01-0,02$) nas dietas contendo a SCP. Apesar do baixo teor de aminoácidos sulfurados, como metionina e cistina, a proteína microbiana demonstrou potencial como fonte proteica, especialmente com suplementação adequada.

Em um estudo proposto por Näsi (1982) comparou o valor nutritivo da proteína de Pekilo® com a biomassa da bactéria *Eurolysine* e o farelo de soja em dietas para suínos em crescimento. A proteína de Pekilo® obteve 49,5% de proteína bruta na matéria seca, com digestibilidade de 74,2% de PB e 81,5% da MO, resultados próximos a dieta controle

(farelo de soja) e a dieta contendo a proteína *Eurolysine*.

Em um estudo comparando duas SCP's avaliou o valor nutritivo de *Paecilomyces variotii* (Pekilo®) e levedura *Candida utilis* (Torula) como fonte proteica em dietas para suínos em crescimento. O Pekilo®, usado em 30% das dietas, apresentou digestibilidade de 77,1% e 87,7% para matéria orgânica e proteína bruta, respectivamente, e valor energético de 2995,13 kcal EM/kg MS, superando a Torula (2842,27 kcal EM/kg MS) destacando o potencial do ingrediente como suplemento proteico (SALO & PEKKARINEN, 1981).

Alguns estudos utilizando a fonte proteica foram conduzidos com alimentos para uso humano: o estudo de Koivurinta *et al.* (1980) avaliou as propriedades de panificação da biomassa fúngica *Paecilomyces variotii* como ingrediente em pães. Foi observado que a inclusão de SCP em até 5% mantiveram as características estruturais (formato) e textura dos pães, além de melhorar a ligação da massa com água. Entretanto ocorreu efeito negativo na estabilidade, propriedades extensográficas e dureza da massa com o aumento na substituição farinha pela proteína microbiana, além disso, seu sabor foi detectado já nos níveis mais baixos de substituição.

Em outro estudo feito por Koivurinta *et al.* (1979), os autores avaliaram o uso da proteína microbiana como ingrediente em salsichas e almôndegas. Em salsichas o ingrediente apresentou dureza acima do alimento controle até 25% de inclusão da farinha, enquanto para as almôndegas obteve-se resultados menores em relação a todos os parâmetros organolépticos com exceção de suculência. Ambos os alimentos apresentaram o sabor residual, sendo percebido em níveis de substituição a partir de 2%, impactando na aceitabilidade sensorial. Além disso, produtos contendo 10-15% da proteína apresentaram cor mais escura e textura mais densa em comparação às amostras do tratamento controle.

Nos últimos anos, com a busca por alternativas às fontes proteicas convencionais, alguns estudos foram desenvolvidos utilizando esta proteína como possível fonte na alimentação animal. O estudo de Hooft *et al.* (2024) avaliou os efeitos da inclusão da biomassa de *Paecilomyces variotii* (PEKILO®) em dietas para juvenis de salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) contendo 0, 5, 10 e 20% de inclusão. Foi constatado redução linear no coeficiente de digestibilidade da proteína bruta e energia ($p < 0,01$) com o aumento da inclusão, entretanto, as dietas com inclusão da biomassa de *P. variotii* não afetaram significativamente o ganho de peso, a taxa de crescimento específica, consumo alimentar, sendo observado inclusive, melhora linear significativa na conversão

alimentar. Adicionalmente, a digestibilidade de proteínas e lipídios foi de 87% e 88%, respectivamente.

Em outro estudo Hooft *et al.* (2025) investigaram os impactos ambientais do uso da biomassa de *Paecilomyces variotii* (PEKILO®) em dietas para salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) com 0, 5, 10 e 20% de inclusão. As dietas contendo a proteína microbiana reduziram significativamente as emissões de gases de efeito estufa, com diminuição de 1,46 kg CO₂-eq no controle para 1,30 kg CO₂-eq em dietas com 20% de inclusão. Além disso, o índice econômico "*Fish-in-Fish-out*" (eFIFO) foi reduzido de 1,02 no controle para 0,93 e a competição por recursos alimentares e reduziu os resíduos de fósforo, magnésio e potássio. Esses resultados indicam que o Pekilo® pode ser alternativa promissora e sustentável como ingrediente proteico para a produção de salmão juvenis, tendo margem para teste em outros animais e alimentação humana.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABINPET. **Manual Pet Food Brasil**. 10 ed. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação, 2019.

ABINPET. **Mercado Pet Brasil 2023**. 2024. Disponível em: <https://abinpet.org.br/dados-de-mercado/>. Acesso em: 22/08/2022.

ABOSIADA, O.; NEGM, M.; BASIOUNY, M.; FOUAD, M. *et al.* Nutrient enrichment of agro-industrial waste using solid state fermentation. **Microbiology Research Journal International**, 22, n. 1, p. 1-11, 2017.

ADEDAYO, M. R.; AJIBOYE, E. A.; AKINTUNDE, J. K.; ODAIBO, A. Single cell proteins: as nutritional enhancer. **Advances in Applied Science Research**, 2, n. 5, p. 396-409, 2011.

ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. **World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision**. 2012. p. 1-147. 2012. (2521-1838).

AMARA, A. A.; EL-BAKY, N. A. Fungi as a source of edible proteins and animal feed. **Journal of Fungi**, 73, 9, n. 1, 2023.

ANUPUMA; RAVINDRA, P. Value-added food:: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, 18, n. 6, p. 459-479, 2000.

BAJIĆ, B.; VUČUROVIĆ, D.; VASIĆ; JEVTIĆ-MUČIBABIĆ, R. *et al.* Biotechnological production of sustainable microbial proteins from agro-industrial residues and by-products. **Foods**, 107, 12, n. 1, 2022.

BAJPAI, P. Single-cell protein from lignocellulosic wastes. *In: Single Cell Protein Production from Lignocellulosic Biomass*: Springer, 2017. cap. 7, p. 41-58.

BOLAND, M. J.; RAE, A. N.; VEREIJKEN, J. M.; MEUWISSEN, M. P. *et al.* The future supply of animal-derived protein for human consumption. **Trends in Food Science & Technology**, 29, n. 1, p. 62-73, 2013.

CARRANZA-MÉNDEZ, R. C.; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L.; SEPÚLVEDA-TORRE, L.; AGUILAR, C. N. *et al.* Production of single cell protein from orange peel residues by *Candida utilis* **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 102298, 40, 2022.

EIBL, R.; SENN, Y.; GUBSER, G.; JOSSEN, V. *et al.* Cellular agriculture: opportunities and challenges. **Annual Review of Food Science and Technology**, 1, n. 12, p. 51-73, 2021.

EISERT, R. Hypercarnivory and the brain: protein requirements of cats reconsidered. **Journal of Comparative Physiology B**, n. 181, p. 1-17, 2011.

ENIFER. **Pekilo history**. Enifer Website, 2023. Disponível em: <https://enifer.com/wp-content/uploads/2023/12/Pekilo-history.pdf>. Acesso em: 04/01.

FRANÇA, J.; SAAD, F. M. O. B. S.; SAAD, C. E. P.; SILVA, R. C. *et al.* Avaliação de ingredientes convencionais e alternativos em rações de cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40, n. 1, p. 222-231, 2011.

GIANNOUTSOU, E. P.; KATSIFAS, E. A.; GELI, A.; KARAGOUNI, A. D. Protein increase and lysine production by a *Paecilomyces variotii* strain grown on two-phase olive mill waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28, 2012.

GREEN, A. S.; RAMSEY, J. J.; VILLAYERDE, C.; ASAMI, D. K. *et al.* Cats are able to adapt protein oxidation to protein intake provided their requirement for dietary protein is met. **The Journal of nutrition**, 138, n. 6, p. 1053-1060, 2008.

HALME, A.; TIUSSA, E. Use of computers in Pekilo-protein production. **Modelling and Control of Biotechnical Processes**, p. 267-272, 1983.

HASSAN, S.; SYUN-ICHI, U.; SHABEER, S.; WU, C. F. *et al.* Molecular and biological characterization of a partitivirus from *Paecilomyces variotii*. **Journal of General Virology**, 001925, 104, n. 11, 2023.

HAYES, K. C. Nutritional problems in cats: taurine deficiency and vitamin A excess. **The Canadian Veterinary Journal**, 23, n. 1, p. 2-5, 1982.

HERRERA BRAVO DE LAGUNA, I.; TOLEDO MARANTE, F. J.; MIOSO, R. Enzymes and bioproducts produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal of Applied Microbiology**, 199, n. 6, p. 1455-1466, 2015.

HOOFT, J. M.; MONTERO, R.; MORALES-LANGE, B.; BLIHOVDE, V. F. *et al.* *Paecilomyces variotii* (PEKILO®) in novel feeds for Atlantic salmon: Effects on pellet quality, growth performance, gut health, and nutrient digestibility and utilization. **Aquaculture**, 740905, 589, 2024.

HOOFT, J. M.; TRAN, H. Q.; MONTERO, R.; MORALES-LANGE, B. *et al.* Environmental impacts of the filamentous fungi *Paecilomyces variotii* (PEKILO®) as a novel protein source in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, 741779, 596, 2025.

ITO, K.; MATSUDOMI, N. Structural characteristics of hen egg ovalbumin expressed in yeast *Pichia pastoris*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 69, n. 4, p. 755-761, 2005.

KOIVURINTA, J.; KURKELA, R.; KOIBISTOINEN, P. Uses of Pekilo, a microfungus biomass from *Paecilomyces varioti* in sausage and meat balls. **International Journal of Food Science & Technology**, 14, n. 6, p. 561-570, 1979.

KOIVURINTA, J.; KURKELA, R.; KOIVISTOINEN, P.; HOLASOVÁ, M. *et al.* Bread baking properties of Pekilo, a microfungus biomass from *Paecilomyces varioti*. **Food/Nahrung**, 24, n. 7, p. 597-606, 1980.

KYANKO, M. V.; CANEL, R. S.; LUDEMANN, V.; POSE, G. *et al.* β -Glucan content and hydration properties of filamentous fungi. **Applied biochemistry and**

microbiology, 49, p. 41-45, 2013.

LAFLAMME, D. P.; BACKUS, R. C.; FORRESTER, S. D.; HOENIG, M. Evidence does not support the controversy regarding carbohydrates in feline diets. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 260, n. 5, p. 506-513, 2022.

LAKSESVELA, B.; SLAGSVOLD, P. Experiments on Pekilo as a Source of Protein for Young Chicks, with Particular Reference to Effects of Supplementation with Methionine and Sulphates: I. Growth and Efficiency of Feed Conversion. **Acta Agriculturae Scandinavica**, 24, n. 2, p. 169-174, 1974.

LEGER, D.; MATASSA, S.; NOOR, E.; SHEPON, A. *et al.* Photovoltaic-driven microbial protein production can use land and sunlight more efficiently than conventional crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, e2015025118, 118, n. 26, 2021.

LI, X. Q.; XU, K.; LIU, X. M.; ZHANG, P. A systematic review on secondary metabolites of *Paecilomyces* species: chemical diversity and biological activity. **Planta Medica**, 86, n. 12, p. 805-821, 2020.

LIU, B.; LI, Y.; SONG, J.; ZHANG, L. *et al.* Production of single-cell protein with two-step fermentation for treatment of potato starch processing waste. **Cellulose**, 21, p. 3637-3645, 2014.

MADEIRA, J. V.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. A new process for simultaneous production of tannase and phytase by *Paecilomyces variotii* in solid-state fermentation of orange pomace. **Bioprocess and biosystems engineering**, 35, p. 477-482, 2012.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Guanabara Koogan, 2007. 404 p. 8527727730 / 978-8527727730.

MATTICK, C. S. Cellular agriculture: the coming revolution in food production. **Bulletin of the Atomic Scientists**, 74, n. 1, p. 32-35, 2018.

MOHAMMADI, P.; ARANKO, A. S.; LANDOWSKI, C. P.; IKKALA, O. *et al.* Biomimetic composites with enhanced toughening using silk-inspired triblock proteins and aligned nanocellulose reinforcements. **Science advances**, 5, n. 9, 2019.

MONTGOMERY, D. R. Soil erosion and agricultural sustainability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 104, n. 33, p. 13268-13272, 2007.

MORENO-GAVÍRA, A.; DIÁNEZ, F.; SÁNCHEZ-MONTESINOS, B.; SANTOS, M. *Paecilomyces variotii* as a plant-growth promoter in horticulture. **Agronomy**, 597, 10, n. 4, 2020.

MORENO-GAVÍRA, A.; DIÁNEZ, F.; SÁNCHEZ-MONTESINOS, B.; SANTOS, M. Biocontrol effects of *Paecilomyces variotii* against fungal plant diseases. **Journal of Fungi**, 415, 7, n. 6, 2021.

MORENO-GAVÍRA, A.; HUERTAS, V.; DIÁNEZ, F.; SÁNCHEZ-MONTESINOS,

- B. *et al.* Paecilomyces and its importance in the biological control of agricultural pests and diseases. **Plants**, 1746, 9, n. 12, 2020.
- MORRIS, J. G. Idiosyncratic nutrient requirements of cats appear to be diet-induced evolutionary adaptations. **Nutrition Research Reviews**, 15, p. 153-168, 2002.
- NASSERI, A. T.; RASOUL-AMINI, S.; MOROWVAT, M. H.; GHASEMI, Y. Single cell protein: production and process. **American Journal of food technology**, 6, n. 2, p. 103-116, 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger** Artmed, 2018. 1312 p. ISBN-10: 8582715331 ISBN-13 : 978-8582715338.
- NYSSÖLÄ, A.; SUHONEN, A.; RITALA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K. M. The role of single cell protein in cellular agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, 102686, 75, 2022.
- NÄSI, M. Nutritive value of Eurolysine bacterial protein and Pekilo protein for growing pigs. **Agricultural and Food Science**, 54, n. 4, 1982.
- POST, M. J. An alternative animal protein source: cultured beef. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1328, n. 1, 2014.
- RISCHER, H.; SZILVAY, G. R.; OKSMAN-CALDENTY, K. M. Cellular agriculture — industrial biotechnology for food and materials. **Current Opinion in Biotechnology**, 61, p. 128-134, 2020.
- RITALA, A.; HÄKKINEN, S. T.; TOIVARI, M.; WIEBE, M. G. Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. **Frontiers in microbiology**, 8, 2017.
- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. *et al.* Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46, p. 912-919, 2011.
- SAEED, M.; YASMIN, I.; MURTAZA, M. A.; FATIMA, I. *et al.* Single cell proteins a novel value added food product. **Pakistan Journal of Food Sciences**, 26, n. 4, p. 211-217, 2016.
- SAFAFAR, H.; ULDALL NØRREGAARD, P.; LJUBIC, A., MØLLER, P.; LØVSTAD HOLDT, S. *et al.* Enhancement of protein and pigment content in two *Chlorella* species cultivated on industrial process water. **Journal of Marine Science and Engineering**, 84, 4, n. 4, 2016.
- SALO, M. L.; PEKKARINEN, E. Nutritive value for growing pigs of Pekilo protein and torula yeast grown in spent sulphite liquor. **Agricultural and Food Science**, 53, n. 1, p. 52-56, 1981.
- SCHULLER-LEVIS, G.; MEHTA, P. D.; RUDELLI, R.; STURMAN, J. Immunologic consequences of taurine deficiency in cats. **Journal of Leukocyte Biology**, 47, n. 4, p.

321-331, 1990.

SHARIF, M.; ZAFAR, M. H.; AQIB, A. I.; SAEED, M. *et al.* Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition. **Aquaculture**, 735885, 531, 2021.

SOUSA, I.; GOUVEIA, L.; BATISTA, A. P.; RAYMUNDO, A. *et al.* Microalgae in novel food products. **Food chemistry research developments**, p. 75-112, 2008.

STRIEKER, M. J.; WERNER, A.; MORRIS, J. G.; ROGERS, Q. R. Excess dietary cystine intensifies the adverse effect of a methionine deficiency in the cat. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 90, 2006.

SUMAN, G.; NUPUR, M.; ANURADHA, S.; PRADEEP, B. Single cell protein production: a review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 4, n. 9, 2015.

TOLEDO MARANTE, F. J.; MIOSO, R.; BERMEJO BARRERA, J.; GONZÁLEZ GONZÁLEZ, J. E. *et al.* Structural characterization and metabolite profiling of the facultative marine fungus *Paecilomyces variotii* **Annals of microbiology**, 62, p. 1601-1607, 2012.

TROPEA, A.; FERRACANE, A.; ALBERGAMO, A.; POTORTÌ, A. G. *et al.* Single cell protein production through multi food-waste substrate fermentation. **Fermentation**, 91, 8, n. 3, 2022.

UGALDE, U. O.; CASTRILLO, J. I. Single cell proteins from fungi and yeasts. **Applied mycology and biotechnology**, 2, p. 123-149, 2002.

URQUHART, A. S.; MONDO, S. J.; MÄKELÄ, M. R.; HANE, J. K. *et al.* Genomic and genetic insights into a cosmopolitan fungus, *Paecilomyces variotii* (Eurotiales). **Frontiers in microbiology**, 3058, 9, 2018.

VERBRUGGHE, A.; BAKOVIC, M. Peculiarities of one-carbon metabolism in the strict carnivorous cat and the role in feline hepatic lipidosis. **Nutrients**, 5, n. 7, p. 2811-2835, 2013.

VERBRUGGHE, A.; HESTA, M. Cats and carbohydrates: the carnivore fantasy? **Veterinary sciences**, 55, 4, n. 4, 2017.

WITHERS, P. J.; NEAL, C.; JARVIE, H. P.; DOODY, D. G. Agriculture and eutrophication: where do we go from here?. **Sustainability**, 6, n. 9, p. 5853-5875, 2014.

ZHANG, Y.; LV, H.; MAN, Y.; SUN, W. *et al.* *Paecilomyces variotii* extracts promote growth and alleviate nutrient deficiency symptoms in apple. **Horticulture Advances**, 23, 2, n. 1, 2024.

ZORAN, D. L. The carnivore connection to nutrition in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 221, n. 11, p. 1559-1567, 2002.

II – OBJETIVOS

Avaliar a digestibilidade, valor energético e os efeitos da proteína unicelular (*Paecilomyces variotii* KCL-24, Pekilo®) como ingrediente na dieta de gatos. Além disso, objetiva-se avaliar a digestibilidade, palatabilidade, características fecais, produtos de fermentação e microbiota fecal em gatos adultos alimentados com dietas crescentes do ingrediente proteico.

Objetivos Específicos

A dissertação foi dividida em dois experimentos. Os objetivos específicos para cada são apresentados a seguir:

Experimento 1 - Estudo: Digestibilidade e valor energético da SCP (*Paecilomyces variotii* KCL-24, Pekilo®):

- Determinar os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes do ingrediente proteico em teste;
- Estimar o valor energético da SCP.

Experimento 2 - Estudo: Digestibilidade, palatabilidade, características fecais, produtos de fermentação e microbiota fecal em gatos alimentados com SCP (*Paecilomyces variotii* KCL-24, Pekilo®):

- Determinar os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes das dietas contendo a SCP;
- Determinar a palatabilidade da dieta contendo níveis crescentes de SCP em gatos;
- Analisar as características fecais e produtos de fermentação de gatos adultos alimentados com dietas incluindo níveis crescentes da SCP;
- Caracterizar o perfil da microbiota fecal dos gatos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de SCP.

**III – DETERMINAÇÃO DO VALOR NUTRICIONAL,
PROPRIEDADES FERMENTATIVAS E EFEITOS SOBRE A
MICROBIOTA DE UMA FONTE PROTEICA UNICELULAR NA
DIETA DE GATOS**

RESUMO

A nutrição de felinos domésticos exige atenção especial devido às particularidades do metabolismo proteico. Nesse contexto, a busca por novas fontes de proteína tem intensificado, destacando-se as proteínas unicelulares (SCP) pela alta eficiência produtiva e elevado teor proteico. Este estudo teve como objetivo avaliar a utilização da proteína unicelular (*Paecilomyces variotii* – KCL-24) em dietas para gatos, analisando digestibilidade, características fecais, palatabilidade e os efeitos sobre produtos de fermentação e microbiota intestinal. O experimento foi conduzido em duas etapas. A primeira etapa avaliou a digestibilidade do ingrediente pelo método de substituição, utilizando uma dieta controle (0% SCP) e outra contendo SCP, com 12 gatos distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso. A segunda etapa utilizou 4 dietas isonutritivas (0%, 4%, 8% e 16% de SCP), oferecidas a 8 gatos em dois quadrados latinos balanceados (4 tratamentos e 4 períodos de 23 dias). Os dados de digestibilidade, produtos de fermentação e características fecais foram submetidos à ANOVA, testes post-hoc de Tukey. Para alfa-diversidade foi utilizado teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn, enquanto a beta-diversidade foi avaliada por PERMANOVA e análise de coordenadas principais (PCoA), por último a palatabilidade foi utilizado o poder do teste. Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca, proteína bruta, matéria orgânica, extrato etéreo e energia bruta foram de aproximadamente 76%, 76%, 69%, 100% e 65%, respectivamente, com energia metabolizável estimada em 2882,89 kcal/kg. No estudo dose-resposta, a inclusão de até 4% inclusão não alterou a digestibilidade ($p > 0,05$), enquanto os níveis de 8% e 16% reduziram o CDA e aumentaram a produção fecal ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas nos produtos de fermentação, pH ou microbiota fecal, embora a inclusão de 8% tenha aumentado a riqueza na alfa-diversidade. Para palatabilidade, os animais preferiram dietas sem ou com menor inclusão da SCP. Conclui-se que a SCP é uma fonte proteica viável para gatos quando utilizada em níveis moderados, sendo a inclusão dependente da formulação do alimento, custo e aspectos relacionados à sustentabilidade.

Palavras-chave: Digestibilidade; Nutrição; Proteína microbiana.

ABSTRACT

The nutrition of domestic cats requires special attention due to the particularities of protein metabolism. In this context, the search for new protein sources has intensified, with single-cell proteins (SCPs) standing out for their high production efficiency and elevated protein content. This study aimed to evaluate the use of the single-cell protein (*Paecilomyces variotii* – KCL-24) in cat diets by analyzing digestibility, fecal characteristics, palatability, and its effects on fermentation products and intestinal microbiota. The experiment was carried out in two phases. The first evaluated the ingredient's digestibility using the substitution method, with a control diet (0% SCP) and another containing SCP, using 12 cats in a completely randomized design. The second phase used four isonutritive diets (0%, 4%, 8%, and 16% SCP), offered to eight cats in two balanced Latin squares (four treatments and four 23-day periods). Digestibility data, fermentation products, and fecal characteristics were analyzed by ANOVA and Tukey's post-hoc test. Alpha-diversity was analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test, while beta-diversity was assessed using PERMANOVA and principal coordinate analysis (PCoA). Palatability was assessed using test power analysis. The apparent total tract digestibility (ATTD) coefficients for dry matter, crude protein, organic matter, ether extract, and gross energy were approximately 76%, 76%, 69%, 100%, and 65%, respectively, with estimated metabolizable energy of 2,882.89 kcal/kg. In the dose-response study, inclusion of up to 4% did not affect digestibility ($p > 0.05$), while levels of 8% and 16% reduced ATTD and increased fecal output ($p < 0.05$). No significant differences were observed in fermentation products, pH, or fecal microbiota, although 8% inclusion increased alpha-diversity richness. Regarding palatability, cats preferred diets without or with lower inclusion of SCP levels. It is concluded that SCP is a viable protein source for cats when used at moderate levels, and its inclusion depends on diet formulation, cost, and sustainability considerations.

Keywords: Digestibility; Nutrition; Microbial protein.

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento esperado da população global e, consequentemente, da demanda por proteína, cresce também a preocupação com as limitações na disponibilidade desse nutriente e os desafios de sustentabilidade na produção de alimentos (BAJIC' *et al.*, 2022). Nesse contexto, a busca por novas fontes de proteína para a formulação de *Pet food* torna-se um desafio.

A nutrição de felinos domésticos exige atenção especial por causa das características particulares do metabolismo proteico (MORRIS *et al.*, 2002; ZORAN, 2002). Estes animais possuem necessidades proteicas consideráveis, tendo a maior quantidade de proteína por quilo, quando comparado com outras espécies domésticas, resultado da alta taxa de *turnover* tecidual (NRC, 2006).

Algumas características são importantes no desenvolvimento de ingredientes proteicos para *Pet food*, tais como minimizar a competição com a alimentação humana, apresentar elevada biodisponibilidade e um perfil adequado de aminoácidos que atenda de modo satisfatório as necessidades dos animais e ainda apresente baixo impacto ambiental no processo produtivo (POND *et al.*, 1995; BOLAND *et al.*, 2013).

Diante do crescente desafio pela busca por fontes proteicas de qualidade e com viés sustentável para a população mundial e o mercado pet, as proteínas unicelulares (*Single Cell Proteins*, SCPs) entram em destaque por serem produzidas a partir de processos fermentativos de resíduos industriais (BAJIC' *et al.*, 2022).

Dentre as principais SCP's desenvolvidas para uso animal, o fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* é conhecido pelo produto Pekilo®, tem obtido destaque recente na alimentação de peixes (HOOFT *et al.*, 2024; HOOFT *et al.*, 2025). A biomassa possui perto de 55-60% de proteína, com perfil de aminoácidos adequado, assemelhando-se a outras fontes disponíveis no mercado, além disso é fonte de vitaminas do complexo B e betaglucanas (10-15%), reconhecida pelo efeito imunoestimulante (BAJPAI, 2017; HOOFT *et al.*, 2025).

Embora microrganismos sejam comumente utilizados na alimentação de cães e gatos, principalmente pelos potenciais efeitos prebióticos e de estímulo à microbiota intestinal (DE OLIVEIRA MATHEUS *et al.*, 2021; ALLENSPACH *et al.*, 2023; SOARES *et al.*, 2023), ainda há poucos estudos que avaliem o uso dos microrganismos como fonte de proteína na dieta desses animais (HOLT & ALDRICH, 2022; DAVENPORT *et al.*, 2023). Sendo assim, este estudo propõe investigar o efeito de uma

fonte proteica unicelular na dieta de gatos, por meio da análise da digestibilidade do ingrediente isolado e de dietas com diferentes níveis de inclusão, bem como as características fecais, produtos da fermentação, microbiota fecal e palatabilidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob protocolo N° 1935310524.

O estudo experimental foi conduzido no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Felinos Domésticos, localizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animais (LANA/UEM) e Laboratório de Análise Físico-Químicas em Águas e Alimentos da UEM (CCQ/UEM).

O estudo foi dividido em dois experimentos, sendo: i) avaliação da digestibilidade do ingrediente pelo método de substituição (MATTERSON *et al.*, 1965) e, ii) avaliação da palatabilidade, digestibilidade, características fecais, produtos de fermentação e microbiota em dietas com inclusões crescentes do ingrediente.

2.1. Experimento 1

2.1.1. Animais e instalações

No primeiro experimento foram utilizados 12 animais, machos e fêmeas, hípidos, castrados, adultos com idade entre 4 e 9 anos e peso corporal médio de $4,08 \pm 0,23$ kg. Foram utilizados animais com escore de condição corporal (ECC) entre 4 e 5 (CHUN *et al.*, 2019), sendo avaliados no início e no final do período experimental.

Durante a maior parte do período de adaptação à dieta, os gatos foram alojados em gatil de 49 m² com acesso a uma área externa de mesmo tamanho (49 m²) separado em dois grandes coletivos, permitindo socialização e atividades físicas, além de acesso *ad libitum* a água fresca e luz natural e artificial. O ambiente foi enriquecido com prateleiras em diferentes alturas, brinquedos e troncos de árvores na área externa.

No momento da alimentação, os gatos foram colocados individualmente em gaiolas de 0,30 m² (60 x 50 cm) com a quantidade de alimento baseada na necessidade

energética diária de manutenção para cada animal, após a alimentação os animais retornavam aos seus respectivos coletivos.

Durante o período de coleta de fezes e urina, permaneceram alojados individualmente em gaiolas metabólicas (1,35 x 0,9 x 0,8m) durante tempo integral. Possuindo prateleiras para descanso e enriquecimento ambiental, piso vazado para coleta de urina e potes para alimentação individualizada e água.

2.1.2. Dietas experimentais

Foram formuladas duas dietas experimentais para o primeiro experimento, destinadas para gatos adultos saudáveis, atendendo às recomendações nutricionais mínimas conforme o guia da *European Pet Food Industry Federation* (FEDIAF, 2021). A primeira dieta, denominada controle, foi composta por ingredientes com valores nutritivos e digestibilidade previamente estabelecidos, sem a adição da SCP (*Paecilomyces variotii* KCL-24, Pekilo®). A segunda dieta foi desenvolvida com os mesmos ingredientes da dieta controle, porém com a substituição da dieta por 18,2% de proteína unicelular, utilizando o método de substituição com cálculo descrito por Matterson *et al.* (1965). Ambas as dietas foram extrusadas na fábrica de rações da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu.

A composição química da SCP (*Paecilomyces variotii* KCL-24, Pekilo®) é detalhada na Tabela 4, enquanto a inclusão dos ingredientes dos tratamentos experimentais e a composição química analisada estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 4. Composição química (% na matéria seca) do ingrediente teste (FS Bioenergética, Mato Grosso do Sul, Brasil).

Item (% na MS)	SCP ¹
Matéria seca	90,41
Proteína bruta	60,21
Matéria orgânica	93,61
Matéria mineral	6,39
Extrato etéreo em hidrólise ácida	5,22
Fibra bruta	11,98
Energia bruta (kcal/kg)	5.020,02

Tabela 5. Composição das dietas experimentais do experimento 1.

Ingredientes (%)	Controle	Teste
Milho	30,36	24,29
Farinha de vísceras de aves	27,38	22,70
Quirera de arroz	20,00	16,00
Farelo de soja 45%	10,00	8,00
Gordura de aves	5,53	4,42
Palatabilizante líquido	2,00	2,00
Sal Comum	0,80	0,64
Celulose em pó	0,70	0,56
Ácido fosfórico	0,70	0,56
Premix mineral/vitamínico	0,64	0,51
Cloreto de potássio	0,62	0,50
Cloreto de colina	0,47	0,38
DL - metionina	0,40	0,32
Antifúngico	0,15	0,12
Taurina	0,15	0,12
Antioxidante (BHT/BHA)	0,10	0,08
SCP ¹	-	18,80
Composição química na MS (%)		
Matéria seca	9454	94,32
Proteína bruta	30,24	35,10
Matéria orgânica	94,01	94,21
Matéria mineral	5,99	5,79
Extrato etéreo em hidrólise ácida	12,39	11,55
Energia bruta (kcal/kg)	4937,45	4916,48

¹SCP– (*Paecilomyces variotii* KCL-24, Pekilo®).

2.1.3. Protocolo experimental

O delineamento utilizado para o primeiro experimento foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo 6 gatos distribuídos aleatoriamente em cada tratamento, conforme o número mínimo de animais preconizado pelo FEDIAF (2021). Cada gato foi considerado uma unidade experimental.

O protocolo de digestibilidade para coleta total de fezes, urina e pH durou o total de 13 dias seguindo o protocolo da FEDIAF (2021) sendo dividido em duas etapas. A primeira a etapa consistiu em um período de adaptação dos animais por 5 dias à alimentação proposta. A alimentação foi oferecida de forma individualizada com intuito de observar e controlar a ingestão de alimento diária de cada animal.

Na segunda etapa, os animais foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas (1,35 x 0,9 x 0,8 m) para coleta total de fezes e urina durante cinco dias (120 horas), e por fim entre 2 e 3 dias para avaliação do pH urinário. Durante o período de coleta, o alimento foi oferecido duas vezes ao dia, às 8h e às 14h, e pela manhã as sobras foram recolhidas e pesadas, registrando o consumo diário. A água foi oferecida *ad libitum*. A quantidade fornecida foi calculada individualmente para cada animal de acordo com as necessidades energéticas para manutenção de acordo com o NRC (2006), sendo:

$$\text{NEM (kcal/dia)} = 75 * (\text{kg de peso metabólico})^{0,67}$$

Equação 1. Necessidade energética em manutenção em gatos adultos saudáveis.

As fezes de cada animal foram coletadas diariamente, pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais previamente identificados. Os sacos foram fechados e armazenados em freezer convencional a -15°C para posterior análise.

Para o cálculo da digestibilidade do ingrediente, considerou-se as seguintes equações:

$$\text{CDI} = \text{CD (RR)}^* + \frac{\text{CD (RT)} - \text{CD (RR)}^*}{\% \text{subst.} / 100}$$

Equação 2. Coeficiente de digestibilidade do ingrediente pelo método de substituição.
Adaptado de MATTERSON *et al.* (1965) e CARCIOFI (2019).

*Considerar a média das repetições dos CD (RR) em que:

CDI = coeficiente de digestibilidade aparente do ingrediente;

CD (RR) = coeficiente de digestibilidade aparente da ração referência;

CD (RT) = coeficiente de digestibilidade aparente da ração teste;

% subst. = percentual de substituição da ração referência pelo ingrediente teste, na MS.

Ração Referência = Dieta Controle.

2.1.4. Digestibilidade aparente dos nutrientes, energia metabolizável e características fecais

Ao final do período de coleta, as fezes foram descongeladas, homogeneizadas e colocadas em uma estufa de ventilação forçada (MA035, Marconi, Piracicaba, Brasil) a 55°C por 72 horas para pré-secagem. Em seguida, as amostras foram moídas em moinho tipo bola (TE-350), identificadas e armazenadas em potes para análises posteriores. As rações também foram moídas em moinho tipo bola.

As fezes e as dietas foram analisadas segundo as metodologias descritas pela AOAC - *Association of the Official Analytical Chemists* (AOAC, 1990) para os seguintes parâmetros: Nitrogênio pelo (método de N: 954.01) e após o cálculo (N x 6.25) proteína bruta, fibra bruta (método: 978.10) e matéria mineral (método: 942.05). A matéria seca (MS) foi determinada em estufa a 105°C (Fanem 315) por 12 h e a matéria orgânica (MO) é obtido pelo cálculo: 100% – MM% (matéria mineral). A energia bruta foi determinada em bomba de calorimetria adiabática (6200 Isoperibol, Parr Instrument Company, Moline, USA). Todas as análises foram realizadas em duplicata, (com exceção da fibra bruta) e repetidas caso o coeficiente de variação fosse maior que 2-3%.

Com base nos resultados obtidos nas análises supracitadas e após a correção para matéria seca, o coeficiente de digestibilidade aparente foi calculado como a diferença entre a ingestão de nutrientes (g) e os nutrientes excretados nas fezes (g), dividida pela ingestão de nutrientes (g) e multiplicada por 100.

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

*CDA = Coeficiente de digestibilidade aparente.

Equação 3. Cálculo de coeficiente de digestibilidade aparente para nutrientes (FEDIAF, 2021).

A energia metabolizável (EM) foi determinada com base na matéria seca usando fator de correção para gatos (0,86), conforme mostrado na equação:

$$\text{EM [kcal/kg]} = \frac{[(\text{ração total consumida} * \text{energia bruta da ração}) - (\text{fezes totais produzidas} * \text{energia bruta das fezes}) - (0,86 * \text{proteína digestível consumida})]{}}{\text{Ração total consumida}}$$

Equação 4. Cálculo de energia metabolizável para gatos (FEDIAF, 2021).

2.2. Experimento 2

2.2.1. Animais e instalações

Para o segundo experimento foram utilizados 8 animais, machos e fêmeas, hígidos, castrados, adultos, com idade entre 4 e 9 anos e peso corporal médio de 3,88 ± 0,08 kg, com escore de condição corporal considerado adequado (4-5) (CHUN *et al.*, 2019).

As condições de alojamento e manejo dos gatos durante o segundo experimento foram idênticas às descritas no primeiro experimento, incluindo o uso de um gatil de 49 m² com acesso a uma área externa de mesmo tamanho, enriquecimento ambiental e manejo durante os períodos de alimentação e coleta de fezes.

2.2.2. Dietas experimentais

Todas as dietas foram extrusadas na fábrica de rações da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu. Foram formuladas quatro dietas experimentais para o segundo experimento, destinadas a gatos adultos saudáveis, atendendo aos requisitos nutricionais mínimos descritos pelo FEDIAF (2021). A primeira, denominada dieta controle (mesma ração formulada no experimento 1), composta por ingredientes com valores nutritivos e digestibilidade previamente estabelecidos, sem a adição da proteína em estudo. Os outros três tratamentos foram desenvolvidos com inclusões de 4%, 8% e 16% da SCP (*Paecilomyces variotii* KCL-24, Pekilo®), substituindo parcialmente os ingredientes proteicos da dieta, com os ajustes necessários para garantir quatro dietas isoproteicas e isonutritivas.

A inclusão dos ingredientes dos tratamentos experimentais e a composição química analisada estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Composição das dietas experimentais do experimento 2.

Ingredientes (%)	Controle	4%	8%	16%
Milho	30,36	30,16	29,60	27,85
Farinha de víscera de aves	27,38	23,63	19,92	12,58
Quirera de arroz	20,00	20,00	20,00	20,00
Farelo de soja 45%	10,00	10,00	10,00	10,00
Gordura de aves	5,53	5,87	6,22	6,93
Palatabilizante líquido	2,00	2,00	2,00	2,00
Sal comum	0,80	0,80	0,80	0,80
Celulose em pó	0,70	0,28	-	-
Ácido fosfórico	0,70	0,70	0,70	0,70
Premix mineral/vitamínico	0,64	0,59	0,55	0,45
Cloreto de potássio	0,62	0,52	0,41	0,21
Cloreto de colina	0,47	0,47	0,48	0,49
DL - metionina	0,40	0,40	0,40	0,40
Antifúngico	0,15	0,15	0,15	0,15
Taurina	0,15	0,15	0,15	0,15

Antioxidante (BHT/BHA)	0,10	0,10	0,10	0,10
Calcário	-	0,17	0,51	1,20
SCP ¹	-	4,00	8,00	16,00
Composição química na MS (%)				
Matéria seca	93,64	94,16	94,37	94,39
Proteína bruta	30,56	31,41	31,12	30,51
Matéria orgânica	94,00	94,08	94,17	94,32
Matéria mineral	6,00	5,92	5,83	5,68
Extrato etéreo em hidrólise ácida	11,26	11,43	10,53	11,86
Energia Bruta (kcal/kg)	4984,91	5055,47	4969,66	4992,43

¹SCP– *Paecilomyces variotii* KCL-24, Pekilo®.

2.2.3. Protocolo experimental

O delineamento utilizado foi o quadrado latino 4x4, possuindo 2 quadrados balanceados com 4 animais cada, disponibilizados de forma aleatória no início do experimento, 4 dietas (Controle, 4%, 8% e 16% de inclusão do ingrediente) sendo divididos em 4 períodos, assim todos os animais passaram por todos os tratamentos.

Cada período/bloco teve duração total de 23 dias, sendo cinco dias de adaptação às dietas experimentais, cinco dias (120 horas) para a coleta total de fezes e urina em gaiolas metabólicas para digestibilidade, dez dias de adaptação do sistema gastrointestinal e microbiota, e três dias para coleta de microbiota e produtos de fermentação em gaiolas metabólicas.

Durante os períodos de adaptação (5 dias iniciais e 10 dias entre as coletas), os animais permaneceram coletivamente em uma área de 49 m² (24 m² de área coberta e 25 m² de solário), com água disponível *ad libitum*. A alimentação foi oferecida de forma individualizada, com o objetivo de monitorar e controlar a ingestão diária de alimento de cada animal. O experimento 2 teve duração total de 92 dias.

Os três últimos dias de cada bloco foram destinados à coleta de produtos de fermentação e microbiota dos animais em experimento. As fezes foram coletadas frescas, com intervalo máximo de 15 a 20 minutos, de forma estéril, homogeneizadas, pesadas e separadas de acordo com as análises subsequentes. As amostras destinadas à análise de microbiota foram coletadas antes da homogeneização, para evitar contaminação com fezes que entraram em contato com superfícies.

2.2.4. Digestibilidade aparente dos nutrientes, energia metabolizável e características fecais

No segundo experimento, a digestibilidade aparente dos nutrientes, energia metabolizável e características fecais seguiram as mesmas etapas descritas no primeiro experimento, incluindo a avaliação do escore fecal, a metodologia de análise de fezes e dietas, e os cálculos de coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) e energia metabolizável (EM).

2.2.5. Produtos de fermentação

Para a determinação do pH fecal, foram pesadas 2 g de amostras, coletadas de forma estéril em intervalo máximo de 15 minutos após a defecação, homogeneizadas e diluídas na proporção 1:3 (p/v) em água destilada. Em seguida, o pH foi medido utilizando um pH-metro digital de bancada (K39—1014B, Kasvi, São José dos Pinhais-PR, Brasil).

Para análises de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR), 5 g de amostra de fezes foram pesadas em pote estéril e então adicionado 15 ml de ácido fórmico 16% (previamente preparado). Esta mistura foi homogeneizada e armazenada em geladeira a 4°C por um período de 3 a 5 dias. Após isso as amostras foram transferidas para tubos *falcon* tendo seu volume anotado e posteriormente centrifugadas a 5.000× g (Rotina 420R, Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Alemanha) por 15 min a 15°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado e submetido a nova centrifugação. Cada amostra passou por três centrifugações e, ao final da última, parte do sobrenadante foi transferida para um tubo identificado para posterior congelamento a -20°C. Em seguida, uma alíquota do sobrenadante foi colocada em um tubo eppendorf de 2 mL, foi centrifugada a 14.000, rpm por 15 min a 4°C e seu conteúdo passado por filtro membrana, após isso foi armazenada a -15°C.

Os AGCC e AGCR foram determinados por cromatografia (ERWIN *et al.*, 1961) gasosa em cromatógrafo Shimadzu (modelo GC-2014, Quioto, Japão) equipada com um detector de ionização de chama (FID) e sistema de injeção de amostras em coluna capilar de sílica fundida (*Agilent Technologies*, HP INNO wax – 19091N, Santa Clara, EUA), com 30 m de comprimento e 0,32 mm de largura. O gás hidrogênio foi utilizado como combustível, com taxa de fluxo de 1,2 mL/min, combinado com ar sintético a 400 mL/min, e o nitrogênio foi o gás transportador, com fluxo de 3,18 mL/min. As temperaturas de trabalho foram definidas como 200°C na injeção, 240°C na coluna (com aquecimento na velocidade de 20°C/min) e 250°C no detector, mantido por 10 minutos. A razão de injeção foi de 1:80, com volume de 1,0 µL. Os compostos foram identificados

por meio de uma curva analítica padrão, comparando os tempos de retenção das amostras com padrões analíticos para ácidos graxos voláteis (AGV). Entre os compostos quantificados estavam ácido acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, metilvalérico, hexanoico e heptanoico.

A determinação de amônia (N-NH_3) foi realizada utilizando o método colorimétrico baseado na reação do indofenol (CHANEY & MARBACH, 1962; KUNG *et al.*, 1984). Amostras de extrato (as mesmas obtidas para AGCC e AGCR) foram pipetados em tubos de ensaio (5 e 25 μL), seguidos da adição de 1,5 mL de solução de fenol (50 g de fenol sólido e 0,25 g de nitroprussiato de sódio em 1 L de água destilada) e 1,5 mL de solução de hipoclorito (25 g de NaOH e 16,8 mL de clorox em 1 L de água destilada). Após agitação em vortex, os tubos foram incubados em banho-maria a 39°C por 15 minutos. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro ajustada para 630 nm, utilizando uma curva padrão preparada com soluções de NH_4Cl para quantificação.

Para realizar as análises do perfil de aminas biogênicas foi utilizada a metodologia descrita no trabalho de Figueiredo (2008) adaptada. Foram coletadas 5 g de fezes frescas em duplicata, adicionadas a 15 mL de ácido perclórico a 5%, homogeneizadas, o volume final anotado e refrigeradas até o momento da análise. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa com porosidade de 0,22 μm . A identificação das aminas foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos nas amostras com as aminas presentes na solução padrão. Os padrões utilizados incluíram: dicloridrato de putrescina, dicloridrato de cadaverina, cloridrato de tiramina, dicloridrato de histamina, cloridrato de 5-hidroxitriptamina (serotonina), complexo sulfato de creatinina-agmatina, tricloridrato de espermidina, tetracloridrato de espermina, cloridrato de 2-feniletilamina e triptamina. A solução estoque foi preparada por diluição individual de cada padrão em ácido clorídrico 0,1N, formando soluções com concentração de 1 mg/mL para cada amina. Posteriormente, as soluções padrões foram combinadas em um balão volumétrico para formar uma solução contendo as 10 aminas.

2.2.6. Microbiota fecal

Para avaliação da microbiota, aproximadamente 2 g de amostra foram retiradas do interior das fezes recém-colhidas, colocadas em um tubo eppendorf estéril e acondicionadas em freezer a -80°C até o momento da análise. Foi empregado o kit

comercial padrão para a matriz específica para extrair o DNA das amostras, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. A qualidade e quantificação foram avaliadas por espectrofotometria em Nanodrop (Thermo Scientific™). Foi amplificado um segmento de aproximadamente 460 bases da região hipervariável V3V4 do gene 16S rRNA utilizando os primers 375F/805R para análise bacteriana, seguindo as seguintes condições de PCR: 95°C por 3 min; 25 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s, seguido de etapa a 72 °C por 5 min. Os amplicons foram ligados a barcodes dual index Nextera da Illumina®, nas seguintes condições: 95°C por 3 min; 8 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s, seguido de etapa a 72°C por 5 min. Os produtos foram então purificados, reunidos em pools e posteriormente sequenciados no sequenciador "NextSeq" da Illumina® (DEGNAN & OCHMAN, 2012), em *paired-end* de 300 bases. Amostras com número de leituras inferiores a 30.000 reads foram submetidas a repetição. As leituras obtidas no sequenciador foram analisadas na plataforma QIIME2 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (CAPORASO *et al.*, 2010, 2011), seguindo-se um fluxo de trabalho de utilização das sequências *forward* e *reverse* (R1 e R2 truncados em 165 pb) na análise bacteriana, prosseguindo com remoção de sequências de baixa qualidade, filtração, remoção de quimeras e classificação taxonômica. As sequências foram classificadas em gêneros bacterianos através do reconhecimento de Variantes de Sequências de Amplicons (ASVs) – neste caso, a homologia entre as sequências quando comparadas contra uma base de dados. Para comparar os amplicons de regiões do gene 16s rRNA foi utilizada a atualização de 2022 (versão GTDB 207) do banco de dados de taxonomia de genomas bacterianos GTDB (PARKS *et al.*, 2021), extraindo leituras *in silico* das mesmas regiões amplificadas.

2.3. Teste de preferência

Para a avaliação da palatabilidade (ou preferência alimentar) foi utilizado o teste de duas tigelas (*two-bowl tests*) (CALDERÓN *et al.*, 2024). No total foram utilizados 23 gatos, alojados individualmente em gaiolas de 0,30 m² (60 x 50 cm) específicas para este ensaio. A palatabilidade foi determinada pela mensuração da preferência do alimento e da primeira escolha entre as dietas oferecidas aos gatos. Foram feitas as seguintes comparações: Controle vs. 8%; Controle vs. 16% e 8% vs. 16% de inclusão do ingrediente.

Cada teste de palatabilidade foi realizado em dois dias consecutivos. Os alimentos selecionados para o desafio foram oferecidos em potes separados, um alimento

em cada pote, quatro vezes ao dia às 08, 10, 14 e 16, por um período de 20 minutos. A quantidade de alimento fornecida foi de 50 g/animal em cada comedouro. Ao final do dia as sobras de alimento foram pesadas e o consumo de cada alimento calculado.

A preferência do alimento / razão de ingestão foi calculada em função da ingestão relativa (oferta menos as sobras) das dietas A e B.

$$\text{Razão de ingestão} = \left(\frac{\text{Consumo da dieta A ou B (g)}}{\text{Total da dieta consumida (A + B)}} \right) \times 100$$

Equação 5. Cálculo de razão de ingestão.

A primeira escolha foi determinada pelo registro do primeiro pote em que o gato se aproximou quando os alimentos foram apresentados.

2.4. Análise estatística

Os procedimentos estatísticos do experimento 1 foram descritivos, uma vez que o objetivo é determinar o valor nutricional do ingrediente, sem propósito comparativo.

No experimento 2, para características fecais, CDA e produtos de fermentação foram realizada estatística descritiva e os dados foram submetidos à ANOVA para comparação de médias entre grupos, post-hoc de Tukey e ajustes de modelos de regressão polinomiais, comparando a qualidade do ajuste pelo coeficiente R^2 . As análises foram realizadas por meio do software R Core Team (2023) e o nível de significância considerado foi de 5%.

A análise de alfa-diversidade foi realizada separadamente, com a comparação estatística entre os grupos conduzida por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

A análise de beta-diversidade foi conduzida utilizando o software *MicrobiomeAnalyst* 2.0 (<https://www.microbiomeanalyst.ca/MicrobiomeAnalyst/home.xhtml>). Após a filtragem, transformação dos dados (total sum scaling - TSS) e rarefação, os dados foram analisados com a ferramenta LEFse, que utiliza distribuição não paramétrica e o teste de hipóteses de Kruskal-Wallis. Para avaliar diferenças na composição da microbiota entre os tratamentos, foi utilizada a análise PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance), com base na métrica de distância de Bray-Curtis. Adicionalmente, foi realizada uma análise de coordenadas principais (PCoA) para explorar as relações e

visualizar padrões de similaridade ou dissimilaridade entre as amostras. Foram considerados significativos os valores de p menores que 0,05, enquanto valores de $0,05 < p \leq 0,1$ foram interpretados como tendência.

Por fim, os resultados para palatabilidade foram analisados conforme metodologia descrita por Pires *et al.* (2020) considerando como significativo o poder de Teste superior a 0.70.

3. RESULTADOS

3.1. Animais

Durante todo o primeiro experimento, os animais apresentaram consumo alimentar considerado adequado, sem registros de recusa de alimentos, vômitos ou diarreias, independentemente da dieta oferecida. Além disso, todos os animais permaneceram saudáveis ao longo do estudo, sem necessidade de exclusões, e a ingestão alimentar foi suficiente para atender às necessidades de manutenção, sem apresentar sinais adversos relacionados à saúde.

3.2. Experimento 1

O consumo das dietas experimentais foi considerado adequado com média de $\pm 18,0$ g de matéria seca/kg^{0,67}. Os resultados para matéria seca fecal, output fecal (Tabela 7) foram menores nos animais que ingeriram a dieta teste contendo a SCP, enquanto para escore fecal os resultados foram considerados próximos sem alterações de acordo com escala descrita por Carciofi *et al.* (2009).

Tabela 7. Consumo e características fecais do experimento 1.

Item	Tratamento		EPM ¹
	Controle	Teste	
Consumo MS (g/kg^{0,67})	18,46	17,57	-
Características fecais			
Matéria seca fecal (%)	36,99	32,18	3,110
Escore fecal	3,75	3,90	0,322
Output fecal na MS (g/kg PM/dia)	2,82	3,30	0,165

¹EPM – Erro padrão da média.

Na Tabela 8, os coeficientes de digestibilidade aparente do ingrediente são apresentados.

Tabela 8. Coeficiente de digestibilidade aparente e energia metabolizável do ingrediente.

Item	Pekilo®	EPM ¹
Matéria seca (%)	76,43	2,747
Proteína bruta (%)	75,74	1,072
Matéria orgânica (%)	69,27	2,283
Extrato etéreo (%)	107,10	7,662
Energia bruta (%)	65,24	2,166
Energia metabolizável (kcal/kg)	2882,89	0,141

¹EPM - Erro padrão da média.

3.3. Experimento 2

De acordo com a Tabela 9, para matéria seca fecal ocorreu a redução da matéria seca fecal com a inclusão do ingrediente, entretanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Já para *output* fecal, houve diferença significativa, sendo possível observar que as inclusões de 8 e 16% aumentaram a produção fecal em comparação aos demais ($p < 0,05$). Para medidas de pH fecal e escore fecal não houve diferença significativa.

Tabela 9. Características fecais, coeficiente de digestibilidade aparente e energia metabolizável de gatos alimentados com níveis crescentes de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta.

Item	Tratamento				EPM ¹	P-valor
	Controle	4%	8%	16%		
Consumo MS (g/kg^{0,67})	16,83	16,93	17,05	16,73	0,5840	0,9492
Características fecais						
Matéria seca fecal (%)	33,66	33,15	32,88	31,75	0,6611	0,6338
Escore fecal	3,72	3,78	3,78	4,14	0,1025	0,1873
Output fecal na MS (g/kg ^{0,67} /dia)	2,50 ^b	2,32 ^b	2,75 ^{ab}	3,10 ^a	0,1113	0,0059
pH fecal	5,91	5,74	5,76	5,81	0,0477	0,6040
Coeficiente de digestibilidade aparente (%)						
Matéria seca (%)	85,12 ^a	86,58 ^a	83,81 ^{ab}	81,52 ^b	0,6134	0,0034
Proteína bruta (%)	84,86 ^{ab}	86,13 ^a	83,17 ^{ab}	82,04 ^b	0,6452	0,0333
Matéria Orgânica (%)	86,77 ^a	88,07 ^a	85,51 ^{ab}	83,98 ^b	0,5781	0,0055
Matéria Mineral (%)	59,27 ^a	62,93 ^a	56,28 ^a	47,65 ^b	1,4266	0,0001
Extrato Etéreo (%)	90,59 ^{ab}	91,78 ^a	88,65 ^b	88,65 ^b	0,4349	0,0105
Energia bruta (%)	86,78 ^{ab}	87,94 ^a	85,27 ^{ab}	83,53 ^b	0,6081	0,0095
Energia metabolizável (kcal/kg)	4102,95 ^{ab}	4177,37 ^a	4019,75 ^{ab}	3953,86 ^b	0,0283	0,0071

a,b = médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$) na mesma linha.

¹EPM - Erro padrão da média.

Ainda na Tabela 9, o tratamento controle (0% inclusão) e com 4% obtiveram valores estatisticamente semelhantes para a maioria dos coeficientes avaliados. A partir da inclusão de 8% da SCP foram limítrofes na redução dos coeficientes de digestibilidade, enquanto 16% reduziram o CDA e aumentaram a produção fecal ($p < 0,05$).

Tabela 10. Produtos de fermentação em gatos alimentados com níveis crescentes de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta.

Item (mmol/kg de MS)	Tratamento				EPM ¹	p-valor
	Controle	4%	8%	16%		
Amônia	405,42	368,90	344,32	379,99	17,8315	0,1991
Ácidos graxos de cadeia curta						
Ácido acético	405,42	368,90	344,32	379,99	17,8315	0,4559
Ácido propiônico	106,98	112,57	112,18	134,05	6,9102	0,1919
Ácido butírico	91,98	85,54	84,29	81,49	8,1459	0,9579
AGCC ²	604,39	567,01	540,80	595,53	25,7528	0,6777
Ácidos graxos de cadeia ramificada						
Ácido isobutírico	19,74	19,30	19,08	19,43	0,4596	0,9447
Ácido isovalérico	20,64	20,30	20,06	19,55	0,4914	0,7761
Ácido valérico	43,44	42,99	45,47	46,88	1,9622	0,8662
AGCR ³	83,83	82,59	84,61	85,86	2,7559	0,9744
Aminas biogênicas						
Serotonina	11,56	11,60	11,39	11,51	0,2899	0,9940
Tiramina	66,87	99,27	71,83	88,96	15,8392	0,8731
Spermidina	77,98	83,11	118,49	103,96	7,9585	0,0870
Cadaverina	819,80	841,35	766,73	789,09	36,8385	0,9129
Histamina	57,84	45,78	45,68	57,86	3,4471	0,2602
Putrescina	1302,56	1314,49	1077,19	1331,81	120,8799	0,8805
Spermina	31,92	33,24	32,92	30,63	0,8750	0,6005
Aminas biogênicas totais	2368,53	2428,84	2124,23	2413,83	159,8892	0,9178

¹EPM - Erro padrão da média.

²AGCC - Ácidos graxos de cadeia curta

³AGCCR – Ácidos graxos de cadeia ramificada

De acordo com a tabela 10, os resultados para os produtos de fermentação: amônia, ácidos graxos de cadeia curta e cadeia ramificada, aminas biogênicas não obtiveram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos e as respectivas inclusões avaliadas. Apenas para spermidina ocorreu uma tendência para diferença estatística (p-

valor = 0,0870).

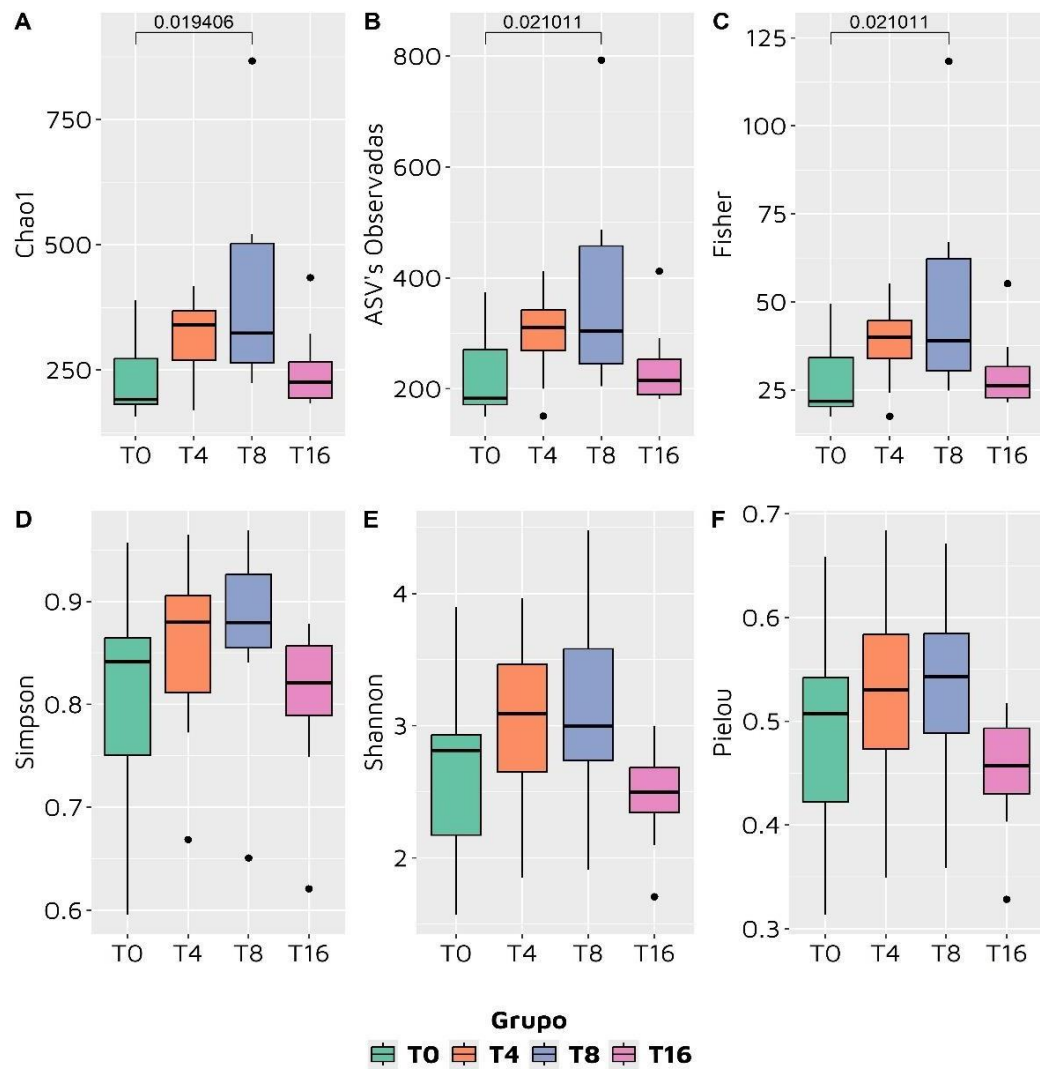


Figura 5. Alfa-diversidade estimada pelos parâmetros Chao1 (A), ASVs Observadas (B), Índice de Fisher (C), Índice de Simpson (D), Shannon (E) e Evenness Pielou (F) da microbiota intestinal de gatos submetidos a dietas com diferentes níveis de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%).

Os resultados obtidos na análise de alfa-diversidade (Figura 5) mostram que os índices de riqueza Chao1, ASVs (*Amplicon Sequence Variants*) e Fisher revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos com inclusão de 8% de Pekilo® em comparação ao tratamento controle (0% de inclusão), promovendo maior diversidade microbiana. Por outro lado, os índices de uniformidade e equitabilidade (Simpson, Shannon e Pielou) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

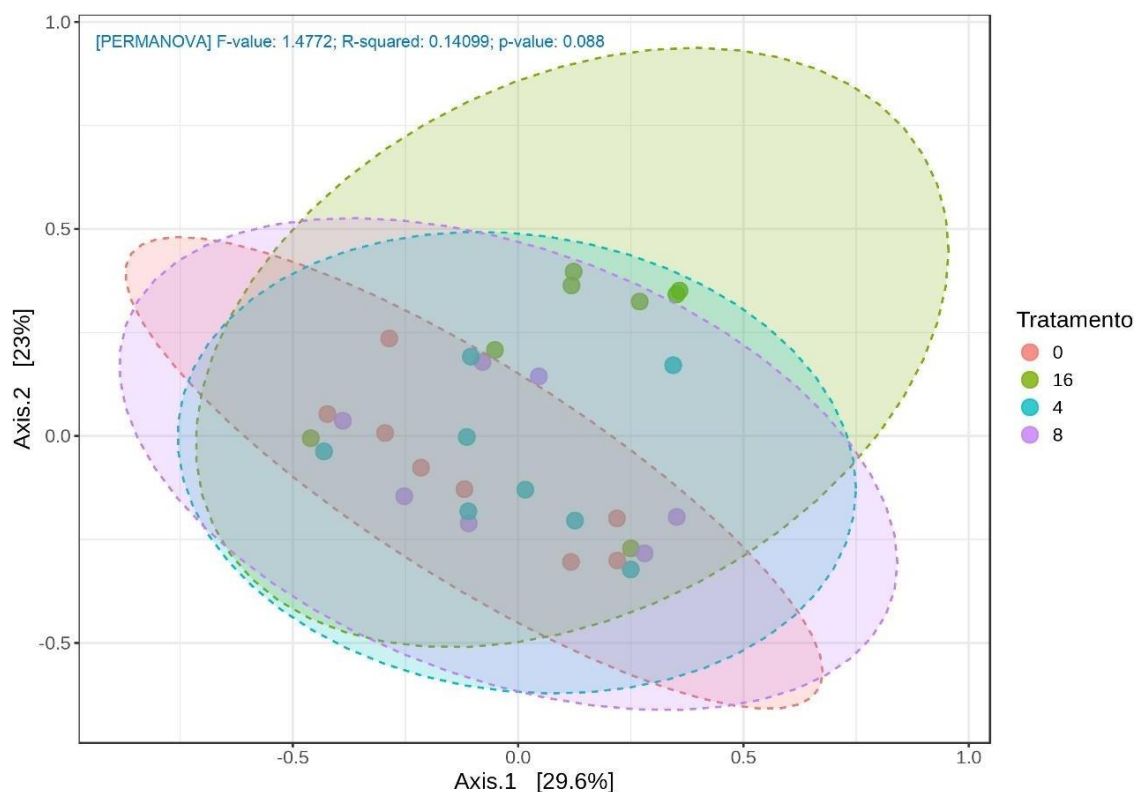


Figura 6. Análise de beta-diversidade (PCoA) para microbiota intestinal de gatos submetidos a dietas com diferentes níveis de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%).

Com base nos resultados apresentados na Figura 6, para a análise de beta-diversidade (PCoA), o F-value (1,4772) e o R-squared (0,14099) sugerem alguma variabilidade explicada pelos tratamentos, tendo os resultados de 16% apresentando tendência nos valor de p ($p = 0,088$), entretanto o valor de, obtido para a comparação entre os tratamentos com diferentes níveis de inclusão (0%, 4%, 8% e 16%), indica que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na composição da microbiota avaliada.

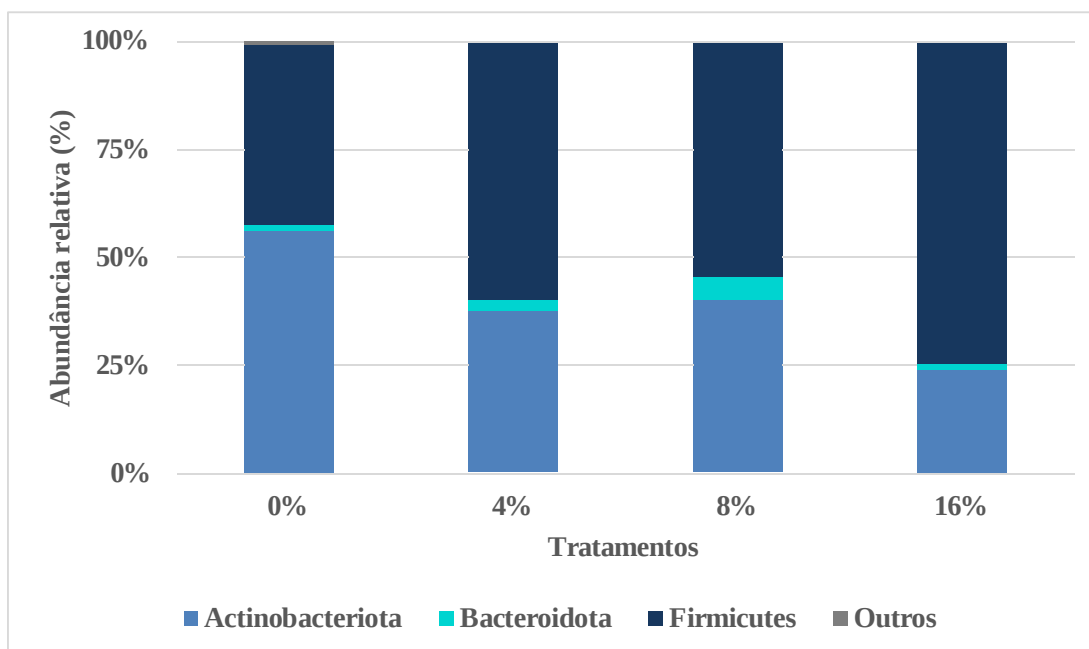


Figura 7. Distribuição da abundância relativa (%) dos principais filos bacterianos na microbiota intestinal de gatos submetidos a diferentes tratamentos com níveis crescentes de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta.

No total, foram identificados 8 filos, 43 famílias e a cerca de 91 gêneros diferentes nos tratamentos com diferentes níveis de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%). Na análise da microbiota, considerando a abundância relativa de filos, famílias e espécies, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos avaliados. A frequência relativa dos filos, família espécie de cada tratamento está ilustrada na Figura 7, 8 e 9 respectivamente.

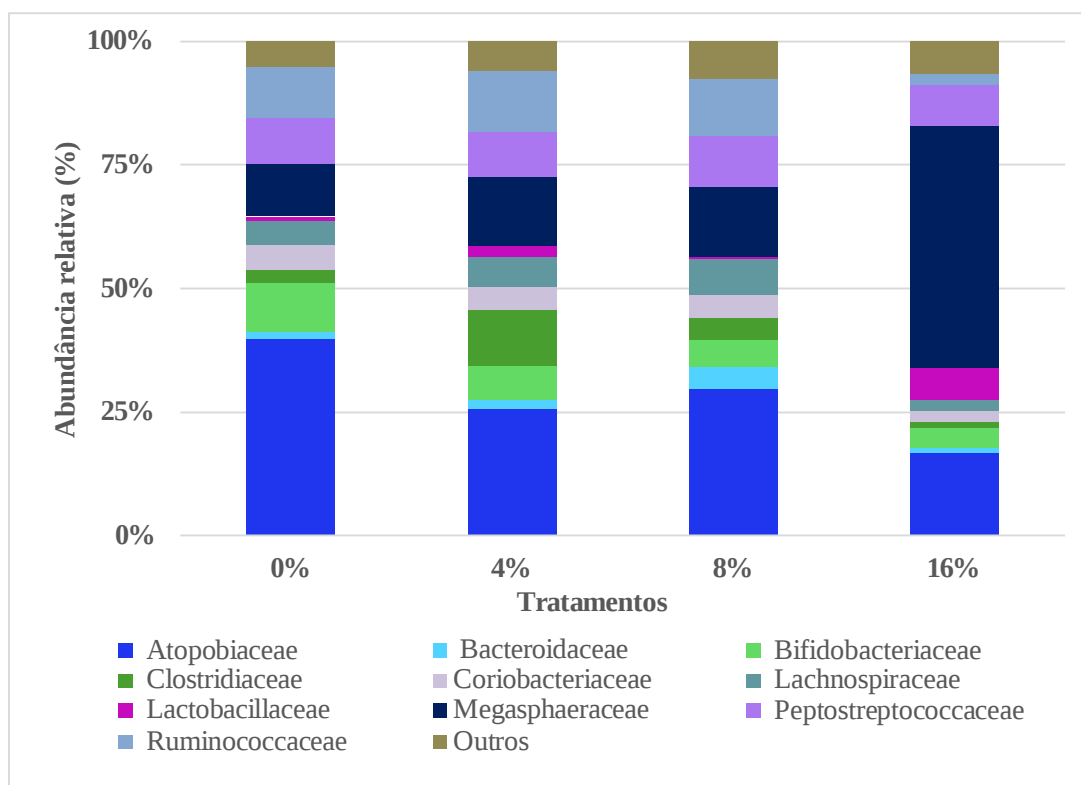


Figura 8. Distribuição da abundância relativa (%) das principais famílias na microbiota intestinal de gatos submetidos a diferentes tratamentos com níveis crescentes de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta.

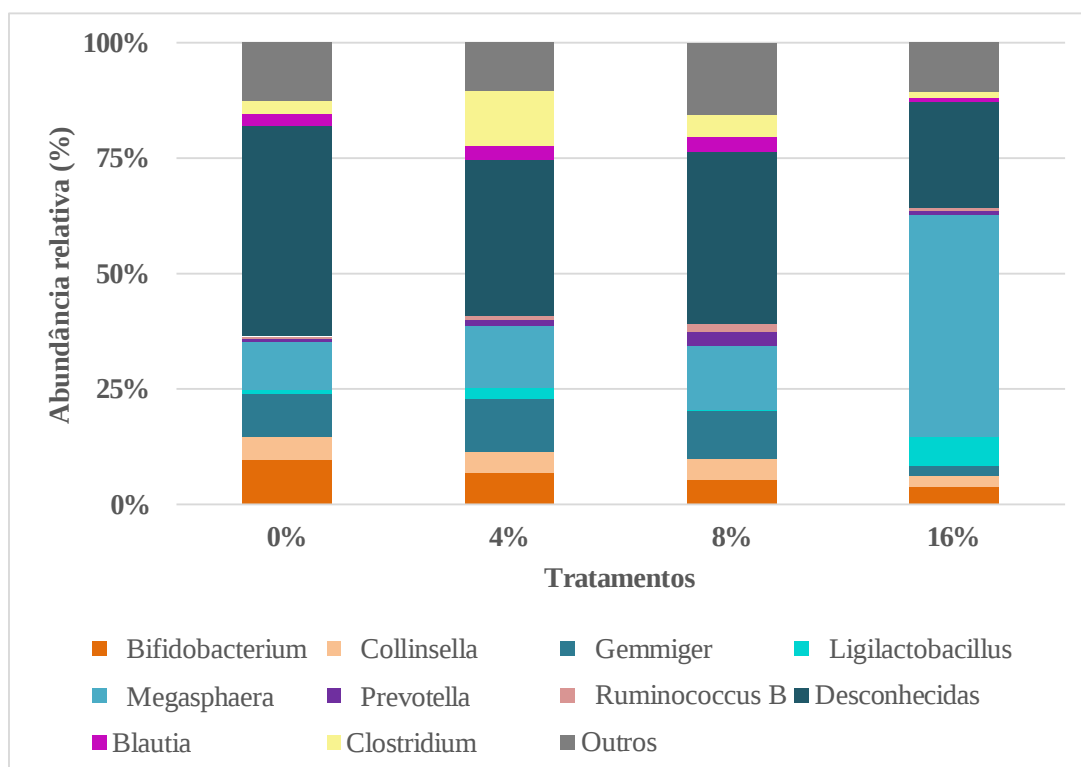


Figura 9. Distribuição da abundância relativa (%) das principais espécies na microbiota intestinal de gatos submetidos a diferentes tratamentos com níveis crescentes de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta.

As tabelas contendo as médias de abundância relativa de filo, família e espécie estão disponibilizadas no apêndice.

Tabela 11. Razão de ingestão das dietas, Controle, 8% e 16% de inclusão do ingrediente.

Desafio	RI A	RI B	DP ¹	N ²	Poder do Teste
Controle x 8%	0,63	0,37	0,24	23	0,99
Controle x 16%	0,66	0,34	0,29	23	0,99
8% x 16%	0,58	0,42	0,22	23	0,91

¹DP = Desvio padrão das médias.

²N = Número de animais por desafio.

De acordo com a Tabela 11, houve diferença estatisticamente significativa para a razão de ingestão entre todos os desafios Controle x 8%, Controle x 16% e 8% x 16% de acordo com o poder do teste (Poder do teste $\geq 0,7$).

4. DISCUSSÃO

Quando um ingrediente ou matéria-prima desperta interesse para a produção de rações em determinada espécie, os primeiros aspectos avaliados são a segurança do alimento, aceitação pelo animal e digestibilidade/aproveitamento dos nutrientes. Essa avaliação é fundamental para determinar o potencial do ingrediente na formulação de dietas adequadas (CARCIOFI, 2019 apud CHO, 1987).

O método de substituição é utilizado para avaliar a digestibilidade de um ingrediente. Esse método foi adaptado para cães e gatos, utilizando dietas extrusadas, desde o início do século XXI (KENDALL & HOLME, 1982; NEIRINCK *et al.*, 1991), e tem auxiliado de forma significativa na escolha dos ingredientes para a formulação de *Pet food*, quando se busca produzir alimentos de alta digestibilidade para minimizar as excreções fecais. O método consiste em empregar duas dietas: uma dieta basal balanceada para a espécie em estudo e outra que substitui, de forma parcial ou total, o ingrediente de interesse nas formulações comparativas (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2016; CARCIOFI, 2019).

Os valores de digestibilidade da matéria seca (74,43%) e matéria orgânica (69,27%) foram considerados menores quando comparados a outras fontes proteicas convencionais, como farelo de glúten de milho 60% (86,6% MS e 88,3% MO) e soja micronizada (85,4% MS e 88,1% MO). Contudo, esses valores aproximaram-se de ingredientes como farinha de vísceras de frango (74,4% MS) e farelo de soja (64,4% MS e 67,2% MO) (CARCIOFI, 2008). A menor digestibilidade aparente da MS do ingrediente pode estar relacionada ao teor de componentes de parede celular, tais como

hemicelulose (23-27%), celulose (7-8,5%) e lignina (4,5-4,8%), além de hexosaminas, que incluem estruturas de quitina e glicoproteínas (SALO, 1977). Esses polissacarídeos estruturais apresentam baixa solubilidade, dificultando a digestão enzimática direta e exigindo a ação de microrganismos digestivos para a degradação (SALO, 1977).

Se por um lado, estes componentes comprometem a digestibilidade, por outro, podem contribuir com a modulação da microbiota intestinal e resposta imunológica, pois este ingrediente possui entre 10-15% de beta-glucanas, os quais têm demonstrado efeitos benéficos nestes parâmetros em cães (FERREIRA *et al.*, 2018; KILBURN-KAPPELER *et al.*, 2023b) e gatos (DE OLIVEIRA MATHEUS *et al.*, 2021).

O coeficiente de digestibilidade aparente da proteína (CDAPB) de Pekilo® apresentou a média de 75,74%, também considerado baixo para uma fonte proteica, especialmente em comparação com fontes convencionais, como farinha de carne e osso, farelo de soja e vísceras de frango. Essa limitação pode ser explicada pelos altos teores de fibra bruta do ingrediente, predominantemente insolúveis, que podem reduzir a digestibilidade da proteína. A biomassa de *P. variotti* é caracterizada por possuir elevados níveis de parede celular, que são indigeríveis para monogástricos e podem dificultar a liberação e o aproveitamento da proteína (NASSERI *et al.*, 2011; RITALA *et al.*, 2017).

O coeficiente de digestibilidade aparente do extrato etéreo (CDAEE) apresentou resultados elevados para ingredientes semelhantes, alcançando 107%, enquanto a maioria das fontes proteicas utilizadas para gatos apresenta valores médios de aproximadamente 82% (CARCIOFI, 2008). Uma possível explicação para essa alta digestibilidade é o baixo teor de gordura do ingrediente, que gira próximo de 5% na matéria seca, contribuindo para maior eficiência digestiva. Em função do baixo teor de gordura, este ingrediente contribui com a formulação de alimentos quando o intuito é elevar a fibra e proteína, sem aumentar a densidade energética, tais como alimentos hipocalóricos ou *light*.

Para Aldrich e Koppel (2015) “Palatabilidade é a medida de ingestão de um alimento que indica aceitação ou a medida de preferência de um alimento em relação a outro”. Ou seja, se aquele alimento/ingrediente é aceito numa dieta e/ou a preferência em reação a outro.

Quando o novo ingrediente é testado para a alimentação animal (especificamente cães e gatos), é necessário saber se sua aceitação em uma dieta será adequada. Os resultados de palatabilidade obtidos neste estudo indicaram a preferência dos animais para dietas que não contêm o ingrediente (dieta controle) ou que possua inclusões menores (no caso de 8%) em comparação com desafios com inclusões maiores, ainda que

o consumo durante os dois experimentos tenha sido satisfatório.

A ausência de estudos com o ingrediente dificulta a compreensão dos resultados de palatabilidade. Todavia, em estudos primordiais envolvendo a inclusão da proteína de Pekilo® em alimentos para consumo humano (KOIVURINTA *et al.*, 1979; KOIVURINTA *et al.*, 1980) foi observado que os tratamentos que possuíam o ingrediente eram destacados por possuir um aroma e gosto característico (*mild taste*) mesmo em inclusões mais baixas, o que pode ser considerado um aspecto negativo.

Levando em consideração a sensibilidade dos felinos, perceberam a presença no novo ingrediente menos palatável. Um outro fator a ser considerado é o fato de os gatos serem considerados neofóbicos, possuindo rejeição a alimentos que não foram apresentados anteriormente, tendo maior aptidão por dietas com ingredientes proteicos convencionais (BRADSHAW *et al.*, 2000; PEKEL *et al.*, 2020).

No entanto, embora a preferência tenha sido pelo alimento controle em relação às dietas com 8 ou 16% de inclusão de SCP nos ensaios de palatabilidade, no experimento 2, no qual este ingrediente foi incluído até 16% na dieta, foi possível verificar que o consumo de MS e calórico dos animais foi total em relação ao oferecido, demonstrando que este ingrediente é bem aceito pelos gatos, podendo ser utilizado até estes níveis sem restrições nas dietas.

A composição da biomassa proteica de cada SCP depende do microrganismo e do substrato que é utilizado na produção, podendo ter resultados de aceitação e palatabilidade diferentes. Em um estudo com biomassa de *Candida utilis* (Torula) como fonte proteica para gatos, observou-se que as dietas contendo a levedura de torula foram preferidas em relação à farinha de vísceras de frango e à proteína de ervilha. De acordo com os autores a preferência pode estar associada a um sabor mais atrativo do produto à base de torula (HOLT & ALDRICH, 2022).

Davenport *et al.* (2023) investigaram o uso da levedura de *Saccharomyces cerevisiae* seca como fonte proteica em dietas extrusadas para cães e gatos. Quanto à palatabilidade, foi observado que as dietas contendo a levedura apresentaram um consumo significativamente maior em gatos ($p < 0,001$) e igual ou ligeiramente maior em cães.

Ambas as leveduras mencionadas acima possuem características distintas de composição de fungos filamentosos. A biomassa do *P. variotti* é conhecida por conter altos níveis de β -glucanos (10-20%). As paredes celulares desses organismos podem influenciar negativamente a digestibilidade, a liberação de proteínas nas dietas e,

consequentemente, a palatabilidade dos alimentos (NASSERI *et al.*, 2011). Em um estudo realizado por Soares *et al.* (2023), foi avaliada, entre outros parâmetros, a palatabilidade de dietas contendo misturas de parede celular de leveduras suplementadas com óleos essenciais de orégano a níveis de 1,5 e 3,0 kg/ton (denominadas 1.5YCO e 3.0YCO). Como resultado, a dieta controle mostrou melhor desempenho em comparação às dietas 1.5YCO e 3.0YCO, e a dieta com menor inclusão (1.5YCO) e em comparação com a maior (3.0YCO).

A avaliação das características fecais dos animais quando utilizados ingredientes novos é de grande importância para a nutrição. Características como consistência, odor, cor são indicativos de qualidade das dietas e do ingrediente, como indícios de problemas com relação ao trato gastrointestinal (FÉLIX *et al.*, 2009).

Não foi constatado diferença significativa nas características de matéria seca fecal e escore fecal ($p > 0,05$) com inclusões de até 16% da proteína de Pekilo®. A matéria seca fecal permaneceu com valores perto de $32,86\% \pm 0,6611$, enquanto o escore fecal apresentou valor de $3,86 \pm 0,1025$, considerados adequados (CARCIOFI *et al.*, 2008), demonstrando que a inclusão do ingrediente não teve impacto negativo na consistência das fezes.

Resultado semelhante ao encontrado por Davenport *et al.* (2023) que não evidenciou alteração significativa no escore fecal com adição de 10% da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em comparação com uma dieta basal para gatos. Isso pode ter acontecido por conta da baixa fermentabilidade das fontes proteicas, por consequência suas inclusões não afetaram a microbiota e os produtos de fermentação do trato gastrointestinal, não alterando a matéria seca ou escore fecal dos animais.

Em contraste, Martins *et al.* (2014), avaliaram a inclusão de levedura de cana-de-açúcar integral (ISCY), observou-se impacto negativo na matéria seca e no escore fecal, provavelmente devido à fermentação da parede celular rica em polissacarídeos no intestino grosso, resultando em maior produção de ácidos graxos de cadeia curta e aumento do teor de água nas fezes (HARRIS *et al.*, 2021).

Outros estudos com *S. cerevisiae*, utilizando a parede celular, componente abundante na biomassa de fungos e leveduras, constatam que a utilização em até 0,65% na matéria seca da dieta não altera o escore fecal (MIDDELBOSS *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA MATHEUS *et al.*, 2021). Para ambos, os estudos podem ser avaliados como uma característica positiva, indicando que os animais toleram a inclusão de pelo menos 16% do ingrediente em dietas sem alterar as características fecais.

Para o pH fecal também não ocorreu diferença estatística com as inclusões até 16% da proteína de Pekilo®, mantendo um pH médio de $5,81 \pm 0,0477$. Em comparação com outros estudos que avaliaram o pH fecal em gatos é possível observar valores próximos ao encontrados no experimento, variando entre 5,75 e 6,0 em dietas controle (HOLT & ALDRICH, 2022; KILBURN-KAPPELER *et al.*, 2023a).

Nos trabalhos de Santos *et al.* (2018) e de Oliveira Matheus *et al.* (2021) não foi constatado diferença estatística significativa no pH com as inclusões de até 0,6% de parede celular de leveduras em comparação com as dietas controle, tendo pouca capacidade fermentativa.

Ao contrário do que foi observado, Urrego *et al.* (2017), avaliaram a fermentabilidade de diferentes fontes de proteínas (farinha de aves; glúten de trigo; proteína hidrolisada) de forma individual ou juntas na mesma dieta. A dieta que incluiu as três fontes proteicas teve pH e escore fecal mais baixos, em comparação com as demais, destacando que as de diferentes fontes proteicas podem alterar as características fecais.

Uma das hipóteses para os valores de pH encontrados no estudo está relacionada as concentrações de produtos de fermentação como o ácido lático e AGCC. O butirato, acetato, propionato e ácido lático produzidos pela fermentação dos carboidratos no cólon são os principais fatores que diminuem o pH das fezes (BINDER, 2010).

Os resultados para produção fecal (*fecal output*) foram maiores em dietas contendo 16 e 8% ($p < 0,05$), indicando que inclusão do ingrediente tem impacto na produção de fezes nos animais. Uma das hipóteses levantadas para estes resultados são os níveis de fibra insolúvel presentes na proteína microbiana, que não são absorvidas e por consequência aumentam a quantidade de fezes.

Kilburn-Kappeler *et al.* (2023a) relataram produção fecal mais alta na utilização de DDGS (*Dried Distillers Grains with Solubles*) com levedura seca de cervejaria em comparação com a dieta controle, proteína fermentada de milho e levedura seca de cerveja em dietas para gatos, de acordo com os autores isto pode ter ocorrido pelo tratamento com DDGS possuir maior proporção de fibras insolúveis.

Os resultados diferem de alguns trabalhos na literatura. Kaelle *et al.* (2023) não constataram diferença na produção fecal utilizando níveis crescentes de DDGS em dieta para cães saudáveis. Holt e Aldrich (2022), obtiveram resultados de produção fecal próximos a outras proteínas convencionais quando utilizaram a biomassa de *Candida utilis* (Torula) na dieta de gatos.

Outra hipótese levantada está relacionada às características do ingrediente. Estudos anteriores destacaram a capacidade da proteína de Pekilo® de reter água em produtos alimentícios, contribuindo para a manutenção da umidade e consistência dos alimentos (KOIVURINTA *et al.*, 1979; KOIVURINTA *et al.*, 1980). Essa propriedade pode impactar a umidade das fezes em maiores inclusões na dieta, aumentando consequentemente a produção fecal. Esse efeito foi observado no estudo de Holt e Aldrich (2022) em dietas para gatos contendo farelo de soja e proteína de ervilha.

Neste experimento, foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os coeficientes de digestibilidade aparente avaliados (CDAMS, CDAMO, CDAMM, CDAPB, CDAEEHA, CDAEB) e energia metabolizável. A dieta controle e 4% de inclusão de SCP apresentaram coeficientes próximo, sem impactar negativa na digestibilidade da ração. A partir da inclusão de 8% da SCP foram limítrofes na redução dos coeficientes de digestibilidade, enquanto 16% reduziram o CDA. Os resultados obtidos corroboram com o experimento de Hooft *et al.* (2024), em que ocorreu redução linear nos coeficientes de digestibilidade da proteína e energia bruta com níveis de inclusão crescentes em rações para salmão do atlântico em água doce.

A quantidade de fibras estruturais não fermentáveis na biomassa das SCPs pode ter influenciado na digestibilidade dos nutrientes. Em um experimento envolvendo a utilização da levedura de torula (*C. utilis*) em rações para gatos, também obteve menor CDA para matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, gordura e energia bruta em comparação com outras fontes proteicas, em principal, fontes de proteína animal (HOLT & ALDRICH, 2022).

O estudo de Kilburn-Kappeler *et al.* (2023) corrobora com essa observação, relatando digestibilidade reduzida para todos os nutrientes em rações contendo proteína fermentada de milho (PFM) e DDGS (*Dried Distillers Grains with Solubles*) com levedura seca de cervejaria (BDY), em comparação com a dieta controle. Os valores de fibra dietética total e insolúvel foram de 15,05% e 12,40% para PFM e 18,46% e 14,34% para DDGS+BDY, respectivamente, enquanto na dieta controle os valores eram de 13% e 10%, evidenciando o impacto do maior teor de fibra na digestibilidade dos nutrientes.

No entanto, no estudo de Davenport *et al.* (2023) não constatou diferença nos coeficientes de digestibilidade aparente da dieta contendo *Saccharomyces cerevisiae* em comparação com a dieta controle. A diferença na composição da biomassa de fungos filamentosos e leveduras pode elucidar a diferença entre as os parâmetros de digestibilidade.

Os resultados indicam que, embora a digestibilidade do ingrediente seja inferior a fontes convencionais, os efeitos de redução da digestibilidade só foram observados a partir de 8% de inclusão nas dietas. Além disso, as dietas com 4, 8 e 16% do ingrediente apresentaram coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) acima de 80% para os principais nutrientes, exceto para a matéria mineral, demonstrando que, até 8%, a inclusão não compromete a digestibilidade e pode ser viável, especialmente se houver benefícios como custo acessível e funcionalidades desejáveis.

Os metabólitos de fermentação microbiana desempenham papel essencial na relação entre a microbiota gastrointestinal e a saúde do hospedeiro, sendo diretamente influenciados pela composição da dieta (CELI *et al.*, 2019). Compostos como acetato, propionato e butirato, são produtos principais da fermentação bacteriana de fibras e proteínas não digeríveis, promovendo benefícios multifuncionais, incluindo efeitos imunomoduladores, regulação da motilidade intestinal e proteção contra patógenos sensíveis ao pH ácido (BINDER, 2010; MINAMOTO *et al.*, 2019). Entretanto, no presente estudo, as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta não foram afetadas pela inclusão de até 16% do ingrediente na dieta ($p > 0,05$).

Uma das possíveis explicações para este resultado é que a maior parte dos AGCC são rapidamente absorvidos no lúmen intestinal. Sendo assim, as concentrações obtidas nas fezes podem subestimar a real produção desses metabólitos e o efeito do ingrediente (VON ENGELHARDT, 1995; STROMPFOVÁ, *et al.*, 2017).

Uma segunda hipótese para os resultados obtidos no estudo está nos baixos teores de carboidratos fermentáveis presente no ingrediente e capacidade fermentativa para os microrganismos do TGI, uma vez que as fontes ou teores desses carboidratos podem influenciar diretamente a produção de AGCC (HARRIS *et al.*, 2021). Nesse sentido, no trabalho de Kaelle *et al.* (2023), a inclusão crescente de HPDDGS (*High Protein Dried Distillers Grains with Solubles*), não afetou a digestibilidade e os produtos de fermentação avaliados, provavelmente ocasionado pelo menor conteúdo de fibra fermentável para os microrganismos em comparação com o DDGS.

Em contraste com os resultados apresentados nesta dissertação, o estudo de Reilly *et al.* (2021) relatou que tratamentos contendo leguminosas e levedura como principais fontes proteicas apresentaram maiores concentrações de AGCC em comparação ao tratamento controle. Além disso, as concentrações de AGCR foram mais elevadas no tratamento com levedura, sugerindo que diferente da SCP em estudo, a composição estrutural da levedura intensificou tanto a fermentação sacarolítica quanto a

proteolítica no cólon.

Outros produtos de fermentação, como amônia, aminas biogênicas e aminoácidos de cadeia ramificada (AGCR) são compostos gerados a partir da degradação de proteínas que não foram absorvidas e chegam ao cólon. Esses metabólitos são conhecidos pela toxicidade, interferindo na homeostase e comprometendo a funcionalidade intestinal (CELI *et al.*, 2019). Neste presente trabalho não foram encontradas diferença estatística significativas para estes produtos fermentativos com as inclusões de 4, 8 e 16% do ingrediente proteico na dieta.

Os resultados obtidos no estudo foram semelhantes aos de Kilburn-Kappeler *et al.* (2023a), que avaliaram dietas contendo proteína fermentada de milho (PFM) e DDGS (*Dried Distillers Grains with Solubles*) com levedura seca de cervejaria (BDY). Esses estudos sugerem que a baixa fermentação observada pode estar relacionada ao alto teor de fibras indigeríveis presentes no ingrediente. Essas que podem interagir com proteínas, reduzindo a disponibilidade para fermentação pelas bactérias do trato gastrointestinal (TGI).

Uma outra possibilidade está relacionada a elevada digestibilidade das fontes proteicas e das dietas, gerando menor fluxo de proteínas não digeridas no intestino grosso limitando a disponibilidade de substrato para as bactérias do TGI (ADEDAYO *et al.*, 2011; URREGO *et al.*, 2017).

Por outro lado, dietas com alto teor de proteínas, mesmo quando altamente digestíveis, podem exceder a capacidade do trato gastrointestinal de digerir e absorver todos os nutrientes, permitindo que uma quantidade significativa de proteínas alcance o intestino, tornando disponível para fermentações proteolíticas (NERY *et al.*, 2012; PINNA *et al.*, 2018).

Em um estudo de Pinna *et al.* (2018) avaliaram a influência das inclusões de baixa e alta proteína com e sem inclusão de frutooligossacarídeo (FOS) nos produtos de fermentação em cães. Os resultados indicaram que existe relação direta entre o teor de proteína da dieta e quantidade de amônia nas fezes, porém a mesma correlação não ocorreu com os demais produtos de fermentação avaliados.

Uma das possibilidades para a pouca variação nos produtos de fermentação apresentados neste estudo, pode estar relacionada a teor de fibras insolúveis não fermentáveis e o conteúdo da parede celular do ingrediente. A parede celular de leveduras e fungos, possuem componentes funcionais como a presença de betaglucanas, mananoligossacarídeos (MOS) (SANTOS *et al.*, 2018; OLIVEIRA MATHEUS *et al.*,

2021). Entretanto, pode apresentar componentes estruturais que se não forem processados de forma adequada, resistem à ação enzimática no trato digestivo e pode afetar a disponibilidade de macronutrientes para fermentação no intestino grosso (ADEDAYO *et al.*, 2011; RITALA *et al.*, 2017).

A microbiota intestinal é composta por uma diversidade complexa de microrganismos, incluindo bactérias, archaea, fungos, protozoários e vírus, que habitam o trato gastrointestinal de mamíferos (SUCHODOLSKI, 2011). Dentre esses, as bactérias (Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes) representam a maior parcela, correspondendo a cerca de 98% do sequenciamento metagenômico de amostras fecais em cães e gatos de indivíduos saudáveis (TUN *et al.*, 2012)

A dieta desempenha papel crucial na saúde gastrointestinal, moldando a microbiota fecal e influenciando a produção de metabólitos, como os ácidos graxos de cadeia curta, essenciais para a integridade intestinal. Alterações nos macronutrientes, especialmente proteínas e fibras, impactam a composição microbiana e o metabolismo fecal em gatos (BARKO *et al.*, 2018; PILLA & SUCHODOLSKI, 2021).

A alfa-diversidade representa o número e a abundância de espécies encontradas em uma amostra ou local específico, ou seja; a riqueza e a diversidade de uma amostra (SUCHODOLSKI, 2021). Os resultados obtidos pelos índices Chao1, ASVs Observadas e Fisher indicam que a inclusão de 8% de na dieta pode ter promovido um efeito seletivo positivo sobre determinados grupos bacterianos, resultando em maior riqueza microbiana. Essa maior riqueza pode ser atribuída à presença de β -glucanas e outros polissacarídeos presentes na biomassa de *P.variotii* que atuam como substratos fermentáveis para a microbiota intestinal (RITALA *et al.*, 2017, HOLT & ALDRICH, 2022). Entretanto, os resultados obtidos acerca dos produtos de fermentação acabam por não reforçar esta hipótese, pois não ocorreu aumento na fermentação microbiana/ produtos de fermentação com a inclusão nos tratamentos avaliados.

Apesar do aumento na riqueza, a ausência de mudanças significativas nos índices de uniformidade e equitabilidade (Simpson, Shannon e Pielou) sugere que a inclusão do ingrediente não provocou alteração considerável na estrutura da microbiota, mantendo a funcionalidade basal e distribuição equilibrada das abundâncias relativas entre as espécies.

A beta-adversidade refere-se a diferença na composição das espécies ou quão semelhante é uma amostra a outra com base nas taxas presentes (SUCHODOLSKI, 2021). Os resultados para β -adversidade não indicaram diferença estatisticamente

significativa ($p > 0,05$), mas sim uma tendência ($p = 0,088$) que a inclusão do ingrediente proteico possa ter promovido alterações no perfil microbiano, em específico, a inclusão 16%. Essa tendência de alteração no perfil da microbiota pode estar relacionada a particularidades na composição do ingrediente avaliado pela inclusão mais alta (16%). Entretanto, não foi comprovada alteração na microbiota ou na produção de produtos de fermentação no experimento *in vivo*.

Os resultados obtidos são consistentes com o estudo de Kilburn-Kappeler *et al.* (2024) que avaliou o impacto da proteína fermentada de milho (PFM) na microbiota fecal de gatos. Para β -adversidade não obteve diferença significativa em comparação com as outras dietas, porém obteve para alfa-diversidade, indicando que não impacta fortemente a beta-diversidade, as fontes proteicas podem influenciar seletivamente populações microbianas específicas, possivelmente pelas diferenças nos substratos disponíveis e as interações com o metabolismo microbiano.

Uma das hipóteses para ausência de significância estatística poderia estar relacionada ao período curto de adaptação à dieta, já que mudanças na composição microbiana podem requerer períodos mais longos para se estabilizarem. No experimento, o período total de adaptação da microbiota dos animais com as dietas foi de 20 dias, tempo similar ou maior que outros autores empregaram (KANAKUPT *et al.*, 2011; BARRY *et al.*, 2014; GONZÁLEZ *et al.*, 2023).

Um outro ponto que vale ressaltar é que a diversidade microbiana varia ao longo do trato intestinal, e gatos apresentam alta variabilidade entre as microbiotas individuais, podendo ter limitado a detecção de mudanças estatisticamente significativas (SUCHODOLSKI, 2021; SHI *et al.*, 2024).

Com relação a predominância dos filos, no presente estudo, dos 8 filos avaliados 2 destacaram-se dos demais, tendo o valor somado cerca de 98% da abundância relativa presentes nas fezes dos gatos alimentos. Os filos predominantes na microbiota dos animais foram o Firmicutes (58%), seguido pelo Actinobacteria (40%), e por último Bactoidetes (2%), as porcentagens dos outros filos foram levadas em consideração, mas não chegaram a 1% da abundância relativa.

Foi possível observar que a abundância relativa da microbiota dos gatos foi alterada com as inclusões avaliadas no experimento. O tratamento controle possuiu 57% da abundância do filo Actonbacteria e 42% para Firmicutes, em comparação com o tratamento com 16% em que ocorreu modificação da abundância relativa para 74% de Firmicutes e 24% Actnobacteria. Apesar disso, as inclusões crescentes do ingrediente não

geraram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) na composição dos filos bacterianos.

A prevalência dos filos na microbiota difere dos resultados encontrados na literatura. Kilburn-Kappeler *et al.* (2024) obteve resultados diferentes com relação a predominância dos filos em gatos, e as 3 predominâncias principais foram de Firmicutes (66%), Bacteroidetes (25%) e por último Actinobacteria (8%).

No trabalho Tun *et al.* (2012) utilizando análise metagenômica centrada em genes, a ordem dos filos era disposta por Bacteroidetes (68%), Firmicutes (13%), Proteobacteria (6%), Actinobacteria (1,2%) e Fusobacteria (0,7%). Já para o estudo de Ritchie *et al.*, (2008) os filos mais abundantes seguiam a ordem de Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria e Actinobacteria.

O filo Firmicutes é o principal filo encontrado na microbiota de gatos, consiste em uma *taxa* bastante ampla, abrangendo classes importantes como Bacilli e Clostridia, que incluem tanto espécies produtoras de AGCC quanto gêneros reconhecidos pelos benefícios ao organismo, como *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Blautia* e *Turicibacter*. No entanto, também estão presentes gêneros conhecidos pela patogenicidade, como *Streptococcus* e *Staphylococcus* (SUCHODOLSKI, 2021).

Por outro lado, o filo Actinobacteria, mesmo sendo um dos predominantes na microbiota, normalmente está posicionado em terceiro ou quarto na abundância relativa de felídeos. Este filo é tipicamente composto por colonizadores do intestino delgado (região do íleo), destacando-se os gêneros *Bifidobacterium*, *Atopobium* e *Collinsella* (RITCHIE *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2024). HOODA *et al.* (2013) observaram aumento no filo Actinobacteria em gatos filhotes que foram alimentados com dietas contendo média proteína e carboidratos em comparação com dietas de alta proteína e baixo carboidrato, destacando que dietas com maiores níveis de carboidratos favorecem o crescimento de bactérias sacarolíticas deste filo como *Bifidobacterium*,

Por último temos o filo Bacteroidetes com uma prevalência de 2% entre os tratamentos avaliados, é um dos filos mais predominantes no intestino de felinos, junto ao Firmicutes (RITCHIE *et al.* 2008; SUCHODOLSKI, 2011). Este filo é conhecido principalmente pelas bactérias do gênero *Bacteroides* e *Prevotella*, a última sendo uma das principais bactérias presentes na microbiota dos cães e gatos, estando associada ao processo de fermentação de carboidratos e fibras para produção de AGCC e AGCR (ALESSANDRI *et al.*, 2020).

Dentre as 42 famílias avaliadas no estudo, as que possuíram maior destaque em relação a abundância foram: Atopobiaceae (28%), Megasphaeraceae (22%),

Ruminococcaceae (9%), Peptostreptococcaceae (9%), Bifidobacteriaceae (6%), Clostridiaceae (5%), Lachnospiraceae (5%).

Alterações foram observadas na abundância relativa das famílias Megasphaeraceae, Ruminococcaceae e Atopobiaceae, que com a inclusão de 16% da SCP a família Megasphaeraceae passou de 10% para 49% em comparação ao controle. Por outro lado, a abundância relativa das famílias Ruminococcaceae e Atopobiaceae apresentou redução, passando de 10% para 2% e de 39% para 17%, respectivamente

As famílias Bifidobacteriaceae e Lactobacillaceae apresentaram comportamentos opostos no experimento. A abundância relativa de Bifidobacteriaceae diminuiu com a inclusão do ingrediente na dieta, enquanto Lactobacillaceae alcançou maior valor com a inclusão de 16%. Entretanto, não ocorreu diferença estatística ($p > 0,05$) com o controle e as inclusões de 4, 8 e 16%.

Microrganismos das famílias Bifidobacteriaceae e Lactobacillaceae possuem grande importância para a saúde intestinal. São conhecidos pela produção de ácido lático que pode servir como substrato para outras bactérias produzirem AGCC, além de ter função importante na acidificação do pH das fezes e controle de bactérias patogênicas. (BINDER, 2010; BARKO *et al.*, 2018).

Em humanos, a família Atopobiaceae destaca-se pela resistência aos ácidos biliares devido à atividade das enzimas hidrolases de sais biliares (MORINAGA *et al.*, 2022). Além disso, pesquisas recentes também apontam que a presença de microrganismos da família Atopobiaceae pode contribuir para a proteção contra patógenos multirresistentes e para a modulação positiva da microbiota intestinal, especialmente em resposta ao uso de prebióticos. (DUCARMON *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2022).

As famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae destacam-se pela degradação de fibras e polissacarídeos complexos, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, em principal o butirato, sendo conhecidas como principais produtoras desse ácido graxo essencial para a nutrição celular do cólon (KIM *et al.*, 2023). Alterações em sua abundância podem estar associadas a distúrbios inflamatórios intestinais (NAGAO-KITAMOTO & KAMADA, 2017; MARSILIO *et al.*, 2019).

Em relação aos principais gêneros avaliados, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$). No entanto, de acordo com os resultados apresentados para as famílias, o gênero *Megasphaera* mostrou crescimento na abundância relativa com a inclusão de Pekilo®, atingindo maior prevalência com 16% de inclusão,

com valores de 48%. Esse aumento sugere uma resposta adaptativa a possível incremento na disponibilidade de substratos específicos que favorecem este gênero. Em contraste, os gêneros *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Clostridium* e *Gemmiger* apresentaram maiores valores relativos nas dietas sem adição (0%) ou com 4% de inclusão, enquanto a abundância diminuiu em inclusões mais elevadas (8-16%). Essa redução pode indicar sensibilidade desses gêneros a determinados componentes nutricionais presentes no ingrediente.

Ocorreu diminuição semelhante no gênero *Bifidobacterium* no trabalho de Kilburn-Kappeler *et al.* (2024) avaliando a microbiota de gatos alimentados com dietas contendo DDGS + levedura e proteína fermentada de milho, indicando que a diminuição deste gênero pode estar relacionada à similaridade da composição dos ingredientes proteicos.

As bactérias do gênero *Megasphaera* possuem grande importância para a saúde intestinal. Dentre elas, a espécie *Megasphaera elsdenii* é conhecida pela capacidade de utilizar o ácido lático como substrato para a produção de butirato, importante para as funções de regeneração epitelial e absorção de água e eletrólitos no intestino grosso (HASHIZUME *et al.*, 2003). Além disso, contribui para a normalização do pH fecal e pode auxiliar na recuperação de disbioses intestinais e condições inflamatórias, promovendo melhorias na saúde da mucosa e na imunidade local (YOSHIDA *et al.*, 2009).

As modificações que ocorreram com relação a abundância relativa na microbiota, podem ter sido influenciadas pelos nutrientes disponibilizados com a inclusão da proteína avaliada. Apesar disso, a ausência de significância estatística indica que esses efeitos podem não ter sido suficientes para gerar impactos consideráveis no ecossistema microbiano.

5. CONCLUSÃO

O ingrediente apresentou coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) inferiores aos de fontes proteicas convencionais. No estudo de dose-resposta, a inclusão de até 4% não alterou os CDA, e a partir deste nível são observadas modificações na digestibilidade e produção fecal. Não foram observadas alterações nos metabólitos fecais, pH ou microbiota fecal, embora tenha havido alteração na alfa-diversidade com inclusão de 8%. Além disso, os gatos demonstraram preferência por dietas sem o ingrediente ou com menores níveis de inclusão, em comparação com níveis mais elevados. Pode-se concluir que a SCP é uma fonte proteica viável para uso em dietas de gatos, mantendo boa aceitação e sem efeitos indesejáveis sobre a qualidade fecal, sendo sua inclusão determinada pelas características do alimento formulado, pelo custo e por aspectos relacionados à sustentabilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEDAYO, M. R.; AJIBOYE, E. A.; AKINTUNDE, J. K.; ODAIBO, A. Single cell proteins: as nutritional enhancer. **Advances in Applied Science Research**, 2, n. 5, p. 396-409, 2011.
- ALDRICH, G. C.; KOPPEL, K. Pet food palatability evaluation: a review of standard assay techniques and interpretation of results with a primary focus on limitations. **Animals**, 5, n. 1, p. 43-55, 2015.
- ALESSANDRI, G.; MILANI, C.; MANCABELLI, L.; LONGHI, G. *et al.* Deciphering the bifidobacterial populations within the canine and feline gut microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, e02875-19, 86, n. 7, 2020.
- ALLENSPACH, K.; SUNG, C. H.; CERON, J. J.; PERES RUBIO, C. *et al.* Effect of the Probiotic *Bacillus subtilis* DE-CA9TM on Fecal Scores, Serum Oxidative Stress Markers and Fecal and Serum Metabolome in Healthy Dogs. **Veterinary Sciences**, 10, n. 9, p. 566, 2023-09-11 2023. Article.
- AOAC. **AOAC - Association of official analytical chemists. Official methods of analysis**. 1990. (AOAC International, Arlington, VA, 15th.
- BAJIĆ, B.; VUČUROVIĆ, D.; VASIĆ, J.; JEVTIĆ-MUČIBABIĆ, R. *et al.* Biotechnological production of sustainable microbial proteins from agro-industrial residues and by-products. **Foods**, 107, 12, n. 1, 2022.
- BAJPAI, P. Single-cell protein from lignocellulosic wastes. *In: Single Cell Protein Production from Lignocellulosic Biomass*: Springer, 2017. cap. 7, p. 41-58.
- BARKO, P. C.; MICHAEL, M. A.; SWANSON, K. S.; WILLIAMS, D. A. The gastrointestinal microbiome: a review. **Journal of veterinary internal medicine**, 32, n. 1, 2018.
- BARRY, K. A.; HERNOT, D. C.; VAN LOO, J.; FAHEY JR, G. C. *et al.* Fructan supplementation of senior cats affects stool metabolite concentrations and fecal microbiota concentrations, but not nitrogen partitioning in excreta. **Journal of animal science**, 92, n. 11, p. 4964-4971, 2014.
- BINDER, H. J. Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea. **Annual review of physiology**, 72, n. 1, p. 297-313, 2010.
- BOLAND, M. J.; RAE, A. N.; VEREIJKEN, J. M.; MEUWISSEN, M. P. *et al.* The future supply of animal-derived protein for human consumption. **Trends in Food Science & Technology**, 29, n. 1, p. 62-73, 2013.
- BRADSHAW, J. W. S.; HEALEY, L. M.; THORNE, C. J.; MACDONALD, D. W. *et al.* Differences in food preferences between individuals and populations of domestic cats *Felis silvestris catus*. **Applied Animal Behaviour Science**, 68, n. 3, p. 257-268, 2000.

- CALDERÓN, N.; WHITE, B. L.; SEO, H. S. Measuring palatability of pet food products: Sensory components, evaluations, challenges, and opportunities. **Journal of Food Science**, 89, n. 12, p. 8175 – 8196, 2024.
- CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, 7, n. 5, p. 335-336, 2010.
- CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D. *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the national academy of sciences**, 108, p. 4516-4522, 2011.
- CARCIOFI, A. C. Fontes de proteína e carboidratos para cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 37, p. 28-41, 2008.
- CARCIOFI, A. C. **Princípios de Avaliação dos Alimentos - Necessidades Nutricionais e de Energia - Processamento de Alimentos para Cães e Gatos.** Unesp - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), p. 109. 2019.
- CARCIOFI, A. C.; DE-OLIVEIRA, L. D.; VALÉRIO, A. G.; BORGES, L. L. *et al.* Comparison of micronized whole soybeans to common protein sources in dry dog and cat diets. **Animal Feed Science and Technology**, 151, n. 3-4, p. 251-260, 2009.
- CAVALARI, A. P. D. M.; DONZELE, J. L.; VIANA, J. A.; ABREU, M. L. T. D. *et al.* Determinação do valor nutritivo de alimentos energéticos e protéicos utilizados em rações para cães adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35, 2006.
- CELI, P.; VERLHAC, V.; CALVO, E. P.; SCHMEISSER, J. *et al.* Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. **Animal Feed Science and Technology**, 250, p. 9-31, 2019.
- CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical chemistry**, 8 n. 2, p. 130-132, 1962.
- CHUN, J. L.; BANG, H. T.; JI, S. Y.; JEONG, J. Y. *et al.* A simple method to evaluate body condition score to maintain the optimal body weight in dogs. **Journal of animal science and technology**, 366, 61, n. 6, 2019.
- DAVENPORT, G. M.; BLOCK, S. S.; ADOLPHE, J. L. Effects of extruded pet foods containing dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on palatability, nutrient digestibility, and fecal quality in dogs and cats. **Translational Animal Science**, txad107, 7, n. 1, 2023.
- DE FIGUEIREDO, T. C. **Características físico-química e microbiológica e aminos bioativas em ovos de consumo.** 2008. (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Repositório UFMG. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/FRPO-7KXH2B>.
- DE OLIVEIRA MATHEUS, L. F.; RISOLIA, L. W.; ERNANDES, M. C.; DE

- SOUZA, J. M. *et al.* Effects of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall addition on feed digestibility, fecal fermentation and microbiota and immunological parameters in adult cats. **BMC Veterinary Research**, n. 17, p. 1-10, 2021.
- DEGNAN, P. H.; OCHMAN, H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. **The ISME journal**, 6, n. 1, p. 183-194, 2012.
- DUCARMON, Q. R.; TERVEER, E. M.; NOOIJ, S.; BLOEM, M. N. *et al.* Microbiota-associated risk factors for asymptomatic gut colonisation with multi-drug-resistant organisms in a Dutch nursing home. **Genome Medicine**, 13, n. 54, p. 1-17, 2021.
- ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science** 44, p. 1768-1771, 1961.
- FEDIAF. **The European Pet Food industry. Nutrition Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs.** The European Pet Food Industry Federation, 2021.
- FÉLIX, A. P.; ZANATTA, C. P.; BRITO, C. B. M.; MURAKAMI, F. Y. *et al.* Suplementação de manoligossacarídeos (MOS) e uma mistura de alumino silicatos na qualidade das fezes de cães adultos **Archives of Veterinary Science**, 14, n. 1, p. 31-35, 2009.
- FERREIRA, L. G.; ENDRIGHI, M.; LISENKO, K. G.; DE OLIVEIRA, M. R. D. *et al.* Oat beta-glucan as a dietary supplement for dogs. **PLoS One**, e0201133, 13, n. 7, 2018.
- GONZÁLEZ, F.; CARELLI, A.; KOMARCHEUSKI, A.; UANA, M. *et al.* Yeast cell wall compounds on the formation of fermentation products and fecal microbiota in cats: an in vivo and *in vitro* approach. **Animals**, 637, 13, n. 4, 2023.
- HARRIS, H. C.; MORRISON, D. J.; EDWARDS, C. A. Impact of the source of fermentable carbohydrate on SCFA production by human gut microbiota *in vitro*-a systematic scoping review and secondary analysis. **Critical reviews in food science and nutrition**, 61, n. 22, p. 3892-3903, 2021.
- HASHIZUME, K.; TSUKAHARA, T.; YAMADA, K.; KOYAMA, H. *et al.* *Megasphaera elsdenii* JCM1772T normalizes hyperlactate production in the large intestine of fructooligosaccharide-fed rats by stimulating butyrate production. **The Journal of nutrition**, 133, n. 10, p. 3187-3190, 2003.
- HOLT, D. A.; ALDRICH, C. G. Evaluation of *Torula* yeast as a protein source in extruded feline diets. **Animal Science**, skac327, 100, n. 12, 2022.
- HOODA, S.; BOLER, B. M. V.; KERR, K. R.; DOWD, S. E. *et al.* The gut microbiome of kittens is affected by dietary protein: carbohydrate ratio and associated with blood metabolite and hormone concentrations. **British Journal of Nutrition**, 109, n. 9, p. 1637-1646, 2013.

HOOFT, J. M.; MONTERO, R.; MORALES-LANGE, B.; BLIHOVDE, V. F. *et al.* Paecilomyces variotii (PEKILO®) in novel feeds for Atlantic salmon: Effects on pellet quality, growth performance, gut health, and nutrient digestibility and utilization. **Aquaculture**, 740905, 589, 2024.

HOOFT, J. M.; TRAN, H. Q.; MONTERO, R.; MORALES-LANGE, B. *et al.* Environmental impacts of the filamentous fungi Paecilomyces variotii (PEKILO®) as a novel protein source in feeds for Atlantic salmon (Salmo salar). **Aquaculture**, 741779, 596, 2025.

KAELE, G. C. B.; BASTOS, T. S.; FERNANDES, E. L.; DE SOUZA, R. B. M. D. S. *et al.* High-protein dried distillers grains in dog diets: diet digestibility and palatability, intestinal fermentation products, and fecal microbiota. **Journal of Animal Science**, skad128, 101, 2023.

KANAKUPT, K.; VESTER BOLER, B. M.; DUNSFORD, B. R.; FAHEY JR, G. C. 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. **Journal of animal science**, 89, n. 5, p. 1376-1384, 2011.

KENDALL, P. T.; HOLME, D. W. Studies on the digestibility of soya bean products, cereals, cereal and plant by-products in diets of dogs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 33, n. 9, p. 813-822, 1982.

KILBURN-KAPPELER, L. R.; ALDRICH, C. G. Evaluation of a yeast β -glucan blend in a pet food application to determine its impact on stool quality, apparent nutrient digestibility, and intestinal health when fed to dogs. **Frontiers in Animal Science**, 1125061, 4, 2023.

KILBURN-KAPPELER, L. R.; DOERKSEN, T.; LU, A.; PALINSKI, R. M. *et al.* Evaluation of corn fermented protein on the fecal microbiome of cats. **Journal of Animal Science**, skae268, 102, 2024.

KILBURN-KAPPELER, L. R.; PAULK, C. B.; ALDRICH, C. G. Diet production and utilization of corn fermented protein compared to traditional yeast in healthy adult cats. **Journal of Animal Science**, skad272, 101, 2023.

KIM, H.; SEO, J.; PARK, T.; SEO, K. *et al.* Obese dogs exhibit different fecal microbiome and specific microbial networks compared with normal weight dogs. **Scientific Reports**, 723, 13, n. 1, 2023.

KOIVURINTA, J.; KURKELA, R.; KOIBISTOINEN, P. Uses of Pekilo®, a microfungus biomass from Paecilomyces varioti in sausage and meat balls. **International Journal of Food Science & Technology**, 14, n. 6, p. 561-570, 1979.

KOIVURINTA, J.; KURKELA, R.; KOIVISTOINEN, P.; HOLASOVÁ, M. *et al.* Bread baking properties of Pekilo®, a microfungus biomass from Paecilomyces varioti. **Food/Nahrung**, 24, n. 7, p. 597-606, 1980.

- KUNG JR, L.; GRIEVE, D. B.; THOMAS, J. W.; HUBER, J. T. Added ammonia or microbial inocula for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, 67, n. 2, p. 299-306, 1984.
- MARSILIO, S.; PILLA, R.; SARAWICHITR, B.; CHOW, B. *et al.* Characterization of the fecal microbiome in cats with inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma. **Scientific reports**, 19208, 9, n. 1, 2019.
- MARTINS, M. S.; SAKOMURA, N. K.; SOUZA, D. F.; FILHO, F. O. R. *et al.* Brewer's yeast and sugarcane yeast as protein sources for dogs. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 98, n. 5, p. 948-957, 2014.
- MATTERSON, L. D.; POTTER, L. M.; STUTZ, M. W.; SINGSEN, E. P. The metabolizable energy of feed ingredients for chickens. **Agricultural Experimental Station Research Report**, 7, n. 1, 1965.
- MIDDELBOSS, I. S.; GODOY, M. R.; FASTINGER, N. D.; FAHEY JR, G. C. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, 85, n. 11, p. 3022-3032, 2007.
- MINAMOTO, Y.; HOODA, S.; SWANSON, K. S.; SUCHODOLSKI, J. S. Feline gastrointestinal microbiota. **Animal Research Reviews**, 13, n. 1, 2012.
- MORINAGA, K.; KUSADA, H.; TAMAKI, H. Bile salt hydrolases with extended substrate specificity confer a high level of resistance to bile toxicity on atopobiaceae bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, 10980, 23, n. 18, 2022.
- MORRIS, J. G. Idiosyncratic nutrient requirements of cats appear to be diet-induced evolutionary adaptations. **Nutrition Research Reviews**, 15, p. 153-168, 2002.
- NAGAO-KITAMOTO, H.; KAMADA, N. Host-microbial cross-talk in inflammatory bowel disease. **Immune network**, 17, n. 1, p. 1-12, 2017.
- NASSERI, A. T.; RASOUL-AMINI, S.; MOROWVAT, M. H.; GHASEMI, Y. Single cell protein: production and process. **American Journal of food technology**, 6, n. 2, p. 103-116, 2011.
- NEIRINCK, K.; ISTASSE, L.; GABRIEL, A.; VAN EENAEME, C. *et al.* Amino acid composition and digestibility of four protein sources for dogs. **The Journal of nutrition**, suppl_11, 121, p. S64-S65, 1991.
- NERY, J.; GOUDEZ, R.; BIOURGE, V.; TOURNIER, C. *et al.* Influence of dietary protein content and source on colonic fermentative activity in dogs differing in body size and digestive tolerance. **Journal of Animal Science**, 90, n. 8, p. 2570-2580, 2012.
- NRC. NCR - National Research Council. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, D.C: National Academies, 2006. 398 p. 978-0-309-08628-8.
- PARKS, D. H.; CHUVOCHINA, M.; RINKE, C.; MUSSIG, A. J. *et al.* GTDB: an

ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. **Nucleic acids research**, 50, n. D1, p. D785-D794, 2022.

PEKEL, A. Y.; MÜLAZIMOĞLU, S. B.; ACAR, N. Taste preferences and diet palatability in cats. **Journal of applied animal research**, 48, n. 1, p. 281-292, 2020.

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. S. The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, 51, n. 3, p. 605-621, 2021.

PINNA, C.; VECCHIATO, C. G.; BOLDUAN, C.; GRANDI, M. *et al.* Influence of dietary protein and fructooligosaccharides on fecal fermentative end-products, fecal bacterial populations and apparent total tract digestibility in dogs. **BMC veterinary research**, 14, p. 1-10, 2018.

PIRES, K. A.; MILTENBURG, T. Z.; MIRANDA, P. D.; ABADE, C. C. *et al.* Factors affecting the results of food preference tests in cats. **Research in Veterinary Science**, 20, p. 247-254, 2020.

POND, W. G.; CHURCH, D. C.; POND, K. R. **Basic animal nutrition and feeding**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 1995. 615 p.

REILLY, L. M.; HE, F.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; SOUTHEY, B. R. *et al.* Use of legumes and yeast as novel dietary protein sources in extruded canine diets. **Frontiers in Veterinary Science**, 667642, 8, 2021.

RITALA, A.; HÄKKINEN, S. T.; TOIVARI, M.; WIEBE, M. G. Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. **Frontiers in microbiology**, 8, 2017.

RITCHIE, L. E.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis. **FEMS microbiology ecology**, 66, n. 3, p. 590-598, 2008.

SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. 2 ed. 2016. 262 p. 978-85-7805-154-9.

SALO, M. L. The carbohydrate composition and solubility of Pekilo protein and two yeasts. **Acta Agriculturae Scandinavica**, 27, n. 1, p. 77-80, 1977.

SANTOS, J. P. F.; AQUINO, A. A.; GLÓRIA, M. B. A.; AVILA-CAMPOS, M. J. *et al.* Effects of dietary yeast cell wall on faecal bacteria and fermentation products in adult cats. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 102, n. 4, p. 1091-1101, 2018.

SHI, Y.; PENG, G.; GEBREMARIAM, A. A.; IQBAL, M. M. *et al.* Analytical insights, modulation and compositional dynamics of the feline gut microbiota: a review. **Animal Diseases**, 36, 4, n. 1, 2024.

SOARES, N. M. M.; BASTOS, T. S.; KAELE, G. C. B.; DE SOUZA, R. B. M. D. S.

et al. Digestibility and palatability of the diet and intestinal functionality of dogs fed a blend of yeast cell wall and oregano essential oil. **Animals**, 2527, 13, n. 15, 2023.

STROMPFOVÁ, V.; KUBAŠOVÁ, I.; LAUKOVÁ, A. Health benefits observed after probiotic *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 application in dogs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 101, n. 16, p. 6309-6319, 2017.

SUCHODOLSKI, J. S. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, 41, n. 2, p. 261-272, 2011.

SUCHODOLSKI, J. S. Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, 50, n. 51, p. 6-17, 2021.

TUN, H. M.; BRAR, M. S.; KHIN, N.; JUN, L. *et al.* Gene-centric metagenomics analysis of feline intestinal microbiome using 454 junior pyrosequencing. **Journal of microbiological methods**, 88, n. 3, p. 369-376, 2012.

URREGO, M. I. G.; MATHEUS, L. F. D. O.; DE MELO SANTOS, K.; ERNANDES, M. C. *et al.* Effects of different protein sources on fermentation metabolites and nutrient digestibility of brachycephalic dogs. **Journal of nutritional science**, e43, 6, 2017.

VON ENGELHARDT, W.; RÖNNAU, K.; RECHKEMMER, G.; SAKATA, T. Absorption of short-chain fatty acids and their role in the hindgut of monogastric animals. **Animal Feed Science and Technology**, 23, n. 1-3, p. 43-53, 1989.

YOSHIDA, Y.; TSUKAHARA, T.; USHIDA, K. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* Lq80 and *Megasphaera elsdenii* iNP-001 induces efficient recovery from mucosal atrophy in the small and the large intestines of weaning piglets. **Animal Science Journal**, 80, n. 6, p. 709-715, 2009.

ZHAO, X.; ZHOU, S.; YAN, R.; GONG, C. *et al.* Parishin from *Gastrodia elata* ameliorates aging phenotype in mice in a gut microbiota-related manner. **Frontiers in Microbiology**, 877099, 13, 2022.

ZORAN, D. L. The carnivore connection to nutrition in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 221, n. 11, p. 1559-1567, 2002.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As inclusões do ingrediente não alteraram as concentrações de metabólitos fecais nem o pH fecal durante o experimento. Uma das possíveis explicações para esse resultado está na composição da fibra presente no ingrediente, que inclui fibras insolúveis e componentes da parede celular. Esses elementos podem dificultar a fermentação microbiana e aumentar a produção fecal. Em estudos futuros, a separação desses componentes do ingrediente pode resultar em um produto com maior digestibilidade e características que favoreçam a fermentação microbiana.

Com relação à microbiota intestinal, a inclusão do ingrediente em 8% promoveu maior diversidade alfa nos componentes Chao1 e Fisher. Entretanto, esse efeito não foi observado nos índices Simpson, Shannon e Pielou, assim como na beta-diversidade e na abundância dos táxons. Esses achados sugerem que a proteína unicelular (SCP) tem potencial para modular a microbiota intestinal, porém, nos níveis testados, a inclusão não foi suficiente para gerar diferenças estatisticamente significativas.

A digestibilidade do ingrediente avaliado foi inferior a outras fontes convencionais para a maioria dos nutrientes, especialmente no que se refere à proteína bruta (PB). No entanto, quando incluído nas dietas, até 4% obteve resultados semelhantes a dieta controle, apenas obtendo impacto negativos sobre a digestibilidade a partir de níveis superiores a 8%. Isso sugere que, caso o ingrediente apresente fatores favoráveis à sua inclusão em formulações, como custo acessível e funcionalidades desejáveis, sua utilização em até 8% pode ser viável sem comprometer a digestibilidade.

Além disso, a digestibilidade da matéria seca da dieta controle foi considerada elevada e compatível com um alimento de alto padrão para gatos, reforçando que, mesmo nesses alimentos, a inclusão de proteínas unicelulares (SCP) em até 8% pode ser uma estratégia viável.

Considerando o elevado teor de beta-glucanas neste ingrediente, estudos futuros, sobre a funcionalidade na resposta imunológica dos animais, são recomendados. Da mesma forma, a determinação na pegada ambiental da produção deste ingrediente, torna-se fundamental, visando contribuir na escolha de formuladores de *Pet food*, os quais consideram os aspectos de segurança do alimento, nutricionais, funcionais e ambientais ao escolher os ingredientes para as formulações.

8. APÊNDICES

Tabela 12A. Abundância relativa dos principais filós bacterianos em amostras fecais de gatos alimentados com níveis crescentes de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta.

Filo (%)	Controle	4%	8%	16%	p-valor	FDR*
Actinobacteriota	56,64	37,99	40,73	24,14	0,1360	0,3998
Asgardarchaeota	0,00	0,00	0,00	0,00	0,9097	0,9232
Bacteroidota	1,22	2,03	4,62	1,03	0,5814	0,7701
Campylobacterota	0,02	0,03	0,06	0,00	0,1432	0,3998
Desulfobacterota	0,02	0,00	0,01	0,00	0,6300	0,7701
Firmicutes	2,06	4,14	4,75	7,05	0,2921	0,5355
Firmicutes_A	27,53	39,44	34,30	13,73	0,1693	0,3998
Firmicutes_B	0,06	0,03	0,03	0,01	0,1817	0,3998
Firmicutes_C	11,95	16,01	15,23	53,67	0,1750	0,3998
Fusobacteriota	0,02	0,03	0,02	0,02	0,9232	0,9232
Proteobacteria	0,48	0,30	0,25	0,34	0,5009	0,7701

*FDR – *False discovery rate*

Tabela 13A. Abundância relativa das principais famílias bacterianas em amostras fecais de gatos alimentados com níveis crescentes de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta.

Família (%)	Controle	4%	8%	16%	p-valor	FDR*
Acidaminococcaceae	0.08	0.22	0.09	0.33	0.2768	0.5733
Actinomycetaceae	0.01	0.01	0.00	0.01	0.4539	0.6983
Acutalibacteraceae	0.07	0.31	0.13	0.02	0.1184	0.5712
Anaerovoracaceae	0.03	0.01	0.01	0.00	0.1000	0.5712
Atopobiaceae	39.24	25.31	29.34	16.65	0.4569	0.6983
Bacillaceae G	0.01	0.01	0.01	0.00	0.7397	0.8136
Bacteroidaceae	1.19	1.93	4.50	1.03	0.6458	0.7680
Bifidobacteriaceae	9.66	6.79	5.41	3.90	0.1785	0.5712
Burkholderiaceae	0.05	0.03	0.05	0.24	0.2553	0.5733
Butyricicoccaceae	0.04	0.06	0.10	0.01	0.2866	0.5733
CAG 508	0.46	0.64	0.98	0.12	0.6190	0.7680
Clostridiaceae	2.62	11.24	4.25	1.24	0.6752	0.7818
Coprobaillaceae	0.47	0.57	0.79	0.36	0.4761	0.6983
Coriobacteriaceae	4.89	4.65	4.64	2.28	0.3828	0.6983
Desulfovibrionaceae	0.02	0.00	0.01	0.00	0.6300	0.7680
Dialisteraceae	0.36	1.39	0.39	0.75	0.6316	0.7680
DRI 13	0.06	0.03	0.03	0.01	0.1817	0.5712

Eggerthellaceae	1.93	1.03	1.06	1.08	0.4621	0.6983
Enterobacteriaceae	0.07	0.01	0.03	0.02	0.8956	0.9447
Enterococcaceae	0.26	0.20	2.32	0.07	0.0180	0.3801
Erysipelotrichaceae	0.56	1.14	1.25	0.26	0.1997	0.5733
Fusobacteriaceae	0.02	0.03	0.02	0.02	0.9232	0.9447
Helicobacteraceae	0.02	0.03	0.06	0.00	0.1432	0.5712
Lachnospiraceae	4.96	5.91	7.35	2.05	0.0876	0.5712
Lactobacillaceae	0.76	2.22	0.39	6.36	0.9797	0.9797
Marinifilaceae	0.01	0.03	0.03	0.00	0.0241	0.3801
Megasphaeraceae	10.41	13.71	13.98	48.61	0.1499	0.5712
Moraxellaceae	0.02	0.00	0.02	0.01	0.2262	0.5733
Muribaculaceae	0.00	0.01	0.02	0.00	0.2117	0.5733
Mycobacteriaceae	0.00	0.00	0.00	0.00	0.1796	0.5712
Neisseriaceae	0.01	0.20	0.09	0.01	0.6356	0.7680
Oscillospiraceae	0.04	0.06	0.06	0.00	0.3234	0.6186
Peptostreptococcaceae	9.22	9.04	10.27	8.01	0.6034	0.7680
Rhizobiaceae	0.02	0.00	0.01	0.00	0.2522	0.5733
Rhizobiaceae A	0.01	0.00	0.01	0.00	0.4533	0.6983
RUG844	0.02	0.01	0.00	0.00	0.2646	0.5733
Ruminococcaceae	10.09	12.15	11.15	2.27	0.0259	0.3801
Selenomonadaceae	1.11	0.69	0.77	3.97	0.5699	0.7680
SOKP01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.9097	0.9447
Sphingomonadaceae	0.28	0.02	0.02	0.02	0.1652	0.5712
Succinivibrionaceae	0.02	0.04	0.03	0.03	0.4248	0.6983
Tannerellaceae	0.02	0.07	0.06	0.00	0.0410	0.4506
UMGS124	0.87	0.17	0.25	0.20	0.1351	0.5712
Não atribuído	0.02	0.02	0.02	0.01	0.7233	0.8136

*FDR – False discovery rate.

Tabela 14A. Abundância relativa dos principais gêneros bacterianos em amostras fecais de gatos alimentados com níveis crescentes de inclusão de Pekilo® (0%, 4%, 8% e 16%) na dieta.

Gênero (%)	Controle	4%	8%	16%	p-valor	FDR*
Achromobacter	0.03	0.01	0.02	0.01	0.2326	0.6073
Acidaminococcus	0.03	0.17	0.04	0.26	0.1849	0.6073
Acinetobacter	0.02	0.00	0.02	0.01	0.2262	0.6073
Acutalibacter	0.01	0.01	0.03	0.00	0.3319	0.6649
Adlercreutzia	1.14	0.61	0.63	0.78	0.5420	0.7649
Agathobaculum	0.02	0.04	0.07	0.01	0.3594	0.6649
Agrobacterium	0.02	0.00	0.01	0.00	0.2522	0.6183
Allisonella	0.04	0.12	0.04	0.03	0.7509	0.8302
Alloprevotella	0.07	0.11	0.36	0.04	0.2038	0.6073

Anaerobiospirillum A	0.01	0.01	0.03	0.02	0.8814	0.9206
Avimicrobium	0.01	0.02	0.05	0.00	0.2565	0.6183
Bacillus A	0.01	0.01	0.01	0.00	0.7397	0.8302
Bacteroides	0.01	0.05	0.09	0.01	0.0795	0.4983
Bifidobacterium	9.66	6.79	5.41	3.90	0.1785	0.6073
Bittarella	0.05	0.14	0.11	0.01	0.1649	0.6073
Blautia	1.58	1.63	1.96	0.42	0.0446	0.3812
Blautia A	0.92	1.39	1.28	0.40	0.4417	0.7231
Bulleidia	0.12	0.30	0.13	0.02	0.0425	0.3812
Burkholderia	0.01	0.00	0.01	0.22	0.6249	0.8072
BX12	0.01	0.00	0.01	0.00	0.7578	0.8302
Caecibacter	0.12	0.30	0.35	0.61	0.2977	0.6636
CA 269	0.10	0.32	0.35	0.05	0.3551	0.6649
CA 793	0.24	0.16	0.30	0.00	0.6441	0.8072
Caproiciproducens	0.00	0.02	0.03	0.00	0.0192	0.3812
Catenibacterium	0.45	0.55	0.73	0.35	0.5172	0.7596
Cetobacterium A	0.01	0.02	0.02	0.02	0.7236	0.8302
Clostridium	0.00	0.01	0.79	0.70	0.0788	0.4983
Clostridium P	2.62	11.24	3.46	0.54	0.7646	0.8302
Clostridium Q	0.29	0.69	0.66	0.22	0.1286	0.6073
Collinsella	4.89	4.65	4.63	2.28	0.3828	0.6834
Denitrobacterium	0.06	0.03	0.05	0.04	0.6187	0.8072
Dialister	0.32	1.27	0.35	0.72	0.4939	0.7596
Dysosmobacter	0.00	0.00	0.01	0.00	0.9721	0.9902
Eisenbergiella	0.10	0.06	0.08	0.02	0.5087	0.7596
Enterocloster	0.03	0.04	0.04	0.00	0.2306	0.6073
Enterococcus B	0.23	0.15	0.05	0.00	0.7540	0.8302
Enterococcus E	0.03	0.05	2.26	0.07	0.0315	0.3812
Erysipelatoclostridium	0.02	0.02	0.06	0.02	0.2148	0.6073
Escherichia	0.07	0.00	0.01	0.01	0.3106	0.6636
Eubacterium R	0.05	0.27	0.06	0.02	0.5452	0.7649
Faecalibacterium	0.02	0.15	0.11	0.00	0.3467	0.6649
Faecalicoccus	0.01	0.00	0.00	0.00	0.0436	0.3812
Fimimorpha	0.00	0.01	0.01	0.00	0.2317	0.6073
Flavonifractor	0.00	0.01	0.00	0.00	0.5756	0.7729
Fournierella	0.02	0.01	0.03	0.01	0.6744	0.8127
Fusobacterium B	0.00	0.00	0.00	0.00	0.5145	0.7596
Gemmiger	9.45	11.56	10.21	2.20	0.0589	0.4617
Harryflintia	0.52	0.25	0.58	0.05	0.0763	0.4983
Holdemanella	0.42	0.84	1.11	0.24	0.3359	0.6649
Intestinimonas	0.02	0.02	0.03	0.00	0.3944	0.6865
JAA XU01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.2646	0.6219
JAGZEG01	0.87	0.17	0.25	0.20	0.1351	0.6073
Lawsonibacter	0.01	0.03	0.02	0.00	0.2221	0.6073

Ligilactobacillus	0.76	2.22	0.39	6.36	0.9797	0.9902
Limisoma	0.00	0.01	0.02	0.00	0.2117	0.6073
Mailhella	0.02	0.00	0.01	0.00	0.6300	0.8072
Mediterraneibacter	0.05	0.05	0.03	0.00	0.6618	0.8127
Megamonas	0.67	0.16	0.13	0.49	0.6675	0.8127
Megasphaera	10.29	13.41	13.63	48.00	0.1499	0.6073
Merdicola	0.11	0.15	0.30	0.05	0.7691	0.8302
Merdisoma	0.02	0.02	0.01	0.00	0.2785	0.6386
Mitsuokella	0.44	0.53	0.64	3.48	0.3106	0.6636
Mycobacterium	0.00	0.00	0.00	0.00	0.1796	0.6073
Odoribacter	0.01	0.03	0.03	0.00	0.0241	0.3812
Olsenella H	0.00	0.01	0.01	0.00	0.7578	0.8302
Parabacteroides	0.02	0.07	0.06	0.00	0.0410	0.3812
Parolsenella	2.06	0.78	1.46	0.76	0.2042	0.6073
Pauljensenia	0.01	0.01	0.00	0.01	0.4539	0.7231
Peptacetobacter	0.11	0.09	0.11	0.06	0.5615	0.7729
Phascolarctobacterium A	0.05	0.04	0.05	0.07	0.9991	0.9991
Phocaeicola	0.24	0.39	0.80	0.24	0.4331	0.7231
Phyllobacterium	0.01	0.00	0.01	0.00	0.4533	0.7231
Plesiomonas	0.00	0.00	0.02	0.01	0.1893	0.6073
Prevotella	0.84	1.35	3.21	0.74	0.7524	0.8302
Pseudobutyricicoccus	0.02	0.01	0.01	0.00	0.3451	0.6649
QFNR01	0.01	0.20	0.09	0.01	0.6356	0.8072
Romboutsia	0.05	0.13	1.11	0.74	0.7772	0.8302
Romboutsia D	0.01	0.01	0.00	0.01	0.4372	0.7231
Roseburia	0.00	0.01	0.04	0.00	0.3607	0.6649
Ruminococcus B	0.42	0.68	1.61	0.79	0.3853	0.6834
Ruthenibacterium	0.01	0.02	0.03	0.00	0.8136	0.8593
Scatomonas	0.00	0.02	0.01	0.00	0.0225	0.3812
Schaedlerella	0.38	0.50	0.75	0.06	0.0096	0.3812
Sellimonas	0.42	0.11	0.20	0.02	0.0272	0.3812
Slackia A	0.73	0.39	0.39	0.26	0.2505	0.6183
SOKP01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.9097	0.9396
Sphingomonas	0.28	0.02	0.02	0.02	0.1652	0.6073
Succinivibrio	0.01	0.03	0.01	0.02	0.5732	0.7729
Sutterella	0.00	0.02	0.03	0.01	0.0962	0.5650
Thermanaerosceptum	0.06	0.03	0.03	0.01	0.1817	0.6073
Thermophilibacter	1.33	0.29	0.55	0.43	0.4691	0.7349
UBA9414	0.01	0.01	0.04	0.00	0.0321	0.3812
VUNA01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.2304	0.6073
Não atribuído	45.75	33.86	37.20	22.80	0.5420	0.7649

*FDR – False discovery rate.