

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO *IN VITRO* DE ALIMENTO EXTRUSADO
E DUAS RAÇAS DE CÃES (BULLDOGUE FRANCÊS E WHIPPET)**

ANA CAROLINE PORTO GOMES

SALVADOR - BA
Agosto de 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO *IN VITRO* DE ALIMENTO EXTRUSADO
E DUAS RAÇAS DE CÃES (BULLDOGUE FRANCÊS E WHIPPET)**

ANA CAROLINE PORTO GOMES

Zootecnista

SALVADOR - BA

Agosto de 2021

ANA CAROLINE PORTO GOMES

**PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO *IN VITRO* DE ALIMENTO
EXTRUSADO E DUAS RAÇAS DE CÃES (BULLDOGUE FRANCÊS
E WHIPPET)**

Dissertação apresentada ao
Programa de Mestrado em
Zootecnia, da Universidade
Federal da Bahia como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção
de Monogástricos

Orientador: Profa. Dra. Bruna Agy Loureiro

Coorientador: Dr. Juraci Marcos Alves Suassuna

SALVADOR – BAHIA

AGOSTO DE 2021

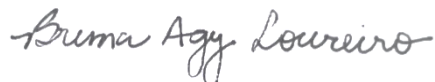
**“PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO *IN VITRO* DE ALIMENTO
EXTRUSADO E DUAS RAÇAS DE CÃES (BULLDOGUE FRANCÊS E
WHIPPET)”**

Ana Caroline Porto Gomes

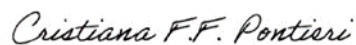
**Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia**

Salvador, 25 de agosto de 2021

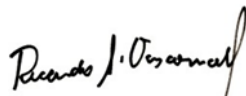
Comissão examinadora:



**Dra. Bruna Agy Loureiro
UFBA
Orientadora / Presidente**



**Dra. Cristiana Fonseca Ferreira Pontieri
Instituto Premier Pet**



**Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
UEM**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado vida e saúde para conduzir este trabalho.

Agradeço aos meus pais, Janair Gomes e Antônio Paulo Gomes, pelo apoio incondicional e todo esforço que sempre fizeram para que eu pudesse chegar até aqui.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Bruna Agy Loureiro, pela confiança, por todo ensinamento, incentivo e orientação ao longo do curso.

Ao meu coorientador, Dr. Juraci Marcos Alves Suassuna por toda ajuda e ensinamentos.

Ao professor Ariosvaldo Nunes e a todos do Laboratório de Nutrição Animal (LAANA) do Centro de Ciências Agrárias da UFPB, pela recepção e acolhimento.

Agradeço ao professor Ricardo Vasconcellos e ao colega Fernando González por toda ajuda e ensinamento, os quais foram essenciais para a realização do experimento.

À Victor Hugo que sempre me apoiou, incentivou e permaneceu ao meu lado mesmo nos momentos difíceis. Você é o meu ponto de paz.

Às alunas de iniciação científica, Gabriela e Rayssa, pela colaboração durante os períodos de coletas e laboratoriais.

Aos proprietários dos animais e funcionários do canil por nos receberem tão bem e permitirem a condução do estudo.

Aos animais pela fundamental participação na execução do projeto.

Aos meus amigos: Igor Moreno, Juliana Felipe, Sarah Nogueira e Susiane Matos, por compartilharem comigo os momentos bons e ruins durante toda jornada acadêmica.

A minha família por todo apoio e incentivo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFBA por todo conhecimento passado e excelência no ensino. Sempre lembrarei de vocês com gratidão.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha jornada na pós-graduação e execução desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 – Produção cumulativa de gás e taxa de fermentação <i>in vitro</i> ao longo do tempo de alimento seco extrusado tratado enzimaticamente (TE) ou não (NT) e utilizando inóculo fecal de cães das raças Bulldogue Francês (BF) e Whippet (W).....	24
Figura 2 – Plotagem de Bland-Altman para as concentrações de amônia nas fezes de cães obtidos da média da análise individual de três dias ou do pool dessas amostras.....	31
Figura 3 – Plotagem de Bland-Altman para as médias de nitrogênio amoniaco nas fezes de cães em três diferentes dias e pool de amostras	31
Figura 4 – Plotagem de Bland-Altman para as concentrações de ácido láctico nas fezes de cães obtidos da média de três dias ou do pool dessas amostras	32
Figura 5 – Plotagem de Bland-Altman para as médias de ácido láctico nas fezes de cães em três diferentes dias e pool de amostras	32
Figura 6 – Plotagem de Bland-Altman para as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes de cães obtidos da média de três dias ou do pool dessas amostras.....	33
Figura 7 – Plotagem de Bland-Altman para as médias de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes de cães em três diferentes dias e pool de amostras.....	33
Figura 8 – Plotagem de Bland-Altman para as concentrações de ácidos graxos de cadeia ramificada nas fezes de cães obtidos da média de três dias ou do pool dessas amostras.....	34
Figura 9 – Plotagem de Bland-Altman para as médias de ácidos graxos de cadeia ramificada nas fezes de cães em três diferentes dias e pool de amostras.....	34

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1 – Composição química dos substratos utilizados na técnica de produção de gás <i>in vitro</i>	16
Tabela 2 – Composição por litro da solução basal.....	17
Tabela 3 – Parâmetros da fermentação <i>in vitro</i> de alimento seco extrusado tratado ou não com enzimas e utilizando inóculo fecal de cães de duas raças (BF, Bulldog Francês e W, Whippet).....	23
Tabela 4 – Desaparecimento da matéria orgânica (%) <i>in vitro</i> de alimento seco extrusado tratado ou não com enzimas e utilizando inóculo fecal de cães de duas raças.....	25
Tabela 5 – pH e produtos finais da fermentação <i>in vitro</i> de alimento seco extrusado previamente tratado ou não com enzimas e utilizando inóculo fecal de cães de duas raças (BF, Bulldog Francês e W, Whippet).....	26
Tabela 6 – Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) expressos como porcentagem de ácidos graxos totais da fermentação <i>in vitro</i>	27
Tabela 7 – Características fecais e produtos finais da fermentação de cães das raças Bulldog Francês e Whippet alimentados com a mesma dieta.....	28
Tabela 8 – Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) expressos como porcentagem de ácidos graxos totais nas fezes de cães das raças Bulldog Francês e Whippet alimentados com a mesma dieta.....	28
Tabela 9 – Correlação entre a concentração dos produtos finais da fermentação e valores de pH mensurados nas fezes de cães e no líquido remanescente da fermentação <i>in vitro</i> utilizando inóculo fecal canino e alimento seco extrusado tratado ou não enzimaticamente	30
Tabela 10 – Correlação entre as concentrações de ácidos graxos voláteis mensurados nas fezes de cães e no líquido remanescente da fermentação <i>in vitro</i>	

utilizando inóculo fecal canino e alimento seco extrusado tratado ou não enzimaticamente.....	30
Tabela 11 – Correlação entre as proporções (%) dos ácidos graxos voláteis mensuradas nas fezes de cães e no líquido remanescente da fermentação <i>in vitro</i> utilizando inóculo fecal de anino e alimento seco extrusado tratado ou não enzimaticamente.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCR	Ácidos graxos de cadeia ramificada
AGV	Ácidos graxos voláteis
BF	Bulldogue Francês
CO₂	Dióxido de carbono
DMO	Desaparecimento da matéria orgânica
DMS	Desaparecimento da matéria seca
EEHA	Extrato etéreo hidrólise ácida
ENN	Extrativo não nitrogenado
FB	Fibra bruta
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
N-NH₃	Nitrogênio amoniacal
NT	Não tratado
PB	Proteína bruta
pH	Potencial Hidrogeniônico
R_{max}	Taxa máxima de fermentação
TE	Tratado enzimaticamente
T_{max}	Tempo em que ocorre a R _{max}
W	Whippet

SUMÁRIO

Parâmetros da fermentação *in vitro* de alimento extrusado e duas raças de cães (Bulldogue Francês e Whippet)

	PÁGINA
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Digestão e fermentação intestinal em cães.....	5
2.2. Técnica de produção de gás <i>in vitro</i>	8
2.3. Transtornos gastrointestinais em cães Bulldogues Franceses	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Ensaio Experimental	13
3.2. Animais e dieta.....	14
3.3. Substratos	14
3.4. Preparo dos frascos.....	16
3.5. Coleta de fezes	17
3.6. Determinação do escore, matéria seca e pH fecais	18
3.7. Preparo dos inóculos fecais	19
3.8. Técnica de produção de gás <i>in vitro</i>	19
3.9. Análise dos produtos finais da fermentação.....	21
3.10. Análises estatísticas	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Parâmetros da fermentação <i>in vitro</i>	23
4.3. Características fecais e produtos da fermentação <i>in vivo</i>	27
4.4. Correlação dos dados <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i>	29
4.5. Avaliação de Bland-Altman	29

5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO.....	42
7. REFERÊNCIAS	43

PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO *IN VITRO* DE ALIMENTO EXTRUSADO E DUAS RAÇAS DE CÃES (BULLDOGUE FRANCÊS E WHIPPET)

RESUMO

Objetivou-se avaliar os parâmetros da fermentação *in vitro* de um alimento seco extrusado completo utilizando cães de duas raças, uma braquicefálica e outra dolicocefálica. Foram utilizados 12 cães adultos, sendo 6 Bulldogs Franceses (BF) e 6 Whippets (W), submetidos a coleta de fezes frescas durante 3 dias consecutivos. Fezes frescas foram incubadas a 39°C sob condições anaeróbicas e como substrato utilizou-se o mesmo alimento extrusado fornecido aos cães, submetido ou não à pré-digestão. A avaliação seguiu delineamento em fatorial 2x2 com duas raças de cães (BF e W) e dois substratos (alimento com e sem tratamento enzimático). A produção de gás foi registrada durante 48h e o desaparecimento da matéria orgânica (DMO) e da matéria seca (DMS) foram calculados por diferença de peso. O líquido remanescente foi coletado e analisado quanto ao pH e concentração de ácidos graxos voláteis, ácido lático e N-NH₃. Fezes frescas também foram utilizadas para determinação do pH, MS e escore fecal, bem como produtos finais da fermentação para estudo da correlação com dados *in vitro*. A pré-digestão do substrato resultou em menores DMS, volume cumulativo de gás e taxa máxima de fermentação ($p < 0,05$). Contudo, o tempo para atingir metade da assíntota foi aumentado em 1h ($p < 0,05$). Substrato não tratado resultou em menor pH e maior concentração de ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta. Inóculo BF apresentou maior atividade fermentativa, representado por maior DMS e produção de gás ($p < 0,05$). Maiores concentrações de N-NH₃, ácido lático e ácidos graxos voláteis foram encontradas utilizando inóculo BF ($p < 0,05$), com tendência ($0,05 < p < 0,10$) de menor valor de pH. Cães da raça Whippet apresentaram fezes mais secas e com menor concentração de amônia ($p < 0,05$). Escore e pH fecais não diferiram entre raças, assim como as concentrações de AGV e ácido lático nas fezes ($p > 0,05$). O tratamento enzimático prévio alterou a cinética de fermentação dos substratos e os cães da raça BF

parecem possuir microbiota intestinal que os leva a uma maior produção de gás *in vitro* e de compostos nitrogenados relacionados a má formação e odor fecal.

Palavras-chave: Fermentação intestinal, cinética de fermentação, extrusão, cães braquicefálicos

PARAMETERS OF *IN VITRO* FERMENTATION OF EXTRUDED FOOD AND TWO DOG BREEDS (FRENCH BULLDOG AND WHIPPET)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* fermentation parameters of a dry extruded complete food using dogs of two breeds, one brachycephalic and the other dolichocephalic. Twelve adult dogs were used, 6 French Bulldogs (FB) and 6 Whippets (W), submitted to fresh feces collection for 3 consecutive days. Fresh feces were incubated at 39°C under anaerobic conditions and the same extruded food supplied to the dogs, submitted or not to pre-digestion, was used as substrate. The evaluation followed a 2x2 factorial design with two breeds of dogs (FB and W) and two substrates (food with and without enzymatic treatment). Gas production was recorded for 48 hours and the disappearance of organic matter (OMD) and dry matter (DMD) was calculated by weight difference. The remaining liquid was collected and analyzed for pH and concentration of volatile fatty acids, lactic acid and N-NH₃. Fresh feces were also used to determine pH, DM and fecal score, as well as final fermentation products to study the correlation with *in vitro* data. Substrate pre-digestion resulted in lower DMD, cumulative gas volume and maximum fermentation rate ($p < 0.05$). However, the time to reach half of the asymptote was increased by 1h ($p < 0.05$). Untreated substrate resulted in lower pH and higher concentration of lactic acid and short chain fatty acids. Inoculum FB showed higher fermentation activity, represented by higher DMD and gas production ($p < 0.05$). Higher concentrations of N-NH₃, lactic acid and volatile fatty acids were found using FB inoculum ($p < 0.05$), with a tendency ($0.05 < p < 0.10$) of a lower pH value. Whippet breed dogs had drier feces and lower ammonia concentration ($p < 0.05$). Fecal score and pH did not differ between breeds, as did the concentrations of VFA and lactic acid in feces ($p > 0.05$). The previous enzymatic treatment changed the substrate fermentation kinetics and FB dogs seem to have a intestinal microbiota that leads them to a greater production of *in vitro* gas and nitrogen compounds related to malformation and fecal odor.

Keywords: Intestinal fermentation, fermentation kinetics, extrusion, brachycephalic dogs

1. INTRODUÇÃO

Pertencentes à ordem *Carnivora*, os cães passaram por diversas adaptações evolutivas que resultaram em modificações anatômicas e fisiológicas, sobretudo do trato gastrointestinal. Apesar de possuírem intestino grosso relativamente simples, a microbiota local exerce fermentação significativa, tendo papel reconhecido em termos de nutrição e saúde intestinal (WILLIAMS et al., 2001). Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e/ou ramificada (AGCR), ácido lático, amônia e gases como dióxido de carbono (CO₂), hidrogênio e metano, são os principais metabólitos resultantes da fermentação microbiana. Estes compostos possuem participação ativa e renovável nas funções fisiológica, nutricional e imunológica do hospedeiro (SEKIROV et al., 2010; SIMPSON et al., 2002), podendo exercer efeitos benéficos ou prejudiciais, e suas concentrações variam de acordo com o substrato disponível.

A interação entre microbiota e substrato está relacionada com a extensão da fermentação (CALABRÒ et al., 2013). Os ácidos graxos de cadeia curta resultantes, sobretudo, da fermentação de carboidratos são associados a vários efeitos benéficos na saúde intestinal e geral do indivíduo (FAHEY et al., 1990). Por outro lado, apesar de ser fundamental para o crescimento microbiano, a fermentação de aminoácidos por bactérias proteolíticas pode resultar na síntese de ácidos graxos de cadeia ramificada e amônia, que quando em excesso são considerados indesejáveis e responsáveis pelo mau odor fecal (HUGHES et al., 2000; NERY et al., 2012; ZENTEK, 1995). Quando estes compostos encontram-se em níveis elevados, o animal geralmente manifesta o quadro de flatulências excessivas, que também pode ocorrer por aerofagia, principalmente nos braquicefálicos (ROUDEBUSH et al., 2010).

Cães de raças braquicefálicas são comumente associados à forte odor fecal e excesso de flatulências (ROUDEBUSH; DAVENPORT; REMILLARD, 2010; URREGO et al., 2017). Suas particularidades anatômicas, caracterizadas por crânio mais curto e largo, dificultam a apreensão dos alimentos e levam a transtornos respiratórios, resultando em aerofagia e lesões no trato gastrointestinal (CAVE, 2013; PONCET et al., 2005; ROUDEBUSH et al., 2010). Dentre as raças braquicefálicas, os Bulldogs Franceses parecem ser mais susceptíveis, apresentando maior frequência e

gravidade dos transtornos gastrintestinais quando comparados com os Pugs, por exemplo (HAIMEL e DUPRÉ, 2015; ROEDLER et al., 2013).

O desenvolvimento de alimentos para quaisquer que sejam a espécie, deve atender não somente às exigências nutricionais, mas também auxiliar na manutenção da saúde e longevidade dos animais. Dessa forma, a mensuração de produtos da fermentação microbiana é importante para determinar a qualidade das dietas e ingredientes e o potencial prebiótico dos alimentos. A formulação de dietas deve visar uma maior produção de ácidos graxos de cadeia curta e menores concentrações de compostos putrefativos com consequente redução do odor fecal, sobretudo em cães da raça Bulldog Francês (URREGO et al., 2017).

A técnica de produção de gás *in vitro* é comumente usada e mostra-se útil para a avaliação dos parâmetros da fermentação de ingredientes destinados à alimentação de cães (BOSCH et al., 2016; CALABRÒ et al., 2013; CUTRIGNELLI et al., 2009; MUSCO et al., 2018; OBA et al., 2020; PINNA et al., 2020; SCHAUF et al., 2018; VAN DEN ABBEELE et al., 2020; VIERBAUM et al., 2019). No entanto, até o momento nenhum estudo *in vitro* foi realizado para mensurar a produção de gases e produtos finais oriundos da fermentação microbiana de alimentos completos extrusados para cães, sendo essa avaliação realizada apenas através do método *in vivo*.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros da fermentação *in vitro* de um alimento seco extrusado completo utilizando dois tipos de substratos (alimento tratado ou não com enzimas) e cães de duas raças, uma braquicefálica (Bulldog Francês) e outra dolicocefálica (Whippet).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Digestão e fermentação intestinal em cães

O sistema gastrintestinal tem como principal função digerir e absorver nutrientes. Nos cães, os processos digestivos ocorrem principalmente através da hidrólise enzimática no estômago e intestino delgado, onde os nutrientes são então absorvidos para a corrente sanguínea. Apesar desse processo ser eficiente, quantidades

substanciais de nutrientes não digeridos, enzimas e células oriundas da descamação da mucosa são transportadas até o intestino grosso, onde permanecem por aproximadamente 12 horas (MASKELL e JOHNSON, 1993) servindo como substrato para fermentação pela microbiota intestinal (CUMMINGS e ENGLYST, 1987). Assim, a fermentação também pode ser considerada uma etapa importante da digestão em animais monogástricos (EWING e COLE, 1994).

O trato gastrointestinal é o sistema mais colonizado no corpo (SEKIROV et al., 2010). O cólon abriga espécies predominantemente anaeróbicas e as bactérias correspondem ao maior grupo, sendo responsáveis por importantes funções digestivas, como a fermentação das fibras e outros nutrientes (BALISH et al., 1977; SIMPSON, 1998). A composição e atividade da microbiota intestinal é fortemente controlada pela dieta do hospedeiro (PILLA e SUCHODOLSKI, 2021), portanto, o fornecimento adequado de substratos é imprescindível para a manutenção de uma microbiota benéfica, conferindo aos hospedeiros os potenciais benefícios à saúde promovidos por esta comunidade (BAUER et al., 2006).

Os carboidratos são os principais substratos para a fermentação intestinal e limitam o crescimento da microbiota colônica (MACFARLANE e CUMMINGS, 1991). Como resultado da fermentação dos carboidratos têm-se a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC: acetato, propionato e butirato) que levam à redução do pH, o que pode alterar a composição e metabolismo das bactérias intestinais (CAMPBELL et al., 1997). Os AGCC também atuam impedindo a adesão e colonização de microrganismos patogênicos na mucosa intestinal, devido a sua capacidade de ocupar seus sítios de ligação (COLLETT, 2000), modulando a resposta do complexo imunológico local e sistêmico (SEKIROV et al., 2010). Em cães, o acetato é o AGCC mais predominante, seguido pelo propionato e butirato. Contudo, a taxa de fermentação e as razões molares dos diferentes ácidos graxos podem variar de acordo com os substratos.

Dentre os produtos da fermentação, os AGCC são os únicos fornecedores de energia para o hospedeiro. Propionato, acetato e butirato disponíveis são rapidamente absorvidos e fornecem energia para o fígado, músculo e epitélio intestinal, respectivamente. Até 7% da energia basal de cães podem ser supridas pelos AGCC (HERSCHEL et al., 1981), no entanto, a maior parte é utilizada pelas bactérias intestinais para síntese proteica, aumentando a biomassa microbiana (COLES et al.,

2005) e apenas pequenas quantidades são excretadas nas fezes (SALMINEN et al., 1998). A absorção de AGCC também irá estimular a absorção de água e sais (SALMINEN et al., 1998) exercendo efeito osmorregulador no intestino. Além disso, são importantes na prevenção e recuperação de distúrbios intestinais, principalmente devido a ação do butirato na manutenção das microvilosidades intestinais (JASKIEWICZ et al., 1996). Foi demonstrado que o isolado canino de colonócitos oxida o butirato em uma taxa 4,5 vezes maior que a glicose (DRACKLEY e BEAULIEU, 1998), confirmando o importante papel desse ácido graxo como a principal fonte de energia para as células epiteliais.

Ácidos orgânicos são gerados como produtos intermediários da fermentação, a exemplo do ácido lático e, de forma geral, possuem atividade antibacteriana, sobretudo contra bactérias *Gram negativas*. O efeito modulador da microbiota intestinal pode ocorrer através da inclusão de prebióticos, por exemplo, que são compostos presentes nos alimentos ou suplementos, digeridos apenas pelos microrganismos do trato gastrointestinal, como as fibras (GIBSON e ROBERFROID, 1995; ROY e GIBSON, 1998). Essa alteração causada pelos prebióticos são benéficas ao indivíduo, pois estimulam o crescimento de bactérias produtoras de ácido lático, que leva a redução do pH luminal e conseqüente redução de bactérias patogênicas sensíveis à acidez (RADECKI e YOKOYAMA, 1991).

Apesar dos carboidratos serem o principal substrato de fermentação colônica, outros compostos também podem ser utilizados, como os aminoácidos fermentados sobretudo por bactérias proteolíticas (HUGHES et al., 2008), que resultam em sua maioria na produção de compostos putrefativos como amônia, aminas biogênicas, fenóis e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR: isobutirato, valerato e isovalerato). Esses compostos estão relacionados com o mau odor nas fezes de cães, aumento da produção de gases e apresentam potencial efeito tóxico, sendo encontrados em quantidades mínimas em animais saudáveis (HUGHES et al., 2000; NERY et al., 2012; ROUDEBUSH et al., 2010; ZENTEK, 1995).

Embora a produção dos AGCC seja comumente relacionada à fermentação de carboidratos, existem hipóteses acerca de vias alternativas de síntese de butirato via fermentação de proteínas em animais carnívoros, uma vez que este metabólito pode ser encontrado em amostras fecais de todos os vertebrados, independente do hábito

alimentar (PILLA e SUCHODOLSKI, 2021; VITAL et al., 2015). Esta hipótese é apoiada por um estudo onde foram comparadas dietas com alto teor de gordura versus dietas ricas em amidos e não foram encontradas diferenças significativas nas proporções molares de AGCC nas fezes de cães alimentados com qualquer das dietas (SCHAUF et al., 2018). Embora tenha sido observada uma tendência para maior proporção de butirato em cães alimentados com dietas ricas em amido e com baixo teor de gordura, os resultados mostram que a produção deste ácido graxo não depende apenas da fermentação de carboidratos. Nos carnívoros, a síntese de butirato parece estar relacionada também à via butirato quinase por meio das bactérias *Clostridium perfringens* (VITAL et al., 2015), que são aumentadas em animais consumindo dietas ricas em proteínas (KIM et al., 2017).

A quantidade de substrato proteico para fermentação no intestino grosso é influenciada por múltiplos fatores, como a quantidade de matéria seca ingerida (HUSSEIN e SUNVOLD, 2000) e a quantidade (YAMKA et al., 2003) e digestibilidade (WIERNUSZ et al., 1995) da proteína dietética. Ao avaliar dietas com diferentes fontes e níveis de digestibilidade da proteína sobre as características fecais de cães, pesquisadores observaram que a oferta de dietas formuladas com fontes proteicas altamente digestíveis resultou em concentrações fecais reduzidas dos produtos de fermentação das proteínas, incluindo AGCR e amônia, associados com a melhora da qualidade das fezes dos cães (NERY et al., 2012).

A mensuração dos produtos da fermentação microbiana como os AGCC, AGCR, ácido lático e amônia nas fezes de cães são importantes para determinar a qualidade de carboidratos e proteínas dietéticas e o potencial prebiótico dos alimentos. A escolha dos alimentos deve ser baseada numa maior produção de ácidos graxos de cadeia curta, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, e menores concentrações de AGCR e amônia, metabólitos relacionados com efeitos deletérios na saúde intestinal.

2.2. Técnica de produção de gás *in vitro*

Medir a atividade funcional da microbiota intestinal através dos produtos finais da fermentação permite deduzir o papel dos componentes dietéticos sobre a população microbiana como um todo. Essa avaliação pode ser feita por métodos *in vivo* ou *in vitro*,

sendo que metodologias *in vitro* além de viabilizar a execução por motivos econômicos e estruturais, reduz o tempo de coleta e o número de animais submetidos a experimentos (VASTOLO et al., 2019; ZICARELLI et al., 2011). Além disso, métodos *in vivo* podem não ser oportunos para todas as situações e não são considerados rotineiros na maior parte dos laboratórios (LÓPEZ, 2005).

Atualmente, a mensuração das características fermentativas e seus produtos finais em cães, na maior parte das vezes, está condicionada a coleta de fezes frescas, observação e monitoramento constantes dos animais, que pode chegar até 60 horas de monitoramento, tornando-se inviável em algumas situações. O protocolo alternativo *in vitro*, além de envolver coleta de fezes mais prática e que envolve menor número de animais, também possibilita o acesso a informações adicionais como desaparecimento da matéria seca ou matéria orgânica, cinética da fermentação e produção global de gases.

As técnicas de produção cumulativa de gás *in vitro* foram inicialmente desenvolvidas para avaliar o valor nutricional de alimentos e dietas para ruminantes. No entanto, o método também mostrou-se aplicável para estudos de fermentação em animais monogástricos (WILLIAMS et al., 2005). A técnica consiste na incubação do substrato de estudo junto a um inóculo em frascos contendo uma solução pré-definida que irá fornecer os nutrientes requeridos para o crescimento bacteriano. Após o período de incubação em condições estritamente anaeróbicas e em temperatura controlada, são realizadas medições dos gases acumulados durante a fermentação para avaliar a atividade da população microbiana que reside no trato gastrointestinal. O gás medido engloba aquele produzido pela fermentação microbiana (hidrogênio, metano e dióxido de carbono) junto ao CO₂ liberado indiretamente pela reação entre os AGCC e o tampão bicarbonato. Como ambos são direta ou indiretamente resultados da fermentação, assume-se que a produção total de gás seja um indicador da atividade microbiana (COLES et al., 2005). É possível também, a partir da coleta do líquido no final do período de fermentação *in vitro*, a medição do pH e a mensuração dos produtos da fermentação (ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, amônia e ácido lático).

Para o hospedeiro, a produção de gás é de pouco uso direto, no entanto, quando produzido de forma repentina e demasiada pode ser prejudicial (WILLIAMS et al., 2005), resultando em excesso de flatulências e desconfortos abdominais. A principal

vantagem desta medida é indicar a região do trato gastrointestinal onde o substrato é potencialmente fermentado. Alimentos fermentados *in vitro* de forma mais rápida ou devagar provavelmente serão fermentados nas regiões mais próximas ao intestino delgado ou posteriormente no intestino grosso, respectivamente. Se a produção de gás é demasiadamente lenta, certamente os substratos serão eliminados pelas fezes antes que sejam utilizados pelas bactérias intestinais (WILLIAMS et al., 2005).

O inóculo representa a maior fonte de variação das técnicas *in vitro* (LÓPEZ, 2005). Sua função é fornecer microrganismos que simulem a população intestinal. Devido a dificuldades de amostragem, o uso de fezes tem sido aceito como representação da microbiota do intestino grosso para estudos *in vitro* (BOSCH et al., 2008), fornecendo uma estimativa confiável da abundância das espécies bacterianas mais relevantes, daí o nome microbiota fecal.

A técnica da produção de gases *in vitro* utilizando fezes de cães como inóculo tem sido empregada na avaliação de fontes de fibras, aditivos e carboidratos (BOSCH et al., 2016; BRAMBILLASCA et al., 2013; CALABRÒ et al., 2013; CUTRIGNELLI et al., 2009; DONADELLI et al., 2019; MYINT et al., 2017; OBA et al., 2020; VIERBAUM et al., 2019), inexistindo até então, um protocolo *in vitro* para mensurar a produção de gases oriundos da fermentação microbiana de alimentos completos extrusados.

A seleção de ingredientes com base em sua cinética de fermentação *in vitro* é útil como medida de projeção da atividade fermentativa da dieta ao longo do trato gastrointestinal (CALABRÒ et al., 2013; WILLIAMS et al., 2005), sendo uma avaliação de grande importância para a indústria e formuladores de rações. No entanto, a avaliação de ingredientes específicos apresenta limitações. Uma vez que a microbiota é adaptada à dieta do hospedeiro, são esperados efeitos da alimentação do animal doador do inóculo sobre o padrão de fermentação *in vitro*. Os cães requerem um total de 43 nutrientes essenciais que devem obrigatoriamente serem fornecidos através da dieta (NRC, 2006), o que não é possível por meio da oferta de um único ingrediente, dificultando as comparações de dados obtidos da análise de ingredientes isolados *in vitro* com aqueles obtidos *in vivo*. Com o objetivo de determinar os efeitos da adaptação microbiana em selecionar fontes de fibras dietéticas, nove gatos foram adaptados a dietas contendo celulose, frutoligossacarídeos (FOS) ou pectina durante 30 dias

(BARRY et al., 2011). As fontes de fibra foram também utilizadas como substratos para fermentação *in vitro*. Os autores observaram que a adaptação ao FOS ou à pectina resultou em maior produção de gás e AGCC, confirmando o efeito da alimentação do animal doador de inóculo sobre os parâmetros fermentativos *in vitro*, com efeito considerável altamente dependente da complexidade do substrato.

O processo de extrusão exerce uma série de efeitos sobre a qualidade final do produto, sobretudo na estrutura e digestibilidade dos carboidratos e proteínas. Além disso, interações entre nutrientes após a extrusão e armazenamento dos alimentos para cães e gatos podem resultar em diferenças na utilização dos nutrientes pelos animais (TRAN et al., 2008), modificando o perfil de substratos que chegam ao intestino grosso e, portanto, alteram a população e atividade microbiana intestinal. Além disso, vale ressaltar que mudanças na contribuição energética de um macronutriente específico, obrigatoriamente resulta em alterações na energia oriunda dos demais macronutrientes. Logo, modificações na microbiota em função da dieta, são resultados de efeitos combinatórios entre todos os ingredientes e nutrientes. Quando alimentados com dietas cruas, em comparação com alimentos secos extrusados, os cães apresentam um aumento na população de bactérias fermentadoras de proteínas e redução de microrganismos relacionados à fermentação de carboidratos, bem como mudanças nos produtos finais da fermentação, sugerindo uma adaptação da microbiota intestinal em função da composição de macronutrientes da dieta (BERMINGHAM et al., 2017; KIM et al., 2017; SANDRI et al., 2017). Portanto, a avaliação de dietas completas é fundamental para garantir os resultados esperados na cinética e produtos finais da fermentação e, conseqüentemente, na saúde animal.

2.3. Transtornos gastrointestinais em cães Bulldogues Franceses

A relação entre cães e seres humanos, intensificada pela domesticação destes animais, resultou no desenvolvimento de centenas de raças caninas ao longo dos anos. Atualmente, 354 raças são reconhecidas pela Federação Cinológica Internacional (FCI, 2021). A seleção dos cães ocorreu visando propósitos específicos, seja funções de trabalho ou o aprimoramento de características fenotípicas atrativas aos tutores e criadores. No entanto, as seleções com base no fenótipo também lhes trouxeram

implicações prejudiciais à saúde, à exemplo dos cães de raças braquicefálicas (Bulldogue Francês, Bulldogue Inglês, Shih-tzu, Pug, Pequinês, etc.).

Cães braquicefálicos são caracterizados por um crânio curto e largo, o que resulta em alterações fisiopatológicas (FREICHE e GERMAN, 2021). Os problemas respiratórios são os mais relatados em literatura, no entanto, também são descritos uma série de sintomas relacionados ao sistema digestivo, como ptialismo, regurgitação, eructação, gastrite, refluxo gastroesofágico e/ou duodenogástrico, vômito, disfagia, alterações no apetite e casos de estenose hipertrófica pilórica congênita ou adquirida, responsável por uma síndrome de retenção gástrica (EIVERS et al., 2019; HAIMEL e DUPRÉ, 2015; HENDRICKS, 1992; LECOINDRE e RICHARD, 2004; PONCET et al., 2005; ROEDLER et al., 2013).

Estas raças também são comumente associadas à produção excessiva de gases e fezes com odor mais forte. Supõe-se que essa maior produção de gás ocorra devido às alterações anatômicas do crânio, que além de dificultar a apreensão do alimento também predispõe a distúrbios respiratórios, o que leva a aerofagia e lesões no trato gastrointestinal (CAVE, 2013; PONCET et al., 2005; ROUDEBUSH et al., 2010). A aerofagia demasiada acarreta em um aumento significativo da pressão intragástrica levando à dilatação crônica e ao aparecimento de flatulências (HENDRICKS, 1992; LECOINDRE e RICHARD, 2004). A gravidade dos sinais gastrintestinais são positivamente correlacionados com a dos sinais respiratórios (PONCET et al., 2005). Além disso, mesmo dentre os braquicefálicos, acredita-se haver efeitos de raça sobre a frequência e gravidade dos transtornos digestivos, a exemplo dos cães Bulldogues Franceses que apresentaram maior frequência e gravidade de sintomas gastrintestinais que os Pugs, demonstrando maior susceptibilidade (HAIMEL e DUPRÉ, 2015; ROEDLER et al., 2013).

Apesar da braquicefalia ser amplamente relatada como causa de perturbações ao trato gastrointestinal e o excesso de flatulências estar relacionado não somente à aerofagia, mas também à alta taxa de fermentação microbiana intestinal, os estudos referentes à digestão e metabolismo de cães de raças braquicefálicas ainda são escassos. Num único artigo encontrado em literatura com esta temática, foi estudado o efeito de diferentes fontes de proteína nos metabólitos de fermentação e digestibilidade de nutrientes em cães Bulldogues Franceses (URREGO et al., 2017). Os autores não

encontraram diferenças significativas nos produtos da fermentação (ácidos graxos de cadeia curta, aminas biogênicas, amônia e ácido lático) em função da fonte de proteína. No entanto, não foram incluídas outras raças no estudo e, portanto, não foi possível demonstrar diferenças na fermentação intestinal entre raças.

Simular as funções do trato gastrointestinal para qualquer espécie é um grande desafio (MOUGHAN, 1999) em função da complexidade do ambiente microbiano. Para tanto, deve-se considerar as características morfológicas e funcionais do intestino posterior da espécie de interesse (CALABRÒ et al., 2013). O uso de técnicas de produção de gás *in vitro* utilizando inóculo fecal de cães de diferentes raças, podem não somente proporcionar informações sobre a capacidade fermentativa da microbiota intestinal destes animais, mas também auxiliar na compreensão da relação que a produção de gases pode ter com a anatomia e comportamento alimentar dos cães.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados no presente experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus II, Areia, Paraíba, Brasil, com número de protocolo 6433180620.

3.1. Ensaio Experimental

O período experimental para obtenção das amostras teve duração de 35 dias, divididos em períodos de adaptação dos animais ao alimento e manejo diário, períodos de coleta de fezes e ensaios de fermentação *in vitro*. Para facilitar o manejo e realização das atividades experimentais, os animais das diferentes raças iniciaram o período de adaptação em momentos distintos. O período de adaptação de cada raça durou 20 dias e as fezes foram coletadas durante três dias consecutivos. Assim, para a primeira raça o período de adaptação foi realizado entre os dias 1 e 20 e as coletas de fezes nos dias 21 a 23. A segunda raça iniciou a adaptação no dia 13 seguindo até o dia 32 e as fezes foram coletadas entre os dias 33 e 35.

3.2. Animais e dieta

Foram selecionados 12 cães adultos, machos e fêmeas, com idades entre 1 e 5 anos, não castrados, sendo 6 cães da raça Bulldogue Francês com peso médio de $15,07 \pm 2,27$ kg e 6 cães da raça Whippet com peso médio de $14,26 \pm 2,26$ kg, todos provenientes de proprietários particulares da Paraíba. Os animais foram previamente vacinados e vermifugados, passaram por avaliação física e nenhum deles havia feito uso de antibióticos por pelo menos seis meses antes do estudo. Os animais foram mantidos durante 23 dias em baias individuais cobertas e liberados para atividade física e socialização uma vez ao dia sob supervisão.

Um alimento comercial seco extrusado (Premier® Fórmula Raças Médias Light Adultos) (

Tabela 1) foi fornecido individualmente em quantidade suficiente para atender à necessidade energética de $110 \text{ kcal/ kg}^{0.75}/ \text{ dia}$, de acordo com as recomendações do *Nutrient Requirements of Dogs and Cats* (NRC, 2006) e o valor de energia metabolizável por quilo de alimento descrito no rótulo do produto. Os cães foram pesados em balança de plataforma e o consumo de alimento monitorado diariamente, sendo a quantidade de alimento ajustada para manter o peso corporal dos animais constante, se necessário. Água foi fornecida *ad libitum*.

3.3. Substratos

Como substrato para a técnica de produção de gás *in vitro* foi utilizado o mesmo alimento seco extrusado oferecido aos cães, sendo este previamente tratado ou não com enzimas. O alimento foi triturado em moinho de faca tipo Willey (Modelo MA 580, Marconi Ltd., Piracicaba, Brasil), com peneira de 1,0 mm e submetido à um tratamento enzimático realizado em duas etapas, adaptado de Hervera et al. (2007) conforme descrito a seguir.

A quantidade de amostra foi padronizada para 40 gramas por frasco. Um litro de solução tampão de fosfato 0,1M (pH 6,0) seguido por 400 ml de solução de HCl 0,2M foram adicionados aos frascos, sob agitação constante. O pH foi ajustado para 2,0 utilizando soluções de NaOH 1M ou HCl 1M e, posteriormente, acrescentou-se 40 ml

de solução de pepsina fresca, preparada na hora contendo 10g de pepsina suína (SIGMA P-7000) por litro de solução. Os frascos foram fechados e acondicionados na incubadora DaisyII (TE-150, Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba, SP, Brasil), sendo mantidos por duas horas em condições constantes de agitação e temperatura à 39°C.

A incubadora DaisyII tem quatro frascos de digestão rotativos que são mantidos dentro de câmaras com temperatura uniforme e agitação constante. As amostras são colocadas em bolsas de filtro seladas e dispostas nos frascos junto com a solução enzimática. O uso da incubadora DaisyII demonstrou ser válido para estudos de digestibilidade *in vitro* de alimentos para cães (MEINERI et al., 2021). No entanto, devido ao grande volume de amostra, optou-se em não utilizar as bolsas de filtro, sendo então o alimento moído disposto diretamente nos frascos.

Após a primeira etapa os frascos foram resfriados em temperatura ambiente e 400 ml de solução tampão de fosfato 0,2M (pH 6,8) seguida por uma solução de NaOH 0,6M (200 ml) foram adicionados sob suave agitação. O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1M ou HCl 1M e 40 ml de solução de pancreatina (100mg/ml, SIGMA P-1750) foi incluída. Os frascos foram novamente colocados na incubadora por mais quatro horas sob as mesmas condições citadas anteriormente. Após as duas etapas de digestão, os frascos foram resfriados em temperatura ambiente e 200 ml de ácido sulfosalicílico 20% foi adicionado e deixado em descanso por 30 minutos em temperatura ambiente para que as proteínas solubilizadas, mas não digeridas, fossem precipitadas.

Os resíduos não digeridos foram coletados por filtração utilizando papel de filtro (maioria dos poros 14 µm) previamente identificados e pesados. Foram realizadas lavagens consecutivas, duas vezes com 10 ml de etanol 95% e duas vezes com 10 ml de acetona 99% por grama de substrato para remover lipídios e açúcares livres. Os papéis juntamente com os resíduos foram colocados em estufa a 55°C por 24 horas. O ensaio foi repetido até que houvesse resíduo suficiente para realização das análises químicas e para uso na técnica de produção de gás *in vitro* compondo o grupo de amostra tratada com enzimas, totalizando seis frascos. Os resíduos secos foram coletados, triturados utilizando almofariz de porcelana e pistilo de vidro até obter textura de pó em tamanho suficiente para passar em peneiras de 1,0 mm.

Os substratos foram submetidos à análise de matéria seca (MS%, método 934.01), matéria mineral (MM%, método 942.39), proteína bruta (PB%, Kjeldahl,

método 954.01), fibra bruta (FB%, método 962.10) e extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA%, método 954.02) segundo a AOAC (1995). O amido total foi determinado segundo metodologia descrita por Hendrix (1993). Os extrativos não nitrogenados (ENN%) foram calculados pela diferença entre a MS% e a soma da PB%, EEHA%, FB% e MM%. A matéria orgânica (MO%) foi calculada por: $MO\% = 100 - MM\%$. As composições químicas dos substratos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química dos substratos (alimento tratado ou não com enzimas) utilizados na técnica de produção de gás *in vitro*

Item	Alimento não tratado	Alimento tratado
Matéria seca (%)	91,27	91,88
Matéria mineral ¹	5,99	4,73
Matéria orgânica ¹	94,01	95,27
Proteína bruta ¹	27,52	27,48
Fibra bruta ¹	4,00	11,56
Extrato etéreo em hidrólise ácida ¹	9,34	1,04
Extrativo não nitrogenado ¹	44,42	47,07
Amido total ¹	38,51	10,75

¹Dados expressos em % da matéria seca

3.4. Preparo dos frascos

Cada amostra, com ou sem tratamento enzimático prévio, foi previamente pesada (0,5 g) em triplicata em frascos de 310 ml e 82 ml de um meio anaeróbico foi adicionado, de acordo com Williams et al. (2005). Durante o preparo eram mantidos um fluxo constante de CO₂ até a vedação dos frascos que eram então mantidos em geladeira por pelo menos 12 horas para permitir a hidratação dos substratos.

O meio anaeróbico foi preparado misturando (por frasco) 76 ml de solução basal (Tabela 2), 1 ml de solução tampão de vitamina/fosfato, 4 ml de tampão de bicarbonato e 1 ml de agente redutor. Todas as soluções foram preparadas antecipadamente e, exceto a solução tampão de vitaminas/fosfato, esterilizadas em autoclave antes do uso durante quinze minutos. A solução basal e tampão de bicarbonato foram mantidos em temperatura ambiente e o agente redutor e solução tampão de vitaminas/fosfato foram acondicionados em geladeira.

O agente redutor continha 41 gramas de cisteína HCl dissolvida em um litro de água destilada fervida com gás nitrogênio. Este procedimento foi realizado em capela.

O tampão de bicarbonato foi preparado com 82 gramas de carbonato de sódio anidro por litro de água destilada fervida com CO₂ infundido nela. Antes de ser adicionado à solução basal e após a autoclave, a solução foi novamente infundida com CO₂ por cerca de vinte minutos.

A solução tampão de vitaminas/fosfato foi preparada com 0,0204g de biotina, 0,0205g de ácido fólico, 0,1640g de pantotenato de cálcio, 0,1640g de nicotinamida, 0,1640g de riboflavina, 0,1640g de tiamina HCl, 0,1640g de piridoxina HCl, 0,0204g de ácido para-aminobenzóico e 0,0205g de cianocobalamina, todos dissolvido em um litro de solução contendo 54,7g de KH₂PO₄. A solução foi preparada em frascos estéreis e filtradas utilizando filtros de seringa.

Tabela 2 – Composição por litro da solução basal

Item	Quantidade
KCl	0.6 g
NaCl	0.6 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Tampão Piperazina	1.5 g
NH ₄ Cl	0.54 g
Tripticase	1.0 g
Solução resazurina 0,001%	1 ml
Solução mineral traço ¹	10 ml
Solução Haemin (0,1g em 0,05M NaOH e 1L de água destilada)	10 ml
Solução de ácidos graxos ²	10 ml

Fonte: Adaptado de Williams et al., 2005.

¹“Solução Mineral Traço” contém 14 ml de Trace Metal Mix A5 with Co (SIGMA – 92949) dissolvido em uma solução molar de HCl 0,02 e perfazendo um litro.

²“Solução de ácido graxo” contém 6,85 ml de ácido acético, 3,00 ml de ácido propiônico, 1,84 ml de ácido butírico, 0,47 ml de ácido isobutírico, 0,55 ml de ácido 2-metilbutírico, 0,55 ml de ácido valérico e 0,55 ml de ácido iso-valérico, por litro de NaOH 0,2 M.

3.5. Coleta de fezes

Durante o período de adaptação os cães passaram por condicionamento para defecar em recipiente durante passeio com coleira e guia. Fezes frescas foram coletadas e processadas dentro de 15 minutos, durante três dias consecutivos para determinação

das características fecais (matéria seca, escore e pH) e quantificação dos produtos finais da fermentação utilizando metodologia convencional *in vivo*. Foram analisados ácidos graxos de cadeia curta (AGCC, acetato, propionato e butirato), ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR, isobutirato, isovalerato e valerato), ácido lático e nitrogênio amoniacal (N-NH₃).

Foram coletadas também amostras para o preparo dos inóculos fecais utilizados nos ensaios de fermentação *in vitro*. Para isso, cada raça foi dividida em dois grupos e as coletas foram realizadas no primeiro e terceiro dia, sendo um grupo por dia. Imediatamente após a defecação, amostras fecais foram coletadas utilizando tubos plásticos estéreis, os quais eram fechados e saturados com CO₂ para manter as condições anaeróbicas. Os frascos com fezes foram acondicionados em garrafas térmicas mantidas a 39°C e imediatamente transportadas para o Laboratório de Nutrição Animal (LAANA) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Campus de Areia-PB, onde foram processadas dentro de 180 minutos após a coleta.

3.6. Determinação do escore, matéria seca e pH fecais

O escore fecal foi mensurado por avaliação visual sempre pelo mesmo pesquisador atribuindo-se notas de 0 a 5, sendo: 0 = fezes líquidas; 1 = fezes pastosas e sem forma; 2 = fezes macias e malformadas; 3 = fezes macias, formadas e úmidas; 4 = fezes bem-formadas e consistentes; 5 = fezes bem-formadas, duras e secas. Valores entre 3 e 4 foram considerados adequados.

Para determinação da matéria seca, amostras de fezes foram pesadas, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados por dia e animal e armazenadas em freezer (-15°C). Ao final do período de coleta as mesmas foram descongeladas e secas em estufa de ventilação forçada à 55°C durante 72 horas, até peso constante. Após secas, as fezes foram moídas em moinho de bola, pesadas e secas em estufa à 105°C. A matéria seca foi determinada por diferença de peso.

O pH foi determinado utilizando-se dois gramas de material fecal diluídos em 6 ml de água miliq (1:3 v/v) e o pH medido com pH-metro de precisão 0,01 pH (Kasvi, modelo K39-1014B). O procedimento foi realizado em cada um dos três dias de coleta e a média destes valores empregada no estudo.

3.7. Preparo dos inóculos fecais

Cada amostra fecal foi diluída (1:10, v/v) em solução estéril de 0,9% NaCl, homogeneizadas e filtradas através de seis camadas de gaze. Cada amostra fecal foi preparada individualmente, resultando em doze diferentes inóculos fecais. Após filtradas, 5 ml de cada solução foi adicionada nos respectivos frascos. Para cada solução fecal foram preparados dois frascos sem substratos (branco) compondo então 8 frascos por solução fecal (3 frascos com amostra tratada, 3 frascos com amostras sem tratamento prévio e 2 frascos sem substratos). Todo o processo foi realizado sob fluxo constante de CO₂.

3.8. Técnica de produção de gás *in vitro*

Depois de inoculados, os frascos foram colocados em uma incubadora (ANKOM^{RF} Gas Production System, Ankom Technology, NY) a 39°C em condições anaeróbicas. O sistema foi ajustado para registrar a produção de gás dos recipientes a cada uma hora usando um transdutor de pressão totalmente automatizado. A medida em que os volumes cumulativos de gás eram mensurados, os dados eram enviados a um computador usando transmissão de radiofrequência (RF) e registrados diretamente em planilhas. A pressão interna de cada recipiente foi programada para ser liberada automaticamente através de válvulas internas em cada módulo sempre que ultrapassavam o limiar de 4 psi, para evitar a solubilização dos gases na fase líquida (THEODOROU et al., 1994).

A fermentação foi interrompida após 48 h de incubação por resfriamento a -4°C, levando em consideração o rápido tempo de trânsito da digesta no intestino posterior do cão (BOSCH et al., 2008; SUNVOLD et al., 1995). O pH foi mensurado no líquido remanescente utilizando pH-metro de precisão 0,01 pH (Kasvi, modelo K39-1014B) e alíquotas foram coletadas para quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta, ácidos graxos de cadeia ramificada, ácido lático e nitrogênio amoniacal. Os sobrenadantes foram removidos por meio de filtração à vácuo utilizando cadinhos de filtro de vidro (Schott Duran, porosidade 2, Mainz, Alemanha) previamente pesados e identificados. A

matéria seca residual foi obtida após secagem em estufa a 105°C até peso constante. A matéria orgânica residual foi calculada por diferença após a queima em mufla a 550°C durante cinco horas. O desaparecimento da matéria seca e da matéria orgânica foram calculados através da seguinte equação:

$$\text{Desaparecimento} = 1 - \left[\frac{(\text{resíduo} - \text{resíduo do branco})}{\text{quantidade incubada}} \right] \times 100$$

A pressão cumulativa do gás medida em psi foi convertida em mols de gás produzido usando a lei dos gases ideais, conforme equação a seguir:

$$n = p \times (V / RT)$$

Onde: n = gás produzido em moles (mol); p = pressão em kilopascal (kPa); V = volume do head-space no frasco em litros; T = temperatura em Kelvin (K); R = constante do gás (8,314472 L·kPa·K⁻¹·mol⁻¹).

Em seguida, foi convertida em mililitros (ml) de gás produzido pela lei de Avogadro, onde:

$$\text{Gás produzido em ml} = n \times 22,4 \times 1000$$

Os volumes cumulativos de gás obtidos para cada frasco ao longo do tempo foram relacionados à quantidade de matéria orgânica incubada e ajustados ao modelo monofásico descrito por Groot et al. (1996) como segue:

$$G = A / (1 + (C / t)^B)$$

Onde G = gás total produzido (ml/g de matéria orgânica) no tempo t (h); A = produção assintótica de gás (ml/g de matéria orgânica incubada); B = característica de comutação da curva; C = tempo em que metade da assíntota é atingida (h).

O procedimento NLIN do software SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) foi usado para ajustar os dados a esta equação. A taxa máxima de fermentação (Rmax) e o momento em que ocorreu (Tmax) foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas (BAUER et al., 2001):

$$R_{\text{max}} = (A \times (C^B) \times B \times (T_{\text{max}}^{-(B-1)})) / (1 + (C^B) \times (T_{\text{max}}^{(-B)}))^2$$

$$T_{\text{max}} = C \times (((B - 1) / (B + 1))^{(1/B)})$$

3.9. Análise dos produtos finais da fermentação

Para a quantificação dos produtos finais da fermentação (AGCC, AGCR, ácido láctico e nitrogênio amoniacal), amostras de fezes e do líquido remanescente da fermentação *in vitro* foram diluídas em ácido fórmico 4,2N (1:3, v/v).

Os extratos (amostra + ácido) preparados com as fezes foram mantidos em geladeira durante os três dias de coleta e homogeneizados diariamente. Alíquotas das amostras dos três dias foram coletadas e misturadas formando um pool por animal. Os extratos foram centrifugados à 3.500 rpm, por 15 minutos, à 15°C. Os sedimentos foram desprezados e os sobrenadantes coletados, sendo este procedimento repetido três vezes. As amostras extraídas foram acondicionadas em tubos vacutainer e congelados a -15°C para posterior análise. As análises foram realizadas em amostras por animal e dia e no pool de cada animal. Os resultados obtidos com as análises de cada dia individualmente foram utilizados para calcular a média empregada no estudo.

As concentrações dos AGCC, AGCR e ácido láctico foram determinadas utilizando um cromatógrafo a gás (Ciola & Gregori, modelo Master) com detector de ionização de chama. A temperatura do injetor foi de 220°C, do detector 230°C e para o forno foi realizada uma rampa de programação, mantido à 70°C graus por 24 minutos, em seguida foi aumentado 20°C por minuto até atingir 180°C e permanecendo por 10 minutos. O volume de injeção foi de dois microlitros em modo Split 1:10. Foi utilizada coluna carbowax de 60 metros com 0,54 milímetros de diâmetro interno e um micrometro de espessura de fase estacionaria. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a 2ml/minuto.

A mensuração da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi realizada seguindo metodologia adaptada de Vieira (1980). Os extratos foram descongelados em geladeira, foram separadas alíquotas de dois mililitros, diluídas em 13 mililitros de água destilada (2:13 v/v) e então submetidas à destilação em destilador de nitrogênio (Tecnal TE - 036/1, Tecnal, Piracicaba, Brasil) utilizando 5 ml de hidróxido de potássio 2N. O destilado foi recebido em Erlenmeyer contendo 10 ml de ácido bórico 2% até atingir o volume de 50 ou 100ml para os extratos preparados com amostras de fezes ou líquido remanescente da fermentação *in vitro*, respectivamente. Após destilação, foi realizada a

titulação do destilado com solução de HCl 0,005N para estimar a quantidade de N-NH₃ presente na amostra.

3.10. Análises estatísticas

O ensaio da técnica de produção de gás *in vitro* seguiu delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x2, onde foram avaliadas duas formas de preparação das amostras (com e sem tratamento enzimático) e inóculo fecal de cães de duas raças (Bulldogue Francês e Whippet). Os parâmetros da fermentação *in vitro* foram submetidos a análise de variância utilizando o procedimento MIXED do SAS para avaliar o efeito dos substratos, da raça e da interação entre raça e substrato por meio do teste t-Student. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($P < 0,05$) e tendências foram consideradas quando $0,05 < P \leq 0,10$. O modelo estatístico foi:

$$Y_{ij} = \mu + \text{Sub}_i + R_j + \text{SubR}_{ij} + e_{ij}$$

Onde Y_{ij} é a variável dependente, μ é a média geral, Sub_i é o efeito fixo dos substratos i ($i = 1-2$), R_j é o efeito fixo da raça j ($j = 1-2$), SubR_{ij} é o efeito de interação entre o substrato e a raça, e_{ij} é o erro experimental aleatório.

Para determinação das características fecais e produtos da fermentação *in vivo*, o ensaio seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com duas raças (Bulldogue e Whippet) e 6 repetições por tratamento. Foram atendidas as pressuposições de normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento MIXED do SAS, considerando o efeito de raça. Coeficientes de correlação de Pearson entre valores de pH e produtos finais da fermentação mensurados com os métodos *in vivo* e *in vitro* foram estudados utilizando o procedimento CORR do SAS.

Adicionalmente, os dados encontrados para AGCC, AGCR, N-NH₃ e ácido láctico foram submetidos ao teste de Bland-Altman no software Sigmaplot 11.0 onde foram analisadas a variação dos dados obtidos entre os dias de coleta e comparadas as médias dos três dias com os valores mensurados no pool das amostras.

4. RESULTADOS

Durante o período de adaptação, um dos animais da raça Whippet apresentou complicações de saúde sendo necessário a administração oral de antibióticos. Devido a isso, o mesmo foi excluído do ensaio experimental, resultando em um número amostral de 11 cães (6 da raça Bulldog Francês e 5 da raça Whippet).

4.1. Parâmetros da fermentação *in vitro*

Os valores médios dos parâmetros da fermentação *in vitro* de alimentos secos extrusados tratados ou não com enzimas (pepsina e pancreatina) e utilizando inóculo fecal de cães de duas raças (Bulldog Francês e Whippet) são mostrados na Tabela 3. Houve efeito significativo de interação ($p < 0,05$) apenas para o desaparecimento da matéria orgânica e, portanto, estes resultados foram detalhados separadamente.

Tabela 3 – Parâmetros da fermentação *in vitro* de alimento seco extrusado tratado ou não com enzimas e utilizando inóculo fecal de cães de duas raças (BF, Bulldog Francês e W, Whippet)

Item	Alimento		Inóculo		EPM	p-valor ¹	
	Não tratado	Tratado	BF	W		S	R
DMS	61,14	47,42	57,43	50,13	1,93	<0,0001	0,0002
Gás (ml/ g MO) ²	154,53	96,09	128,75	120,16	6,97	<0,0001	0,0295
A (ml/g MO)	156,42	105,55	134,52	125,68	6,13	<0,0001	0,0232
C (h)	3,97	4,98	4,62	4,03	0,19	0,0056	0,0522
Tmax (h)	2,01	1,94	2,05	1,98	0,18	0,9809	0,9245
Rmax (ml/h)	26,54	11,94	19,02	20,65	2,10	<0,0001	0,7562

EPM, erro padrão da média; DMS, desaparecimento da matéria seca (%); A, produção assintótica de gás (ml/g de matéria orgânica incubada); C, tempo em que metade da assíntota é atingida (horas); Tmax, tempo em que a taxa máxima de produção de gás é atingida (horas); Rmax, taxa máxima de fermentação (ml/h).

¹Foi estabelecido nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e tendências consideradas quando $0,05 \leq p \leq 0,10$.

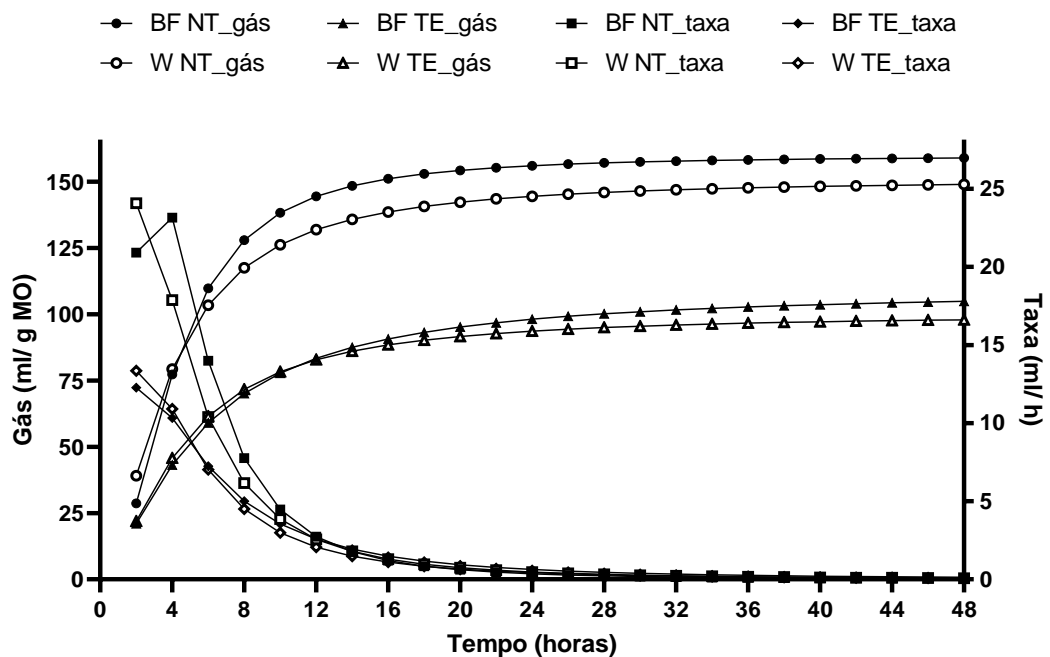
²Volume cumulativo de gás em ml por grama de matéria orgânica incubada.

O tratamento enzimático prévio resultou em mudanças na cinética da fermentação do substrato. O alimento previamente tratado apresentou menores valores de desaparecimento da matéria seca e de volume cumulativo e produção assintótica de gás. O alimento não tratado atingiu metade da assíntota 1,01h antes que a amostra

tratada e, além disso, a média R_{max} (taxa máxima de fermentação) do alimento tratado (11,94 ml/h) correspondeu a cerca de 45% do valor médio da taxa apresentada pelo alimento sem tratamento prévio (26,54 ml/h), mesmo com T_{max} (tempo em que ocorre a R_{max}) semelhante entre os substratos (1,94h e 2,01h, respectivamente).

A fonte do inóculo também foi responsável por mudanças significativas ($p < 0,05$) no volume cumulativo e produção assintótica de gás (Tabela 3). O inóculo fecal de cães da raça Bulldog Francês apresentou em média um aumento de 8,59 ml na produção de gás por grama de matéria orgânica incubada em relação ao inóculo de cães da raça Whippet, que representa uma elevação em 7,15%, diferindo estatisticamente entre eles ($p < 0,05$). A produção assintótica de gás também foi maior para o inóculo fecal da raça Bulldog Francês ($p < 0,05$) e houve uma tendência ($p = 0,0522$) de maior tempo em que metade da assíntota é atingida para a mesma raça. A taxa máxima de fermentação e o tempo que esta ocorreu não diferiu entre inóculos ($p > 0,05$). A produção cumulativa de gás por grama de matéria orgânica incubada e a taxa de fermentação ao longo do tempo de incubação (48h) dos diferentes substratos e inóculos fecais utilizados podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1 – Produção cumulativa de gás e taxa de fermentação *in vitro* ao longo do tempo de alimento seco extrusado tratado enzimaticamente (TE) ou não (NT) e utilizando inóculo fecal de cães das raças Bulldog Francês (BF) e Whippet (W)



Conforme supracitado houve efeito de interação significativo ($p < 0,05$) entre substrato e raça doadora do inóculo para o desaparecimento da matéria orgânica *in vitro* (Tabela 4). Houve uma diferença de 26,15% no DMO dos frascos incubados com substrato sem tratamento prévio e utilizando inóculo fecal de cães da raça Bulldog Francês e a média obtida com a fermentação do alimento tratado e utilizando inóculo fecal da raça Whippet que apresentaram o maior e o menor DMO, respectivamente.

Tabela 4 – Desaparecimento da matéria orgânica (%) *in vitro* de alimento seco extrusado tratado ou não com enzimas e utilizando inóculo fecal de cães de duas raças

Inóculo	Alimento		Média	EPM	p-valor ¹		
	Não tratado	Tratado			R	S	I
Bulldog Francês	70,97a	48,55c	62,00				
Whippet	61,65b	44,82d	53,24	3,02	<,0001	<,0001	0,0027
Média	65,65	46,06					

EPM, erro padrão da média; R, p-valor considerando efeito de raça; S, p-valor considerando efeito de substrato; I, p-valor considerando efeito de interação.

¹Foi estabelecido nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e tendências consideradas quando $0,05 \leq p \leq 0,10$.

Letras diferentes correspondem em diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2. pH e produtos finais da fermentação *in vitro*

Os valores de pH e concentrações de nitrogênio amoniacal, ácido láctico e ácidos graxos voláteis são apresentados na Tabela 5. Não houve efeito significativo de interação substrato e raça, para nenhuma das variáveis citadas.

O pH medido após 48h de incubação foi menor para o substrato não tratado. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração (mmol) de ácidos graxos entre os substratos, em virtude das diferenças na concentração de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente acetato e propionato ($p < 0,05$). Concentração de ácido láctico (mmol) foi cerca de 35% superior nos frascos incubados com substratos não tratado e não houve diferença significativa entre os substratos para os indicadores de fermentação proteolítica (amônia e ácidos graxos de cadeia ramificada).

Em relação ao inóculo, fezes da raça Bulldog Francês resultou em maior produção de amônia que a raça Whippet. Além disso, houve uma tendência ($p = 0,0576$) em mudanças no pH do líquido remanescente em função do inóculo utilizado, com valores mais baixos nos frascos contendo inóculo fecal de Bulldogues Franceses.

Tabela 5 – Valores de pH e produtos finais da fermentação *in vitro* de alimento seco extrusado previamente tratado ou não com enzimas e utilizando inóculo fecal de cães de duas raças (BF, Bulldog Francês e W, Whippet)

Item	Alimento		Inóculo		EPM	p-valor ¹	
	Não tratado	Tratado	BF	W		S	R
pH	6,30	6,37	6,32	6,35	0,01	0,0002	0,0576
N-NH ₃ (mmol/L)	22,06	22,41	23,34	21,00	0,47	0,5348	0,0102
Ácido láctico (mmol/L)	5,09	3,75	5,06	3,77	0,26	0,0020	0,0027
AGCC total (mmol/L)	46,66	37,88	46,42	38,14	1,72	0,0024	0,0039
Acetato	30,30	25,61	29,42	26,58	0,89	0,0053	0,0856
Propionato	12,69	8,47	12,88	8,26	0,93	0,0073	0,0037
Butirato	3,67	3,80	4,13	3,29	0,29	0,8040	0,1692
AGCR total (mmol/L)	2,11	2,11	2,21	1,99	0,08	0,9331	0,2105
Isobutirato	0,64	0,63	0,64	0,63	0,01	0,7981	0,8015
Isovalerato	1,31	1,32	1,37	1,26	0,08	0,9269	0,5264
Valerato	0,16	0,15	0,20	0,10	0,01	0,9444	0,0002
Ácidos graxos total	48,76	39,98	48,63	40,13	1,73	0,0022	0,0029

EPM, erro padrão da média; N-NH₃, nitrogênio amoniacal; AGCC, ácidos graxos voláteis de cadeia curta; AGCR, ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada.

Concentrações de ácidos graxos voláteis foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) com o inóculo BF apresentando maiores valores para ácidos graxos totais, ácidos graxos de cadeia curta, em virtude da maior concentração de propionato, e valerato.

Também foram calculadas a proporção (%) de cada ácido graxo volátil em relação ao total de ácidos graxos. Estes resultados podem ser conferidos na Tabela 6. Fermentação do substrato tratado previamente com pepsina e pancreatina resultou em menor proporção de propionato e maior proporção de isovalerato, com tendências ($0,05 \leq p \leq 0,10$) de aumento na proporção de ácidos graxos de cadeia ramificada e redução na proporção de ácidos graxos de cadeia curta, quando comparado com o substrato não tratado.

Inóculo preparado com fezes dos cães da raça Bulldog Francês resultou em menor proporção de acetato e isobutirato, porém maiores concentrações de propionato e valerato ($p < 0,05$) quando comparado com o inóculo fecal da raça Whippet. Demais ácidos graxos voláteis não apresentaram proporções significativamente distintas ($p > 0,05$).

Tabela 6 – Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) expressos como porcentagem de ácidos graxos totais da fermentação *in vitro*

Item	Alimento		Inóculo		EPM	p-valor ¹	
	Não tratado	Tratado	BF	W		S	R
AGCC total	95,54	94,63	95,30	94,90	0,23	0,0550	0,4095
Acetato	64,02	64,23	61,68	66,80	0,77	0,9754	0,0003
Propionato	23,82	20,91	24,84	19,78	0,85	0,0386	0,0006
Butirato	7,70	9,49	8,77	8,32	0,65	0,1928	0,6484
AGCR total	4,46	5,37	4,70	5,10	0,23	0,0550	0,4095
Isobutirato	1,36	1,61	1,36	1,62	0,05	0,0057	0,0051
Isovalerato	2,78	3,37	2,91	3,23	0,20	0,1683	0,4721
Valerato	0,32	0,38	0,43	0,26	0,03	0,1554	0,0023

BF, Bulldog Francês; W, Whippet; EPM, erro padrão da média; S, p-valor considerando efeito do substrato; R, p-valor considerando efeito da raça.

¹Foi estabelecido nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e tendências consideradas quando $0,05 \leq p \leq 0,10$.

4.3. Características fecais e produtos da fermentação *in vivo*

As características fecais e produtos finais da fermentação *in vivo* dos cães são mostradas na Tabela 7. Dados obtidos com as análises de nitrogênio amoniacal, ácido láctico e ácidos graxos voláteis dos pools de amostras foram utilizados para a análise estatística.

Cães da raça Bulldog Francês apresentaram fezes mais úmidas ($p < 0,05$) em comparação com os cães da raça Whippet, no entanto não foram encontradas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) no escore e pH fecal.

A concentração de nitrogênio amoniacal (mmol/g MS) nas fezes de cães diferiu entre raças ($p < 0,05$), sendo que os Whippets apresentaram uma concentração média em torno de 50% da concentração encontrada nas fezes dos Bulldogues Franceses. Concentrações fecais (mmol/g MS) de ácido láctico e ácidos graxos voláteis não diferiram entre raças ($p > 0,05$).

Do mesmo modo que ocorreu com o estudo *in vitro*, também foram calculadas as proporções de cada ácido graxo volátil em relação ao total (Tabela 8). Não houve diferença significativa entre raças ($p > 0,05$), porém houve uma tendência ($0,05 \leq p \leq 0,10$) de maior proporção de isovalerato nas fezes de cães da raça Bulldog Francês em

comparação com as fezes da raça Whippet, com valores de 0,93% e 0,72%, respectivamente.

Tabela 7 – Características fecais e concentração dos produtos finais da fermentação de cães das raças Bulldog Francês e Whippet alimentados com a mesma dieta

Item	Raça		EPM	p-valor ¹
	Bulldogue francês	Whippet		
Matéria seca (%)	21,59	25,43	0,89	0,0225
Escore	3,08	3,40	0,10	0,1213
pH	5,87	6,02	0,07	0,3394
N-NH ₃ (mmol/g MS)	0,143	0,07	0,01	<,0001
Ácido Lático (mmol/g MS)	45,20	42,58	1,71	0,4760
AGCC (mmol/g MS)	715,02	691,18	40,35	0,7856
Acetato	464,16	457,65	25,62	0,9069
Propionato	173,81	160,29	13,06	0,6320
Butirato	77,05	73,25	4,54	0,6992
AGCR (mmol/g MS)	12,30	10,93	0,53	0,2137
Isobutirato	4,23	4,34	0,19	0,7929
Isovalerato	6,66	5,04	0,49	0,1038
Valerato	1,41	1,54	0,06	0,3011
Ácidos graxos total	727,32	702,11	40,58	0,7748

EPM, erro padrão da média; N-NH₃, nitrogênio amoniacal; AGCC, ácidos graxos voláteis de cadeia curta; AGCR, ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada.

¹Foi estabelecido nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e tendências consideradas quando $0,05 \leq p \leq 0,10$.

Tabela 8 – Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) expressos como porcentagem de ácidos graxos totais nas fezes de cães das raças Bulldog Francês e Whippet alimentados com a mesma dieta

Item	Raça		EPM	p-valor ¹
	Bulldogue francês	Whippet		
AGCC	98,26	98,43	0,09	0,3507
Acetato	63,86	65,17	0,48	0,1826
Propionato	23,71	22,74	0,74	0,5411
Butirato	10,69	10,52	0,55	0,8821
AGCR	1,74	1,57	0,09	0,3507
Isobutirato	0,61	0,63	0,05	0,8390
Isovalerato	0,93	0,72	0,06	0,0737
Valerato	0,20	0,22	0,01	0,3235

¹Foi estabelecido nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e tendências consideradas quando $0,05 \leq p \leq 0,10$

4.4. Correlação dos dados *in vivo* x *in vitro*

Correlações positivas e significativas ($p < 0,05$) foram encontradas entre as concentrações de nitrogênio amoniacal e no total de ácidos graxos de cadeia ramificada (Tabela 9), sobretudo de isovalerato (Tabela 10), mensuradas nas fezes dos cães e no líquido remanescente da fermentação *in vitro* do substrato sem tratamento prévio.

Concentrações totais de ácidos graxos de cadeia curta e de ácidos graxos voláteis nas fezes apresentaram tendência ($0,05 \leq p \leq 0,10$) de correlação positiva com os resultados obtidos após fermentação *in vitro* do substrato submetido ao tratamento enzimático com pepsina e pancreatina (Tabela 9).

Proporção de acetato e propionato do líquido remanescente da fermentação *in vitro* do substrato não tratado apresentou correlação significativa ($p < 0,05$) com aquelas mensuradas nas fezes, com tendência ($0,05 \leq p \leq 0,10$) de correlação positiva para butirato, isovalerato e proporções de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada. Quando correlacionadas com os dados obtidos da fermentação *in vitro* do substrato submetido a tratamento enzimático, as proporções dos diferentes ácidos graxos voláteis das fezes apresentaram baixa correlação, sem efeito estatístico significativo (Tabela 11).

4.5. Avaliação de Bland-Altman

A avaliação dos gráficos de Bland-Altman para os dados de nitrogênio amoniacal (Figura 2 e Figura 3), ácido láctico (Figura 4 e Figura 5) e ácidos graxos de cadeia curta (Figura 6 e Figura 7) nas fezes dos cães revelou que as comparações entre cada um dos três diferentes dias de coleta e o pool de amostras apresentaram viés proporcional e de moderada concordância. Já entre a média dos três dias e o pool, obteve-se os menores vieses, considerados, portanto, com melhores concordâncias e sem viés fixo ou proporcional.

Para a avaliação dos gráficos com os dados de ácidos graxos de cadeia ramificada (Figura 8 e Figura 9), todas as comparações apresentaram viés proporcional de moderada concordância, mesmo entre a média dos três dias de coleta e o pool de amostras.

Tabela 9 – Correlação entre a concentração dos produtos finais da fermentação e valores de pH mensurados nas fezes de cães e no líquido remanescente da fermentação *in vitro* utilizando inóculo fecal canino e alimento seco extrusado tratado ou não enzimaticamente

Alimento	AGCC		AGCR		AGV		Ácido Lático		N-NH ₃		pH	
	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p
Não tratado	0,479	NS	0,769	<0,05	0,474	NS	-0,028	NS	0,608	<0,05	0,354	NS
Tratado	0,560	0,07	0,330	NS	0,546	0,08	-0,212	NS	0,215	NS	0,202	NS

AGCC, ácidos graxos voláteis de cadeia curta; AGCR, ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada; AGV, ácidos graxos voláteis totais; N-NH₃, nitrogênio amoniacal.
r, coeficiente de correlação.

Foi estabelecido um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e tendências consideradas quando $0,05 \leq p \leq 0,10$; NS, não significativo.

Tabela 10 – Correlação entre as concentrações de ácidos graxos voláteis mensurados nas fezes de cães e no líquido remanescente da fermentação *in vitro* utilizando inóculo fecal canino e alimento seco extrusado tratado ou não enzimaticamente

Alimento	Acetato		Propionato		Butirato		Isobutirato		Isovalerato		Valerato	
	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p
Não tratado	0,496	NS	0,543	0,08	0,285	NS	-0,111	NS	0,743	<0,05	0,044	NS
Tratado	0,288	NS	0,230	NS	-0,185	NS	-0,450	NS	0,415	NS	0,132	NS

AGCC, ácidos graxos voláteis de cadeia curta; AGCR, ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada.
r, coeficiente de correlação.

Foi estabelecido um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e tendências consideradas quando $0,05 \leq p \leq 0,10$; NS, não significativo.

Tabela 11 – Correlação entre as proporções (%) dos ácidos graxos voláteis mensuradas nas fezes de cães e no líquido remanescente da fermentação *in vitro* utilizando inóculo fecal de anino e alimento seco extrusado tratado ou não enzimaticamente

Alimento	Acetato		Propionato		Butirato		Isobutirato		Isovalerato		Valerato		AGCC e AGCR	
	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p	<i>r</i>	p
Não tratado	0,813	<0,05	0,608	<0,05	0,584	0,06	0,400	NS	0,543	0,08	0,089	NS	0,534	0,09
Tratado	0,525	NS	0,307	NS	-0,243	NS	0,021	NS	0,216	NS	0,475	NS	0,285	NS

AGCC, ácidos graxos voláteis de cadeia curta; AGCR, ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada.
r, coeficiente de correlação.

Foi estabelecido um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e tendências consideradas quando $0,05 \leq p \leq 0,10$; NS, não significativo.

Figura 2 – Plotagem de Bland-Altman para as concentrações de amônia nas fezes de cães obtidos da média da análise individual de três dias ou do pool dessas amostras

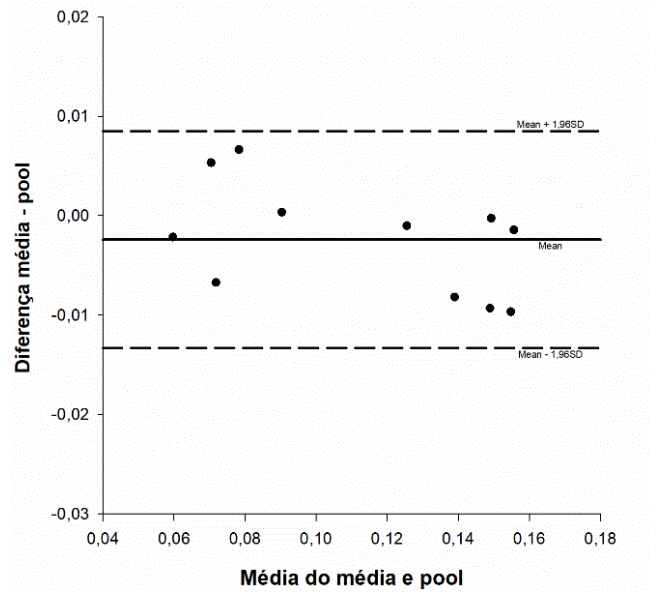


Figura 3 – Plotagem de Bland-Altman para as médias de nitrogênio amoniacal nas fezes de cães em três diferentes dias e pool de amostras

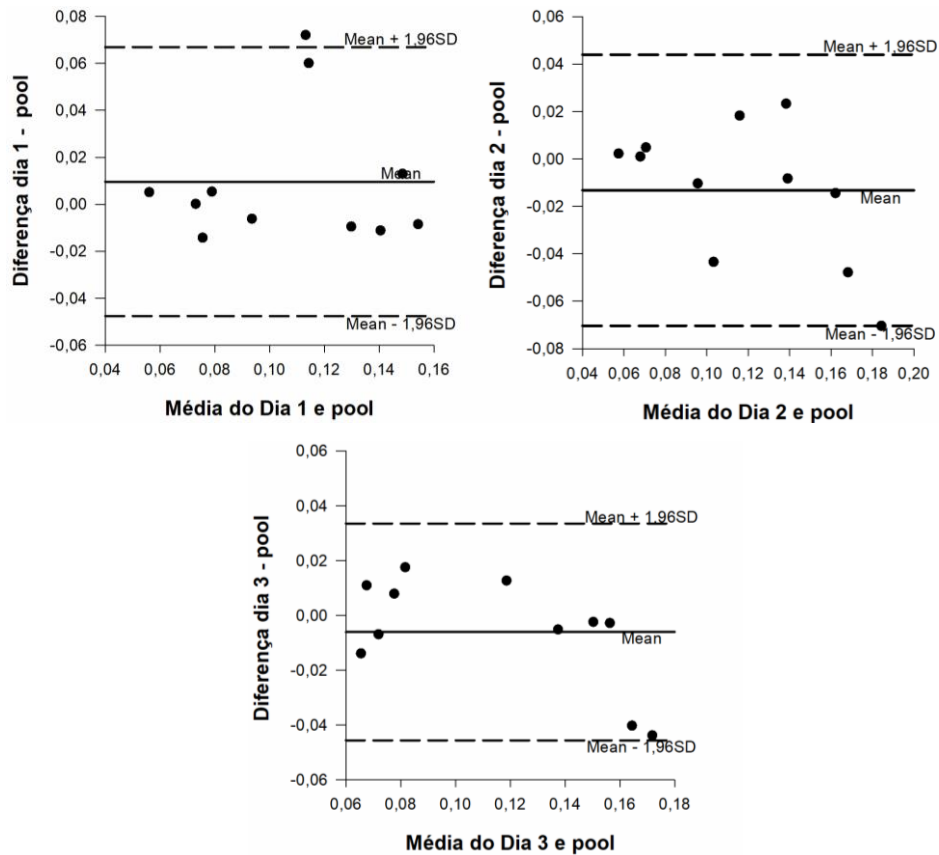


Figura 4 – Plotagem de Bland-Altman para as concentrações de ácido láctico nas fezes de cães obtidos da média de três dias ou do pool dessas amostras

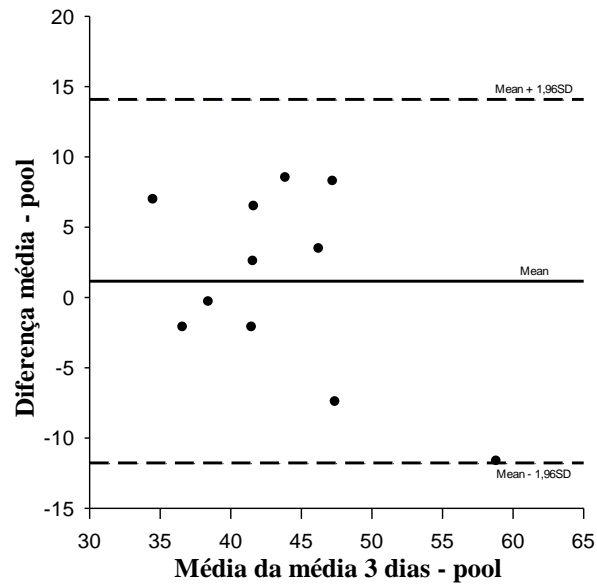


Figura 5 – Plotagem de Bland-Altman para as médias de ácido láctico nas fezes de cães em três diferentes dias e pool de amostras

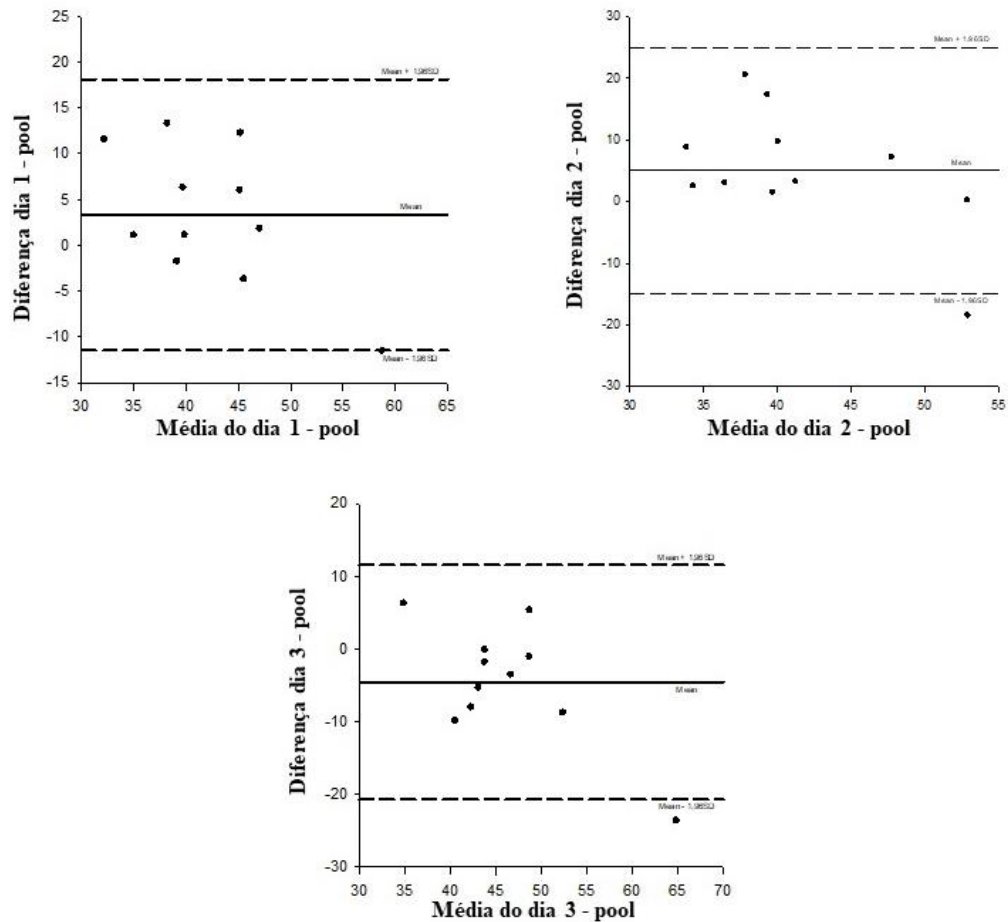


Figura 6 – Plotagem de Bland-Altman para as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes de cães obtidos da média de três dias ou do pool dessas amostras

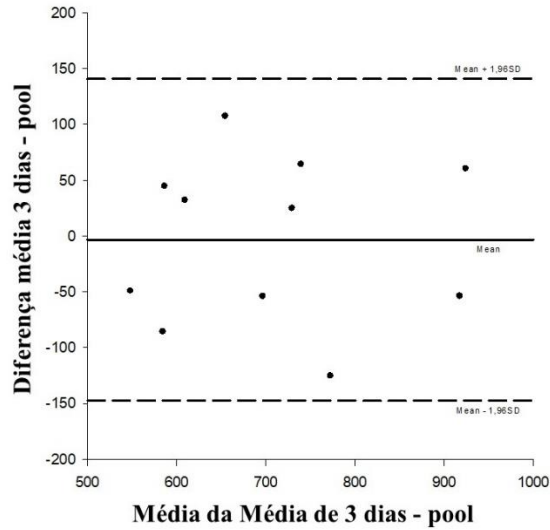


Figura 7 – Plotagem de Bland-Altman para as médias de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes de cães em três diferentes dias e pool de amostras

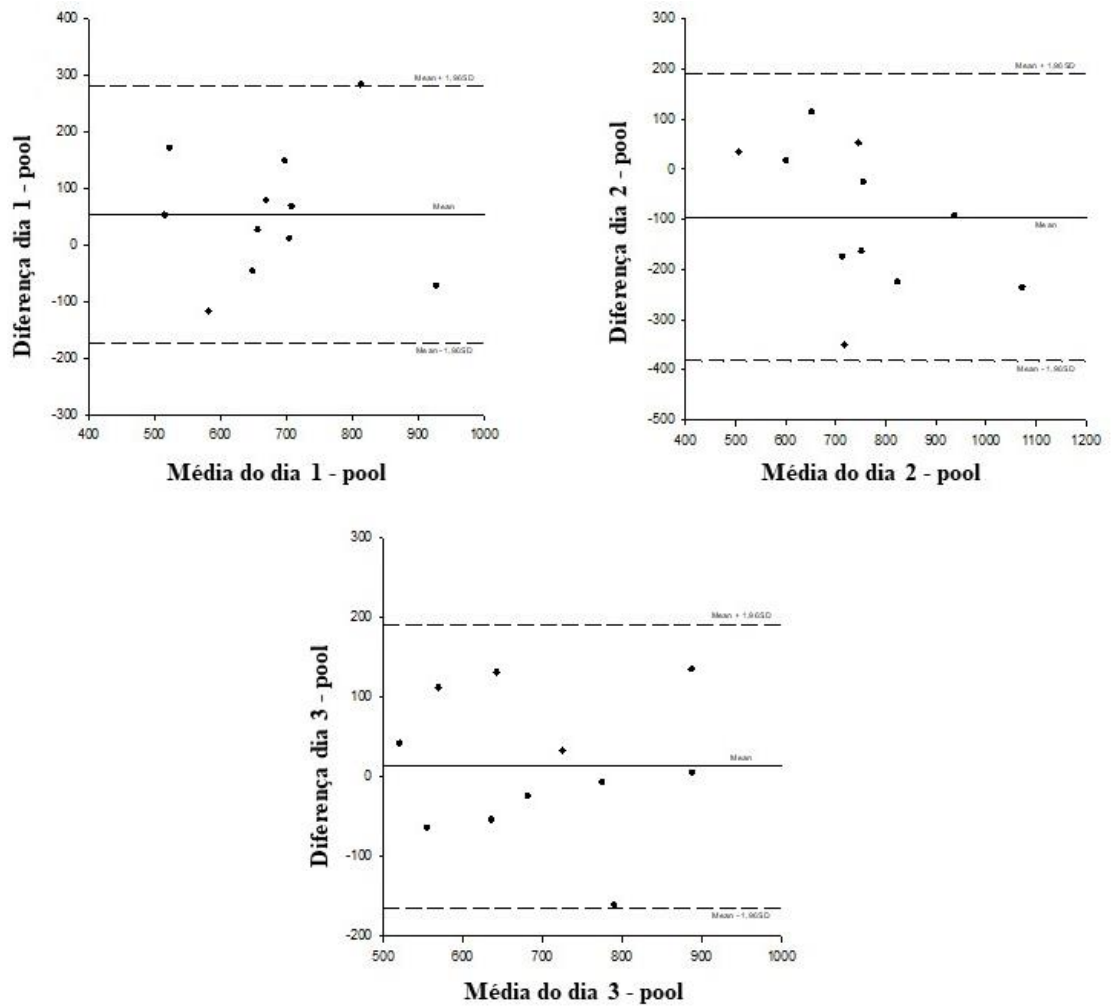


Figura 8 – Plotagem de Bland-Altman para as concentrações de ácidos graxos de cadeia ramificada nas fezes de cães obtidos da média de três dias ou do pool dessas amostras

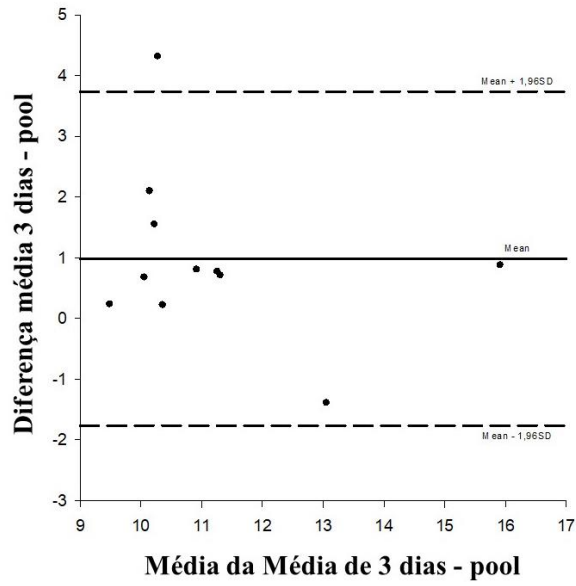
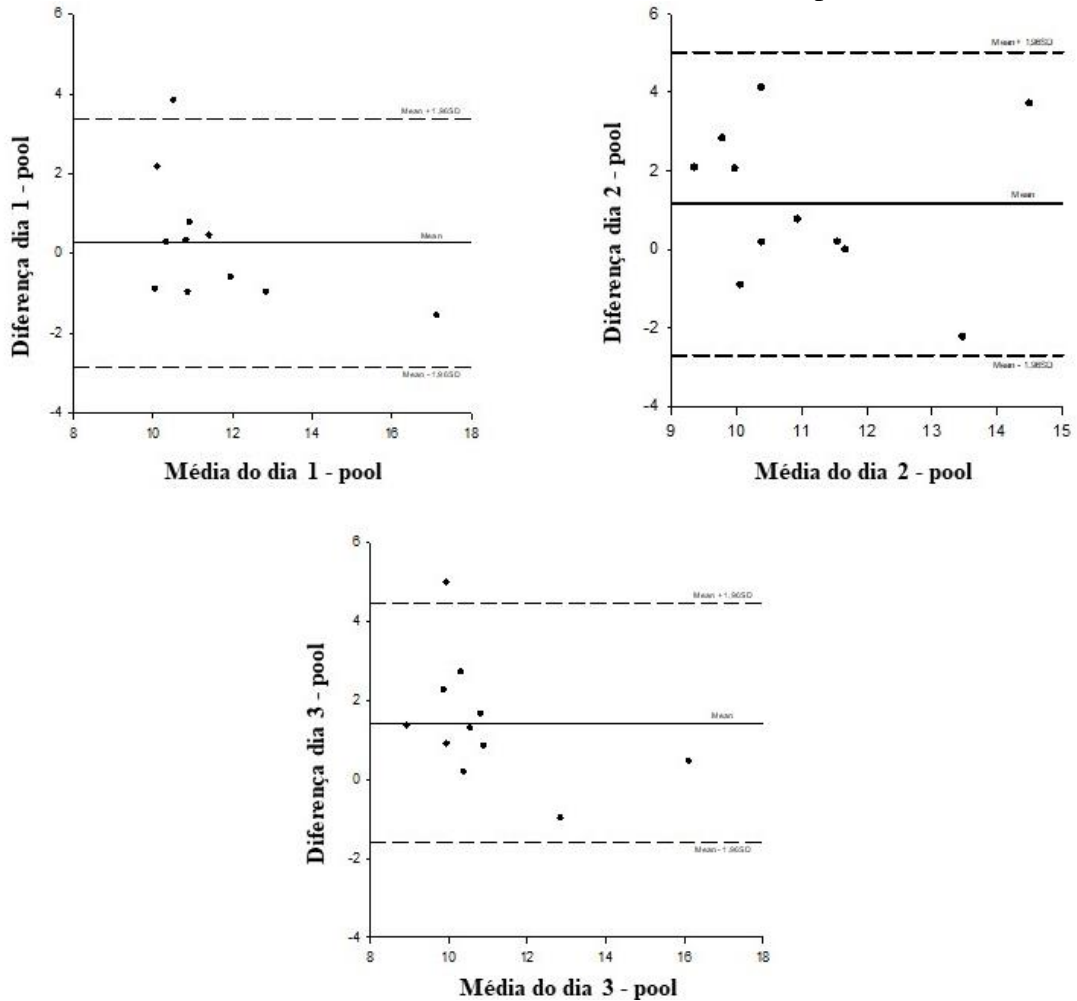


Figura 9 – Plotagem de Bland-Altman para as médias de ácidos graxos de cadeia ramificada nas fezes de cães em três diferentes dias e pool de amostras



5. DISCUSSÃO

Alimentos secos completos extrusados são ricos em amido e compostos solúveis, os quais são facilmente degradados por ação das enzimas endógenas do trato gastrointestinal de cães e absorvidos no intestino delgado, sendo então disponibilizados em quantidades mínimas para fermentação microbiana no intestino grosso. O processo de digestão *in vitro* visa simular tais processos enzimáticos para que sejam obtidos resíduos mais semelhantes ao que chegariam ao intestino grosso no modelo *in vivo*. Assim, o resíduo remanescente da digestão é formado principalmente por compostos de mais difícil digestão e os classificados como indigestíveis, como as fibras insolúveis.

O tratamento enzimático prévio realizado no presente estudo demonstrou reduzir a fermentabilidade do substrato, conforme observado nos dados de produção de gás e desaparecimento da matéria seca (Tabela 3). Todavia, o tempo para atingir a taxa máxima de fermentação não diferiu entre os substratos, sugerindo que a maior produção de gás no alimento não tratado ocorreu principalmente devido a maior presença de compostos solúveis e rapidamente fermentáveis, sobretudo o amido (9,88% e 35,15% com base na MS para os substratos tratado ou não, respectivamente), resultando também em maior produção de ácidos graxos de cadeia curta e ácido lático, compostos oriundos da fermentação de carboidratos e que levam a uma redução no pH e aumento da biomassa microbiana (CAMPBELL et al., 1997; COLES et al., 2005).

Menor produção de gás também foi observada utilizando casca de soja tratada com enzimas como substrato de fermentação *in vitro* utilizando inóculo fecal de cães, em comparação com o mesmo ingrediente sem tratamento (MYINT et al., 2017). Semelhante ao presente estudo, a menor quantidade de gás produzido foi atribuída à remoção de compostos solúveis rapidamente fermentáveis através da pré-digestão. Esses compostos podem ter sido digeridos pelas enzimas utilizadas na digestão *in vitro* ou removidos durante a etapa de filtração.

Os coeficientes de correlação de Pearson encontrados demonstram a capacidade do ensaio *in vitro* para estudar as características da fermentação do alimento seco extrusado para cães utilizado no estudo. No entanto, em sua maioria, os produtos finais da fermentação mensurados *in vivo* apresentaram correlação significativa com os dados obtidos após incubação do substrato não tratado enzimaticamente. Apesar da digestão

enzimática dos substratos previamente aos estudos de produção de gás *in vitro* parecer ser mais apropriada (COLES et al., 2005), alguns questionamentos podem ser levantados.

É possível que durante a etapa de filtração dos resíduos durante o tratamento prévio com enzimas ocorra perda de compostos solúveis e de pequenas partículas de materiais não digeridos, mas fermentáveis (BAUER et al., 2003). *In vivo*, tais compostos poderiam alcançar o intestino do animal e servirem como substratos para as bactérias intestinais contribuindo na formação de ácidos graxos voláteis.

As fibras solúveis, por exemplo, são geralmente fermentáveis, mesmo que em um curto período de tempo disponível para fermentação (DUST et al., 2004). O curto tempo em que ocorreu a taxa máxima de fermentação dos substratos utilizados no presente estudo sugerem que, independente da pré-digestão, ambos seriam fermentados em porções mais craniais do trato intestinal, podendo ocorrer inclusive fermentação no intestino delgado. Foi demonstrado em um estudo de fermentação *in vitro* utilizando quimo ileal canino que existe uma população bacteriana no intestino delgado de cães e que esta é capaz de fermentar amido e produzir ácidos graxos de cadeia curta e lactato (MURRAY et al., 2001). Além disso, vale ressaltar que além dos substratos oriundos da dieta, a fermentação bacteriana também pode ocorrer a partir de enzimas endógenas liberadas durante o processo de digestão.

Outro fator importante, diz respeito ao tempo de incubação, onde neste estudo, amostras do líquido remanescente da fermentação foram coletadas e avaliadas apenas após 48 horas de incubação. Interações entre microbiota, substrato e os próprios metabólitos da fermentação, onde pode ocorrer consumo e transformação de tais compostos, podem proporcionar concentrações diferentes ao longo do tempo (DONADELLI et al., 2019; PINNA et al., 2016, 2020). O tempo de incubação que melhor represente as concentrações obtidas *in vivo* precisa ser estabelecido.

Dust et al. (2004) observaram que diferentes condições de extrusão de ingredientes selecionados resultou em diferenças no desaparecimento da matéria orgânica durante o processo de digestão enzimática (pepsina, amiloglicosidase, R-amilase e pancreatina) seguindo em mudanças na produção total de ácidos graxos voláteis após fermentação *in vitro* utilizando inóculo fecal de suínos. Até onde sabemos, o impacto da pré-digestão enzimática de um alimento seco extrusado submetido ao

procedimento de fermentação *in vitro* utilizando inóculo fecal de cães ainda não tinha sido investigado. O presente trabalho foi o primeiro a avaliar tal correlação e deve servir como subsídio para estudos futuros. Em concordância com o retratado por Bauer et al. (2003), não é possível afirmar que a digestão enzimática previamente aos estudos de fermentação *in vitro* resultou em um substrato de fermentabilidade semelhante ao quimo ileal, posto que inúmeros processos fisiológicos podem acontecer no trato gastrointestinal superior e não são passíveis de reprodução *in vitro*, ocorre fermentação bacteriana no intestino delgado e a hidrólise enzimática pode não resultar em substratos com semelhanças precisas aos obtidos *in vivo*. Uma investigação mais aprofundada é necessária para verificar as contribuições e real necessidade da pré-digestão de diferentes categorias de alimentos secos extrusados para cães nos estudos de produção de gás e fermentação *in vitro*.

Em termos de raças, cães da raça Bulldog Francês (BF) são comumente associados à excesso de flatulências e fezes com odor mais forte, supostamente em função de anormalidades anatômicas que os levam a aerofagia e lesões no trato gastrointestinal (CAVE, 2013; PONCET et al., 2005; ROUDEBUSH et al., 2010; URREGO et al., 2017). Além da aerofagia, a reação entre o ácido gástrico e o bicarbonato liberado pelo pâncreas e/ou a fermentação microbiana também são contribuintes para o acúmulo de gases no lúmen intestinal (CAVE, 2013). No presente estudo *in vitro*, o inóculo BF apresentou maior atividade fermentativa, com maior produção de gás e desaparecimento da matéria seca, indicando que a fermentação intestinal parece ser um importante fator contribuinte para a flatulência excessiva relatada na raça. Esses resultados foram confirmados por um aumento nos níveis de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente na produção de propionato e acetato. Além disso, aumento significativo de valerato foi observado. De todo modo, a concentração de butirato – principal fonte de energia para os colonócitos e regulador do crescimento e diferenciação celular (SALMINEN et al., 1998) – não foram afetadas e os AGCC foram sempre representados por mais de 80% de acetato mais propionato, apontando uma tendência fisiológica da fermentação intestinal (WILLIAMS et al., 2001).

Tais achados supracitados podem ser devido a diferenças na atividade bacteriana dos diferentes inóculos. A extensão da fermentação e seus produtos finais estão

relacionados à interação entre microbiota e substratos (CALABRÒ et al., 2013), de forma que alterações na população microbiana pode resultar na formação de diferentes metabólitos. A abundância e riqueza de bactérias também variam ao longo do trato gastrointestinal (SUCHODOLSKI et al., 2008) e entre animais de diferentes raças, idades e escores de condição corporal (CUTRIGNELLI et al., 2009; REDDY et al., 2019; SIMPSON et al., 2002; YOU e KIM, 2021). Simpson et al. (2002) encontraram diferenças significativas na contagem de bactérias anaeróbicas e aeróbicas realizadas em cães de diferentes raças. You e Kim (2021) analisaram por sequenciamento de rRNA a microbiota gastrointestinal de cães de oito raças diferentes e constataram que, dentre elas, cães da raça Bulldog Francês apresentaram maior riqueza microbiana, constatada por meio do número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) observadas.

O menor valor de pH encontrado com o inóculo BF pode ser explicado pela maior concentração de ácido lático, sugerindo maior proliferação de bactérias ácido-láticas. Ademais, os valores de pH obtidos com ambos os inóculos encontraram-se dentro da faixa de normalidade fisiológica (5,5-7,5) indicada para o conteúdo do cólon e fezes de mamíferos, incluindo cães e gatos (YOUNES et al., 2001).

Quando as proporções de um único ácido graxo foram calculadas em relação ao total de ácidos graxos voláteis (Tabela 5), observou-se valores inferiores para acetato e isobutirato, enquanto que as concentrações de propionato e valerato foram superiores após a fermentação *in vitro* com inóculo BF, quando comparados com inóculo de cães da raça Whippet. As proporções totais de ácidos graxos de cadeia curta e de cadeia ramificada não diferiram entre os inóculos. As proporções dos ácidos graxos voláteis podem variar dependendo do tipo de substrato disponível (SUNVOLD et al., 1995), no entanto existe uma limitada competição pela absorção entre os variados metabólitos da fermentação. Sendo assim, a taxa de produção é um aspecto importante da fermentação, uma vez que a produção excessiva de compostos pode levar ao acúmulo de gases no intestino causando desconforto ao animal (DONADELLI et al., 2019).

Os ácidos graxos de cadeia curta são a principal fonte de energia para as bactérias intestinais e aumentam a utilização da amônia como fonte de nitrogênio para síntese da massa microbiana (HUGHES et al., 2000). No entanto, os ácidos graxos voláteis produzidos no intestino são rapidamente absorvidos, com cerca de 90-95% sendo absorvidos antes de atingirem o cólon distal (CUMMINGS, 1981). A baixa

disponibilidade de substratos pode levar à autólise de bactérias e fermentação de proteína microbiana pelos microrganismos remanescentes (CALABRÒ et al., 2013), resultando principalmente na formação de amônia (ROUDEBUSH et al., 2010).

As possíveis diferenças na microbiota intestinal puderam ser observadas, não só pela maior atividade e produção de AGVs *in vitro*, mas também pela maior produção de amônia com o inóculo obtido a partir das fezes dos Bulldogues Franceses. Uma hipótese levantada com este estudo é que cães desta raça (BF) apresentam uma maior população microbiana em comparação com os Whippets, sobretudo em porções mais distais do intestino. No entanto, é possível que durante a formação do bolo fecal e processo digestivo normal, ocorra limitação de substratos disponíveis para o crescimento microbiano, levando ao acúmulo de amônia que é então excretada nas fezes e relacionada ao mau odor fecal (ROUDEBUSH et al., 2010).

Ao analisar as fezes frescas coletadas dos cães das raças Bulldog Francês e Whippet é possível observar que não houve diferença nas concentrações dos ácidos graxos voláteis, porém cães Bulldogues apresentaram maior proporção de isovalerato em relação ao total. Esses resultados podem ser explicados devido à rápida absorção e utilização dos ácidos graxos no lúmen intestinal, restando apenas quantidades mínimas a serem excretadas nas fezes. Além disso, deve-se ressaltar que podem ocorrer interações fisiológicas entre o hospedeiro e a microbiota intestinal, as quais não são passíveis de simulação *in vitro*. Vale lembrar que também foram observados concentração e proporção superiores de valerato nos frascos de fermentação *in vitro* com inóculo BF. O isovalerato e o valerato são ácidos graxos resultante do metabolismo bacteriano dos aminoácidos leucina e prolina, respectivamente (CUTRIGNELLI et al., 2009).

A maior concentração de amônia nas fezes dos Bulldogues corrobora com a hipótese levantada a partir dos dados *in vitro* de diferenciação de microbiota e limitação de substrato para crescimento microbiano nas porções distais do intestino entre as raças estudadas. O acúmulo dos metabólitos gerados a partir da fermentação microbiana também pode alterar o equilíbrio osmótico no cólon, estimulando o transporte de água para o lúmen (DONADELLI et al., 2019), o que explicaria o menor valor de matéria seca fecal encontrado nos cães Bulldogues Franceses.

Estudos *in vivo* de mensuração dos produtos finais de fermentação em cães são condicionados à coleta de fezes frescas e constante observação e monitoramento dos animais, podendo chegar até 60 horas de supervisão, tornando-se inviável em algumas situações. Alguns estudos propõem metodologias que contempla coletas de fezes durante três dias consecutivos (PERINI et al., 2020; RENTAS et al., 2020) e, em seguida, as amostras são homogeneizadas formando um pool dessas amostras por animal que é então analisado. A avaliação durante 3 dias é utilizada afim de reduzir possíveis erros de coleta e variação diária, o que proporciona maior representatividade do que ocorre nos animais ao longo do tempo. Contudo, alguns estudos utilizam protocolos com apenas 1 dia de coleta de fezes e análise da amostra (CHIOFALO et al., 2019).

Um estudo secundário foi realizado para mensurar a variação entre as concentrações dos produtos finais da fermentação ao longo dos dias de coleta, bem como se a análise de uma amostra única é representativa o bastante, para substituir a coleta de 3 dias e a análise do pool destas amostras. Para isso, foram realizadas análises de nitrogênio amoniacal, ácidos graxos de cadeia curta, ácidos graxos de cadeia ramificada e ácido láctico seguindo metodologia tradicional de pool de amostras, bem como análises em amostras de cada um dos três dias e calculada uma média por animal.

Os resultados demonstraram considerável variação na concentração de todos os metabólitos analisados ao longo dos dias, evidenciando a necessidade de coleta de fezes por no mínimo três dias consecutivos para minimizar os efeitos de variação diária e erros durante a coleta. Além disso, com exceção dos AGCR, também houve alta concordância entre as concentrações dos compostos obtidas pela média das análises dos três dias e da análise do pool, sendo recomendada então apenas a análise do pool visando redução de custos.

Esse estudo possui algumas limitações. Primeiramente, a inclusão de um número maior de animais poderia ajudar a diminuir as interferências decorrentes de variações interindividuais. Aliado a isso, foram utilizados animais de uma mesma população, geneticamente homogêneos, vivendo sob as mesmas condições de ambiente e rotina, o que pode limitar a interpretação e replicação dos resultados em outros cães. Estudos futuros devem explorar as variações existentes entre as diferentes populações, sejam estas caracterizadas pela localização geográfica, idade, raça, escore de condição

corporal, entre outras variáveis. Análises microbiológicas também são necessárias para atestar os resultados obtidos.

O conhecimento dos parâmetros da fermentação é importante para o entendimento das interações entre microbiota e hospedeiro que, por sua vez, interferem diretamente nas funções fisiológicas, imunológicas e nutricionais dos animais. Neste sentido, vale ressaltar a importância de estudos *in vitro* como ferramenta complementar nos estudos de fermentação, para avaliar por exemplo a dinâmica da atividade fermentativa ou produção de gases, que muitas vezes não podem ser facilmente avaliadas *in vivo*. Esses resultados preliminares podem ser considerados o primeiro passo para se estabelecer o melhor protocolo *in vitro* para avaliação de alimentos completos extrusados. Além disto, este estudo trouxe informações relevantes sobre a atividade da microbiota gastrintestinal de cães da raça Bulldogue Francês, que fornecem subsidio para posteriores estudos da composição e atividade da microbiota e sua relação com o comportamento alimentar, anatomia e fisiologia do trato digestório das diferentes raças de cães.

6. CONCLUSÃO

A técnica de produção de gás *in vitro* demonstrou ser ferramenta complementar e útil para prever a fermentabilidade *in vivo* de alimento seco extrusado para cães. No entanto, mais pesquisas são necessárias para responder com precisão o impacto e necessidade da pré-digestão de alimentos para ensaios de fermentação *in vitro*. Os animais utilizados neste estudo apresentaram diferenças na cinética e produtos finais da fermentação *in vitro*, sendo que os cães da raça Bulldog Francês parecem possuir microbiota intestinal que proporciona maior produção de gás e de compostos nitrogenados que contribuem com o odor fecal.

7. REFERÊNCIAS

AOAC (ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS). Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. . 1995.

BALISH, E. et al. Nose, throat, and fecal flora of beagle dogs housed in “locked” or “open” environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 207–221, 1977.

BARRY, K. A. et al. Adaptation of healthy adult cats to select dietary fibers in vivo affects gas and short-chain fatty acid production from fiber fermentation in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 10, p. 3163–3169, 2011.

BAUER, E. et al. Microbial activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable carbohydrates. **Animal Science**, v. 73, n. 2, p. 313–322, 2001.

BAUER, E. et al. Impact of mammalian enzyme pretreatment on the fermentability of carbohydrate-rich feedstuffs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 3, p. 207–214, 2003.

BAUER, E. et al. Influence of dietary components on development of the microbiota in single-stomached species. **Nutrition Research Reviews**, v. 19, n. 1, p. 63–78, 2006.

BERMINGHAM, E. N. et al. Key bacterial families (Clostridiaceae, Erysipelotrichaceae and Bacteroidaceae) are related to the digestion of protein and energy in dogs. **PeerJ**, v. 2017, n. 3, 2017.

BOSCH, G. et al. Comparative in vitro fermentation activity in the canine distal gastrointestinal tract and fermentation kinetics of fiber sources. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 11, p. 2979–2989, 2008.

BOSCH, G.; VERVOORT, J. J. M.; HENDRIKS, W. H. In vitro digestibility and fermentability of selected insects for dog foods. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, p. 174–184, 2016.

BRAMBILLASCA, S. et al. Addition of citrus pulp and apple pomace in diets for dogs: Influence on fermentation kinetics, digestion, faecal characteristics and bacterial populations. **Archives of Animal Nutrition**, v. 67, n. 6, p. 492–502, 2013.

CALABRÒ, S. et al. Fermentation characteristics of several carbohydrate

sources for dog diets using the in vitro gas production technique. **Italian Journal of Animal Science**, v. 12, n. 1, p. 21–27, 2013.

CAMPBELL, J. M.; FAHEY, G. C.; WOLF, B. W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 1, p. 130–136, 1997.

CAVE, N. Gastrointestinal gas. In: WASHABAU, R. J.; DAY, M. J. (Eds.). . **Canine and Feline Gastroenterology**. St. Louis: Elsevier Saunders, 2013. p. 124–128.

CHIOFALO, B. et al. Grain free diets for utility dogs during training work: Evaluation of the nutrient digestibility and faecal characteristics. **Animal Nutrition**, v. 5, n. 3, p. 297–306, set. 2019.

COLES, L. T.; MOUGHAN, P. J.; DARRAGH, A. J. In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123- 124 Pa, p. 421–444, 2005.

COLLETT, S. **Nutrição, imunidade e produtividade**. Ronda Latinoamericana e do Caribe. **Anais...**Campinas: Alltech, 2000

CUMMINGS, J. H. Short chain fatty acids in the human colon. **Gut**, v. 22, n. 9, p. 763–79, set. 1981.

CUMMINGS, J. H.; ENGLYST, H. N. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 45, n. 5 SUPPL., p. 1243–1255, 1987.

CUTRIGNELLI, M. I. et al. In vitro fermentation characteristics of different carbohydrate sources in two dog breeds (German shepherd and Neapolitan mastiff). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 3, p. 305–312, 2009.

DONADELLI, R. A.; TITGEMEYER, E. C.; ALDRICH, C. G. Organic matter disappearance and production of short- and branched-chain fatty acids from selected fiber sources used in pet foods by a canine in vitro fermentation model. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 11, p. 4532–4539, 2019.

DRACKLEY, J. K.; BEAULIEU, A. D. **Energetic substrates for intestinal cells**. RECENT ADVANCES IN CANINE AND FELINE NUTRITION. **Anais...**Willmington: Iams, 1998

DUST, J. M. et al. Extrusion Conditions Affect Chemical Composition and in

Vitro Digestion of Select Food Ingredients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2989–2996, 2004.

EIVERS, C. et al. Retrospective analysis of esophageal imaging features in brachycephalic versus non-brachycephalic dogs based on videofluoroscopic swallowing studies. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 4, p. 1740–1746, 2019.

EWING, W. N.; COLE, D. J. A. **The living gut: an introduction to micro-organisms in nutrition**. [s.l.] Dungannon, Co.Tyrone, N. Ireland: Context, 1994.

FAHEY, G. C. et al. Levels of Dietary Beet Pulp on Nutrient Intake ., **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 4221–4228, 1990.

FCI. **Federation Cynologique Internationale**. Disponível em: <<http://www.fci.be/en/Presentation-of-our-organisation-4.html>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

FREICHE, V.; GERMAN, A. J. Digestive Diseases in Brachycephalic Dogs. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 51, n. 1, p. 61–78, 2021.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.

GROOT, J. C. J. et al. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 77–89, 1996.

HAIMEL, G.; DUPRÉ, G. Brachycephalic airway syndrome: A comparative study between pugs and French bulldogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 12, p. 714–719, 2015.

HENDRICKS, J. C. Brachycephalic airway syndrome. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 22, n. 5, p. 1145–1153, 1992.

HENDRIX, D. L. Rapid Extraction and Analysis of Nonstructural Carbohydrates in Plant Tissues. **Crop Science**, v. 33, n. 6, p. 1306–1311, nov. 1993.

HERSCHEL, D. A. . et al. Absorption of volatile fatty acid, Na, and H₂O by the colon of the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 7, p. 1118–1124, 1981.

HERVERA, M. et al. Prediction of digestible energy content of extruded dog

food by in vitro analyses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, n. 5–6, p. 205–209, 2007.

HUGHES, R. et al. Effect of colonic bacterial metabolites on caco-2 cell paracellular permeability in vitro. **Nutrition and Cancer**, v. 60, n. 2, p. 259–266, 2008.

HUGHES, R.; MAGEE, E. A. M.; BINGHAM, S. Protein degradation in large intestine. **Current issues in intestinal microbiology**, v. 1, p. 51–58, 2000.

HUSSEIN, S. H.; SUNVOLD, G. D. Dietary strategies to decrease dog and cat fecal odor components. In: REINHART, G. A.; CAREY, D. P. (Eds.). . **RECENT ADVANCES IN CANINE AND FELINE NUTRITION**. Willmington: Orange Frazer Press, 2000. p. 153–168.

JASKIEWICZ, J. et al. Catabolism of isobutyrate by colonocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 327, n. 2, p. 265–270, 1996.

KIM, J. et al. Differences in the gut microbiota of dogs (*Canis lupus familiaris*) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform. **Gut Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2017.

LECOINDRE, P.; RICHARD, S. Digestive disorders associated with the chronic obstructive respiratory syndrome of brachycephalic dogs: 30 Cases (1999-2001). **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 155, n. 3, p. 141–146, 2004.

LÓPEZ, S. In Vitro and In Situ Techniques for Estimating Digestibility. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Eds.). . **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. 2. ed. Wallingford: CABI, 2005. p. 87–121.

MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. The colonic flora, fermentation, and large bowel digestive function. In: PHILLIPS, S. F.; PEMBERTON, J. H.; SHORTER, R. G. (Eds.). . **The Large intestine: Physiology, Pathophysiology, and Disease**. New York: Raven Press, 1991. p. 51–92.

MASKELL, I. E.; JOHNSON, J. V. Digestion and absorption. In: BURGER, I. (Ed.). . **The Waltham Book of Companion Animal Nutrition**. Oxford, UK: Pergamon Press, 1993. p. 25–44.

MEINER, G. et al. Effects of “fresh mechanically deboned meat” inclusion on nutritional value, palatability, shelf-life microbiological risk and digestibility in dry dog food. **PLOS ONE**, v. 16, n. 4, p. e0250351, 22 abr. 2021.

MURRAY, S. M. et al. In vitro fermentation characteristics of native and

processed cereal grains and potato starch using ileal chyme from dogs. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 2, p. 435–444, 2001.

MUSCO, N. et al. In vitro evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall fermentability using a dog model. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. October 2017, p. 24–30, 2018.

MYINT, H. et al. Effect of soybean husk supplementation on the fecal fermentation metabolites and microbiota of dogs. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 11, p. 1730–1736, 2017.

NERY, J. 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**, v. 90, n. 8, p. 2570–2580, 2012.

NRC. **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2006.

OBA, P. M. et al. Effect of a novel animal milk oligosaccharide biosimilar on the gut microbial communities and metabolites of in vitro incubations using feline and canine fecal inocula. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 9, 1 set. 2020.

PERINI, M. P. et al. Duration of prebiotic intake is a key-factor for diet-induced modulation of immunity and fecal fermentation products in dogs. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1–13, 2020.

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

PINNA, C. et al. In vitro influence of dietary protein and fructooligosaccharides on metabolism of canine fecal microbiota. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2016.

PINNA, C. et al. In vitro evaluation of the effects of tylosin on the composition and metabolism of canine fecal microbiota. **Animals**, v. 10, n. 1, 2020.

PONCET, C. M. et al. Poncet 2005. Prevalence of GI tract lesions in 73 brachycephalic dogs with upper respiratory syndrome. *J Sm Ani Prac*. v. 46, n. June, 2005.

RADECKI, S. V.; YOKOYAMA, M. T. Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition. **Swine nutrition**, p. 439–447, 1991.

REDDY, K. E. et al. Impact of breed on the fecal microbiome of dogs under the same dietary condition. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 1947–1956, 2019.

RENTAS, M. F. et al. Galactoligosaccharide and a prebiotic blend improve colonic health and immunity of adult dogs. **PLoS ONE**, v. 15, n. 8 August, p. 1–13, 2020.

ROEDLER, F. S.; POHL, S.; OECHTERING, G. U. How does severe brachycephaly affect dog's lives? Results of a structured preoperative owner questionnaire. **Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 606–610, 2013.

ROUDEBUSH, P.; DAVENPORT, D. J.; REMILLARD, R. L. Flatulence. In: HAND, M. S. et al. (Eds.). . **Small Animal Clinical Nutrition**. 5. ed. [s.l: s.n.]. p. 1082–1088.

ROY, M.; GIBSON, G. R. Probiotics and prebiotics – microbial in menu. **CHO carbohydrates**, v. 9, n. 3, p. 6, 1998.

SALMINEN, S. et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. S1, p. S147–S171, 1998.

SANDRI, M. et al. Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2017.

SCHAUF, S. et al. Effect of dietary fat to starch content on fecal microbiota composition and activity in dogs. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 9, p. 3684–3698, 2018.

SEKIROV, I. et al. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 859–904, 2010.

SIMPSON, J. M. et al. Characterization of fecal bacterial populations in canines: Effects of age, breed and dietary fiber. **Microbial Ecology**, v. 44, n. 2, p. 186–197, 2002.

SIMPSON, J. W. Diet and large intestinal disease in dogs and cats. **Journal of Nutrition**, v. 128, n. 12 SUPPL., p. 2717–2722, 1998.

SUCHODOLSKI, J. S.; CAMACHO, J.; STEINER, J. M. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 3, p. 567–578, dez. 2008.

SUNVOLD, G. D. et al. In vitro fermentation of selected fibrous substrates by dog and cat fecal inoculum: influence of diet composition on substrate organic matter disappearance and short-chain fatty acid production. **Journal of animal science**, v. 73, n. 4, p. 1110–1122, 1995.

THEODOROU, M. K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 3–4, p. 185–197, ago. 1994.

TRAN, Q. D.; HENDRIKS, W. H.; VAN DER POEL, A. F. Effects of extrusion processing on nutrients in dry pet food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 9, p. 1487–1493, jul. 2008.

URREGO, M. I. G. et al. Effects of different protein sources on fermentation metabolites and nutrient digestibility of brachycephalic dogs. **Journal of Nutritional Science**, p. 1–5, 2017.

VAN DEN ABBEELE, P. et al. Yeast-Derived Formulations Are Differentially Fermented by the Canine and Feline Microbiome As Assessed in a Novel in Vitro Colonic Fermentation Model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 46, p. 13102–13110, 2020.

VASTOLO, A. et al. In vitro fermentation and chemical characteristics of mediterranean by-products for swine nutrition. **Animals**, v. 9, n. 8, p. 1–12, 2019.

VIEIRA, P. DE F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminantes**, 1980.

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

VITAL, M. et al. Diet is a major factor governing the fecal butyrate-producing community structure across Mammalia, Aves and Reptilia. **ISME Journal**, v. 9, n. 4, p. 832–843, 2015.

WIERNUSZ, C. J. et al. Canine nutrient digestibility and stool quality evaluation of canned diets containing various soy protein supplements. **Vet. Clin. Nutr.**, v. 2, n. April, p. 49–56, 1995.

WILLIAMS, B. A. et al. An in vitro batch culture method to assess potential

fermentability of feed ingredients for monogastric diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123- 124 Pa, p. 445–462, 2005.

WILLIAMS, B. A.; VERSTEGEN, M. W. A.; TAMMINGA, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. **Nutrition Research Reviews**, v. 14, n. 02, p. 207, 2001.

YAMKA, R. M. et al. Evaluation of low-ash poultry meal as a protein source in canine foods¹. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 9, p. 2279–2284, 1 set. 2003.

YOU, I. W.; KIM, M. J. Comparison of gut microbiota of 96 healthy dogs by individual traits: Breed, age, and body condition score. **Animals**, v. 11, n. 8, 2021.

YOUNES, H. et al. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 86, n. 4, p. 479–485, 9 out. 2001.

ZENTEK, J. Influence of diet composition on the microbial activity in the gastro-intestinal tract of dogs. II. Effects on the microflora in the ileum chyme. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 74, n. 1–5, p. 53–61, 1995.

ZICARELLI, F. et al. In vitro fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios: Comparison of rumen and faecal inocula. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 7, p. 1213–1221, 2011.