

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**JÉSSICA FERREIRA BARCELLOS
Zootecnista/UFRGS**

**AVALIAÇÃO DE ADITIVOS ZOOTÉCNICOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE,
PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO E MICROBIOTA FECAL EM CÃES ADULTOS**

**PORTO ALEGRE
Estado do Rio Grande do Sul
Junho – 2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**JÉSSICA FERREIRA BARCELLOS
Zootecnista/UFRGS**

**AVALIAÇÃO DE ADITIVOS ZOOTÉCNICOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE,
PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO E MICROBIOTA FECAL EM CÃES ADULTOS**

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Zootecnia. Área de concentração Produção Animal, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Trevizan

**PORTO ALEGRE
Estado do Rio Grande do Sul
Junho – 2023**

Jéssica Ferreira Barcellos
Zootecnista

DISSERTAÇÃO


Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 05.06.2023
Pela Banca Examinadora


Homologado em:
08/08/2023 Por

Documento assinado digitalmente
 LUCIANO TREVIZAN
Data: 05/06/2023 16:33:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Assinado de forma digital por Sergio
Sergio Luiz Vieira Luiz Vieira
Dados: 2023.08.09 13:22:51 -03'00'

LUCIANO TREVIZAN
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador


SERGIO LUIZ VIEIRA
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia

Documento assinado digitalmente
 DEBORA CRISTINA NICHELLE LOPES
Data: 07/06/2023 08:51:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Débora Cristina Nichelle Lopes
UFPel

Documento assinado digitalmente
 GABRIEL FARIA ESTIVALLET PACHECO
Data: 05/06/2023 17:39:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Gabriel Faria Estivallet Pacheco
IFF

Documento assinado digitalmente
 PRISCILA DE OLIVEIRA MORAES
Data: 09/06/2023 11:57:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Priscila de Oliveira Moraes
UFSC

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

CIP - Catalogação na Publicação

Barcellos, Jéssica Ferreira

Avaliação de aditivos zootécnicos sobre a digestibilidade, produtos de fermentação e microbiota fecal em cães adultos / Jéssica Ferreira Barcellos. -- 2023.

52 f.

Orientador: Luciano Trevizan.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. nutrição animal. 2. aditivos. 3. microbioma. 4. cães . 5. ácidos graxos. I. Trevizan, Luciano, orient.
II. Título.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”
John F. Kennedy

À minha filha, Maria Helena.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a mim, pois em diversos momentos pensei em desistir mas segui em frente, firme e forte para a realização de mais um sonho, a pós-graduação.

Também gostaria de agradecer aos que estiveram comigo nessa caminhada, minha amiga e colega Zootecnista Jéssica D'avila, e também aos estagiários do laboratório, Matheus e Ariane.

Não posso esquecer também de agradecer especialmente aos cães, que sem eles, nada disso teria sido possível, obrigada a Tati, Mari, Billy, Sauco, Star, Aston, Vera, Lennon, Matheo, Açai, Close, Marra, Marla, Joco e a Baby.

Agradecer também ao Programa de Pós-Graduação, ao professor Luciano Trevizan, a Capes e a Tectron.

À minha mãe, minha filha e meu namorado, obrigada pelo suporte, não teria conseguido sem vocês.

AVALIAÇÃO DE ADITIVOS ZOOTÉCNICOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE, PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO E MICROBIOTA FECAL EM CÃES ADULTOS¹

Autor: Jéssica Ferreira Barcellos

Orientador: Prof. Dr. Luciano Trevizan

RESUMO

Ao longo dos anos, vários aditivos nutricionais têm sido utilizados para melhorar a digestão e promover a eubiose no trato gastrointestinal. Entre esses aditivos, o extrato de yucca, os mananoligossacarídeos (MOS), os probióticos e as proteases têm sido amplamente estudados e utilizados em alimentos para animais. Este estudo teve como objetivo comparar formulações de aditivos zootécnicos para cães contendo extrato de yucca, mananoligossacarídeos e protease para testar o efeito sinérgico entre eles na saúde intestinal de cães adultos. Foram utilizados 12 cães adultos saudáveis, distribuídos em um delineamento em quadrado latino incompleto e balanceado com 6 tratamentos, sendo eles: Controle (dieta basal sem aditivos), *Blend* YSA (dieta basal + Extrato de Yucca A 0,250kg/t), *Blend* YSB (dieta basal + Extrato de Yucca B 0,250kg), *Blend* YM (dieta basal + Extrato de Yucca A + MOS 0,250kg/t), *Blend* YMP (dieta basal + Extrato de Yucca A + MOS + Protease 0,250kg/t) e Prot (dieta basal + protease 0,200kg/t). Os cães foram alimentados por 27 dias com as dietas experimentais. Após 10 dias de adaptação as dietas, avaliou-se a digestibilidade dos nutrientes e da energia, características fecais e urinárias e os produtos de fermentação fecal. No último dia do estudo amostras de fezes foram coletadas para avaliação da microbiota fecal. As médias foram avaliadas para normalidade e testadas pelas análises de variância assumindo a significância $P < 0,05$. Não houve diferença significativa entre digestibilidade de nutrientes e energia, características urinárias e fecais. As análises de microbiota foram feitas em charutos fecais e foram classificados em 25 filos, 47 classes, 105 ordens, 177 famílias e 347 gêneros. Os tratamentos Controle, YSA, YMP e Prot apresentaram maior quantidade do filo Firmicutes quando comparado aos demais tratamentos (YSB e YM) com as classes Alphaproteobacteria, Clostridia, Bacteroidia, Bacilos e Ignavibactérias sendo os principais representantes. A abundância relativa de *Blautia* diminuiu em cães alimentados com YSB em comparação com Prot ($p = 0.0406$). O gênero *Prevotella* diminuiu em cães alimentados com Prot em comparação com YMP ($p = 0.0269$). O presente estudo mostrou que o uso dos aditivos Yucca shidigera, MOS e protease adicionados nas dietas nestas concentrações não demonstraram resultados significativos quanto ao uso individual ou em conjunto quando analisados para características fecais.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (50 p.) Junho, 2023.

Palavras-chave: ácidos graxos; amônia; lactato; microbioma

EVALUATION OF ZOOTECHNICAL ADDITIVES ON DIGESTIBILITY, FERMENTATION PRODUCTS AND FECAL MICROBIOTA IN ADULT DOGS ²

Author: Jéssica Ferreira Barcellos

Advisor: Prof. Dr. Luciano Trevizan

ABSTRACT

Over the years, various nutritional additives have been used to improve digestion and promote eubiosis in the gastrointestinal tract. Among these additives, yucca extract, mannan oligosaccharides (MOS), probiotics and proteases have been widely studied and used in animal feed. This study aimed to compare formulations of zootechnical additives for dogs containing yucca extract, mannanoligosaccharides and protease to test the synergistic effect between them on the intestinal health of adult dogs. Twelve healthy adult dogs were used, distributed in an incomplete and balanced Latin square design with 6 treatments, namely: Control (basal diet without additives), Blend YSA (basal diet + Yucca Extract A 0.250kg/t), Blend YSB (basal diet + Yucca Extract B 0.250kg, Blend YM (basal diet + Yucca A Extract + MOS 0.250kg/t), Blend YMP (basal diet + Yucca A Extract + MOS + Protease 0.250kg/t) and Prot (basal diet + protease 0.200kg/t). The dogs were fed the experimental diets for 27 days. After 10 days of adaptation to the diets, the digestibility of nutrients and energy, fecal and urinary characteristics and fecal fermentation products were evaluated. On the last day of the study, stool samples were collected to assess the fecal microbiota. Means were evaluated for normality and tested by analysis of variance assuming $P < 0.05$ significance. There was no significant difference between nutrient and energy digestibility, urinary and fecal characteristics. Microbiota analyzes were performed on fecal cigars and they were classified into 25 phyla, 47 classes, 105 orders, 177 families and 347 genera. The Control, YSA, YMP and Prot treatments showed a higher amount of the Firmicutes phylum when compared to the other treatments (YSB and YM) with the classes Alphaproteobacteria, Clostridia, Bacteroidia, Bacilli and Ignavibacteria being the main representatives. The relative abundance of Blautia decreased in dogs fed YSB compared to Prot ($p = 0.0406$). The genus Prevotella decreased in dogs fed Prot compared to YMP ($p = 0.0269$). The present study showed that the use of additives Yucca shidigera, MOS and protease added to diets at these concentrations did not show significant results for individual or combined use when analyzed for fecal characteristics.

Key words: microbiome; ammonia; lactate; fatty acids

¹ Master of Science dissertation in Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (50 p.) June, 2023.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	10
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Microbiota intestinal	14
2.2 Aditivos	15
2.3 Prebióticos	16
2.3.1 Extrato de Yucca	17
2.3.2 Mananoligossacarídeos (MOS)	18
2.3.3 Enzima protease	19
2.4 Probiótico	19
2.5 Efeito sinérgico de aditivos	20
3. OBJETIVOS	22
4. HIPÓTESES	23
CAPÍTULO II	24
Abstract	26
Introduction	27
Results and discussion	34
CAPÍTULO III	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS	48

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais tendências na indústria de alimentos é a busca por alimentos funcionais que possam melhorar a saúde tanto dos seres humanos quanto dos animais, sendo eles de produção ou de companhia. Existem diferentes aditivos que podem ser usados em formulações alimentares, sintéticos ou naturais, adicionados com o propósito de produzir algum benefício às dietas. Cada aditivo possui efeitos específicos e estes efeitos são inerentes aos componentes ativos.

Entre os aditivos os mais utilizados são o extrato de *Yucca schidigera*, que ajuda a controlar o odor das fezes; os mananoligossacarídeos (MOS), que se ligam às bactérias patogênicas reduzindo a capacidade de fixação no intestino; as proteases, enzimas que auxiliam na digestão da proteína e consequente absorção de aminoácidos. Apesar de cada aditivo ter uma função específica, a associação entre aditivos pode produzir interação quando na luz intestinal. Efeitos somatórios ou inibitórios podem ocorrer de forma que o estudo destes aditivos de forma isolada e associada são necessários.

Em alimentos que apresentam elevados teores de proteína não digestível, há maior disponibilidade de aminoácidos para a fermentação no cólon, gerando compostos como amônia, ácidos graxos de cadeia ramificada, aminas, além de fenóis e indóis. Esses compostos pioram o odor fecal e alguns apresentam toxicidade para as células da mucosa intestinal, podendo estar envolvidos em processos inflamatórios intestinais (SWANSON *et al.*, 2002; MIDDELBOSS *et al.*, 2007). O uso de extrato de *yucca* atua na redução dos odores de fezes através das saponinas, que possuem propriedades de atuar no metabolismo do nitrogênio, fixando amônia e reduzindo os gases que proporcionam o odor fétido das fezes.

A microbiota gastrointestinal de cães e gatos é similar à de humanos, sendo um ecossistema complexo, com várias centenas de diferentes filotipos bacterianos (SUCHODOLSKI *et al.*, 2009). O intestino dos mamíferos serve de abrigo para um total de 10^{10} - 10^{40} células microbianas, cerca de 10 vezes mais do que células hospedeiras. A microbiota auxilia o indivíduo, atuando como uma barreira de defesa contra enteropatógenos, auxiliando também na digestão de fontes complexas de fibras, produzindo ácidos graxos de cadeia curta e outros metabólitos, fornecendo suporte nutricional para enterócitos, que desempenham um importante papel na

regulação e desenvolvimento do sistema imunológico do indivíduo (SUCHODOLSKI *et al.*, 2009).

Mananoligossacarídeos também são utilizados na indústria de animais de companhia, tem demonstrando resultados benéficos em cães (LOWE & KERSHAW, 1997; SWANSON *et al.*, 2002; MIDDELBOS *et al.*, 2007; FÉLIX *et al.*, 2009), pois possuem semelhanças estruturais com alguns microrganismos patogênicos, se ligam as bactérias carregando-as para fora do organismo, reduzindo a ação de patógenos no intestino.

Conhecer o efeito isolado e o efeito sinérgico dos aditivos sobre as dietas, os efeitos específicos sobre a digestão e absorção de nutrientes, fermentação no cólon, qualidade fecal, interferência sobre a microbiota fecal e sobre os produtos da fermentação são decisivos para a escolha de aditivos que possam trazer benefícios a diferentes formulações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microbiota intestinal

No sentido mais amplo, microbiota é o conjunto de microrganismos do trato intestinal, como bactérias, protozoários, fungos e vírus. O microbioma é o ambiente onde estes microrganismos estão inseridos. Estudos recentes mostram que a microbiota gastrointestinal de cães e gatos é semelhante à dos humanos, sendo um ecossistema complexo, com várias centenas de filotipos bacterianos diferentes (SUCHODOLSKI et al., 2009). O intestino dos mamíferos abriga um total de 10^{10} - 10^{40} células microbianas, cerca de 10 vezes mais do que as células hospedeiras. A microbiota auxilia o indivíduo atuando como uma barreira de defesa contra enteropatógenos, auxiliando também na digestão de fontes complexas de fibras, produzindo ácidos graxos de cadeia curta e outros metabólitos, fornecendo suporte nutricional para os enterócitos, que desempenham um papel importante na regulação e desenvolvimento do sistema imunológico do indivíduo. O intestino delgado é o abrigo onde estão organismos anaeróbicos e aeróbicos, porém os anaeróbicos também estão no cólon, sendo que os filos mais predominantes na composição do trato intestinal são o das Fusobacterias, Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes.

Um grande número de microrganismos, principalmente bactérias, está presente na microbiota de cães e gatos e são adquiridos logo após o nascimento. As bactérias comumente convivem com pessoas e animais e estão ligadas a uma série de outros tecidos, como a pele, o trato respiratório e o sistema urinário, por exemplo. A microbiota encontrada no trato digestivo canino desempenha funções vitais no organismo, pois funciona como uma barreira que impede a adesão de bactérias causadoras de doenças, desempenha um papel significativo no sistema imunológico ativando células e estimulando a produção de imunoglobulinas, e também afeta a digestão de nutrientes e a motilidade gastrointestinal.

Depois que a microbiota intestinal se estabelece, ela permanece amplamente estável, embora possa ser afetada pela dieta, doenças, uso de medicamentos e envelhecimento. Fatores emocionais como a chegada de um novo animal no ambiente, viagens, ausência do dono, mudanças ambientais, e mesmo um declínio nos padrões de caminhada pode resultar no desequilíbrio da microbiota. A desordem da microbiota intestinal, também conhecida como disbiose, pode levar à diminuição

do número de bactérias benéficas e favorecer a disseminação e adução de agentes patogênicos, colocando em risco a saúde dos animais de companhia por meio de distúrbios imunológicos e metabólicos.

2.2 Aditivos

Conforme portaria ANVISA nº 540, de 27 de outubro de 1997, aditivos são ingredientes adicionados intencionalmente aos alimentos com a intenção de alterar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, sem o objetivo de melhorar sua nutrição. Isso pode ocorrer durante a produção, processamento, preparação, manuseio, embalsamamento, adjudicação, armazenamento, transporte, ou manipulação dos alimentos em questão.

Por definição do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), na Instrução Normativa nº 30, de 05 de agosto de 2009, alterada depois pela Instrução Normativa nº 44, de 2014, substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios ou atenda às necessidades nutricionais (MAPA, 2015).

Em termos gerais, a classificação dos aditivos baseia-se na função que estes desempenham no alimento, incluindo-se as moléculas de estrutura e propriedades físico-químicas semelhantes em uma mesma categoria. Deste modo distinguem-se algumas categorias ou classes de aditivos: corantes, conservantes, antioxidantes, emulsionantes, espessantes, gelificantes, estabilizantes, intensificadores de sabor, acidificantes, reguladores de acidez, antiaglutinante, edulcorantes, levedantes químicos, sequestrantes, amidos modificados, anti-espumantes e aromatizantes (ANVISA, 1997).

Segundo a Instrução Normativa nº 13, de 01 de dezembro de 2004, existem outras categorias e sub-categorias como: adsorvente, aglomerante, antiaglomerante, antiumectante, umectante, palatabilizante, aditivos zootécnicos, oligoelementos, vitaminas e aminoácidos.

Os aditivos incluídos nas dietas de cães têm o propósito de conservar os alimentos, intensificar a cor, dar sabor, melhorar a digestibilidade dos nutrientes ou auxiliar na modulação do trato gastrointestinal, seja melhorando o processo

fermentativo, sequestrando componentes voláteis de odor indesejável ou alterando as populações microbianas presentes no bolo fecal. Diversos componentes podem ser enquadrados na categoria dos aditivos zotéuticos, cada um possui uma forma de ação. A associação entre diferentes aditivos pode funcionar de forma isolada ou associada, potencializando o efeito de cada aditivo.

Este estudo tem como principais aditivos utilizados, o extrato de *Yucca*, mananoligossacarídeos e a enzima protease.

2.3 Prebióticos

Prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que modulam o crescimento de microrganismos intestinais. Estes componentes são utilizados separadamente ou em associação com os probióticos (microrganismos esporulados), especialmente buscando a prevenção ou tratamento de diarreias, pois produzem efeitos benéficos à microbiota intestinal e apresentam baixos custos de produção (MACFARLANE *et al.*, 2006).

As moléculas prebióticas na alimentação de animais de companhia incluem carboidratos não digeríveis, como frutoligossacarídeos (FOS) e mananoligossacarídeos (MOS), que são fibras fermentáveis que promovem o crescimento de bactérias benéficas no trato gastrointestinal. Estudos de Gibson *et al.* (2004) revisaram o conceito de prebiótico e citaram três aspectos-chaves de sua definição: resistência à digestão; fermentação pela microbiota do intestino grosso; e o efeito seletivo na microbiota que promove a saúde intestinal. O mesmo pesquisador propôs uma nova definição para estes aditivos: “prebiótico é um ingrediente fermentado seletivamente que permite alterações específicas, tanto na composição quanto na atividade da microbiota gastrointestinal que confere benefícios ao bem-estar e à saúde do hospedeiro” (Gibson *et al.*, 2004). Sendo assim, o prebiótico deve estar disponível para alguns tipos de bactérias que são benéficas para a saúde intestinal, sendo utilizada como substrato criando um ambiente propício em que a população bacteriana benéfica aumente em comparação as bactérias patogênicas.

Hussen *et al.* (1998) observaram que o uso de mananoligossacarídeos aumentaram as bifidobactérias fecais e os lactobacilos ileais em cães. Para a pesquisa nutricional de animais de companhia, o uso de prebióticos pode reduzir o crescimento de microrganismos patogênicos no intestino delgado, melhorando o perfil microbiano

do cólon e a digestibilidade dos nutrientes e diminui compostos putrefativos fecais, resultando na melhora das características fecais (GIBSON *et al.*, 2004).

Outra estratégia como probiótico é o uso de algumas bactérias do gênero *Bacillus*, pois quando suplementadas na dieta, podem favorecer bactérias não patogênicas. Bastos *et al.* (2020) observaram um melhor escore fecal em cães quando suplementados com *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* em dietas extrusadas. Essas bactérias do gênero *Bacillus*, possuem características de serem resistentes ao pH gástrico ácido, o que os torna mais viáveis em dietas para animais de companhia (MOIR, 2006).

2.3.1 Extrato de Yucca

Yucca schidigera é uma planta da família Agavaceae, nativa dos Estados Unidos da América, mais precisamente dos desertos no sudeste americano que foi comumente usada como um fitoterápico pelos nativos (CHEEKE *et al.*, 2006). Os produtos derivados da *Yucca schidigera* são o pó, obtido através da maceração mecânica da planta seca, e o extrato, obtido através do caldo da planta.

A *Yucca schidigera* apresenta compostos denominados saponinas esteroidais. As saponinas são glicosídeos que são unidos em um ou em vários monossacarídeos por uma ligação glicosídica a uma aglicoma, denominando-se sapogenina. Também consistem em três compostos: os alcaloides esteroidais, os triterpenoides glicosilados e os esteroides (WINA *et al.*, 2005). Comumente estudadas, as saponinas têm ótimo poder de melhorar a absorção de nutrientes e também auxiliar na aceleração da atividade da microbiota intestinal (HUSSAIN & CHEEKE, 1995). As saponinas contêm carboidratos como glicose, galactose, ácido glicurônico, xilose e rhamnose. Elas também são conhecidas por atuarem na redução do colesterol, pois formam complexos insolúveis e assim, previne a absorção no intestino delgado (SIDHU; OAKENFULL, 1986). Bingham (1976) propôs que as saponinas da planta possuem atividade antiprotozoária capaz de evitar infecções intestinais

Alguns estudos mostram que ocorre uma redução significativa de até 56% no odor das fezes de cães (MACFARLANE, 1988; BASTOS, 2020). Possíveis mecanismos mostram que o extrato de *Yucca schidigera* reduz o odor das fezes pela inibição da urease, conseguida pela fração de saponinas que o extrato possui (PRESTON *et al.*, 1987). Outro possível mecanismo é que a parte solúvel em água

possui grande afinidade pela amônia se ligando a ela (HEADON, 1991). A redução na produção de amônia nas fezes tem sido atribuída ao extrato de *Yucca* (FRANCIS *et al.*, 2002).

A incorporação de extrato de *Yucca schidigera* nas dietas para animais de companhia demonstrou não comprometer a palatabilidade da ração, tanto em cães como em felinos, ilustrando alto grau de aceitabilidade (MAIA *et al.*, 2010; SANTOS, 2011). Segundo Yan *et al.* (2017) a inclusão de 0,025g/kg de saponinas totais podem trazer benefícios para a diversidade da microbiota.

2.3.2 Mananoligossacarídeos (MOS)

Os mananoligossacarídeos (MOS) ou mananas são carboidratos derivados da parede celular externa de levedura, a *Saccharomyces cerevisiae*, que não são hidrolisados pelas enzimas digestivas do intestino delgado. Estaquiose, galactona e os mananos são alguns oligossacarídeos que atuam impedindo a fixação intestinal de bactérias patogênicas tais como *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* É necessária a adesão destas bactérias ao epitélio intestinal para criar uma condição patogênica (FELSSNER, 2013).

Uma das formas de reduzir as chances de fixação intestinal das bactérias patogênicas é através do uso de açúcares ou oligossacarídeos dietéticos que quando disponíveis na luz intestinal se ligam as fimbrias das mesmas bactérias e impedem a adesão reduzindo a capacidade patogênica das bactérias. O MOS atua beneficiando a resposta imune dos animais, pois os patógenos e toxinas que se ligam ao MOS formam um grande novelo que é reconhecido pelo sistema imunológico (FELSSNER, 2013).

Atualmente, os carboidratos e oligossacarídeos vem sendo utilizados como moduladores nutricionais do sistema imunológico. Estudo realizado por Gouveia *et al.*, (2006) sobre a efetividade do MOS em cães, entre 2 e 6 meses de idade, durante quadros de gastroenterite, verificou que cerca de 85% dos cães tiveram maior eliminação fecal da *Escherichia coli* patogênica nas fezes. Já no grupo controle, 25% dos cães que não receberam MOS na dieta, não apresentaram o microrganismo nas fezes, sendo MOS efetivo no controle de *E. coli* patogênica. Desta forma, o MOS foi indicado no tratamento adjuvante para gastroenterites. Middelbos *et al.* (2007) descrevem que houve diminuição no pH das fezes dos cães, recebendo 0,45% de MOS na dieta. Um resultado semelhante foi relatado por Zentek *et al.* (2002) que

observaram diminuição no pH fecal e menor concentração de amônia nas fezes de cães que foram suplementados com 1 g/kg de peso corporal/dia de MOS, em relação à dieta controle.

Os mananoligossacarídeos (MOS) por apresentarem semelhanças estruturais com alguns microrganismos patogênicos, ligam as bactérias e as transportam para fora do corpo, reduzindo a ação de patógenos no intestino.

2.3.3 Enzima protease

Um dos três maiores grupos de enzimas industriais são as proteases, sendo utilizadas em indústrias de couro, em indústrias alimentícias, indústrias farmacêuticas e em processos de biorremediação. Esse uso extensivo se deve ao baixo custo e a grande velocidade de produção. Essas enzimas proteolíticas são de fundamental importância na digestão dos alimentos, pois quebram as ligações peptídicas das proteínas, liberando os aminoácidos necessários para o organismo (OGINO *et al.*, 2008).

O uso dessas enzimas na medicina já é notável, com base em vários estudos clínicos, nos quais indicam os benefícios em condições inflamatórias, regulação imunológica, trazendo benefícios também para a área de oncologia (NAIDU, 2011). Os vírus são parasitas celulares, cuja a formação consiste em ácidos nucleicos com uma película proteica. As enzimas proteases digerem as capas protetoras dos vírus, os inativando, o que pode poupar o sistema imunológico pois conseguem quebrar as proteínas não digeridas, assim como resíduos celulares e também as toxinas no sangue. Além disso, as proteases também possuem a capacidade de digerir certas bactérias.

Como um grupo grande e diversificado de enzimas hidrolíticas, as proteases são categorizadas de acordo com suas estruturas e mecanismos de ação específicos. As proteases controlam uma ampla gama de funções corporais, incluindo as funções celulares vitais de divisão celular, motilidade e morte.

2.4 Probiótico

O termo "probiótico", que por definição significa "a favor da vida", foi usado pela primeira vez para descrever os ingredientes para uma vida saudável em 1954. Os probióticos são suplementos dietéticos feitos com microrganismos vivos que atuam favoravelmente no tratamento intestinal. As bactérias probióticas trabalham para

manter o equilíbrio intestinal, regulando a microbiota no intestino. A inclusão de probióticos em dietas para cães está associada com benefícios à saúde de cães, pois previnem da colonização de bactérias patogênicas, estimulam o sistema imunológico e facilitam a digestão e absorção de nutrientes (GRZEŚKOWIAK *et al.*, 2015).

Os probióticos podem ser administrados à animais de estimação em qualquer fase da vida, mas são especialmente cruciais quando há altos níveis de estresse e um consequente declínio no sistema imunológico. Algumas fases da vida de um cão são estressantes, como a fase de separação da ninhada ou o tempo que antecede e segue o parto nas fêmeas, ou mesmo mudanças abruptas na rotina pode causar estresse nos animais. Nestas situações, os probióticos podem ser utilizados para prevenir o desequilíbrio da microbiota gastrointestinal e, conseqüentemente, os problemas que podem resultar desta circunstância. O objetivo do uso de microrganismos probióticos deve ser sempre manter o equilíbrio benéfico da microbiota.

Baillon *et al.* (2004) avaliou a qualidade de *L. acidophilus* DSM13241, em cães adultos como aditivo alimentar. O probiótico se mostrou estável em ração seca, mostrando também que sobreviveu ao trato gastrointestinal dos cães, além de aumentar o número de lactobacilos e a diminuição de clostrídios nas fezes, melhorando os parâmetros imunológicos e sanguíneos.

2.5 Efeito sinérgico de aditivos

O efeito sinérgico ocorre quando duas ou mais substâncias se combinam para produzir um resultado mais potente ou eficaz do que seria esperado pela soma dos efeitos das substâncias individualmente. Em outras palavras, o efeito sinérgico é o resultado de uma interação positiva entre as substâncias, onde cada componente potencializa o efeito do outro.

Souza *et al.* (2017) avaliaram a inclusão de MOS e *Yucca* na dieta de cães e concluíram que a dieta apresentou efeitos benéficos à saúde intestinal e nas características fecais dos animais, com a redução da produção de amônia e ácidos graxos de cadeia ramificada, diminuindo o odor fecal. Além disso, foi notado aumento na produção de ácido acético intestinal e redução do acúmulo de água nas fezes, permitindo melhor consistência fecal.

Reis *et al.* (2016) avaliaram o efeito da inclusão de *Yucca* em dietas com diferentes níveis de proteína bruta e concluíram que o odor fecal reduziu quando a

inclusão foi de 500 mg/kg em dietas que continham maior nível de proteína bruta, em torno de 34%. Além disso, a inclusão de *Yucca* reduziu a formação de gás intestinal. Não houve efeitos na digestibilidade dos nutrientes, nem na consistência fecal, mas independente do teor proteico, a inclusão reduziu a amônia fecal.

Santos *et al.* (2016) também avaliaram a inclusão de *Yucca* com adição de zeólita adicionados às dietas para cães sobre os efeitos dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) das dietas e pH urinário. Os autores concluíram que o CDA da dieta e o pH urinário não foram afetados pela inclusão dos aditivos, exceto o CDA do extrato etéreo em hidrólise ácida, que houve uma redução com a suplementação do extrato de *Yucca*.

Esses e outros estudos mostram que estes aditivos, quando atuando em conjunto, possuem seus efeitos melhorados em comparação quando estudados individualmente e isso pode ocasionar pela função das proteases aumentarem a digestibilidade da proteína da dieta, originando menos substrato fermentativo, reduzindo os componentes fétidos pela ação da *Yucca schidigera*.

3. OBJETIVOS

Objetivou-se com a realização deste trabalho avaliar o uso de aditivos e seus efeitos sobre a digestibilidade dos nutrientes e energia, características fecais e urinárias, produtos de fermentação e microbiota fecal de cães adultos.

Objetivos específicos:

- Avaliar a digestibilidade dos nutrientes e da energia em dietas acrescidas por diferentes aditivos de forma isolada e combinada.
- Avaliar a sinergia entre os aditivos e seus efeitos sobre a qualidade fecal
- Avaliar as alterações na população microbiana intestinal com o uso de aditivos.

4. HIPÓTESES

- A inclusão de protease, mananoligossacarídeo e extrato de Yucca em dietas, aumenta a digestibilidade dos nutrientes e da energia em cães adultos;
- O efeito sinérgico da associação entre os aditivos melhora a qualidade fecal;
- Os usos dos aditivos melhoram a saúde microbiana intestinal

CAPÍTULO II

EVALUATION OF DIET ADDITIVES ON DIGESTIBILITY, FERMENTATION PRODUCTS AND FECAL MICROBIOTA IN ADULT DOGS

Este capítulo é apresentado de acordo com as normas de publicação da
Italian Journal of Animal Science

Evaluation of zootechnical additives on digestibility, fermentation products and fecal microbiota in adult dogs

Jéssica Ferreira Barcellos^{a*}, Jéssica Neto D'avila^a, Camila Carneiro Figueiredo Monteiro^a, Giovane Krebs^a, Luciano Trevizan^a

^aAnimal Science Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

CONTACT

*Jéssica Ferreira Barcellos

jessicafbarcellos@gmail.com

Animal Science Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, 91540-000

EVALUATION OF ZOOTECHNICAL ADDITIVES ON DIGESTIBILITY, FERMENTATION PRODUCTS AND FECAL MICROBIOTA IN ADULT DOGS

Abstract

Over the years, various nutritional additives have been used to improve digestion and promote eubiosis in the gastrointestinal tract. Among these additives, yucca extract, mannan oligosaccharides (MOS), probiotics and proteases have been widely studied and used in animal feed. This study aimed to compare formulations of zootechnical additives for dogs containing yucca extract, mannanoligosaccharides and protease to test the synergistic effect between them on the intestinal health of adult dogs. Twelve healthy adult dogs were used, distributed in an incomplete and balanced Latin square design with 6 treatments, namely: Control (basal diet without additives), Blend YSA (basal diet + Yucca Extract A 0.250kg/t), Blend YSB (basal diet + Yucca Extract B 0.250kg, Blend YM (basal diet + Yucca A Extract + MOS 0.250kg/t), Blend YMP (basal diet + Yucca A Extract + MOS + Protease 0.250kg/t) and Prot (basal diet + protease 0.200kg/t). The dogs were fed the experimental diets for 27 days. After 10 days of adaptation to the diets, the digestibility of nutrients and energy, fecal and urinary characteristics and fecal fermentation products were evaluated. On the last day of the study, stool samples were collected to assess the fecal microbiota. Means were evaluated for normality and tested by analysis of variance assuming $P < 0.05$ significance. There was no significant difference between nutrient and energy digestibility, urinary and fecal characteristics. Microbiota analyzes were performed on fecal cigars and they were classified into 25 phyla, 47 classes, 105 orders, 177 families and 347 genera. The Control, YSA, YMP and Prot treatments showed a higher amount of the Firmicutes phylum when compared to the other treatments (YSB and YM) with the classes Alphaproteobacteria, Clostridia, Bacteroidia, Bacilli and Ignavibacteria being the main representatives. The relative abundance of Blautia decreased in dogs fed YSB compared to Prot ($p = 0.0406$). The genus Prevotella decreased in dogs fed Prot compared to YMP ($p = 0.0269$). The present study showed that the use of additives Yucca shidigera, MOS and protease added

to diets at these concentrations did not show significant results for individual or combined use when analyzed for fecal characteristics.

Highlights

- The inclusion of protease, mannanoligosaccharides and Yucca extract in diets increases the digestibility of nutrients and energy in adult dogs;
- The synergistic effect of the association between additives improves fecal quality;
- Uses of additives improve gut microbial health

Introduction

One of the main trends in the food industry is the search for functional foods (SAARELA *et al.*, 2002). There are different additives that can be used in food formulations, synthetic or natural, added for the purpose of producing some dietary benefit to diets. Each additive has individual effects and these effects are inherent to the active components. Among the most used additives used in animal nutrition are yucca extract, which helps to control the odor of feces; mannanoligosaccharides (MOS), which bind to pathogenic bacteria, reducing their ability to stick in the intestine; proteases, exogenous enzymes that aid digestion of protein and subsequent absorption of amino acids. Although each additive has an individual function, the association between additives can produce interaction when in the intestinal lumen. Summative or inhibitory effects may occur, so that the study of these additives in isolation and in association is necessary. In some foods that have high levels of non-digestible protein, there is greater availability of amino acids for fermentation in the colon, generating compounds such as ammonia, branched-chain fatty acids, in addition to phenols and indoles. These compounds worsen fecal odor and some are toxic to intestinal mucosal cells and may be involved in intestinal inflammatory processes (SWANSON *et al.*, 2002; MIDDELBOSS *et al.*, 2007). The use of *Yucca schidigera* extract works to reduce feces odors through saponins, which have

properties to act on nitrogen metabolism, fixing ammonia and reducing the gases that give feces bad fecal odor. Studies show that the gastrointestinal microbiota of dogs and cats is similar to that of humans, being a complex ecosystem, with at least several hundred different bacterial phylotypes. The mammalian gut is home to a total of 10^{10} - 10^{40} microbial cells, about 10 times more than host cells (SUCHODOLSKI *et al.*, 2009). The microbiota helps the individual, acting as a defense barrier against enteropathogens, also, in the digestion of part of soluble fiber, producing short-chain fatty acids and other metabolites, providing nutritional support for enterocytes, that play an important role in the regulation and development of the individual's immune system. Mannan oligosaccharides, also used in the petfood industry, have shown positive results in dogs (LOWE AND KERSHAW, 1997; SWANSON *et al.*, 2002; MIDDELBOS *et al.*, 2007; FÉLIX *et al.*, 2009), as they have structural similarities with some pathogenic microorganisms, they bind to bacteria carrying them out of the body, reducing the action of pathogens in the intestine. The use of exogenous enzymes with hydrolytic capacity in the gastrointestinal tract of dogs is a considerable option to reduce the formation of fermentable compounds in the colon and result in an improvement in fecal conditions. Knowing the individual effect and the synergistic effect of additives on diets, the specific effects on the digestion and absorption of nutrients, fermentation in the colon, fecal quality, interference on the fecal microbiota and on the fermentation end products are decisive for the choice of additives that can bring benefits to different formulations.

Materials and methods

All animal care and handling procedures were approved by the Animal Ethical Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, protocol number 41825.

Animals and experimental design

Twelve Beagle dogs, 1 to 5 years old, 6 females and 6 males, an average BW of approximately between 9 – 12 kg, all healthy based on clinical evaluation, CBC and serum biochemistry. All dogs were vaccinated and de-wormed before the experiment. During the pre-experimental test, they were kept in groups in the yards during the day for socialization, and during the meals and the night they were kept individually in stain steel metabolic cages (0.80 x 1.00 x 0.80 m) in a controlled environment with a temperature ranging between 21 and 24°C. Dogs were assigned in 6 treatments using 3 blocks of 27-days, to obtain two observations per treatment per block in a total of six observations per treatment at the end of the study. Dogs were randomised into the treatments in each block. Each block includes an adaption phase (d 1-10) followed by a digestibility assay (d 11-15), and at day 27th faeces collection of faeces for microbiota profile. At day 27th, also samples of faeces were collected for analyses for fermentation end products, ammonia and lactic acid.

Dietary treatments

A basal diet was formulated and extruded with no additives. The test diets were made from control diet by including “on top” one or more additives to produce the following diets: Control (Basal diet without additive); YSA (basal diet + Yucca extract A 0,250kg/t), YSB (basal diet + Yucca extract B 0,250kg/t), YM (basal diet + yucca extract A + MOS 0,250kg/t); YMP (basal diet + Yucca extract A + MOS + protease 0,250kg/t) e Prot (basal diet + protease 0,200kg/t) (Table 1). The dogs received fractionated diets (the yucca extract, MOS and protease were added on top at the diet in the feeder, just before dog start the meal) twice a day, at 8:30 am and 4:30 pm, in order to meet the daily maintenance energy requirement for adult dogs of 120 kcal x BW (kg)^{0.75}, as recommended by the NRC (2006). Water was provided in individual drinkers, *ad libitum* throughout the experimental period. Body weight (BW) was measured every week.

Table 1. Composition of experimental diets as-is and chemical analysis

	Control ^a	YSA ^b	YSB ^c	YM ^d	YMP ^e	Prot ^f
Ingredients (%)						
Corn grain	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7
Full fat rice bran	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Meat and bone meal	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00
Brewers rice	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Reprocessed diet	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Feather meal	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Poultry fat	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Palatability enhancer	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Common salt	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Premix	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Garlic aroma	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Yucca schidigera A ^a (kg/t)	-	0.25	-	0.25	0.3	-
Yucca schidigera B ^b (kg/t)	-	-	0.25	-	-	-
MOS ^c (kg/t)	-	-	-	0.027	0.027	-
Protease ^d (U/g)	-	-	-	-	2.500	20.000
C18:2 linoleic	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
C18:3 linolenic	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Arginine	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
Phenylalanine	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Gly+Serine	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14
Histidine	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Isoleucine	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Leucine	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Lysine	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Threonine	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Tryptophan	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
Valine	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03
Calcium	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
Phosphorus	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Chlorin	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
Water ^g	10	10	10	10	10	10
Protein ^g	23.4	23.4	23.4	23.4	23	23.6
Fat ^g	11	116	11	11	11	11
Ash ^g	8.93	8.93	8.93	8.93	8.93	8.95

Provided the following per kilogram of diet: Vitamin A, 3500 IU; Vitamin B1, 4.63 mg; Vitamin B12, 11.21 mg; Vitamin B2, 1.20 mg; Vitamin B6, 5.8480 mg; Vitamin D, 0.0075 mg; Vitamin E, 49.1 mg; Vitamin K, 0.5 mg; Pantothenic Acid, 9.6 mg; Biotin, 0.11 mg; Niacin, 80.9 mg; Iron, 173.4 mg; Iodine, 0.001 mg; Manganese, 40.26 mg; Selenium, 0.176 mg; Zinc, 76.88 mg.

ME FEDIAF = 3.162 kcal

^aBasal diet without additive.

^bYSA: Basal diet + Yucca extract; saponin warranty level between 80-100mg/kg).

^cYSB: Basal diet + Yucca extract; saponin warranty level 70mg/kg).

^dYM: Basal diet + Blend (Yucca extract (200g/kg); beta glucans (38g/kg); glucomannans (65g/kg); mannanoligosaccharides (27g/kg); *Bacillus licheniformis* (10x10E8UFC/g); *Bacillus subtilis* (5x10E8UFC/g)).

^eYMP: Basal diet +Blend (Yucca extract (200g/kg); beta glucans (38g/kg); glucomannans (65g/kg); mannanoligosaccharides (27g/kg); *Bacillus licheniformis* (10x10E8UFC/g); *Bacillus subtilis* (5x10E8UFC/g) + fermentation product of *Aspergillus niger* (ACCC 33326), fermentation product of *Bacillus subtilis* (GIM 1286), mesquite bran; protease warranty level 20.000 U/g).

^fProt: Basal diet + fermentation product of *Aspergillus niger* (ACCC 33326), fermentation product of *Bacillus subtilis* (GIM 1286), mesquite bran; protease warranty level 20.000 U/g.

^gAnalysed composition

Digestibility assay

Digestibility was performed by the method of total collection of feces. Urine was also collected.

At day 10th of adaptation, dogs received orally, together with the offer of food in the morning, a gelatin capsule containing inorganic marker, iron oxide III (Fe²O³), to allow the demarcation of the beginning of the collection of feces. Likewise, at the end of the evaluation period and total collection of feces, the dogs received the inorganic marker again orally, to delimit the end of the collections. Urine was placed in individual containers, containing 0.1 g of thymol/100 ml of urine, and collected daily after feeding in the morning, from the eleventh day onwards, to measure the volume, pH and urinary density of the dogs. Feces were collected during the day shortly after defecation and the assessment of the fecal score was performed according to Moxham (2001) *The Waltham Fecal Score System*: 1 = “bullet like”, crumbles with little pressure; 1.5 = hard and dry, stool cracks when pressed; 2 = well formed, does not leave a mark when picked up; 2.5 = well formed with slightly moist surface, leaves a mark when picked up; 3 = moist, beginning to loose form, leaving a definite mark when picked up; 3.5 = very moist, still with some definite form; 4 = moisture all for is lost, no real shape; 4.5 = liquid stool with slight consistency; 5 = entire liquid stool. Feces produced during the night were collected in the following morning. Fecal pH concentration was analyzed in daily feces, using 3.0 g of sample diluted with 9 ml of distilled water using a digital pH meter (AKSO® pH Plus, São Leopoldo, Brazil). Then, the feces were weighed and placed in individual plastic bags and stored in a

freezer at -20°C until processing and subsequent performance of bromatological analyses. Total faecal output from each dog was mixed, then samples were taken and dried at 55°C in a forced-air oven for 72 hours according AOAC (Association of Official Analytical Chemistry – AOAC 1995) followed by grinding 1-mm screen in a Willey hammer mill (DeLeo Equipamentos Laboratoriais, Porto Alegre, Brazil).

Chemical Analysis

Diets and feces were analysed for DM (Dry Matter) (AOAC 934.01), ash (AOAC, 1995) crude protein (AOAC 954.01), total fat content by acid hydrolysis (AOAC 954.02). Dietary and fecal gross energy (GE) were determined by bomb calorimeter (Parr Instrument Co., model 1261, Moline, IL, USA).

Statistical analysis

Coefficient of apparent digestibility for nutrients and energy were calculated as well aspects on fecal output, then data were tested for normality according to the Shapiro-Wilk test $p > 0.05$. Means were tested by ANOVA using *Jamovi*. Dog was used as a random effect, diet and time as a fixed effect. Means were considered significant at $P < 0.05$.

Fermentation end products (AGCC, AGCR, ammonia, and lactic acid)

Feces samples were immediately collected after defecation on day 27. Ammonia concentration was determined in 5 g of feces, homogenized and mixed with 15 mL of formic acid solution (16%). Ammonia samples were duplicated. One sample was performed for the ammonia analysis itself and the other was for the analysis of fatty acids. The falcon with solution was centrifuged three times at 3.500 rpm for 15 min at environmental temperature. After centrifugation supernatant was retained and the pellet was discarded. The content was packed

in tubes falcon 15mL in freezer -20°C for further analysis. For lactic acid analysis, 3g of feces diluted in 9 mL of distilled water were measured. The same centrifugation process was performed. Afterwards, they were frozen for later analysis.

Analysis fatty acids by Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID)

The separation was achieved using a Shimadzu gas chromatograph (GC-2010 Plus), equipped with a flame ionization detector, a ZB-WAXplus capillary column (30 m x 0.32 mm ID, 0.50 µm, Zebron) and a split injector at 250°C. The gas flows were 2.14 mL.min⁻¹ for the hydrogen carrier gas (H₂), 40 mL min⁻¹ for the auxiliary nitrogen gas (N₂), and 30 and 300 mL min⁻¹ for the flame gases (H₂) and synthetic air, respectively. A sample volume of 2 µL was injected, in triplicate, with a sample split of 1:80. The column temperature was maintained at -80°C for 1.0 minutes, followed by a heating ramp from 35 °C minutes⁻¹ to 230°C, maintained for 5 minutes, totaling an analysis time of 10.29 minutes. Retention times and peak areas were determined using the Lab Solutions program.

Statistical analysis

Differences in ammonia, lactic acid and fatty acids between treatments were normally distributed according to the Shapiro-Wilk test $p > 0.05$. Means were tested by ANOVA using *Jamovi*.

Fecal microbiota

Fecal samples were collected after 27 days of dogs being fed experimental diets. Dog were watched for defecation. From the inside of the fecal “cigars”, about 3 grams of feces were collected inside a identified Eppendorf tubes and stored in a freezer at -20°C until the laboratory analysis was carried out. All analyzes, using the Dual-index1 methodology. DNA was extracted

using commercial kits, and its integrity validated. Then, a fragment of approximately 460 base pairs (bp), corresponding to the V3 and V4 hypervariable regions of the ribosomal rRNA gene (16S rRNA), was amplified using universal primers. The amplicons were used to build a metagenomic library (Nextera XT), which was sequenced on the Illumina 2 “MiSeq” sequencer. The reads obtained from the sequencer were analyzed on the QIIME3 platform. The sequences were classified into bacterial genera through the recognition of operational taxonomic units (OTUS), in this case, the homology (> 97%) between the sequences when compared against a database. To compare the sequences, a more recent version of the SILVA ribosomal sequence database⁴ was used.

Statistical analysis

Mixed model procedures were implemented to determine the effect of diet on the Chao1 and Shannon diversity indices. Diet was included as a fixed effect, and animal within treatment was included as a random effect. For all tests, $p < 0.05$ was considered significant.

Results and discussion

The dogs had a similar intake (kcal ME x BW kg^{0.75}/day) for all experimental diets (Table 1). All dogs remained healthy throughout the study. Suppling on top of additives did not interfere with palatability or voluntary feed intake.

No significant difference ($p > 0,05$) were observed in the apparent digestibility coefficients (ADC) of dry matter, organic matter, crude protein, crude energy, carbohydrates, or fatty acids between experimental treatments (Table 2). The supplemental additives did not influence the digestibility of nutrients and energy on the basal diet. Çabuk *et al.* (2004) evaluated the addition of Yucca in broiler chickens, with an improvement in feed conversion. The fecal score values

were better in the groups that contained Yucca extract and Protease, which is due to the fact that it has protease, since proteins are broken down into smaller peptides and amino acids, they can be absorbed by the small intestine. Better protein digestion leads to better nutrient absorption, which can lead to an improvement in the fecal score of dogs. Naidu (2011) noted that in several clinical studies demonstrated its benefits in oncology, inflammatory conditions, control of blood clotting and regulation of the immune system, with this, protease can help reduce inflammation in the gastrointestinal tract, which can help improve the consistency of dog stools. Owens *et al.* (2013) investigated the effects of protease supplementation in healthy dogs and found no significant differences in protein digestibility or amino acid absorption. No difference was observed for the other fecal parameters and urinary characteristics (Table 2). Fecal consistency is an important aspect for tutors, as it can be seen as harmful for the addition of an additive. The fecal score, even without significant effects, remained normal (Félix *et al.*, 2009). The addition of Yucca to the diets had no apparent effect on the evaluated fecal characteristics. As surfactants, saponins have significant activity in reducing surface tension. This property seems to be crucial in the absorption of nutrients by the intestinal mucosa, (RYAN; QUINN, 1999) however, no change was observed in the digestibility of the nutrients. The digestibility of nutrients depends on several factors, including the quality of the diet, the effectiveness of enzymatic digestion and intestinal absorption. Although yucca extract may contain components that help improve digestion, such as saponins and fiber, the effectiveness of these components may depend on dose, diet composition and other factors. Fecal ammonia is a by-product of protein metabolism in the gastrointestinal tract and can contribute to the unpleasant odor of animal feces. Yucca extract is often added to dog's diets because of its potential properties to reduce fecal ammonia production and thus reduce odor. High levels of ammonia and sulfuric gas can be harmful to the health of animals in closed spaces, retarding their growth and increasing their susceptibility to a variety of diseases (WHEELER, 2003). The

lowest ammonia concentration was observed in the YSA group, where it is believed that the reduction in ammonia concentration is important to keep the intestinal pH lower and directly favor the reduction of fecal odor (SOUZA *et al.*, 2017). Fecal ammonia production can be influenced by several factors, including dietary protein digestibility, gut microbiota balance, and fecal transit time.

The dietary fatty acid profile is important for the health of the dog and can be affected by the addition of dietary additives such as yucca extract, MOS and protease. However, some studies have not observed significant differences in the fatty acid profile in the diet of dogs supplemented with these ingredients. A study published in 2020 by Canibe *et al.* evaluated the effect of dietary supplementation with yucca extract, MOS and protease on dietary digestibility and fatty acid profile in dogs. Study results showed that supplementation with these ingredients did not significantly affect the dietary fatty acid profile of dogs. There are several reasons why supplementation with yucca extract, MOS and protease may not affect the dietary fatty acid profile of dogs. For example, supplementation may not directly affect the digestion and absorption of dietary fatty acids, or there may be other factors that affect the dietary fatty acid profile of dogs, such as the source and amount of fat in the diet. According to SOUZA *et al.*, (2017) the inclusion of 800 g/t of MOS and Yucca in the diet can have beneficial effects, both in the intestinal health and in the fecal characteristics of dogs, perhaps for this reason, no significant effect is observed in these characteristics, since the inclusion of additives did not exceed 250 g/t.

- 1 Table 2. Compared averages of digestibility coefficient of natural matter, dry matter, organic matter, crude protein, ether extract, carbohydrate,
 2 mineral matter, crude fiber, gross energy, fecal quality parameters and fermentation acids by test T-student.

Digestibility coeficiente (5)	Treatments						<i>P-value</i>				
	Control ^a	YSA ^b	YSB ^c	YM ^d	YMP ^e	Prot ^f	Control vs. YSA ²	Control vs. YSB ³	Control vs. YM ⁴	Control vs. YMP ⁵	Control vs. Prot ⁶
Natural matter	35.5	29.3	23.3	36.5	30.6	31.4	0.375	0.081	0.802	0.401	0.580
Dry matter	76.4	74.9	71.3	75.2	74.8	76.6	0.645	0.082	0.600	0.400	0.883
Organic matter	79.9	78.9	75.6	78.9	78.6	80.1	0.687	0.086	0.583	0.399	0.910
Crude protein	77.8	75.4	72.6	77.4	76.3	78	0.506	0.139	0.850	0.389	0.933
Ether extract	91.0	91.4	89.3	91.9	91.7	92.1	0.871	0.371	0.636	0.613	0.495
Carbohydrate	78.5	77.6	74	76.8	76.9	78.4	0.759	0.054	0.444	0.338	0.942
Mineral matter	39.8	35.1	27	37.6	36.1	40.9	0.504	0.070	0.664	0.406	0.800
Crude fiber	-11.8	-13	-31.9	-15.9	-18.2	-17.9	0.934	0.084	0.774	0.675	0.496
Energy	79.3	77.6	74	78.6	77.3	79	0.537	0.057	0.722	0.265	0.778
Fecal parameters											
Initial weight	10.94	11.87	11.14	11.17	11.92	11.90	0.213	0.791	0.759	0.190	0.196
Final weight	11.44	11.61	11.00	11.39	12.09	11.97	0.827	0.556	0.941	0.387	0.477
Natural matter consumption	1147	1181	1149	1163	1227	1213	0.566	0.973	0.794	0.179	0.268
Feces dry matter	32.69	31.61	33.56	34.80	32.54	31.22	0.446	0.534	0.138	0.914	0.299
Fecal pH	6.05	6.09	6.07	6.12	6.05	6.09	0.660	0.825	0.468	0.968	0.648
Fecal score ^g	2.21	2.70	2.65	2.19	2.53	2.61	0.113	0.153	0.9640	0.289	0.191
Urinary pH	7.31	7.32	7.27	7.70	7.71	7.33	0.969	0.906	0.208	0.203	0.936
Urinary density	1022	1023	1026	1024	1019	1020	0.928	0.510	0.760	0.593	0.693

Acids (mm/Mol)											
Acetic	10.01	7.22	14.32	5.51	6.32	5.48	0.474	0.271	0.250	0.344	0.247
Propionic	4.77	2.61	5.21	2.57	3.46	2.99	0.192	0.787	0.183	0.426	0.279
Isobutyric	1.50	1.49	1.51	1.47	1.56	1.48	0.861	0.857	0.616	0.333	0.702
Butyric	2.18	1.68	2.29	1.72	1.84	1.74	0.206	0.771	0.245	0.390	0.263
Isovaleric	1.58	1.49	1.60	1.50	1.60	1.47	0.417	0.870	0.437	0.878	0.303
Valeric	1.54	1.48	1.51	1.49	1.51	1.49	0.112	0.458	0.186	0.426	0.169
4methylvaleric	0.20	0.17	0.17	0.19	0.22	0.18	0.367	0.385	0.659	0.660	0.406
Hexanoic	0.19	0.17	0.17	0.19	0.20	0.17	0.454	0.485	0.746	0.956	0.380
Heptanoic	1.53	1.50	1.50	1.50	1.55	1.50	0.379	0.351	0.391	0.613	0.311
AGCC ^h	18.46	13.01	23.33	11.26	13.18	11.68	0.340	0.394	0.211	0.356	0.237
AGCR ⁱ	5.05	4.82	4.96	4.86	5.07	4.80	0.288	0.666	0.384	0.932	0.247
AGT ^j	23.51	17.83	28.29	16.13	18.25	16.48	0.326	0.408	0.204	0.363	0.226
Ammonia	108	87	115	104	95	109	0.238	0.694	0.800	0.459	0.951
Lactate	6.38	5.20	6.80	6.10	7.76	4.74	0.526	0.825	0.877	0.463	0.382

3 ^aBasal diet without additive.

4 ^bYSA: Basal diet + Yucca extract; saponin warranty level between 80-100mg/kg.

5 ^cYSB: Basal diet + Yucca extract; saponin warranty level 70mg/kg.

6 ^dYM: Basal diet + Blend (Yucca extract (200g/kg); beta glucans (38g/kg); glucomannans (65g/kg); mannanoligosaccharides (27g/kg); *Bacillus licheniformis* (10x10E8UFC/g); *Bacillus subtilis* (5x10E8UFC/g))

7 ^eYMP: Basal diet + Blend (Yucca extract (200g/kg); beta glucans (38g/kg); glucomannans (65g/kg); mannanoligosaccharides (27g/kg); *Bacillus licheniformis* (10x10E8UFC/g); *Bacillus subtilis* (5x10E8UFC/g) + fermentation product of *Aspergillus niger* (ATCC 33326), fermentation product of *Bacillus subtilis* (GIM 1286), mesquite bran; protease warranty level 20.000 U/g).

8 ^fProt: Basal diet + fermentation product of *Aspergillus niger* (ATCC 33326), fermentation product of *Bacillus subtilis* (GIM 1286), mesquite bran; protease warranty level 20.000 U/g.

9 ^gFecal score based on the following scale: 1 = “bullet like”, crumbles with little pressure; 1.5 = hard and dry, stool cracks when pressed; 2 = well formed, does not leave a mark when picked up; 2.5 = well formed with slightly moist surface, leaves a mark when picked up; 3 = moist, beginning to loose form, leaving a definite mark when picked up; 3.5 = very moist, still with some definite form; 4 = mostoir all for is lost, no real shape; 4.5 = liquid stool with slight consistency; 5 = entire liquid stool.

10 ^hsum of short chain fatty acids

11 ⁱsum of branched chain fatty acids

12 ^jtotal fatty acids

13 *There was a significant effect between treatments ($p < 0.05$).

Composition of the canine fecal microbioma

We characterized the normal variability of dog fecal microbiota in a well-controlled cohort of a number of Beagle dogs (N = 12) with a shared environment, similar ages, and related genetic background. The composition of the intestinal microbiota of dogs in different treatment groups is shown in Table 3. We found a total of 357 bacterial species, which were taxonomically classified into 25 phyla, 47 classes, 105 orders, 177 families and 347 genera. Specifically, the main phyla that inhabit the fecal microbiome were Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidota, Fusobacteria and Actinobacteria, followed by others with lesser abundance, as well as observed by Ritchie *et al.* (2010) where the main phyla were also reported as predominant bacterial phyla in the colon and feces of dogs and cats, namely firmicutes (mainly Clostridiales), bacteroides and Fusobacteria.

Richness and uniformity of alpha diversity, or diversity within samples, denoted as Chao1 (P = 0.8306), Observed OTU (P = 0.8351), Fisher (P = 0.8351), Simpson (P = 0.8123), Shannon (P = 0.6692) and Pielou's uniformity (P = 0.6881) did not change significantly between groups (Table 3). Similarly, no significant differences were observed for beta diversity between dietary treatments. No significant treatment effect on the alpha diversity was detected.

The Control, YSA, YMP and Prot treatments showed a higher amount of the Firmicutes phylum when compared to the other treatments (YSB and YM) with the classes Alphaproteobacteria, Clostridia, Bacteroidia, Bacilli and Ignavibacteria being the main representatives. As noted by Li *et al.* (2013), which evaluated the effect of yucca extract supplementation on the intestinal microbiota and metabolism of dogs, showed that yucca extract supplementation significantly increased the proportion of Firmicutes phylum bacteria and reduced the proportion of Bacteroidetes phylum bacteria in the intestinal microbiota of dogs.

The relative abundance of Lachnospiraceae increased in the YSA group relative to the YSB group (P = 0.0253), and also increased in the Prot group relative to the YSB and YM groups (P

< 0.05). Finally, the Peptostreptococcaceae family decreased in the group of dogs fed YSA compared to those fed YMP (P = 0.0430).

The relative abundance of *Blautia* decreased in dogs fed YSB compared to Prot (P = 0.0406). Whereas the genus *Prevotella* decreased in dogs fed Prot compared to YMP (P = 0.0269). According to some studies, the genus *Prevotella* is involved in the hydrolysis of saponins (DONG *et al.*, 2017; KIM, 2017; XIAO *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2016) which may have been the abundance of this genus in the groups that have yucca extract as the main additive, but this does not correspond to the increase in the group that contains the extruded protease. Other studies show that the ratio of the phylum Bacteroidetes to Firmicutes is currently considered to be related to plasma glucose levels or obesity (LARSEN *et al.*, 2010; YAN *et al.*, 2017). According to the authors, the relative abundance of Firmicutes was significantly lower, while the proportion of Bacteroidetes and Proteobacteria was slightly higher in diabetic people compared to non-diabetics. In this study we observed that the ratio of Firmicutes and Bacteroidetes is higher in all groups of dogs, thus suggesting that dogs do not have any type of propensities correlated with reduced glucose tolerance. According to Yan *et al.* (2017) showed that the inclusion of steroid saponins in the diet of diabetic rats decreases the levels of Bacteroidetes and Proteobacteria, increasing Firmicutes to levels close to those of non-diabetic rats, improving the intestinal microbiota. The authors also suggested that the inclusion of 0.025g/kg of total saponins can bring benefits to the diversity of the microbiota. Studies have also shown that steroidal saponin caused a decrease in the Firmicutes to Bacteroidetes ratio in rats fed a high-fat diet, reversing the dysbiosis induced by the high-fat diet (CHEN *et al.*, 2017). In particular, new indications of the role of saponins as "prebiotic-like" compositions may merit further investigation. The total sum of branched-chain fatty acids was lower in the YM group, even without significant effects, it was observed that the effect of MOS being related to the

intestinal microbiota, where it may be reducing the population of pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp. and *Clostridium* spp. (STRICKLING *et al.*, 2000).

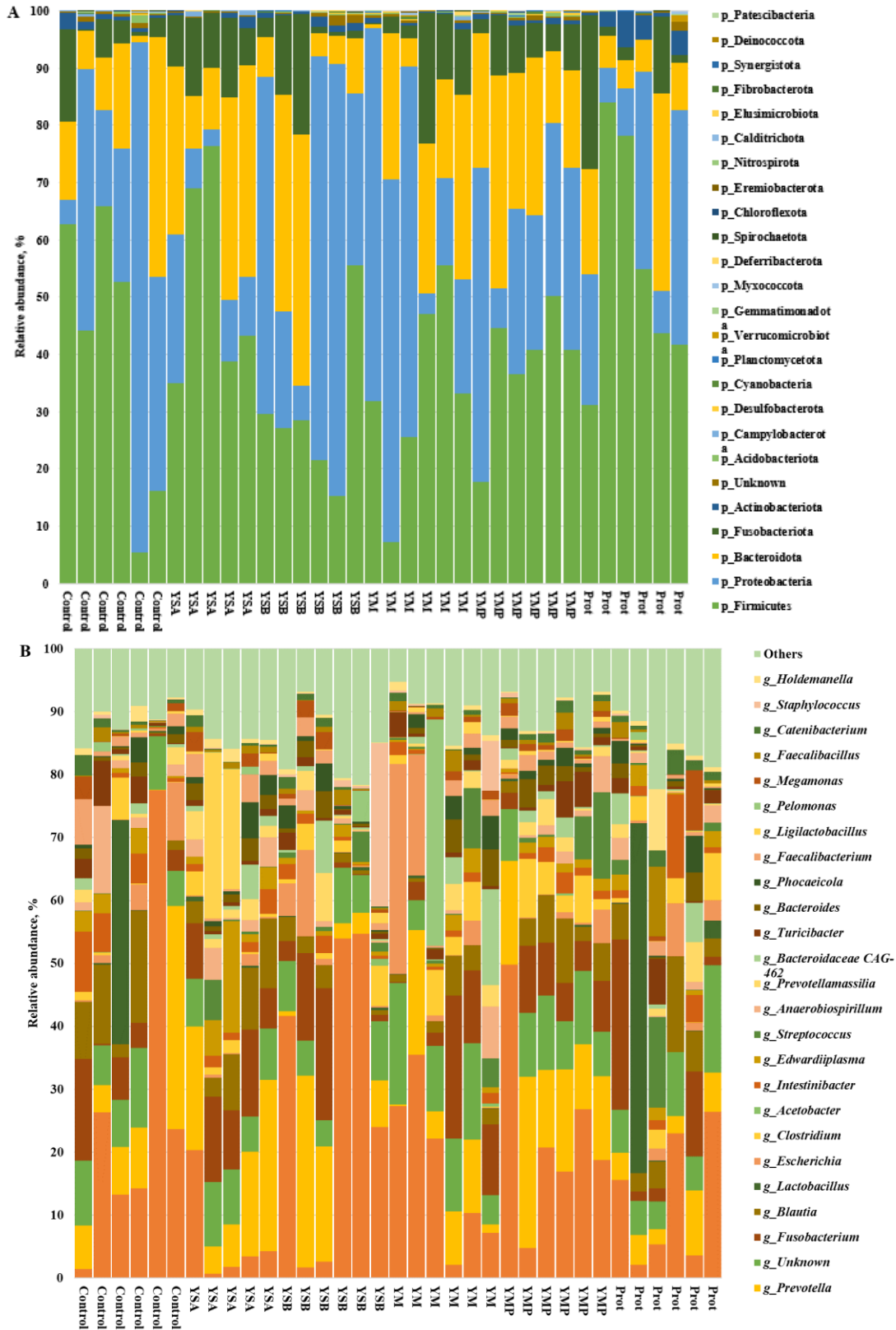


Figure 1. Relative abundances of bacterial phylum (A) and genera (B) in the feces of healthy dogs fed the experimental diets over 27 days. Others correspond to the bacteria taxa with < 1% abundance. Control (Basal diet without additive); YSA (basal diet + Yucca extract A 0.250kg/t), YSB (basal diet + Yucca extract B 0.250kg/t), YM (basal diet + yucca extract A + mos 0.250kg/t); YMP (basal diet + Yucca extract A + mos + protease 0.250kg/t) e Prot (basal diet + protease 0.200kg/t).

Table 3. Alpha diversity indices [median (1st;3rd quartiles)] in the fecal microbiota of dogs fed experimental diets.

	Control	YSA	YSB	YM	YMP	Prot	P
Chao1	130[119;148]	125[98;164]	134[121;175]	124[92;146]	141[122;148]	130[124;143]	0.8306
Observed	128[118;145]	123[98;162]	131[120;173]	124[92;146]	141[122;147]	129[123;138]	0.8351
Fisher	19.8[18.0;23.3]	18.9[14.7;26.1]	20.2[18.4;28.4]	19.0[13.4;23.1]	22.1[18.7;23.3]	19.9[18.9;21.6]	0.8351
Simpson	0.91[0.74;0.95]	0.94[0.72;0.97]	0.86[0.70;0.95]	0.89[0.82;0.95]	0.93[0.87;0.95]	0.92[0.86;0.95]	0.8123
Shannon	3.26[2.60;3.65]	3.65[2.71;3.92]	3.25[2.45;3.60]	3.17[2.57;3.82]	3.58[3.23;3.78]	3.54[3.13;3.68]	0.6692
Pielou evenness	0.67[0.54;0.76]	0.74[0.57;0.79]	0.64[0.51;0.74]	0.67[0.57;0.76]	0.73[0.66;0.77]	0.73[0.65;0.75]	0.6881

Kruskall-Wallis test ($P < 0.05$).

Control (Basal diet without additive); YSA (basal diet + Yucca extract A 0,250kg/t), YSB (basal diet + Yucca extract B 0,250kg/t), YM (basal diet + yucca extract A + mos 0,250kg/t); YMP (basal diet + Yucca extract A + mos + protease 0,250kg/t) e Prot (basal diet + protease 0,200kg/t).

Conclusion

The inclusion of *Yucca schidigera* extract, MOS and protease did not influence feed digestibility. There were no significant differences between the effects of the treatments tested, although it cannot be concluded that this applies to all products available on the market. With the inclusion of additives, an improvement in the intestinal microbiota of dogs was observed. However, there are no effects related to the synergistic effect of additives.

References

- Çabuk, M.; Alçiçek, A.; Bozkurt, M. et al. 2004. Effect of *Yucca schidigera* and natural zeolite on broiler performance. **International Journal of Poultry Science**, v.3, n.10, p.651-654.
- Canibe, N., Poulsen, M. W., Højberg, O., Jensen, B. B. 2020. Effect of supplementation with mannanoligosaccharides, protease, and yucca extract on nutrient digestibility, fecal microbiota, and fatty acid profile in dogs. **Journal of Animal Science**.
- Dong, W. W., Xuan, F. L., Zhong, F. L., Jiang, J., Wu, S., Li, D., & Quan, L. H. 2017. Comparative analysis of the rats' gut microbiota composition in animals with different ginsenosides metabolizing activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 65(2), 327–337.
- Félix, A.P.; Zanatta, C.P.; Brito, C.B.M.; Murakami, F.Y.; França, M.I.; Maiorka, A.; Flemming, J.S. 2009. Suplementação de mananoligossacarídeos (MOS) e uma mistura de aluminossilicatos na qualidade das fezes de cães adultos. **Archives of veterinary science**, v.14, n.1, p.31-35.
- Kim, D. H. 2017. Gut microbiota-mediated pharmacokinetics of ginseng saponins. **Journal of Ginseng Research**.
- Li, Z., Ahn, D. U., Kim, I. H. 2013. Effect of dietary supplementation of yucca extract on intestinal microbiota composition of dogs. **BMC microbiology**, 13(1), 2013.
- Lowe, J.A.; Kershaw, S.J. 1997. The ameliorating effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal aroma. **Research in Veterinary Science**, v.63, p.61-66.
- Middelbos, I.S.; Godoy, M.R.; Fastinger, N.D.; Fahey, G.C.Jr. 2007. A dose-response evaluation of spraydried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v.85, p.3022-3032.
- Naidu, K.S. 2011. Characterization and Purification of Protease enzyme. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** 01 (03); 107-112, 2011.
- National Research Council - NRC. **Nutrient requirements of dogs and cats**. 2006 Washington, D.C.: Nacional Academy of Science, 424p.
- Owens, E., Murugesan, G. R., & Biourge, V. 2013. Effects of dietary supplementation of a *Bacillus subtilis* direct-fed microbial on digestibility and serum biochemical profiles in dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 97(5), 770-778. DOI: 10.1111/jpn.12008
- Ritchie LE, Burke KF, Garcia-Mazcorro JF, et al. 2010. Characterization of fecal microbiota in cats using universal 16S rRNA gene and group-specific primers for lactobacillus and Bifidobacterium spp. **Vet Microbiol**;144:140–6.
- Souza, C.M.; Lima, D.C.; Kaelle, G.C.; Oliveira, S.G.; Kuritza, L.N.; Félix, A. P. 2017. Associação de mananoligossacarídeos e yucca como promotor da saúde intestinal e características fecais de cães. **Archives of Veterinary Science.**, v.22, n.3, p. 15-23.

- Strickling, J.A.; Harmon, D.L.; Dawson, K.A.; Gross, K.L. 2000. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v.86, n.2, p.205-219.
- Suchodolski, J.S., Dowd, S.E., Westermarck, E., Steiner, J.M., Wolcott, R.D., Spillmann t, Harmoinen, J.A. 2009. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing.
- Swanson, K.S.; Grieshop, C.M.; Flickinger, E.A.; Bauer, L.L.; Healy, H.P.; Dawson, K.A.; Merchen, N.R.; Fahey, G.C.Jr. 2002. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrients digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Journal of Nutrition**, v.132, p.980-989.
- Wheeler, E.F., Casey, K.D., Zajackowski J.S., Topper, P., Gates, R.S., Xin H., Liang, Y., Liang and A. Tanaka. 2003. Ammonia emissions from U.S. poultry houses: Part III – broiler houses. Proc of the Third **International Conference on Air Pollution from Agricultural Operations**, October 11-14, 2003, Raleigh, NC, ASAE, St Joseph, MI.
- Xiao, J., Chen, H., Kang, D., Shao, Y., Shen, B., Li, X., ... Liang, Y. (2016). Qualitatively and quantitatively investigating the regulation of intestinal microbiota on the metabolism of *Panax notoginseng* saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, 194, 324–336.
- Yan, H., Lu, J., Wang, Y., Gu, W., Yang, X., & Yu, J. (2017). Intake of total saponins and polysaccharides from *Polygonatum kingianum* affects the gut microbiota in diabetic rats. **Phytomedicine**, 26, 45–54. CHEN *et al.*, 2017
- Zhou, S. S., Xu, J., Zhu, H., Wu, J., Xu, J. Di, Yan, R., ... Li, S. L. (2016). Gut microbiota involved mechanisms in enhancing systemic exposure of ginsenosides by coexisting polysaccharides in ginseng decoction. **Scientific Reports**, 6(1), 22474.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os muitos aditivos que podem ser adicionados à dieta dos cães, o extrato de yucca, o MOS (mananoligossacarídeos) e as enzimas proteases são frequentemente utilizados por seus benefícios potenciais para a saúde intestinal. Embora que a dieta tenha sido formulada para proporcionar um desafio aos animais, não foram encontradas diferenças significativas nas características fecais e nos coeficientes de digestibilidade dos cães alimentados com dietas contendo ou não extrato de yucca, MOS e protease. Isso não significa que esses ingredientes utilizados sejam inúteis ou prejudiciais para a saúde dos animais. Também deve ser levado em consideração que as análises de digestibilidade em cães podem apresentar algumas limitações e desafios, como a variabilidade individual, as fontes de alimentos, a adaptação à dieta, a coleta de amostras como o erro de amostragem, limitações de tempo e custo, efeitos do processamento e também as limitações das técnicas de análise.

A composição da microbiota fecal também pode variar individualmente, mas geralmente é caracterizada pela presença de diversos grupos bacterianos benéficos que contribuem para a eubiose assim como pode ser visto nesse trabalho. Alguns grupos são considerados importantes para uma microbiota fecal equilibrada como os Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e outros grupos bacterianos e estes são encontrados nos animais deste estudo.

Talvez com uma dieta formulada com ingredientes menos digestíveis e uma inclusão maior dos aditivos, sejam observadas algumas diferenças nos parâmetros analisados. De qualquer forma, mais estudos devem ser realizados para melhor compreender o potencial uso estes aditivos.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União: Seção 1**, Brasília, DF, p. 49, 28 out. 1997.
- BAILLON, M. A.; MARSHALL-JONES, Z. V.; BUTTERWICK, R. F. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 65, n. 3, p. 338-343, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.338>. Acesso em: 26 mar. 2023.
- BASTOS, T. S. *et al.* *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* reduce faecal protein catabolites concentration and odour in dogs. **BMC Veterinary Research**, London, v. 16, [art.] 116, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02321-7>. Acesso em: 7 set. 2022.
- BINGHAM, R. New and effective approaches to the prevention and treatment of arthritis. **Journal of Applied Nutrition**, Dallas, v. 28, p. 38–47, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 44, de 15 de Dezembro de 2015. **Diário Oficial da União: Seção 1**, Brasília, DF, p. 7, 17 dez. 2015. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas/instrucao-normativa-sda-mapa-ndeg-44-de-15-12-2015.pdf/@_@download/file. Acesso em: 1º jul. 2023.
- CHEEKE, P. R.; OTERO, R. Yucca, quillaja may have role in animal nutrition. **Feedstuffs**, Minneapolis, v. 77, n. 3, p. 11-14, 2005.
- CHEEKE, P.; PIACENTE, S.; OLESZEK, W. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of yucca schidigera: a review. **Journal of Inflammation**, London, v. 3, [art.] 6, 2006.
- FÉLIX, A. P. *et al.* Suplementação de mananoligossacarídeos (MOS) e uma mistura de aluminossilicatos na qualidade das fezes de cães adultos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 14, n. 1, p. 31-35, 2009.
- FELSSNER, K. D. **Efeito da adição de MOS e FOS, associados antes ou após extrusão, em dietas para cães**. 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.
- FRANCIS, G. *et al.* The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 88, n. 6, p. 587-605, 2002.

GIBSON, G. R. *et al.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 17, p. 259-275, 2004.

GOUVEIA, E. M. F. *et al.* Use of mannanoligosacharides as an adjuvant treatment for gastrointestinal diseases and this effects on *E.coli* inactivated in dogs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, p. 23-23, 2006. Supl. 4.

HEADON, D. R. *et al.* Glycofractions of the Yucca plant and their role in ammonia control. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 60, [art.] e160359, Jan./Dec. 2017.

HUSSAIN, L.; CHEEKE, P. R. Effect of dietary *Yucca schidigera* extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate- or roughage-based diets, **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 51, n. 3/4, p. 231-242, 1995.

HUSSEIN, H. S. *et al.* Selected fruc-tooligosaccharide composition of pet-food ingredients. **The Journal of Nutrition**, Springfield, v. 128, p. 2803-2805, 1988. Supl. 12.

LOWE, J. A.; KERSHAW, S. J. The ameliorating effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal aroma. **Research in Veterinary Science**, London, v. 63, p. 61-66, 1997.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Prebiotics in the gastrointestinal tract. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 701-714, 2006.

MAIA, G. V. C. *et al.* Zeólitas e *Yucca schidigera* em rações para cães: palatabilidade, digestibilidade e redução de odores fecais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 11, p. 2442-2446, 2010.

MCFARLANE, J. M.; METHENEY, C. D. **Effect of dietary micro aid on canine fecal odour**. Porterville: Report, Distributors Processing, 1988.

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

MOIR, A. How do spores germinate? **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, n. 3, p. 526–530, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02885.x>. Acesso em: 19 ago. 2022.

PRESTON, T. R.; LENG, R. A Matching ruminant production systems with available resources in the tropics and sub-tropics. **Agricultural Systems**, Barking, v. 30, n. 2, p. 200-201, 1989.

REIS, J. S.; ZANGERÔNIMO, M. G.; OGOSHI, R. C. Inclusion of *Yucca schidigera* extract in diets with different protein levels for dogs. **Animal Science Journal**, Richmond, v.87, n. 8, p. 1019-1027, 2016.

SANTOS, J. P. F. *Yucca schidigera* e zeólita em alimento para gatos adultos e seus efeitos na excreção de minerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v. 63, n. 3, p. 687-693, 2011.

SANTOS, J. P. F.; SAAD, F. M. O. B.; OGOSHI, R. C. S. Inclusion of *Yucca schidigera* extract and zeolite in the diet and its relationship to the apparent digestibility of nutrients and urinary pH in adult dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n.8, p. 1456-1459, ago. 2016.

SIDHU, G.; OAKENFULL, D. A mechanism for the hypocholesterolemic activity of saponins. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 55, n. 3, p. 643-649, 1986.

SOUZA, C. M. *et al.* Associação de mananoligossacarídeos e yucca como promotor da saúde intestinal e características fecais de cães. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 22, n. 3, p. 15-23, 2017.

SUCHODOLSKI, J. S. *et al.* The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. **BMC Microbiology**, London, v. 9, [art.] 210, Oct. 2009.

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

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The Impact of saponins or saponin- containing plant materials on ruminant productions: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, D.C, v. 53, n. 21, p. 8093-8105, 2005.

YAN, H. *et al.* Intake of total saponins and polysaccharides from *Polygonatum kingianum* affects the gut microbiota in diabetic rats. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 26, p. 45–54, 2017.

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

