

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

INCLUSÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM RAÇÃO PARA GATOS

Autor: Bruna Moura Rodrigues
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Magali Soares dos Santos Pozza

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

INCLUSÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM RAÇÃO PARA GATOS

Autor: Bruna Moura Rodrigues
Orientador: Prof.^a Dr.^a Magali Soares dos Santos Pozza

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Tecnologia dos Produtos de Origem Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2018

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

R696i Rodrigues, Bruna Moura
Inclusão de bactérias probióticas em ração para
gatos / Bruna Moura Rodrigues. -- Maringá, 2018.
66 f. : il., figs., tabs.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Magali Soares dos
Santos Pozza.
Co-orientador(a): Prof. Dr. Ricardo de Souza
Vasconcellos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia - Área de Concentração:
Tecnologia dos Produtos de Origem Animal, 2018.

1. Felinos. 2. Microbiota fecal. 3.
Microencapsulação. 4. Shelf life - Vida de
prateleira. I. Pozza, Magali Soares dos Santos,
orient. II. Vasconcellos, Ricardo de Souza,
coorient. III. Universidade Estadual de Maringá.
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação Zootecnia - Área de Concentração:
Tecnologia dos Produtos de Origem Animal. IV.
Título.

. CDD 21.ed. 636.8

AHS-CRB-9/1065



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

INCLUSÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM RAÇÃO PARA GATOS

Autora: Bruna Moura Rodrigues
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Magali Soares dos Santos Pozza

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 01 de março de 2018.

Prof^ª Dr^ª Sandra Garcia

Prof^ª Dr^ª Grasielle Scaramal
Madrona

Prof^ª Dr^ª Magali Soares dos Santos
Pozza
(Orientadora)

Se apenas houvesse uma única verdade, não poderiam pintar-se cem telas sobre o mesmo tema.

Pablo Picasso

A minha família e amigos especiais

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelo amadurecimento a cada oportunidade.

À Universidade Estadual de Maringá e Fazenda Experimental de Iguatemi, por terem viabilizado a realização do experimento.

À Prof.^a Dr.^a Magali Soares dos Santos Pozza, pela orientação, confiança, e incentivo para trabalhar com a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos, pela coorientação e atenção despendida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ), pela valiosa contribuição para minha formação.

Aos estagiários do grupo de pesquisa, Gislaine Oliveira e José Messias, pela colaboração nos trabalhos a campo e de laboratório.

A doutoranda e amiga, Paula Martins Olivo, pela amizade, apoio, demonstração de companheirismo e ajuda durante todo o experimento.

A empresa Organnact, pelo fornecimento do probiótico para o experimento.

Aos estagiários e bolsistas do Gatil, que colaboraram com a execução do experimento a campo.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

BRUNA MOURA RODRIGUES, filha de Ademir Antônio Rodrigues e Ilza Moura Rodrigues, nasceu em Maringá, Paraná, no dia 16 de agosto de 1989.

Em dezembro de 2013, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2014, iniciou no curso de Pós-Graduação MBA em Gestão do Agronegócio, na instituição Unicesumar.

Em janeiro de 2015, foi contratada pela empresa Biomax Homeopatia Animal, onde exerceu a função de Auxiliar administrativo.

Em março de 2016, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de mestrado, na área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal.

Em fevereiro de 2018, submeteu-se a banca para defesa da dissertação de mestrado.

ÍNDICE

	Página
Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
I - INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Revisão Bibliográfica	2
1.1. Processo de colonização da microbiota intestinal de felinos domésticos	2
1.2 Probióticos e prebióticos na modulação da microbiota fecal	5
1.2.1 Probiótico	5
1.2.2 Modo de ação dos probióticos	6
1.2.2.1. Exclusão competitiva	6
1.2.2.2. Estímulo do sistema imune	6
1.2.2.3. Produção de substâncias antibacterianas	7
1.2.3 Prebióticos	8
1.2.3.1. Frutooligossacarídeos (FOS)	9
1.3. Probióticos em <i>Pet food</i>	10
1.4 Microencapsulação	11
2.0 Referências	12
II. Inclusion of probiotics bacteria in cat food: evaluation of resistance to the microencapsulation process and modulating capacity of the fecal microbiota	17
ABSTRACT	17
INTRODUCTION	18
MATERIAL E METHODS	19
RESULTS AND DISCUSSION	26
RESUMO	40

REFERÊNCIAS

LISTA DE TABELAS

	Página
Table I. Composition of the basal diet	37
Table II. Microorganism count in log/CFU/g before and after lyophilization and <i>in vitro</i> digestibility	38
Table III. Counting of microorganisms in log/CFU/g before and after the drying process by spray drying	40
Table IV. Microbial composition (log/CFU/g), pH and fecal score of the animals submitted to the different experimental treatments at the different sampling times	42
Table V. Viability of the microorganisms expressed in log/CFU/g of feed over the storage period at room temperature	43
Table VI. Log/CFU/g count of commercial probiotic at time 0 and 7 months of experiment	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figure 1. Structure of the lyophilized microcapsules and probiotic commercial in Scanning Electron Microscopy (SEM)	39
Figure 2: Structure of dried microcapsules by the Spray drying technique in Scanning Electron Microscopy (SEM)	41
Figure 3. Behavior of the microorganisms in the different experimental treatments cultivated in MRS, M17 and YEPD agar during the 120 days of storage of the feed	45

RESUMO

Objetivou-se avaliar a resistência de um probiótico comercial composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* e *Sacharomyces cerevisiae*, ao processo de microencapsulação pela técnica de liofilização e spray dryer, modulação da microbiota fecal de gatos, assim como a manutenção da viabilidade dos micro-organismos ao serem adicionados em ração comercial, pelo período de 120 dias. Para o processo de liofilização, goma acácia, frutooligossacarídeo e a associação dos dois, foram utilizados como agentes encapsulantes, para a secagem por Spray dryer utilizou-se frutooligossacarídeo. As microcápsulas e o produto comercial foram testados também quanto à passagem *in vitro* pelo trato gastrointestinal, sendo submetidos a condições ácidas seguido de condições alcalinas. Análises microbiológicas em ágar MRS para bactérias ácido lácticas, ágar M17 para *Enterococcus faecium* e ágar YEPD para *Sacharomyces cerevisiae*, foram realizadas para determinação da viabilidade dos mesmos após processamento. Para determinação da modulação da microbiota fecal de felinos, três tratamentos experimentais, sendo estes: T1 (controle) ração comercial, T2 ração comercial com adição de probiótico e T3 ração comercial com adição de probiótico + frutooligossacarídeo, foram fornecidos a 18 animais, sendo seis unidades experimentais por tratamento, pelo período de 21 dias. Os felinos foram alojados em gaiolas de digestibilidade para coleta de fezes e receberam durante o período experimental alimentação duas vezes ao dia. As fezes coletadas foram analisadas quanto a escore fecal, pH, bactérias ácido lácticas (em ágar MRS) e enterobactérias (em ágar McConkey). Para viabilidade dos micro-organismos e vida de prateleira da ração, amostras foram armazenadas à temperatura ambiente para análises microbiológicas.

Observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre a viabilidade do produto comercial antes e após simulação a passagem pelo TGI, com contagens de bactérias ácido lácticas, enterococos e leveduras, em \log_{10}/g , de 8,25; 8,27; 8,25 e 7,28; 7,22; 7,18 respectivamente. Quando comparados os processos de microencapsulação, a liofilização se mostrou mais eficiente, com a maior viabilidade observada nas microcápsulas revestidas por frutooligossacarídeo, 8,74 \log_{10}/g para bactérias ácido lácticas e 8,75 \log_{10}/g para enterococos, porém após digestibilidade *in vitro* houve redução acentuada na contagem de micro-organismos liofilizados para 3,67 e 4,65 \log_{10}/g . Para a técnica de Spray dryer não foi observada presença de micro-organismos por causa das injúrias causadas pela temperatura de secagem. Quando adicionados à ração, foi possível observar redução significativa ($P < 0,05$) na viabilidade dos micro-organismos ao longo da vida de prateleira do alimento, porém mesmo com esta redução, verificou-se diferença significativa ($P < 0,05$) na modulação da microbiota fecal dos gatos, visto que houve aumento na contagem de *Lactobacillus* em \log_{10}/g de fezes nos tratamentos com adição de probiótico e probiótico associado à frutooligossacarídeo (5,07; 4,87, respectivamente) quando comparados ao tratamento controle (3,65 \log_{10}/g). Verificou-se que a inclusão de aditivo probiótico na dieta de felinos foi capaz de modular a microbiota intestinal de forma positiva, porém em virtude da redução na viabilidade dos micro-organismos ao longo da *shelf life*, é necessário emprego de técnicas como a microencapsulação, que visam proteger os micro-organismos, devendo-se observar a resistência microbiana ao processamento.

Palavras-chave: felinos, microbiota fecal, microencapsulação, *shelf life*.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the resistance of a commercial probiotic composed of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* and *Sacharomyces cerevisiae*, to the microencapsulation process by the lyophilization and spray dryer technique, the modulation of the fecal microbiota of cats, as well as the microbial viability when added to commercial feed for a period of 120 days. For the lyophilization process, gum acacia, fructooligosaccharide and an association of the two were used as encapsulating agents, for spray dryer technique it was only the fructooligosaccharide. The microcapsules and the commercial product were also tested for in vitro passage through the gastrointestinal tract, being subjected to acidic conditions followed by alkaline conditions. Microbiological analyzes on MRS agar for lactic acid bacteria, M17 agar for *Enterococcus faecium* and YEPD agar for *Sacharomyces cerevisiae* were performed to determine their viability after processing. For the determination of the fecal microbiota modulation, three experimental treatments were used: T1 (control) commercial ration, T2 commercial ration with addition of probiotic and T3 commercial ration with addition of probiotic + fructooligosaccharide. The rations were given to 18 animals being, six experimental units per treatment, for a period of 21 days. The cats were housed in digestibility cages for feces collection and received during the experimental period feeding twice a day. The feces collected were analyzed for fecal score, pH, lactic acid bacteria (on MRS agar) and enterobacteria (on McConkey agar). For microbial viability to the shelf-life of the ration, feed samples were stored at room temperature for microbiological analyzes. A significant difference ($P < 0.05$) was observed between the viability of the commercial product before and after simulation of the TGI, with counts

of lactic acid bacteria, enterococci and yeasts, in \log_{10}/g of 8.25; 8.27; 8.25 and 7.28; 7.22; 7.18 respectively. When compared to the microencapsulation processes, lyophilization was more efficient, with the greater viability observed in the fructooligosaccharide-coated microcapsules, with 8.74 \log_{10}/g for lactic acid bacteria and 8.75 \log_{10}/g for enterococci, after in vitro digestibility there was a marked reduction in the count of lyophilized microorganisms (3.67 and 4.65 \log_{10}/g , respectively). For the Spray dryer technique there were not observed microorganisms due to injuries caused by the drying temperature. When added to the feed, it was possible to observe a significant reduction ($P < 0.05$) in the viability of the microorganisms throughout the shelf-life of the food, but even with this reduction, there was a significant difference ($P < 0.05$) in the modulation of fecal microbiota, since there was an increase in *Lactobacillus* count in treatments with addition of probiotic and probiotic plus fructooligosaccharide (5.07, 4.87, respectively) when compared to control (3.65 \log_{10}/g). It was verified that the inclusion of probiotic additive in the diet of cats was able to modulate the intestinal microbiota in a positive way, but due to the reduction in the microbial viability throughout shelf-life, it is necessary to use techniques such as microencapsulation, as well as the microbial resistance to the processing must be observed.

Key words: felines, fecal microbiota, microencapsulation, shelf life.

INTRODUÇÃO GERAL

Os veículos de vendas e *marketing* usam o termo “*pet*”, palavra de origem inglesa, cujo significado é animal de estimação, para se referirem aos animais que fazem parte do convívio humano, e que trazem benefícios por meio dos laços afetivos estabelecidos entre animais e tutores (Elizeire, 2013).

De acordo com Borges (2011), o conceito de “*pet*” como membro da família, é uma realidade no Brasil e no mundo, e esta aproximação estabeleceu-se pelo fato destes animais suprirem a carência de pessoas que vivem sozinhas em grandes centros, atuarem como apoio em situações tensas e de estresse, apresentarem boa relação com crianças, auxiliando no desenvolvimento de afeto e responsabilidades, e companhia para idosos.

O IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), no ano de 2013, apresentou a estimativa de 52,2 milhões de cães em 44,3% dos domicílios brasileiros, e 22,1 milhões de gatos, presentes em 17,7% dos lares, mostrando o quanto esta convivência tem se tornado cada vez mais frequente, e que há perspectiva de que as características de maior independência dos felinos levem ao aumento no número destes, como tem ocorrido nos Estados Unidos e Europa (Abinpet, 2013)

Esta proximidade favorece o mercado *pet*, que hoje apresenta vasta gama de produtos para este segmento, elevando o padrão de consumo destinado aos animais de companhia (Viotto, 2009). Dentre as variedades de produtos, o mercado de alimentos é o principal em termos de faturamento, 67,6% do total no ano de 2016, com

aproximadamente 2,59 milhões de toneladas produzidas, 5,7% a mais do que o ano de 2015 (Abinpet, 2016).

Assim como a indústria voltada para alimentação humana, a indústria de alimentação animal é também rigorosa quanto à qualidade no processamento de seus alimentos, visando oferecer um produto que atenda a demanda e satisfaça o mercado que é totalmente exigente (PetBr, 2003). Com estas similaridades, era de se esperar que os avanços na nutrição de cães e gatos caminhassem paralelamente aos avanços nutricionais em humanos, com foco nos alimentos funcionais (Borges, 2011).

Dentre estes alimentos funcionais, destacam-se os probióticos e prebióticos, que são definidos como micro-organismos adicionados à alimentação com o propósito de regular a microbiota intestinal do hospedeiro (Schrezenmeir e De Vrese, 2001); e, ingredientes nutricionais não digeríveis pelo hospedeiro, porém fermentáveis pelos micro-organismos, que estimulam o crescimento de bactérias intestinais benéficas, trazendo benefícios ao hospedeiro (Gibson; Roberfroid, 1995).

Os micro-organismos, ao colonizarem o trato gastro intestinal apresentam importante papel na digestão e absorção de nutrientes, sendo assim, ao se modular a microbiota intestinal por meio do uso de aditivos na dieta, é possível favorecer a atividade de bactérias benéficas em relação às patogênicas, trazendo benefícios para a saúde do hospedeiro (Fernandes et al., 2000; National Research council, 2006).

O objetivo do estudo foi avaliar a resistência de um pool de micro-organismos probióticos comercial ao processo de microencapsulação por liofilização e spray drying, assim como a influência destes micro-organismos na modulação da microbiota fecal de felinos domésticos e sua resistência à vida de prateleira da ração.

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Processo de colonização da microbiota intestinal de felinos domésticos

A mucosa do trato gastrointestinal (TGI) é um ambiente ideal para colonização de micro-organismos (Richter, 1992), que são de grande importância na digestão e absorção de nutrientes e síntese de vitaminas (Kozasa, 1989).

O processo de colonização intestinal de neonatos é bastante importante para a saúde dos indivíduos ao longo da vida. O trato gastrointestinal em cães e gatos apresenta colonização de micro-organismos semelhante aos demais mamíferos, e ao nascimento a mucosa intestinal estéril é rapidamente colonizada por bactérias do canal do parto e ambiente (Buddington, 2003).

Alguns trabalhos recentes destacam a possibilidade de colonização bacteriana em fase fetal (Thum et al., 2012; Funkhouser, Bordenstein, 2013; Rodríguez et al., 2015), tornando a ideia de que a barreira placentária mantém os fetos estéreis um enigma, porém de acordo com Rodríguez et. al. (2015), é considerado um risco para o feto a presença de qualquer micro-organismo no útero.

Thum et al. (2012), estudando a microbiota de gatas em fase de lactação, observaram que uma microbiota rica em *Bifidobacterium spp.*, e número reduzido de *E. coli*, contribui para o desenvolvimento fetal e neonatal, além de reduzir a incidência de distúrbios imunológicos na infância. Já Bermingham et al. (2013) observaram que a microbiota de fêmeas gestantes foram modificadas com a dieta, porém pequenas alterações ocorreram na prole na fase pré-desmame, com diferença em relação aos micro-organismos *Solobacterium*, *Peptococcaceae*, *Clostridium*, *Megamonas* e *Allisonela*. Já na fase pós desmame, tais alterações foram pronunciadas, com modulação de filos associados à dieta, observando-se aumento em *Firmicutes* e *Actinobacteria* e redução em *Fusobacterium*, nos animais que receberam dieta seca quando comparados à dieta úmida.

Sugere-se que a evolução dos carnívoros ao longo dos anos foi a responsável por alterar a microbiota intestinal, facilitando a rápida transição entre a alimentação líquida e sólida (Santos, 2015).

Segundo Strombeck & Guilford (1991), em pequenos animais a cavidade oral apresenta 10^7 UFC (unidade formadoras de colônias) por grama de secreções residuais. O estômago, por ser um ambiente com pH baixo, é praticamente isento de micro-organismos, com apenas 10^1 a 10^2 UFC/g. O intestino delgado apresenta, na parte cranial, colonização semelhante ao estômago (10^1 a 10^2 UFC/g) aumentando a colonização na parte caudal, que apresenta 10^3 a 10^4 UFC/g. Já no intestino grosso este número aumenta, com colonização entre 10^{10} a 10^{11} UFC/g.

Nos gatos quando adultos, as bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas ocorrem em maior abundância no intestino delgado, enquanto no intestino grosso há predominância de anaeróbias (Suchodolski et al. 2011), sendo os filos bacterianos predominantes na microbiota fecal de cães e gatos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria* (Deng e Swanson, 2015).

Quando avaliados os filos e gêneros bacterianos de felinos, Desai et al. (2009), observaram que o filo *Actinobacteria* (particularmente *Bifidobacterium spp.*) e *Firmicutes* (*Clostridium spp.* e *Lactobacillus spp.*), apresentam-se em maior quantidade no TGI dos felinos, enquanto *Proteobacteria* (como exemplo *Escherichia*), em menor quantidade. Resultado semelhante aos obtidos por Handl et al. (2011), que observaram abundante população de *Firmicutes* (92,1%), seguido de *Actinobacteria* (7,3%). Ambos os resultados diferenciam de Ritchie et al. (2010), que, avaliando as fezes de gatos observaram maior predominância do filo *Firmicutes* (87,3%), *Proteobacteria* (7,9%), *Bacteroidetes* (2,4%), *Actinobacteria* (2,3%) e *Fusobacteria* (0,2%).

Fatores como espécie, dieta, idade, ambiente e técnica empregada para análise, são responsáveis pelas variações nas proporções de bactérias intestinais entre indivíduos da mesma espécie (Garcia-Mazcorro; Minamoto, 2013; Kerr; Beloshapka; Swanson, 2014; Deng, Swanson, 2015; Grzeskowiak et al., 2015).

1.2 Probióticos e prebióticos na modulação da microbiota fecal

De acordo com Martins de Sá (2003), alimento funcional é todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benéficos à saúde, dentre estes se destacam os probióticos e prebióticos.

O uso de probióticos e prebióticos como aditivo na alimentação animal é regulamentado pela Instrução Normativa nº44 de 2015, que define estes aditivos como substâncias, micro-organismos ou produtos formulados, adicionados intencionalmente ao alimento, que não são utilizados normalmente como ingredientes, tenham ou não valor nutritivo e que melhorem as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhorem o desempenho dos animais sadios ou atenda

às necessidades nutricionais. Estes podem ser classificados de quatro formas: tecnológicos, sensoriais, nutricionais e zootécnicos, sendo os probióticos e prebióticos, enquadrados na última categoria.

1.2.1 Probióticos

Os probióticos foram definidos por Fuller (1989) como sendo o suplemento alimentar microbiano vivo, capaz de afetar benéficamente o hospedeiro, melhorando o equilíbrio da sua microbiota intestinal.

O uso de probióticos para não ruminantes pode ser justificado por auxiliarem na manutenção da estabilidade da microbiota intestinal benéfica, estabilizarem a microbiota após desequilíbrio causado por estresse ou uso de antibióticos, além de promover a estabilidade da microbiota de indivíduos recém-nascidos (Fernandes et al., 2012).

Para um micro-organismo ser considerado probiótico, deve ser habitante natural ou transitório do trato gastrointestinal do hospedeiro, sobreviver à passagem pelo estômago e manter a viabilidade no intestino (Saad, 2006; Cook et al., 2012). Os gêneros de bactérias mais utilizados como probióticos são as produtoras de ácido láctico, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e micro-organismos do gênero *Bacillus*, que apresentam a vantagem de esporular, sendo mais resistentes a condições desfavoráveis do ambiente e ao pH ácido do estômago (Biourge et al., 1998).

Ferreira e Astolfi-Ferreira (2006), relataram que as bactérias lácticas produzem as substâncias nisina, diplococcina, lactocidina, acidofilina, bulgaricina e reuterina, que apresentam atividade inibitória para micro-organismos como *Salmonella*, *Escherichia coli*. e *Staphylococcus* .

Biourge et al. (1998), ao estudar filhotes de cães sem raça definida, não encontraram diferença significativa na digestibilidade de nutrientes entre a ração com ou sem adição de *Bacillus* (C-5832). Resultados semelhantes aos encontrados por Feliciano et al. (2009), que ao adicionarem probiótico composto por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*, na alimentação de cães, também não observaram diferença significativa na digestibilidade, e observaram que o escore fecal foi afetado de

forma benéfica. Resultados estes que diferem de Swanson et al. (2012), que observaram maior digestibilidade em dietas suplementadas com *Lactobacillus*.

Sabendo dos benefícios dos probióticos na microbiota intestinal e a dificuldade de estabelecimento e manutenção da mesma, sugere-se que o uso frequente de probióticos pode promover benefícios ao hospedeiro.

1.2.2 Modo de ação dos probióticos

O intuito no uso de probióticos é a modulação da microbiota intestinal, a fim de que as bactérias benéficas se sobressaiam ao crescimento e estabelecimento das patogênicas, favorecendo a saúde do hospedeiro (Ghadban, 2002), e os modos de ação podem ser definidos como exclusão competitiva, estímulo ao sistema imune e produção de substâncias antibacterianas.

1.2.2.1. Exclusão competitiva

As bactérias probióticas quando adicionadas às dietas, competem com os micro-organismos patogênicos por sítios de adesão no epitélio intestinal (Sissons, 1989), porém esta competição é dependente do número de bactérias viáveis que chegam a estes receptores específicos, concluiu Vanbelle (1990), em um estudo realizado na França com *Bifidobacterium*. Esta hipótese de competição por sítios de adesão pode ser comprovada, por exemplo, com o fato de que algumas espécies de *Bifidobacterium* possuem afinidade de ligação pelos receptores β -glucosamine, que são os mesmos receptores para algumas espécies de *Escherichia. coli* (*E. coli*) enteropatogênicas.

Em estudos realizados com suínos, Cross (2002), demonstrou que a adição de *Lactobacillus* spp. a dieta reduziu a fixação de *E. coli* na mucosa intestinal. Resultados semelhantes aos verificados por Ross et al. (2010), que observaram redução no número de enterobactérias no intestino dos animais que receberam probiótico oral quando comprado ao grupo controle. Estes resultados evidenciam que os micro-organismos probióticos são eficientes em competir com os sítios de aderência nas vilosidades intestinais, protegendo estas vilosidades de possíveis danos causados por bactérias patogênicas (Nicoli e Vieira, 2000).

1.2.2.2. Estímulo do sistema imune

Os probióticos modulam o sistema imune aumentando em número e também a atividade das células fagocíticas do hospedeiro, com isto agem como estimuladores do sistema imunológico, aumentando a atividade dos macrófagos, estimulando a produção de anticorpos (Ferreira e Astolfi-Ferrera, 2006).

A capacidade que os micro-organismos probióticos possuem de interagir com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B, que são responsáveis pela produção de imunoglobulina A e a migração de células T do intestino, pode estar relacionada ao estímulo do sistema imune (Perdigón & Holgado, 2000).

Em um estudo realizado por Benyacoub et al. (2003), suplementando a dieta de cães com *Enterococcus faecium*, foi possível observar aumento em Imunoglobulina fecal (Ig) A, Ig circulante e IgA e células linfoides, aumentando as funções imunes em cães jovens. Resultados semelhantes foram verificados por Gonçalves et al. (2007), que observaram aumento na resposta imune de cães que foram vacinados contra os sorovares *canicola* e *Icterohaemorrhagiae* e suplementados com probiótico composto por *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*.

De acordo com Carlos et al. (2003), a ingestão de micro-organismos probióticos aumenta a resistência a patógenos por aumentar em número e ativação de macrófagos e linfócitos, produção de anticorpos e resposta em placas de Peyer.

1.2.2.3. Produção de substâncias antibacterianas

Além do efeito físico de barreira, por meio da competição por sítios de adesão na mucosa intestinal, os probióticos também exercem efeito biológico, promovendo ambiente de baixa tensão de oxigênio, prejudicando o crescimento de micro-organismos patogênicos, principalmente do gênero *Salmonella* spp., e ainda efeito químico, pelo produção de ácidos orgânicos que reduzem o pH do lúmen intestinal, inibindo a atividade de bactérias como *Clostridium perfringens* e estimulam o desenvolvimento de micro-organismos benéficos, como *Lactobacillus* (Ghadban, 2002).

Os micro-organismos probióticos podem também produzir substâncias conhecidas como bacteriocinas, que inibem o desenvolvimento de patógenos como *Salmonella*, *Escherichia coli*. e *Staphylococcus*. Exemplos destas bacteriocinas são

nisina, diplococcina, lactocidina, acidofilina, bulgaricina, que são produzidas por bactérias lácticas (Ferreira e Astolfi-Ferreira, 2006).

1.2.3 Prebióticos

Os prebióticos podem ser definidos como compostos não digeridos pelo organismo animal, porém fermentáveis pelos micro-organismos do trato gastrointestinal (TGI), favorecendo o crescimento e/ou atividade de micro-organismos capazes de promover benefícios ao hospedeiro (Gibson e Roberfroid, 1995).

Assim como os probióticos, os prebióticos também precisam apresentar algumas características para se enquadrarem na categoria, características estas que são: incapacidade de serem totalmente digeridos pelo hospedeiro, não ser absorvível no intestino delgado, fracamente fermentável pelas bactérias da microbiota oral e da microbiota patogênica do TGI e serem possivelmente fermentados por micro-organismos benéficos (Crittenden e Playne, 2009).

Mesmo sabendo que os micro-organismos benéficos agem sobre os patogênicos de modo a competir por nutrientes e sítios de ligação, produzir enzimas e bacteriocinas, além de produtos da fermentação que atuam como inibidores desta microbiota patogênica, e síntese de vitaminas e substratos que beneficiem seu próprio metabolismo (O'Toole e Cooney, 2008), os prebióticos podem apresentar vantagens sobre estes, pela sua estabilidade em longos períodos de *shelf life*, amplas faixas de temperatura e pH e resistindo de forma mais eficiente a passagem pelo trato gastrointestinal (Crittenden e Playne, 2009).

Kanakupt et al. (2011), ao avaliarem os efeitos de frutoligossacarídeos (FOS a 0,5%) e galactoligossacarídeos (GOS a 0,5%) sobre a microbiota fecal de gatos, observaram que ambos induziram ao aumento na população de *Bifidobacterium* spp. nas fezes quando comparadas ao grupo controle. Barry et al. (2010) avaliando uma proporção maior de FOS (4%), observaram aumento na população de *Bifidobacterium* spp. e redução na população de *E. coli*, quando comparados a dietas com a inclusão de pectina (4%) e celulose (4%). Doses reduzidas de FOS (0,75%) para gatos, elevaram em 164 vezes o número de *Lactobacillus* spp., provocaram redução de 75% no número de

E. coli e de 98% em *Clostridium perfringens*, quando comparados aos tratamentos sem suplementação (Sparkers et al. 1998).

Devido a estes benefícios comprovados, FOS, GOS e outras fontes prebióticas vêm sendo estudadas e utilizadas na alimentação de animais de companhia.

1.2.3.1. Frutooligossacarídeos (FOS)

Os FOS são oligossacarídeos constituídos por uma cadeia de frutose com ligações β (2-1) e uma unidade de glicose terminal, com grau de polimerização menor que 10. Ocorrem de forma natural principalmente em produtos de origem vegetal (Hartemink et al. 1997), e são chamados de açúcares não convencionais, que apresentam impacto na indústria por suas características funcionais nos alimentos (Spiegel et al., 1994).

Os FOS favorecem o desenvolvimento da microbiota benéfica do intestino por serem altamente fermentáveis por bactérias lácticas, enquanto micro-organismos patogênicos como *Salmonella* spp e *E. coli* são incapazes de fermentá-lo (Hidaka et al., 1990; Russell, 1998; Swanson et al., 2002; Middelbos et al., 2007).

Sparkes et al. (1998) avaliando a inclusão de FOS em dietas de felinos, observaram o aumento no número de lactobacilos e menor número de *E. coli* nas fezes.

Segundo estudos, a suplementação com FOS é capaz de diminuir os níveis de triglicerídeos séricos e aumentar a produção de ácidos graxos voláteis (Hidaka et al., 1986), além de aumentar a absorção de cálcio, magnésio e fósforo (Ohta et al. 1995).

Russel (1998) ao suplementar a ração de cães com 1% de FOS ou 3% de chicória (fonte de FOS), observou maior concentração de *Bifidobacterium* nas fezes. Swanson et al. (2002), fornecendo a cães 4 g de FOS por dia em cápsulas de gelatina, também observaram maior concentração de *Lactobacillus* spp, butirato e ácido láctico, e menor concentração de *Clostridium perfringens* nas fezes quando comparados ao grupo de animais que receberam 4 g de sacarose. Estes mesmos autores sugeriram que a suplementação com FOS pode reduzir a produção de compostos putrefativos (fenóis, indóis, amônia, entre outros), que contribuem para o mau odor nas fezes e desenvolvimento de câncer de cólon. Por fim, pode-se observar que a suplementação

com FOS na dieta promove equilíbrio na microbiota intestinal, estimulando assim outros benefícios ao organismo.

1.3. Probióticos em *Pet food*

No Brasil, a IN n° 44/15 regulamenta o uso de probióticos como aditivos em produtos destinados a alimentação animal. E prevê que é de responsabilidade dos fabricantes informar a taxonomia dos micro-organismos, assim como a quantidade inserida no produto em Unidades Formadoras de Colônia (UFC), e que os mesmos devem ser inseridos em quantidade necessária para obtenção do efeito desejado, visto que não há quantidade mínima estabelecida.

Na indústria *Pet Food*, o processamento é o ponto crítico ao se trabalhar com probióticos, pois os alimentos secos são extrusados, e neste processamento passam por temperaturas que podem atingir de 150°C a 160°C, eliminando os micro-organismos.

Likimani e Sofos (1990), avaliando a resistência de esporos de *Bacillus globigii* durante a extrusão de um alimento composto por milho e soja, concluíram grande perda de viabilidade dos micro-organismos. Com isto, Gonçalves (2007) determinou que as bactérias devem ser incorporadas ao alimento após o processo de extrusão.

Rações peletizadas passam por um processamento com temperatura inferior, atingindo no máximo 60°C, podendo estas bactérias serem inclusas neste caso antes ou depois do processamento (Nakandakare, 2013).

Dzani (2003) ao avaliar diferentes produtos comerciais com inclusão de probióticos para alimentação de cães e gatos observou concentrações menores que as garantidas pelos fabricantes ou até mesmo ausentes. Fator este que pode estar relacionado as ações adversas do ambiente, reduzindo a viabilidade destes micro-organismos.

Assim, visando evitar perda de viabilidade durante o processamento, armazenamento e consumo de produtos probióticos, a indústria vem buscando alternativas para proteger estes micro-organismos do meio em que se encontram, uma destas alternativas é a microencapsulação, que consiste em revestir estes probióticos com agentes denominados encapsulantes, que são normalmente insolúveis em meio

ácido e solúveis em meio alcalino, favorecendo a liberação dos mesmos somente no intestino.

Apesar das evidências dos efeitos benéficos dos probióticos em humanos, poucos trabalhos são conclusivos quando se trata da avaliação destes aditivos para cães e gatos (Borges, 2011). Com isto, pesquisadores e indústrias devem buscar atender as necessidades de um mercado atento e exigente, fidelizando seus clientes e se estabelecendo em um mercado cada dia mais competitivo.

1.4. Microencapsulação

A microencapsulação é um processamento que tem por finalidade reter materiais sólidos líquidos ou gasosos dentro de uma membrana encapsulante (Anal e Singh, 2007). Uma de suas principais aplicações na indústria envolve a proteção de compostos biologicamente ativos, como as bactérias probióticas, de ambientes nocivos para liberação controlada sob condições específicas (Doherty et al. 2011).

Técnicas como spray drying, spraycooling, coacervação, extrusão, liofilização, entre outras, são utilizadas na confecção das microcápsulas, aumentando a estabilidade dos compostos a fatores extrínsecos como presença de luz, oxigênio, pH extremos (Rebello, 2009).

A liofilização é uma técnica que consiste em remover água por sublimação, evitando injúrias celulares em materiais biológicos (Costa e Ferreira, 1991; Morgan et al. 2006). É constituída por três etapas: congelamento, desidratação primária e desidratação secundária. O congelamento interrompe as reações químicas e atividades biológicas, promovendo inércia, em seguida o material sofre desidratação por sublimação, e por fim, há o emprego de temperaturas de secagem sob pressões reduzidas (Paoli, 2005; Costa et al., 2009). Já a microencapsulação por spray drying é uma técnica a quente que consiste na dispersão das células em uma solução que é atomizada na câmara de secagem (Gharsallaoui et al., 2007), provocando a evaporação do solvente e a formação das microcápsulas (Kailasapathy, 2002),

REFERÊNCIAS

- Abinpet. 2016. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de estimação. Disponível em <<http://abinpet.org.br/site/faturamento-2016-do-setor-pet-aumenta-49-e-fecha-em-r-189-bilhoes-revela-abinpet/>> Acesso 18 Jan 2018
- Anal AK, Singh H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Technol* 18: 240-251.
- Benyacoub J, Czarnecki-Maulden GL, Cavadini C, Sauthier T, Anderson RE, Schiffrin EJ, von der Weid T. 2003. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune function in young dogs. *J Nutr* 133: 1158-1162.
- Bermingham EN, Kittelmann S, Yong W, Kerr KR, Swanson, KS, Roy NC, Thomas DG. 2013. Post-Weaning Diet Affects Faecal Microbial Composition but Not Selected Adipose Gene Expression in the Cat (*Felis catus*). *PLOS One* 8: 1-13.
- Biourge V, Vallet C, Levesque A, Sergheraert R, Chevalier S, Roberton JL. 1998. The use of probiotics in the diet of dogs. *J Nutr* 128: 2730-2732.
- Borges FM, Salgarello RM and Gurian TM. 2003. Recentes avanços na nutrição de cães e gatos. III Simpósio sobre nutrição de animais de estimação. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, Campinas – São Paulo, 21 - 60 p.
- Buddington RK. 2003. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs. *Am J Vet Res* 64: 646-651.
- Cândido LMB, Campos AM. 2005. Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da SBCTA* 29: 193- 203.
- Carlos IZ, Vendramini AP, Vendramini RC, Dâmaso AR. 2003. Influência de nutrientes no sistema imune: papel das citocinas, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. In: *Prebióticos e probiótico: atualização e prospecção*, Viçosa-MG, 1: 135-154.
- Cook MT, Tzortzis G Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J Control Release* 162: 56-67.
- Costa CP, Ferreira MC. 1991. Preservação de microrganismos: revisão. *Rev Microbiol* 22: 263-268.

Costa EC, Teixeira MFS, Dantas TVM, Melo VSP, Araujo SAC, Rolim BN. 2009. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. Rev. Acad. Ciên. Anim 19: 111-122.

Crittenden R, Playne MJ. 2009. Prebiotics. In: Lee YK, Salminen S. Handbook of Prebiotics and Probiotics 2th ed. New Jersey: John Wiley & Sons p.535-581.

Cross ML. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic *lactobacilli* and their role in protection against microbial pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol 34: 245-253.

Deng P, Swanson KS. 2015. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. Br J Nutr 113:6-17.

Desai AR, Musil KM, Carr AP, Hill JE. 2009. Characterization and quantification of feline fecal microbiota using cpn60 sequence-based methods and investigation of animal-to-animal variation in microbial population structure. Vet Microbiol 137:120-128.

Doherty SB, Gee VL, Ross RP, Stanton C, Fitzgerald GF, Brodkorb A. 2011. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. Food Hydrocoll 25: 1604-1617.

Dzanic DA. Scientific evaluations of popular novel ingredients, Part I e II. 2003. Production Symposium Trade Show – Pet Food Forum, Chicago – Illinois, 11 - 20 p.

Elizeire MB. 2013. Expansão do Mercado *pet* e a importância do *marketing* na medicina veterinária. Trabalho de Conclusão de curso. Medicina Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre.

Feliciano MAR, Saad BOMF, Logato PVR, Aquino AA, José VA, Roque NC. 2009. Efeito de probióticos sobre a digestibilidade, escore fecal e características hematológicas em cães. Arq. Bras. Med. Vet Zootec 61: 1268-1274

Fernandes PCC, Silva AV, Rodriguez NM, Ferreira SLL. F. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de cães. Disponível em <http://www.vetnil.com.br/idiomas/wpcontent/uploads/2012/05/viabilidade.pdf> Acesso em: 31 Ago 2017.

Fernandes PCC. Ladeira IQ, Ferreira CLLF, Rodriguez NM, Silva, AV. 2000. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogástricos. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia 31: 53-71.

Ferreira AP, Astolfi-Ferreira, CS. 2006. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. In: Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó-SC, p.56-66.

Fuller R. 1989. Probiotic in man and animals - a review. J Appl Bacteriol 66: 365 - 378.

Funkhouser LJ, Bordenstein SR. 2013. Mom Knows Best: the universality of maternal microbial transmission. PLOS Biol 11:1-9.

Garcia-Mazcorro JF, Minamoto Y. 2013. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. *Arch Med Vet.* 45: 111-124.

Ghadban GS. 2002. Probiotics in Broiler production – a review. *Arch. Geflugelk* 66: 49-58.

Ghadban GS. 2002. Probiotics in Broiler production- a review. *Arch Geflugelk* 66: 49-58.

Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. 2007. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res Int* 40: 1107–1121.

Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125: 1401- 1412.

Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125: 1401-12.

Gonçalves M, Maluta RP, Dahlke F, Maiorka A, Ávior FA. 2007. Avaliação da capacidade imunoestimulante e da estabilidade de um probiótico empregado em rações de cães. *Arch Vet Sci* 12: 25 – 30.

Grzeskowiak L, Endo A, Beasley S, Salminen S. 2015. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe* 34: 14-23.

Handl S, Dowd SE, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS. 2011. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiol Ecol* 76: 301-310.

Hartemink R, Vanlaere KMJ and Rombouts FM. 1997. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. *J Appl Microbiol* 383: 367 – 374.

Hidaka H, Eida T, Takizawa T, Tokunaga T and Tashito Y. 1986. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacterium Microflora* 5: 37-50.

Hidaka H, Hirayama M, Tokunaga T and Eida T. 1990. The effects of undigestible fructooligosaccharides on intestinal microflora and various physiological functions on human health. *Adv Exp Med Biol* 270:105-117.

Kailasapathy K. 2002. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr Issues Intest Microbiol* 3: 39-48.

Kanakupt K, Vester Boler BM, Dunsford BR, Fahey Jr GC. 2011. Effects of short-chain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adult cats. *J Ani Sci* 89: 1376-1384.

- Kerr KR, Dowd SE, Swanson KS. 2014. Salmonellosis impacts the proportions of faecal microbial populations in domestic cats fed 1–3-d-old chicks. *J Nutr Sci* 30: 1-5.
- Kozasa M. 1989. Probiotics for animal use in Japan. *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.* 8: 517-531.
- Likimani TA and Sofos JN. 1990. Bacterial spore injury during extrusion cooking of corn/soybean mixtures. *Int J Food Microbiol* 11: 243 - 250.
- Mandigan MT, Martinko JM, Parker J. 1997. Brock biology of microorganisms. 8th.ed. New Jersey: Prentice Hall p. 986.
- Middelbos IS, Fastinger ND and Fahey GC Jr. 2007. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dog in comparison to fiber standards. *J Anim Sci* 85: 3033-3044.
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. 2006. Preservation of microorganisms by drying – a review. *J Microbiol Methods* :183-193.
- Nakandakare IB, Iwashita MKP, Dias DC, Tachibana L, Ranzani-Paiva MJT, Romagosa E. 2013. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de Tilápia-do-Nilo: Parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. *Bol Inst Pesca* 39: 121 – 135.
- Nicoli JR, Vieira LQ. 2000. Probióticos, prebióticos e simbióticos. Moduladores do ecossistema digestivo. *Ciência Hoje* 28: 34-38.
- O’Toole PW. Cooney JC. 2008. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008: 1-9.
- Ohta, A, Ohtsuki M, Baba S, Takizawa T, Adachi T and Kimura S. 1995. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. *J of NutrSci and Vitam* 41: 281 – 291.
- Paoli de P. 2005. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol Rev* 29: 897- 910.
- Perdigón G, Holgado APR. 2000. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: *Probiotics 3: Immunodulation by the Gut Microflora and Probiotics*. Dordrecht: Kluwer Academic 213-233 p.
- PETBR, A força dos nutrientes. Disponível em <<http://www.petbrasil.com.br>> Acesso 20 Nov 2017.
- Rebello FFP. 2009. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Rev Agrogeoambient*, 1: 134-144.
- Richter, KP. 1992 Moléstias do intestino grosso. In: Ettinger, S.J. (ed), *Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e gato*. p.1462-1486

Ritchie BK, Brewster DR, Tran CD, Davidson GP, McNeil Y, Butler RN. 2010. Efficacy of *Lactobacillus* GG in Aboriginal Children With Acute Diarrhoeal Disease: A Randomised Clinical Trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 50: 619-624

Rodríguez JM et al. 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Healthy Dis* 26: 1-17.

Ross GR, Gusil C, Oliszewski R, Holgado SC, González SN. 2010. Effects of probiotic in swine. *J Biosci Bioeng* 109: 545-549.

Russell TJ. 1998. The effect of natural source of non-digestible oligosaccharides on the fecal microflora of the dog and effects on digestion. Friskies R & D Center, St. Joseph: Missouri, 19 p.

Saad SMI. 2006. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev Bras Ciênc Farm* 42: 1-16.

Santos JPF. 2015. Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sob a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Pirassununga.

Schrezenmeir J, De Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotics – approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73: 361 -364.

SparkerS AH, Papanoulitis K, Sunvold G, Werrett G, Gruffydd-Jones EA, Egan K, Gruffydd-Jones TJ, Reinhart G. 1998. Effect of dietary supplementation with fructooligosaccharides on fecal flora of healthy cats. *Am J Vet Res* 59: 436-440.

Sparkes AH, Papanoulitis K, Sunvold G, Werrett G, Clarke C, Jones M, Gruffydd-Jones TJ and Reinhart G. 1998. Bacterial flora in the duodenum of healthy cats, and effect of dietary supplementation with fructooligosaccharides. *Am J Vet Res* 59: 431-435.

Speigel JE, Rose R, Karabell P, Frankos VH and Schmitt DF. 1994. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Techn* 48: 85 – 89.

Strombeck DR, Guilford WG. 1991. *Small Animal Gastroenterology*, 2^oed, 774p.

Suchodolski JS. 2011. Companion animals symposium: microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *J. Animal Sci* 89: 1520-1530.

Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Chow J, Wolf BW, Garleb KA, Fahey GC Jr. 2002. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy Adult dogs. *J Nutr*. 132: 3721–3731.

Thum C, Cookson AL, Otter DE, McNabb WC, Hodgkinson AL, Duer J, Roy NC. 2012. Can Nutritional Modulation of Maternal Intestinal Microbiota Influence the

Development of the Infant Gastrointestinal Tract. J Nutr 142: 1921-1928.

Vanbelle M, Teller E, Focant M. 1990. Probiotics in animal nutrition: a review. Arch. Anim. Nutr. 40: 543-567.

Viotto FRS. 2009. Tendencias do mercado Pet no Brasil e no mundo. Rev Nutron, 4p.

II - Inclusion of probiotic bacteria in cat food: resistance to the microencapsulation process and modulating of the fecal microbiota

ABSTRACT – The objective of this study was to evaluate the commercial probiotic resistance to the microencapsulation process by lyophilization and spray drying, the modulation capacity of fecal microbiota of cats, pH and fecal analysis, maintenance of microbial viability during 120 days of rations storage. Three treatments, T1 commercial ration (control), T2 ration + probiotic, T3 ration + probiotic + fructooligosaccharide, were supplied to 18 animals for 21 days. Lyophilization was more efficient in maintaining microorganism viability, with a higher bacterial count using FOS as an encapsulating agent, with 8.74 and 8.75 log/CFU/g of lactic acid bacteria and Enterococci, but after In vitro digestibility, there was a marked reduction in the number of bacteria (3.67 and 4.65 log/CFU/g). The addition of commercial probiotic in diet was able to modulate the fecal microbiota ($P < 0.05$), with increase of lactic acid bacteria from 3.65 log/CFU/g to 5.07 and 4.87 log/CFU/g in treatments 2 and 3 respectively. The microbial viability during the shelf-life of the ration decreased significantly ($P < 0.05$), but even with this reduction, the microorganisms were able to beneficially modulate the intestinal microbiota without affecting the fecal score ($P > 0.05$).

Key words: felines, fructooligosaccharide, *Lactobacillus*, microbiology

INTRODUCTION

The IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics), in the year 2013, showed an estimative of 52.2 million dogs in 44.3% of the Brazilian households, and 22.1 million cats, in 17.7% of households, favoring the *pet* market, which presents a wide range of commercial (Viotto, 2009). The food market in terms of sales is the main, with 67.6% of the total in 2016 (Abinpet, 2016). Among this large market stand out the functional pet foods, which are those that besides the basic nutritional functions, produce benefic metabolic and/or physiological effects to health (Cândido and Campos, 2005).

Probiotics can be defined as live microorganisms, which contribute to the improvement of intestinal microbiota balance (Morais and Jacob, 2006). They are considered functional additives, with use in animal feed that are regulated in Brazil by Normative Instruction No. 44/15, which defines food additives as substances, microorganisms or formulated products, intentionally added to products, which are not normally used as an ingredient, whether or not they have a nutritional value that improve the characteristics of animal feed or animal products, the performance of healthy animals or meet nutritional requirements.

The microorganisms to be considered probiotics must be normal or transient inhabitants of the gastrointestinal tract, to survive the passage through the stomach, maintaining viability and activity in the intestine (Saad, 2006; Cook et al., 2012), thus, due to the low resistance of several microorganisms in these situations, techniques such as microencapsulation, which consists of covering particles or small drops of material, forming microcapsules, which can release their content at controlled rates and/or under specific conditions can be used (Menezes et al., 2012).

The administration of probiotics in the animal diet is to maintain the stability of the beneficial intestinal microbiota, stabilizing the microbiota after imbalance caused by

stress or antibiotic use, and promoting the microbiota stability of newborns (Fernandes et al., 2012).

In the *Pet Food* industry, processing is the critical point when working with probiotics, because dry foods are extruded, used temperatures that can reach 150 °C to 160 °C, eliminating the microorganisms (Nakandakare, 2013).

According to Nakandakare (2013), in pelleted feed, probiotic microorganisms may be included before or after processing, because it does not reach temperature higher than 60 °C. As for extruded feed, Likimani and Sofos (1990) studying the spore resistance of *Bacillus globigii* during the extrusion of a corn and soybean mixture, concluded that at the highest extrusion temperatures (reaching 150 °C) the destructive effects on the viability of microorganisms are greater. For *Bacillus* CIP 5832, the loss during the extrusion process reached 99% of the spores (Biourge et al., 1998), showing that they should be added to the feed after extrusion. Gonçalves et al. (2007), studying a probiotic, lyophilized, encapsulated, composed of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*, incorporated into commercial dog food after extrusion, verified probiotic stability after 12 months, and increased immune response in animals.

Given the benefits of probiotics on host intestinal microbiota and the increased search for improved animal health and welfare, the aim of this work was to evaluate the viability of a probiotic bacteria pool after microencapsulation process, the microbial viability in cat food during shelf-life and its influence on fecal microbiota.

Material and methods

The experimental procedures were previously approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the State University of Maringá (UEM), under protocol n° 3211300517.

Two experiments were carried out. In the "*in vitro*" experiment was evaluate the resistance of the microorganisms to the processes of microencapsulation by lyophilization and spray drying. The second experiment was to evaluate the influence of the microorganisms in the modulation of fecal microbiota and the microbial viability after inclusion in feed for cats during 120 days of storage.

First stage - Pre-experimental:

The "*in vitro*" test was developed at the State University of Maringá, at the Nucleus of Natural Products - NEPRON and Laboratory of Enzymatic Biotechnology, for drying in Spray drying and lyophilization, respectively. For this, a commercial microorganism pool was used, consisting of: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* and *Saccharomyces cerevisiae*, containing 10^9 CFU/g, besides gum acacia and fructooligosaccharide (FOS) as encapsulating agents, trehalose as thermoprotectant and powdered milk as cryoprotectant.

For the preparation of the solutions used in both techniques, 0.3 g of the microorganisms were activated in 100 ml of MRS broth (for lactobacilli and bifidobacteria), BHI broth (enterococci), at 37 °C for 24 hours, and YEPD broth culture (yeast) at 26 °C for 24 hours, then centrifuged for 15 minutes and the precipitates washed with sterile water and centrifuged again twice (Liserre et al., 2007).

The encapsulating agents were dissolved in 0.05M phosphate buffered saline, pH 7.6, under agitation, and at the end of the dissolution, 1% of the probiotic of each activated and centrifuged broth was added to the buffer solution plus pre-prepared encapsulant (Fávaro -Trindade & Grosso, 2000).

Lyophilization:

For microcapsules production by lyophilization, a cryoprotectant solution containing powdered milk (20%) and distilled water was prepared and sterilized. Three solutions were then prepared (S1; S2; S3) containing as base: 150 ml of 0.05M phosphate buffered saline, pH 7.6 + 1% of each activated microorganism + 20% cryoprotectant solution, being S1 added with 2% gum acacia; S2 with 2% FOS and S3: with 2% gum acacia + 2% FOS. The solutions were homogenized for 5 minutes on a magnetic stirrer, added in previously sterilized aluminum trays, subjected to freezing at -20 °C for a period of 24 hours then lyophilization in LIOBRAS lyophilizer, model Liotop L101, during 48 hours. After this period, the powder of the microcapsules was collected with the aid of sterile spatulas in glass bottles and kept at room temperature for later microbiological analysis.

Microbiological analyzes were performed at the Mesoregional Center for Excellence in Milk Technology - Northwest, located at the Experimental Farm of

Iguatemi (FEI/UEM). To verify the viability of the microorganisms after the lyophilization process, 1g of each sample was added in 9 ml of 0.1% peptone water, homogenized, followed by serial dilutions in test tubes containing 9 ml of peptone water, inoculating 1 ml of the dilutions of 10^{-4} to 10^{-6} in sterile Petri dishes, in triplicate, in the culture media.

To determine the probiotic viability after process, the microcapsules were subjected to stirring in 0.05M phosphate buffered saline, pH 7.6, at a ratio of 0.01 g.ml^{-1} , at 37 °C for 5 minutes, for capsule disintegration (Grosso & Favaro-Trindade, 2004). The bacterial count was made on Man, Rogosa and Sharpe agar - MRS for lactic bacteria, incubated at 37 °C for 72 hours in anaerobiosis, M17 for enterococci, incubated at 37 °C for 48 hours and YEPD for yeasts incubated at 26 °C for 48 hours. Dilutions containing between 25 and 250 colonies were considered.

Spray drying:

For microcapsules production by Spray drying, a solution containing 600 ml of 0.05M phosphate buffered saline, pH 7.6 + 1% of each microorganism + 2% trehalose + 2% starch + 2% FOS was prepared. The drying was performed in Buchi B-191 Mini Spray Dryer, operated with air inlet temperature of 175 °C and air outlet temperature of 104 °C, belonging to the Nucleus of Natural Products - NEPRON. The microcapsule powder was collected in the lower part of the cyclone, stored, previously sterilized in glass vial and stored at room temperature for further microbiological analyzes.

Disintegration of the capsules, serial dilutions and incubation of the microorganisms followed the same methodology as described before.

Resistance to passage through the gastrointestinal tract:

The commercial probiotic and microcapsules were also tested for resistance to passage through the gastrointestinal tract, following the methodology described by Hervera et al. (2007), where one gram of each sample was weighed in 50 ml Erlenmeyer flasks and incubated in two steps:

First step, gastric digestion simulation: twenty-five ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 6) were added to each flask, homogenized by means of magnetic stirring. To this solution was added 10 mL of 0.2 M HCl and the pH was adjusted to 2.0 with 1M HCl

solution and 1M NaOH. Then 1 ml of pepsin solution (containing 10 mg of pepsin (3651 U. mg⁻¹)) freshly prepared was added. The vials were closed and the samples were incubated in a water bath at 39 °C for a period of 2 hours under constant stirring.

Second step, simulation post-gastric digestion: After 2 hours of incubation, the Erlenmeyer flasks were cooled to room temperature and then there were added 10 ml of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.8) and 5 ml of NaOH 0.6 M. The pH was adjusted to 6.8 with 1M HCl solution and 1M NaOH. Then 1 ml of pancreatin solution containing 100 mg of pancreatin powder (freshly prepared) was added in each Erlenmeyer. Thereafter, the flasks were again incubated in a water bath at 39 °C for 4 hours under constant stirring.

At the end of the incubation, 1 ml of each flask was used for microbiological analysis, where 1 ml of each solution was added in test tubes containing 9 ml of 0.1% peptone water, homogenized, followed by serial dilutions of 10⁻² to 10⁻⁴, then 1 ml of the dilutions were inoculated into sterile Petri dishes, in triplicate, into the culture media: MRS, M17 and YEPD.

Experiment II

The experiment was carried out at the Laboratory of Nutrition and Metabolism of Domestic Felines, located at the Experimental Farm of Iguatemi (FEI), belonging to the State University of Maringá, Campus Maringá (UEM).

Eighteen adult cats were used, nine females and nine males, without breed, neutered, with ± 3 years old and average weight of 3.84 kg.

Management of animals and diets:

To prepare the treatments, it was used a commercial feed, without addition of oil and palatabilizer, whose composition is presented in Table I. The oil and palatabilizer were added in the proportion of 5% and 2% respectively, together with the commercial probiotic and FOS, to aid in their adhesion of the food surface of the food. The probiotic was added according to the recommendations of the manufacturer industry, 2 g.animal⁻¹.day⁻¹.

The feed was prepared weekly, and three treatments were elaborated: T1 Control: basal feed; T2: basal feed + commercial probiotic; T3: basal feed + commercial probiotic + FOS. Packages containing 25 grams of feed of the different treatments were prepared and stored at room temperature (25°C) and protected from light to determine the microbial viability throughout the shelf-life.

For feed inoculation, oil, palatabilizing, probiotic and prebiotic additives were added to previously sterilized beakers, homogenized and then added to the feed in plastic trays previously sanitized with 70% alcohol for proper homogenization. The experimental treatments remained in the trays for 24 hours for absorption of the inoculum, and then transferred to plastic buckets that were stored at room temperature.

The experiment was carried out in a randomized block design, with three cats per treatment in each block, totaling six cats per treatment. Each block lasted for 21 days, distributed as follows: days 1 to 7 for adaptation of the animals to the metabolic cage and diet, days 8 to 15 for adaptation to the digestibility cages, days 16 to 21 collection of feces and analyzes of the same. The collections were performed on alternate days, totaling three collections/animal/treatment.

During the adaptation days of cages and diet, the animals remained in individual metabolic cages only during feeding hours, from 8:00 a.m. to 10:00 a.m., and from 2:00 p.m. to 4:00 p.m. in the afternoon, the rest of the day were housed in collective cattery. Feed leftovers from the feed were weighed after the evening meal.

In the adaptation days to the digestibility cage and in the feces collection period, the animals remained full time housed in digestibility cages (1m x 1m x 0.5m), the feed was given at 8:00 am and 2:00 pm, and the leftovers were weighed the next day in the morning. Water was supplied ad libitum and the metabolizable energy of the feed estimated according to their bromatological composition. The amounts supplied to each animal were calculated according to the metabolizable energy of the food (EMA), considering the NRC (2006) recommendations, which was estimated at 3500 kcal.kg⁻¹, and the metabolizable energy requirement (NEM) of each animal was used, using the weight of the animals previously determined, and sufficient quantity was supplied to meet the 80 kcal /kg^{0.67}.

Microbiology of feed samples (*shelf life*)

Packages with 25g of feed were opened and diluted in 225 ml of 0.1% peptone water, homogenized, followed by serial dilutions 10^{-3} to 10^{-5} in test tubes containing 9 ml of 0.1 peptone water and 1 ml of the dilutions were then inoculated into sterile Petri dishes in triplicate into culture media: MRS, M17 and YEPD.

Fecal parameters

Feces were collected up to 30 minutes after defecation to determine the pH, fecal score and number of Colony Forming Units (CFU) of enteric bacteria and lactic acid bacteria.

At the moment of collection, the fecal score was determined in a visual way following the methodology described by de-Oliveira et al. (2008), where scores from 1 to 5 are given to determine feces quality, being: 1 = liquid feces; 2 = smooth and unformulated feces; 3 = soft, well-formed and moist feces; 4 = hard feces, dry, firm and well formed; 5 = very hard and dry. Scores 3 and 4 are considered normal.

After collection, the samples were sent to the Meso - Regional Center for Excellence in Milk Technology - Northwest (CMETL). For pH determination, a solution of 1: 9 feces and distilled water (2 grams of feces diluted in 18 ml of water) was prepared, the pH was mensured in triplicate in digital bench pH meter.

For microbiological counts, 1 g of each sample was weighed, diluted in 9 ml of 0.1% peptone water followed by serial dilutions of 10^{-2} to 10^{-4} . 1 ml of each dilution was added in triplicate in Petri dishes containing MRS agar by pour plate technique, incubated at 37 °C for 72 hours in B.O.D. For enterobacteria determination, 0.1 ml of each dilution was added in triplicate in Petri dishes containing MacConkey agar by the surface plating technique and incubated at 37 °C for 24 hours in B.O.D.

Statistical analysis

The results of microencapsulation techniques viability, fecal parameters and viability of bacteria probiotic inclusion during the feed shelf life were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test, at 5% significance level. For modulation of fecal microbiota, a contrast study was performed using Software SAS 6.0 (Statistical Analysis System Institute, Cary, NC).

Results and Discussion

Experiment I

The most effective treatment to maintain the viability of the microorganisms was the lyophilization with association of FOS to the probiotic, maintaining 8.74 and 8.75 log/UFC/g of lactic acid bacteria and enterococci after processing (Table II).

The lyophilization of microorganisms associated with FOS and gum acacia when observed in scanning electron microscopy (SEM), did not form uniform capsules with a rounded and smooth surface (Figure I), but the efficiency of the processing can be observed by the fact, that, even with the lowest count in lactic acid bacteria and enterococci (7.52 and 7.86 log/UFC/g), microbial viability was maintained (91.15% and 95.04%, respectively).

The values observed in this work are above that verified by Zayed and Ross (2004), which evaluated the preservation of *Lactobacillus salivarius* by the lyophilization technique using powdered milk as a cellular protector and observed cellular viability of only 22% of microorganisms.

The values obtained above those mentioned in the literature can be explained by the addition of prebiotics to lyophilized solutions. Shin et al. (2000) observed a 55.7% improvement in the viability of *Bifidobacterium spp.* after 4 weeks of refrigerated storage using skimmed milk with addition of fructooligosaccharides. The combination of cryoprotectants + prebiotics + microencapsulation was used to increase probiotic strains viability in yoghurt (Capela; Hay; Shah, 2006).

Lyophilization when applied in yeast can cause high mortality of these microorganisms. Miyamoto-Shinohara et al. (2000), evaluating the survival rate of different microorganisms after lyophilization, found a survival rate of *Saccharomyces cerevisiae* of 10%, whereas for Gram positive bacteria such as *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium glutamicum* and *Streptococcus mutans*, the viability remained around 80%, however, *Lactobacillus acidophilus* and *Enterococcus faecium* presented post-lyophilization viability of 62.5% and 85.2%, respectively, revealing a higher yeast sensitivity to processing when compared to other microorganisms.

Alcarde and Basso (1997), using strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*, stimulated the accumulation of endogenous trehalose of these microorganisms and lyophilized them with addition of skim milk and sucrose as cryoprotectants, best results to maintain the viability were obtained in the treatment with accumulation of endogenous trehalose and skimmed milk.

Trevisol et al. (2011), studying the application of trehalose application in *Saccharomyces cerevisiae*, found that this carbohydrate, besides protecting the microorganisms under stressful industrial conditions, also causes an improvement in fermentation capacity and conservation of these yeasts, reinforcing the hypothesis that an association of cryoprotectants is ideal to avoid high mortality of these microorganisms.

When the lyophilized capsules and the probiotic were submitted to the *in vitro* digestibility test, the microbial viability declined sharply, with lower reduction observed in the commercial product, than for lactic bacteria, enterococci and yeasts, that decreased only 11.86%, 12.70% and 12.97% respectively. The higher mortality of lactic bacteria (70.21%) was observed in the lyophilized capsules with association of gum and FOS to the probiotic, where the counts decreased from 7.52 to 2.24 log/UFC/g, occurring a reduction of 5.28 logarithmic cycles. For enterococci the addition of gum acacia to the commercial probiotic caused a higher viability loss of the bacteria, reducing the count in 4.32 log cycles. This fact was probably due to the consecutive stress in microorganisms, as the freeze caused by the lyophilization followed by the hydrochloric acid action when simulating the passage through the pH of the stomach.

When the microorganisms were submitted to the microencapsulation process by spray drying, no viability of the microorganisms was observed (Table III).

Silva et al. (2015), when microencapsulating *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus*, verified efficiency in the use of the spray drying technique because spherical capsules and without cracks were produced, that protected the microorganisms in simulated gastrointestinal conditions.

Ananta et al. (2005), studying spray dryer drying of *Lactobacillus rhamnosus* with different outlet temperatures (70 °C to 100 °C), concluded that survival was inversely proportional to temperature.

According to Sunny-Roberts and Knorr (2009), spray drying is a technique that produces a large amount of material, but with a high loss of microbial viability due to thermal inactivation. So, considering the microbial sensitivity in high temperatures, thermoprotectants are studied and added to the solutions. Carvalho et al. (2004), evaluating the resistance of *Lactobacillus bulgaricus*, observed higher viability when fructose, lactose, mannose, glucose, monosodium glutamate and sorbitol were used as coating material. Trehalose is a glucose disaccharide that has been gaining prominence because it is effective in protecting bacterial cells in freezing and drying at high temperatures (Sunny-Roberts and Knorr 2009). Thus, even the technique allowing the formation of microcapsules with a more rounded structure, uniform and smooth surface (Figure 2), as well as the addition of trehalose as an adjuvant in the microbial viability, the high drying temperatures employed (175 °C inlet, 104 °C outlet), probably led to the cell death of the bacteria.

It is observed that the viability maintenance of probiotic microorganisms after spray drying technique depends on parameters such as: stress tolerance of bacteria, encapsulating agent, temperature, drying and storage conditions so they should be considered for the success of the same (Chàvez and Ledebøer, 2007).

Experiment II

Basal feed (T1), basal feed + commercial probiotic (T2) and basal feed + commercial probiotic + FOS (T3) were adequately consumed by cats, with no episodes of refusal, vomiting or diarrhea, with total consumption during the experimental period of 6.401 kg; 6.418 kg and 6.136 kg, and mean consumption per animal per day of 56 g; 56 g and 54 g, respectively. Suggesting that the additives inclusion in the evaluated proportions does not interfere with the food acceptability.

- Modulation of fecal microbiota

There was a significant difference for lactic acid bacteria count and fecal pH ($P < 0.05$), but for fecal and enteric pathogenic bacteria no significant differences were observed ($P > 0.05$) (Table IV).

When feces were seeded in MRS agar medium, treatments containing probiotic and probiotic association + FOS were shown to be efficient in increasing the beneficial

population in the TGI, with \log_{10}/g scores of 5.07 and 4.87 respectively, while the control treatment had lower values of lactic bacteria (3.65 \log_{10}/g of feces). According to the contrast analysis performed between the treatments containing only basal feed and basal + commercial probiotic + FOS, a positive effect in the beneficial microbiota of the animals ($P < 0.05$) was observed with additives inclusion.

It is observed that lactobacilli and bifidobacteria are not microorganisms abundant in the intestinal microbiota of felines (Ritchie et al., 2010), but the inclusion of these or substrates that benefit their growth in the animals' diet is able to modulate the number of bacteria present in the medium.

The idea that the probiotics in pet diets increase the intestinal health of these animals, corroborates with data found by Marshall-Jones et al. (2006), that when administering *Lactobacillus acidophilus* DSM13241 in a diet of healthy adult cats, observed an increase in the number of beneficial *Lactobacillus* groups in feces and a decrease in the number of *Clostridium spp.* and *Enterococcus faecalis*.

A study carried out by Bybee et al. (2011) with dogs and cats revealed less diarrhea in animals that were supplemented with *Enterococcus faecium* SF68, suggesting a beneficial effect of this probiotic on their gastrointestinal. Similar effect was verified by Garcia-Mazcorro et al. (2011), that administering a probiotic association containing 7 strains of microorganisms and fructooligosaccharide as prebiotic in diets of dogs and cats observed an abundance of beneficial bacteria in their feces of the animals, besides not having adverse gastrointestinal effects.

Torres-Henderson et al. (2017), administer the antibiotic Amoxillin-Clavulanate in one group of animals and Amoxillin-Clavulanate + probiotic *Enterococcus Faecium* SF68 in another group, observed that the animals that received only antibiotic presented diarrhea and alteration in the fecal microbiota, by other hand, the probiotic administration in animals treated with antibiotics was able to reduce the diarrhea rates.

Grieshop et al. (2004) and Swanson et al. (2002), providing diets with the of MOS, observed an increase in the population of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* at 0.5 and 0.68 $\log/UFC/g$ respectively. These results resemble the inclusion of FOS

as a prebiotic, since the inclusion of the same associated with probiotic increased the amount of lactic acid bacteria in the feces of the animals and are in agreement with the research of Kanakupt et al. (2011), that observed induction an increase of *Bifidobacterium spp.* in the fecal microbiota of cats supplemented with 0.5% FOS.

A higher probiotic bacteria concentration also increases the organic acids concentration in the medium, as well as the addition of prebiotics stimulate the growth and stability of this population of beneficial microorganisms producing such acids as fermentation products. The production of these organic acids reduces the medium pH and, together with other antibacterial substances and enzymes produced by this bacterial population, may inhibit the growth of pathogenic microorganisms (Ghadban 2002).

A significant reduction in the number of enteric bacteria during the 4 days of fecal collection can be observed. This reduction is probably due to growth suppression by the increase in the beneficial population, as well as the fact that pathogenic microorganisms such as *Salmonella* and *Escherichia coli* do not have fermentative capacity for FOS, so it can be used as a growth inhibitor to these and others microorganisms (Hidaka et al., 1990; Russell, 1998; Swanson et al., 2002; Middelbos et al., 2007). According to the contrast analysis, comparing the different stool collection times (0, 2 and 4 days), lower counts of enterobacteria were observed on the 2nd day when compared to the others.

With an increase in the of lactic bacteria population, it was expected to reduce the pH of feces in the treatments with probiotic bacteria inclusion, but an increase in the same was observed. In the contrast study between the different treatments, a significant difference ($P < 0.05$) was observed, with the lowest pH value for the control treatment (5.67).

Regarding the fecal score, no significant difference was observed between the treatments ($P > 0.05$), all remaining between the values considered normal (3 and 4). This result is similar to that observed by Swanson et al. (2002), that administering diets with addition of MOS and FOS to the dogs, did not observe influence of the supplementation in the fecal score.

- Shelf-life of the feed

Probiotic products to be placed on the market must have a long-term shelf life and maintain stability in the microbial viability during this period, preferably without the need for refrigeration.

It can be verified that the of probiotic addition and the probiotic associated with FOS significantly reduced the microbial viability during the 120 days of storage ($P < 0.05$) (Table V). However, for treatment containing only the commercial probiotic, this reduction was more pronounced, because for lactobacilli, enterococci and yeast, viability losses were higher than 30% (35.00, 30.17, 36.13, respectively), while for association of probiotic + FOS, losses were 21.32%, 21.18% and 19.02%, respectively.

When these counts are compared to the commercial probiotic (Table VI), it is possible to observe that the reduction in the microbial viability added to the feed is related to extrinsic factors such as air humidity, temperature and gas composition of the storage environment, since treatment with probiotic had reduction higher than 2 logarithmic cycles for lactobacilli, enterococci and yeasts (2.28, 2.00, 2.37), while for the association of probiotic + FOS this reduction was 1.29 ; 1.33; 1.16 log cycles over a period of 120 days, while the commercial product presented reduction of less than 2 log cycles for lactobacilli, enterococci and yeasts (1.63, 1.13 and 1.24) in a period of 7 months .

Thus, we are allowed to observe that the inclusion of FOS associated with the commercial probiotic aid in the protection of microorganisms against the action of extrinsic factors (Figure 3). In order to improve the microbial viability of the product over time, techniques that protect microorganisms, such as microencapsulation, when microorganisms are resistant to encapsulation conditions, are interesting, as observed by Gonçalves et al. (2007), which included lyophilized probiotic bacteria followed by microencapsulation by spray drying, operated at 60 °C outlet temperature, in extruded and extruded dog feed, observed viability in both for 12 months of storage.

However, even with a significant reduction ($P < 0.05$) in the microbial count in all culture media, soon after the first week of shelf life of the feed, it was possible to observe that microorganisms colonized the gastrointestinal tract of cats, favorably modulating the fecal microbiota by promoting increase in the lactic acid bacteria counts (Table 4).

Final Considerations

The inclusion of probiotic microorganisms in cat food is favorable to the development and establishment of the beneficial intestinal microbiota. However, during the shelf-life of the food the loss of microbial viability is accentuated due to the bacterial interaction with the oxygen, temperature, humidity of the medium in which they are inserted. Thus, the need for techniques such as microencapsulation, which protect biological agents from extrinsic factors in the environment, should be considered, taking into account the conditions that these probiotics will be submitted to ensure their viability at the end of processing and storage of the product where they will be inserted. Considering the expansion of the pet market and the population growth of domestic felines in homes, it is necessary to further studies aiming the development of probiotic foods, in order to improve the health and well-being of these animals.

II - Inclusão de bactérias probióticas em ração para gatos: avaliação da resistência ao processo de microencapsulação e capacidade de modulação da microbiota fecal

RESUMO – Objetivou-se avaliar a resistência de probiótico comercial ao processo de microencapsulação por liofilização e spray drying, a capacidade de modulação da microbiota fecal de gatos por meio de contagem de microbiota fecal, pH e escore fecal, manutenção da viabilidade microbiana ao longo de 120 dias de armazenamento da ração. Três tratamentos, T1 ração comercial (controle), T2 ração + probiótico, T3 ração + probiótico + frutooligossacarídeo, foram fornecidos a 18 animais por 21 dias. A liofilização se mostrou mais eficiente na manutenção da viabilidade dos micro-organismos, com maior contagem bacteriana na adição de FOS como agente encapsulante, com 8,74 e 8,75 log/UFC/g de bactérias lácticas e enterococos, porém após digestibilidade *in vitro* houve redução acentuada no número de bactérias (3,67 e 4,65 log/UFC/g). A adição de probiótico comercial na ração, foi capaz de modular a microbiota fecal dos animais ($P < 0,05$), com aumento de bactérias ácido lácticas de 3,65 log/UFC/g para 5,07 e 4,87 log/UFC/g nos tratamentos 2 e 3 respectivamente. A viabilidade dos micro-organismos na *shelf-life* da ração decresceu de forma significativa ($P < 0,05$), porém, os micro-organismos foram capazes de modular de forma benéfica a microbiota intestinal sem afetar o escore fecal ($P > 0,05$).

Palavras-chave: felinos, frutooligossacarídeo, *Lactobacillus*, microbiologia.

REFERÊNCIAS

- Abinpet. 2016. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de estimação. Disponível em <<http://abinpet.org.br/site/faturamento-2016-do-setor-pet-aumenta-49-e-fecha-em-r-189-bilhoes-revela-abinpet/>> Acesso 18 Jan 2018
- Alcarde AR, Basso LC. 1997. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161997000200013> Acesso 15 Jan 2018. doi <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90161997000200013>
- Ananta E, Volkert D, Knorr D. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG, Int Dairy J 15: 399-409.
- Biourge V, Vallet C, Levesque A, Sergheraert R, Chevalier S, Roberton JL. 1998. The use of probiotics in the diet of dogs. 328 J Nutr 128: 2730-2732.
- Bybee SN, Scorza AV, Lappin MR. 2011. Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF 68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in a animal shelter. J Vet Intern Med 25: 856-860.
- Capela P, Hay TKC, Shah NP. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Res Int 39: 203-211.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. 2004. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*. Biotechnol Prog 20: 248-254.
- Chávez BE, Ledebøer AM. 2007. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. Drying Technol 25: 1193-1201.
- Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. J Control Release 162: 56-67.
- de-Oliveira L D, Carciofi A C, Oliveira M C C, Vasconcellos R S, Bazolli R S, Pereira GT, Prada F. 2008. Effects of six carbohydrate sources on diet digestibility and postprandial glucose and insulin responses in cats. J Animal Sci 86: 2237-2246.
- Etchepare MA, Menezes MFSC, Barreto AR, Cavalheiro CP, Menezes CR. 2014. Microencapsulação de probióticos pelo método de extrusão associado a interações eletrostáticas. Cienc Nat 37: 75-86.
- Fávaro-Trindade CS, Grosso CRF. 2000. The effect of the immobilization of *L. acidophilus* and *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. Michwissenschaft 55: 496 – 499.

- Garcia-Mazcorro JF, Lanerie DJ, Dowd SE, Paddock CG, Grützner N, Steiner JM, Ivanek R, Suchodolski JS. 2011. Effect of a multi-species symbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 78:542–554.
- Ghadban GS. 2002. Probiotics in Broiler production – a review. *Arch Geflugelk*, 66: 49-58.
- Gonçalves M, Maluta RP, Dahlke F, Maiorka A, Ávia FA. 2007. Avaliação da capacidade imunoestimulante e da estabilidade de um probiótico empregado em rações de cães. *Arch Vet Sci* 12: 25 – 30.
- Grieshop C, Flickinger E, Bruce K, Patil AR, Czarnecki-Maulden GL, Fahey JrGC. 2004. Gastrointestinal and Immunological responses of senior dogs to chicory and mannanoligosaccharides. *Arch Anim Nutr* 5: 483-493.
- Grosso CRF, Fávoro-Trindade CS. 2004. Stability on free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. *Braz J Microbiol* 35: 151-156.
- Hervera, M, Baucells MD, Blanch F, Castrillo C. 2007. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by in vitro analyses. *J Anim Physiol Anim Nutr* 91: 205-209.
- Hidaka H, Hirayama M, Tokunaga T, Eida T. 1990. The effects of undigestible fructooligosaccharides on intestinal microflora and various physiological functions on human health. In: Furda. I ed. *New Development in Dietary Fiber*. New York: Plenum press, p.105.
- Kanakupt K. 2011. Effects of short-chain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adults cats. *J Anim Sci* 89: 376-1384.
- Likimani TA, Sofos JN. 1990. Bacterial spore injury during extrusion cooking of corn/soybean mixtures. *International J Food Microbiol* 11: 243 – 250.
- Liserre AM, Ré MI, Franco BDGM. 2007. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnol* 21: 1-16.
- Marshall-Jones ZV, Baillon ML, Croft JM, Butterwick RF. 2006. Effects of *Lactobacillus acidophilus* DSM13241 as a probiotic in healthy adult cats. *Am J Vet Res* 67: 1005-1012.
- Menezes CR, Barin JS, Chicoski AJ, Zepka LQ, Jacob-Lopes E, Fries LLM, Terra NN. 2012. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Ciênc. Rural* 43: 1309-1316.

- Middelbos IS, Fastinger ND, Fahey GC Jr. 2007. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dog in comparison to fiber standards. *J Anim Sci* 85: 3033- 3044.
- Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi T, Sukenobe J, Murakami Y, Kawamura S, Komatsu Y. 2000. Survival rate of microbes after freeze-drying and long term storage. *Cryobiology* 4: 251-255.
- Morais MB, Jacob CMA. 2006. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *J Pediatr.* 82 : 189-197.
- Nakandakare IB, Iwashita MKP, Dias DC, Tachibana L, Ranzani-Paiva MJT, Romagosa E. 2013. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de Tilápia-do-Nilo: Parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. *Bol Inst Pesca* 39: 121 – 135.
- National Research Council. (NRC). Nutrient requirements of dogs and cats. 2006. Washington, D.C: National Academy of Science; National Academy Press 398 p.
- Ritchie LE, Burke KF, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS. 2010. Characterization of fecal microbiota in cats using universal 16S rRNA gene and group-specific primers for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. *Vet Microbiol* 144: 140-146.
- Russell TJ. 1998. The effect of natural source of non-digestible oligosaccharides on the fecal microflora of the dog and effects on digestion. Copyright Friskies–Europe. Friskies R & D Center, St. Joseph, MO, p.19.
- Saad SMI. 2006. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev Bras Ciênc Farm* 42: 1-16.
- Shin HS, Lee JH, Pestka JJ, Ustunol Z. 2000. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. *J Food Sci* 65: 884-887.
- Silva PT, Fries LLM, Menezes CR, Silva CB, Soriani HH, Bastos JO, Motta MH, Rieiro RF. 2015. Microencapsulation of probiotics by spray drying: evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and availability under different storage temperatures. *Cienc. Rural* 45 Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782015000701342> Acesso 20 Dez 2017 doi <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140211>
- Sunny-Roberts EO, Knorr D. 2009. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. *Int Dairy J* 19: 209-214.
- Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Healy HP, Dawson KA, Merchen NR, Fahey JrGC. 2002. Supplementalfrutooligossacarides and mannanoligossacarides influence immune function ileal and total tract nutrients digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the

large bowel of dogs. J Nutr 132: 980-989.

Trevisol ET, Panek AD, Mannarino SC, Eleutherio EC. 2011. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 90: 697-704.

Torres-Henderson C, Summers S, Suchodolski J, Lappin MR. 2017. Effect of *Enterococcus faecium* Strain SF68 on Gastrointestinal Signs and Fecal Microbiome in Cats Administered Amoxicillin-Clavulanate. Topics in Companion Med 32: 104–108

Viotto FRS. 2009. Tendencias do mercado Pet no Brasil e no mundo. Rev Nutron, 4p.

Zayed G, Roos YH. 2004. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage”, Process Biochemi 36: 1081 - 1086.

Table I. Composition of the basal diet used as control for cats

BASIC FORMULATION – FEED FOR CATS	
Corn grain	30.40 %
Poultry meal	29.00 %
Soybean meal 45%	11.00 %
Breweres rice	7.00 %
Fish meal 61%	5.00 %
Wheat bran	7.00 %
Oil poultry meal	4.50 %
Liquid palatabilizer	2.00 %
Beet pulp	1.00 %
Yeast extract	0.80 %
Sodium Chloride	0.56 %
Flax Seed	0.40 %
Mineral and vitamin premix	0.40 %
Calcium propionate	0.15 %
Sodium hexametaphosphate	0.10 %
DL- Methionine	0.10 %
Odor Adsorbent (extract of <i>Yucca schidegera</i>)	0.08 %
Adsorbent mycotoxins	0.05 %
Chelated Zinc	0.04 %
Urinary Acidifier	0.40 %
Synthetic antioxidant	0.02 %

Levels of guarantee: humidity: maximum (12%); crude protein: minimum (30%);
 ethereal extract: minimum (10%); fibrous matter: maximum (3.5%); mineral matter:
 maximum (8.5%); calcium: minimum (0.9%); calcium: maximum (1.8%); phosphorus:
 minimum: 0.9%; linolenic acid: minimum (2,500 mg/kg); linoleic acid (25 g/kg);
 saponin: minimum (4 mg/kg). Minimum enrichment per kg of product: vitamin A:
 10,000 UI; vitamin D: 720 UI; vitamin E: 48 UI; vitamin k: 0.80 mg; vitamin B1: 5.6
 mg; vitamin B2: 6 mg; vitamin B6 4.8 mg; vitamin B12: 22 mg; pantothenic acid: 6 mg;
 folic acid: 0.80 mg; copper 5 mg; iron: 80 mg; manganese: 8 mg; iodine: 0.60 mg; zinc:
 80 mg; selenium: 0.10 mg; biotin: 0.08 mg; niacin: 64 mg; taurine: 1,000 mg; coline:
 2,400 mg.

Sodium hexametaphosphate: tartar control; Acidifying: propionic acid; Antioxidant: BHA and BHT; Calcium propionate: antifungal.

Table II. Microorganism count in (log/CFU/g) before and after lyophilization and *in vitro* digestibility

Variables	Treatments					
	Prob	C F	C G	C G+F	EP	P
MRS	8.25 ^b	8.74 ^a	7.71 ^c	7.52 ^d	0.039	<0.0001
M17	8.27 ^b	8.75 ^a	8.10 ^b	7.86 ^c	0.051	<0.0001
YEPD	8.25 ^a	<1.00 ^b	<1.00 ^b	<1.00 ^b	0.034	<0.0001
	D Prob	D C F	D C G	D C G+F	EP	P
MRS	7.28 ^a	3.67 ^b	3.67 ^b	2.24 ^c	0.039	<0.0001
M17	7.22 ^a	4.65 ^b	3.78 ^c	3.73 ^c	0.051	<0.0001
YEPD	7.18 ^a	<1.00 ^b	<1.00 ^b	<1.00 ^b	0.034	<0.0001

Prob: commercial product; C F: capsules FOS; C G: gum acacia capsule; C G+F: gum acacia capsule + FOS; D Prob: commercial product digestibility; D C F: capsule digestibility of FOS; D C G: digestibility of gum capsule; D C G+F: digestibility of gum capsule + FOS; EP: mean standard error; P: significancy <0.05%. Averages followed by different lowercase letters on the same line differ (P<0.05).

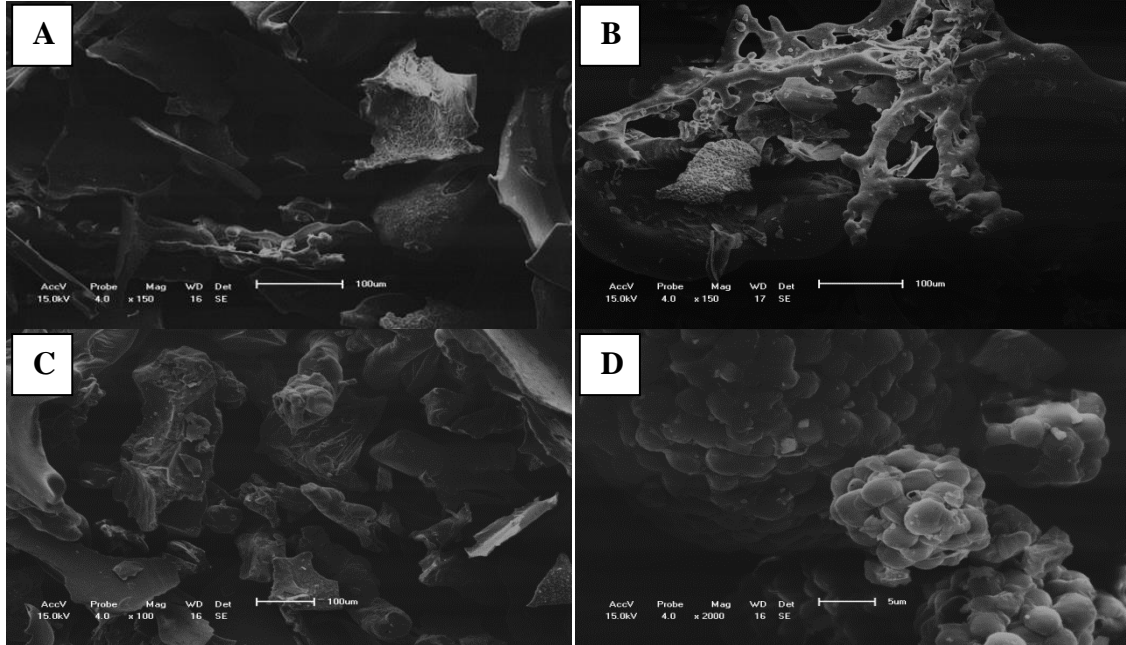


Figure1. Structure of the lyophilized microcapsules and commercial probiotic in Scanning Electron Microscopy (SEM)

A: capsule FOS x150; B: gum capsule +FOS x100; C: gum capsule x 100; D: commercial probiotic x 2000.

Table III. Counting of microorganisms in (\log_{10}/g) before and after the drying process by Spray drying

Variables	Treatments			
	Prob	C. S. dryer	EP	P
MRS	8.25 ^a	<1.00 ^b	0.039	<0.0001
M17	8.27 ^a	<1.00 ^b	0.051	<0.0001
YEPD	8.25 ^a	<1.00 ^b	0.034	<0.0001

Prob: commercial product; C. S. dryer: drying capsules spray dryer; EP: mean standard error, P:

significancy <0.05%. Averages followed by different lowercase letters on the same line differ (P<0.05).

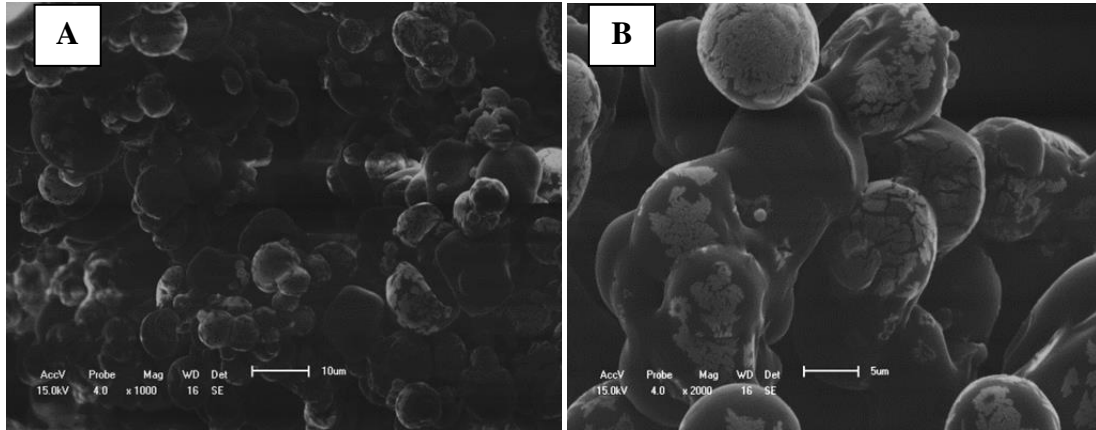


Figure 2: Structure of dried microcapsules by the Spray drying technique in Scanning Electron Microscopy (SEM)

A: microcapsule spray drying x 1000; B: microcapsule spray drying x 2000.

Table IV. Microbial composition log/CFU/g, pH and fecal score of the animals submitted to the different experimental treatments at the different sampling times

Variables	Treatments			EP	P	Contrasts	
	1	2	3			Trat 1 X Trat 3	Trat 2 X Trat 1; 3
MRS	3.65 ^b	5.07 ^a	4.87 ^a	0.097	<0.0001	<0.0001	<0.0001
McConkey	2.50	3.00	2.98	0.195	0.1268	NS	NS
fecal pH	5.67 ^b	5.96 ^a	5.81 ^{ab}	0.059	<0.05	<0.05	<0.05
Fecal score	3.22	3.22	3.11	0.103	0.6815	NS	NS

Variables	Days			EP	P	Contrasts	
	0	2	4			T 0 X T4	T 2 X T 0; 4
MRS	4.42	4.61	4.54	0.097	0.3650	NS	NS
McConkey	3.25 ^a	2.31 ^b	2.91 ^{ab}	0.195	<0.05	NS	<0.05
fecal pH	5.78	5.88	5.82	0.059	0.4674	NS	NS
Fecal score	3.11	3.19	3.25	0.103	0.6344	NS	NS

EP: mean standard error, P: significancy <0.05%, NS: not significant. T 0: day 0; T2: day 2; T4:

day 4. Tratament 1: control; Tratament 2: commercial probiotic; Tratament 3: commercial probiotic + fructooligosaccharide. Averages followed by different lowercase letters on the same line differ (P<0.05).

Table V. Microbial viability of the microorganisms expressed in log/CFU/g of feed over the storage period at room temperature

MRS						
Trat						
Times	Prob	Prob+FOS	EP	P		
				Trat	Time	Trat x time
0	6.52 ^a	6.05 ^b	0.027	<0.0001	<0.0001 ⁽¹⁾	<0.0001
7	5.99 ^b	5.28 ^c	0.027			
15	5.33 ^c	5.26 ^c	0.027			
30	5.13 ^d	4.94 ^e	0.027			
60	4.94 ^e	4.97 ^e	0.027			
90	4.44 ^h	4.86 ^f	0.027			
120	4.24 ⁱ	4.76 ^g	0.027			
M17						
0	6.63 ^a	6.28 ^b	0.041	<0.0001	<0.0001 ⁽²⁾	<0.0001
7	6.32 ^b	5.82 ^d	0.041			
15	5.92 ^{cd}	5.67 ^e	0.041			
30	5.85 ^d	5.97 ^c	0.041			
60	5.36 ^f	5.60 ^e	0.041			
90	5.15 ^g	5.02 ^h	0.041			
120	4.63 ⁱ	4.95 ^h	0.041			
YEPD						
0	6.56 ^a	6.10 ^b	0.037	0.3030	<0.0001 ⁽³⁾	<0.0001
7	6.17 ^b	5.66 ^d	0.037			
15	5.77 ^c	5.43 ^e	0.037			
30	5.15 ^f	5.13 ^f	0.037			
60	5.01 ^g	5.01 ^g	0.037			
90	4.69 ^h	5.12 ^f	0.037			
120	4.19 ⁱ	4.94 ^g	0.037			

(1) $\hat{y} = 5.735 - 0.012x$ / $r^2 = 66.99\%$; (2) $\hat{y} = 6.218 - 0.012x$ / $r^2 = 86.08\%$; (3) $\hat{y} = 5.922 - 0.012x$ / $r^2 = 71.17\%$. Prob: commercial probiotic; Prob+FOS: commercial probiotic + fructooligosaccharide. EP: mean standard error, P: significancy <0.05%. Means followed by different lowercase letters in the same column differ (P<0.05).

Table VI. Microbial count (log/CFU/g) of commercial probiotic at 0 and 7 months of experiment

Variables	Commercial probiotic		
	may /17	december /17	% red
MRS	8.28	6.65	19.66
M17	8.22	7.09	13.75
YEPD	8.22	6.98	15.09

% red: reduction of the \log_{10}/g count of commercial product over the 7 experimental months.

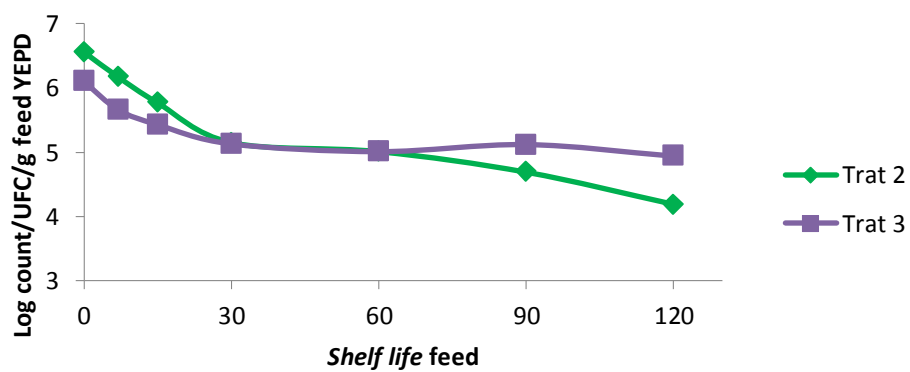
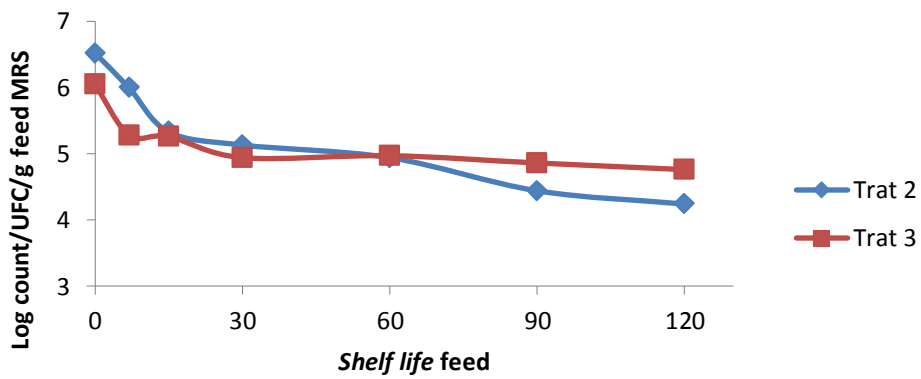
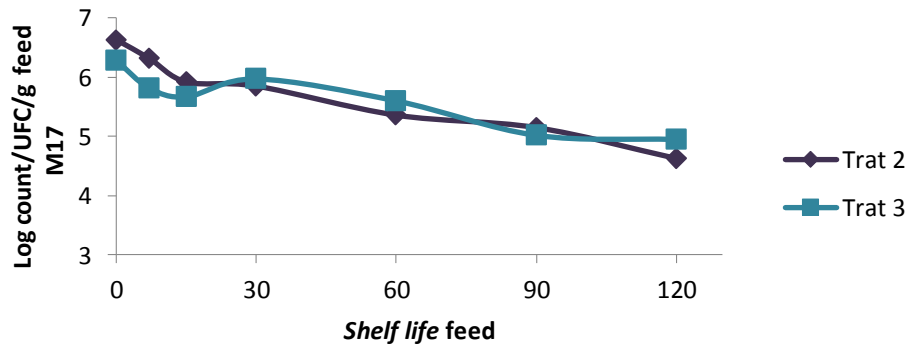


Figure 3. Behavior of the microorganisms in the different experimental treatments cultivated in MRS, M17 and YEPD agar during the 120 days of feed storage

Trat 2: probiotic; Trat 3: probiotic + FOS

Anais da academia brasileira de ciências

Instruções aos Autores

Revisadas em dezembro de 2007

A revista ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS encoraja fortemente as submissões online. Uma vez o artigo preparado de acordo com as instruções abaixo, visite o site de submissão online (<http://aabc.abc.org.br/>).

As instruções devem ser lidas cuidadosamente e seguidas integralmente. Desta forma, a avaliação e publicação de seu artigo poderão ser feitas com mais eficiência e rapidez. Os editores reservam-se o direito de devolver artigos que não estejam de acordo com estas instruções. Os artigos devem ser escritos em inglês claro e conciso.

Objetivo e Política Editorial

Todos os artigos submetidos devem conter pesquisa original e ainda não publicada ou submetida para publicação. O primeiro critério para aceitação é a qualidade científica. O uso excessivo de abreviaturas ou jargões deve ser evitado, e os artigos devem ser compreensíveis para uma audiência tão vasta quanto possível. Atenção especial deve ser dada ao Abstract, Introdução e Discussão, que devem nitidamente chamar a atenção para a novidade e importância dos dados relatados. A não observância desta recomendação poderá resultar em demora na publicação ou na recusa do artigo.

Os textos podem ser publicados como uma revisão, um artigo ou como uma breve comunicação. A revista é trimestral, sendo publicada nos meses de março, junho, setembro e dezembro.

Tipos de Artigos

Revisões: Revisões são publicadas somente a convite. Entretanto, uma revisão pode ser submetida na forma de breve carta ao Editor a qualquer tempo. A carta deve informar os tópicos e autores da revisão proposta e declarar a razão do interesse particular do assunto para a área.

Artigos: Sempre que possível, os artigos devem ser subdivididos nas seguintes partes: 1. Página de rosto; 2. Abstract (escrito em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações); 3. Introdução; 4. Materiais e Métodos; 5. Resultados; 6. Discussão; 7. Agradecimentos quando necessário; 8. Resumo e palavras-chave (em português - os autores estrangeiros receberão assistência); 9. Referências. Artigos de algumas áreas, como Ciências Matemáticas, devem observar seu formato usual. Em certos casos pode ser aconselhável omitir a parte (4) e reunir as partes (5) e (6). Onde se aplicar, a parte de Materiais e Métodos deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em humanos ou as normas seguidas para a manutenção e os tratamentos experimentais em animais.

Breves Comunicações: Breves comunicações devem ser enviadas em espaço duplo. Depois da aprovação não serão permitidas alterações no artigo, a fim de que somente correções de erros tipográficos sejam feitas nas provas.

Os autores devem enviar seus artigos somente em versão eletrônica.

Preparo dos Artigos

Os artigos devem ser preparados em espaço duplo. Depois de aceitos nenhuma modificação será realizada, para que nas provas haja somente correção de erros tipográficos.

Tamanho dos artigos: Embora os artigos possam ter o tamanho necessário para a apresentação concisa e discussão dos dados, artigos sucintos e cuidadosamente preparados têm preferência tanto em termos de impacto quando na sua facilidade de leitura.

Tabelas e ilustrações: Somente ilustrações de alta qualidade serão aceitas. Todas as ilustrações serão consideradas como figuras, inclusive desenhos, gráficos, mapas, fotografias e tabelas com mais de 12 colunas ou mais de 24 linhas (máximo de figuras gratuitas: cinco figuras). A localização provável das figuras no artigo deve ser indicada.

Figuras digitalizadas: As figuras devem ser enviadas de acordo com as seguintes especificações: 1. Desenhos e ilustrações devem ser em formato .PS/.EPS ou .CDR (Postscript ou Corel Draw) e nunca inseridas no texto; 2. Imagens ou figuras em meio tom devem ser no formato TIF e nunca inseridas no texto; 3. Cada figura deve ser enviada em arquivo separado; 4. Em princípio, as figuras devem ser submetidas no tamanho em que devem aparecer na revista, i.e., largura de 8 cm (uma coluna) ou 12,6 cm (duas colunas) e com altura máxima para cada figura menor ou igual a 22 cm. As legendas das figuras devem ser enviadas em espaço duplo e em folha separada. Cada dimensão linear das menores letras e símbolos não deve ser menor que 2 mm depois da redução. Somente figuras em preto e branco serão aceitas. 5. Artigos de Matemática, Física ou Química podem ser digitados em Tex, AMS-Tex ou Latex; 6. Artigos sem fórmulas matemáticas podem ser enviados em .RTF ou em WORD para Windows.

Página de rosto: A página de rosto deve conter os seguintes itens: 1. Título do artigo (o título deve ser curto, específico e informativo); 2. Nome (s) completo (s) do (s) autor (es); 3. Endereço profissional de cada autor; 4. Palavras-chave (4 a 6 palavras, em ordem alfabética); 5. Título abreviado (até 50 letras); 6. Seção da Academia na qual se enquadra o artigo; 7. Indicação do nome, endereço, números de fax, telefone e endereço eletrônico do autor a quem deve ser endereçada toda correspondência e prova do artigo.

Agradecimentos: Devem ser inseridos no final do texto. Agradecimentos pessoais devem preceder os agradecimentos a instituições ou agências. Notas de rodapé devem ser evitadas; quando necessário, devem ser numeradas. Agradecimentos a auxílios ou bolsas, assim como agradecimentos à colaboração de colegas, bem como menção à origem de um artigo (e.g. teses) devem ser indicados nesta seção.

Abreviaturas: As abreviaturas devem ser definidas em sua primeira ocorrência no texto, exceto no caso de abreviaturas padrão e oficial. Unidades e seus símbolos devem

estar de acordo com os aprovados pela ABNT ou pelo Bureau International des Poids et Mesures (SI).

Referências: Os autores são responsáveis pela exatidão das referências. Artigos publicados e aceitos para publicação (no prelo) podem ser incluídos. Comunicações pessoais devem ser autorizadas por escrito pelas pessoas envolvidas. Referências a teses, abstracts de reuniões, simpósios (não publicados em revistas indexadas) e artigos em preparo ou submetidos mas ainda não aceitos, podem ser citados no texto como (Smith et al. unpublished data) e não devem ser incluídos na lista de referências.

As referências devem ser citadas no texto como, por exemplo, (Smith 2004), (Smith and Wesson 2005) ou, para três ou mais autores, (Smith et al. 2006). Dois ou mais artigos do mesmo autor no mesmo ano devem ser distinguidos por letras, e.g. (Smith 2004a), (Smith 2004b) etc. Artigos com três ou mais autores com o mesmo primeiro autor e ano de publicação também devem ser distinguidos por letras.

As referências devem ser listadas em ordem alfabética do primeiro autor sempre na ordem do sobrenome XY no qual X e Y são as iniciais. Se houver mais de 10 autores, use o primeiro seguido de et al. As referências devem ter o nome do artigo. Os nomes das revistas devem ser abreviados. Para as abreviações corretas, consultar a listagem de base de dados na qual a revista é indexada ou consulte a World List of Scientific Periodicals. A abreviatura para os Anais da Academia Brasileira de Ciências é An Acad Bras Cienc. Os seguintes exemplos são considerados como guia geral para as referências.

Artigos

Albe-Fessard D, Condes-Lara M, Sanderson P and Levante A . 1984a. Tentative explanation of the special role played by the áreas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. Adv Pain Res Ther 6: 167-182.

Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Delandsheer E, Giuffrida R and Cesaro P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. An Acad Bras Cienc 56: 371-383.

Knowles RG and Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

Pinto ID and Sanguinetti YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

Livros e capítulos de livro

Davies M. 1947. An outline of the development of Science, Athinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

Prehn RT . 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: National Cancer Conference , 5., Philadelphia Proceedings, Philadelphia: J.B. Lippincott, p. 97-104.

Uytenbogaardt W and Burke EAJ . 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2 nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

Woody RW . 1974. Studies of theoretical circular dichroism of Polipeptides: contributions of B-turns. In: Blouts ER et al . (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.

Outras publicações

International Kimberlite Conference , 5, 1991. Araxá, Brazil. Proceedings ... Rio de Janeiro: CPRM, 1994., 495 p.

Siatycki J . 1985. Dynamics of Classical Fields. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 19985, 55 p. Preprint n. 600.

