

## A INCLUSÃO DE EXTRATO DE MALTE NO ALIMENTO APRESENTA EFEITO PREBIÓTICO EM CÃES ADULTOS SAUDÁVEIS

**Resumo:** O intuito do presente trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de 1,0% de extrato de malte na matéria natural de alimento seco extrusado em parâmetros de digestibilidade aparente dos nutrientes, imunidade, microbiota e produtos fermentativos fecais em cães adultos saudáveis. O delineamento experimental utilizado foi do tipo crossover 2x2. Foram utilizados 12 cães saudáveis com 2 anos de idade, os quais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos e, consumiram dois alimentos experimentais: Alimento Controle (AC), sem a adição de extrato de malte e Alimento Malte (AM), com composição similar ao AC, porém com a adição de 1,0% de extrato de malte, durante dois períodos experimentais. Os resultados obtidos foram analisados pelo *software* computacional SAS. A normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk e Levine, respectivamente. Foi realizada análise de variância pelo PROC MIXED para as variáveis de digestibilidade, produtos de fermentação e imunidade. A abundância das bactérias fecais foi avaliada pelo PROC GLIMMIX. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Não foram observadas diferenças para os parâmetros de digestibilidade aparente dos nutrientes e produtos fermentativos. Entretanto, foram encontradas diferenças para os resultados das análises de imunidade e microbiota fecal. Após o consumo do alimento que continha extrato de malte, os cães apresentaram aumento do índice de proliferação de linfócitos e na relação de linfócitos CD4+:CD8+, também foi observada diferença para alguns filos, famílias e gêneros bacterianos, como maiores médias de alguns grupos pertencentes ao *cluster Clostridium XIVa* para o tratamento malte, sendo estes os principais responsáveis pela produção de ácidos graxos de cadeia e podem também estar relacionados com a melhora da resposta imune. Concluiu-se que a inclusão de 1,0% de extrato de malte na dieta apresentou efeito prebiótico em cães adultos saudáveis.

**Palavras-chave:** canino; cevada; maltagem; manutenção; nutrição.

## **1. Introdução**

O extrato de malte derivado de grãos de cevada pode ser utilizado como aditivo na fabricação de pães, biscoitos, macarrão, chás e bebidas maltadas para seres humanos (PAIK et al., 1991; MEINTS et al., 2020). Ele pode apresentar em sua composição algumas vitaminas, aminoácidos e minerais (GUPTA et al., 2010). Além disto, possui capacidade antioxidante, características palatáveis e potencial prebiótico, que podem promover benefícios à saúde e melhorar o aroma e sabor de produtos alimentícios (GUPTA et al., 2010; ŠIMIĆ et al., 2017; BETTENHAUSEN et al., 2018).

Na literatura, não foram encontrados estudos que avaliaram a aplicação do extrato de malte na alimentação de cães. Baseado neste último aspecto e na demanda constante dos fabricantes de alimentos para cães por ingredientes alternativos que possam ser utilizados, procurou-se com este trabalho avaliar este coproduto como potencial aditivo para uso na nutrição de cães.

## **2. Material e métodos**

O presente estudo foi aprovado e realizado de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Foram utilizados 12 cães (6 beagles e 6 cocker spaniel inglês) com peso corporal (PC) médio de  $13,45 \pm 1,76$ kg, machos e fêmeas, castrados, com idade média de 2,0 anos, clinicamente sadios, desverminados e vacinados. Todos os animais apresentaram escore de condição corporal (ECC) ideal ( $5,25 \pm 0,44$ ) segundo a escala de 9 pontos descrita por Laflamme (1997) e escore de massa muscular ideal (3) segundo a escala de 4 pontos descrita por Michel et al. (2011).

A necessidade energética para manutenção dos animais foi determinada pela equação:  $110 \times PC^{0,75}$  (FEDIAF, 2020). O delineamento experimental utilizado foi do tipo crossover 2x2, contendo dois alimentos experimentais: Alimento Controle (AC), alimento sem a adição de extrato de malte e Alimento Malte (AM), alimento com composição similar, porém com adição de 1,0% de extrato de malte e, dois períodos experimentais.

No total, o experimento foi constituído por 120 dias, sendo os primeiros 23 dias dos períodos 1 e 2 de adaptação aos alimentos e os sete dias seguintes de coletas de fezes e sangue para análise de digestibilidade aparente dos nutrientes, escore fecal,

produtos fermentativos, microbiota fecal e imunidade. O *washout* durou 60 dias, durante este período os cães receberam um alimento comercial seco extrusado que não continha extrato de malte em sua composição.

Durante cinco dias consecutivos dos períodos de coletas, as fezes foram recolhidas, pesadas e armazenadas para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes (CDAs) dos alimentos fornecidos segundo protocolo de coleta total da AAFCO (2019) e análises bromatológicas de acordo com a AOAC (1996). Após esse período, durante um dia, foram coletadas fezes frescas e de forma asséptica para caracterização da microbiota fecal e avaliação dos produtos de fermentação {ácido láctico (PRYCE, 1969), ácidos graxos de cadeia curta e ramificada [AGCC/AGCR (FERREIRA et al., 2016), nitrogênio amoniacal (VIEIRA, 1980) e pH fecal (WALTER et al., 2005)]}. Durante todos os dias de coletas, as fezes foram pontuadas de acordo com a escala de escore fecal de 5 pontos descrita por Waltham (2000). O último dia de cada período foi destinado para a coleta de sangue para análise de imunidade (índice de proliferação de linfócitos e relação de linfócitos CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>), por meio de punção da veia jugular (2mL).

### **3. Resultados**

Não foi observada diferença entre as médias dos CDAs dos nutrientes [matéria seca (MS), matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, matéria mineral, fibra bruta e extrativos não nitrogenados], escore fecal e produção fecal em MS após a ingestão dos alimentos experimentais pelos animais (Tabela 1). Também não foram observadas diferenças, entre os tratamentos, em relação às concentrações de produtos fermentativos avaliados neste estudo (pH fecal, ácido láctico, amônia, AGCC e AGCR), como demonstrado na Tabela 2. Todavia, a ingestão de extrato de malte resultou em efeito na imunidade adaptativa dos cães após o consumo do AM, quando comparado com os cães que ingeriram AC. Como apresentado na Tabela 3, o índice de proliferação de linfócitos e a relação CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> foram maiores nos animais quando consumiram o AM.

Em relação a análise de microbiota fecal, ao total, foram identificados 7 filos, 15 classes, 40 famílias e 69 gêneros diferentes entre os dois grupos experimentais. Os principais resultados para esta análise estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 1 - Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes (%) e produção fecal dos cães após o consumo dos alimentos experimentais.

	Tratamentos		EPM	Valor de p
	AC	AM		
<b>Coeficientes de digestibilidade (%)</b>				
<b>Matéria seca</b>	86,69	86,90	0,507	0,6561
<b>Matéria orgânica</b>	89,46	89,56	0,426	0,7808
<b>Proteína bruta</b>	89,50	90,15	0,426	0,1528
<b>Extrato etéreo em hidrólise ácida</b>	97,31	97,34	0,161	0,8564
<b>Matéria mineral</b>	32,91	35,62	2,558	0,3399
<b>Fibra bruta</b>	81,33	81,61	0,965	0,7844
<b>Extrativos não-nitrogenados</b>	87,98	87,80	0,571	0,5863
<b>Produção fecal</b>				
<b>Escore fecal</b>	2,10	2,15	0,064	0,3229
<b>Produção de fezes (g/dia/MS)</b>	24,65	24,19	1,679	0,6126

Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte; MS = matéria seca; EPM= erro padrão da média.

Tabela 2 - Concentração de ácido láctico, amônia, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada e pH fecais dos cães após o consumo dos alimentos experimentais.

	Tratamentos		EPM	Valor de p
	AC	AM		
<b>pH fecal</b>	6,65	6,61	0,129	0,5583
<b>Ácido láctico (mMol/kg de MS)</b>	30,00	28,19	3,552	0,7145
<b>Amônia (mMol/kg de MS)*</b>	166,70	168,20	12,362	0,8962
<b>AG totais (mMol/kg de MS)*</b>	534,80	551,10	69,064	0,5021
<b>AGCC (Mmol/kg de MS)</b>				
<b>Ácido acético</b>	316,50	331,90	45,269	0,3992
<b>Ácido propiônico</b>	135,80	137,10	14,189	0,8468
<b>Ácido butírico</b>	63,27	61,02	9,316	0,6456
<b>AGCC totais*</b>	515,50	530,00	65,935	0,5491
<b>AGCR (Mmol/kg de MS)</b>				
<b>Ácido valérico</b>	0,84	0,70	0,777	0,3002
<b>Ácido isovalérico</b>	11,03	12,55	1,650	0,1734
<b>Ácido isobutírico</b>	7,37	7,80	1,031	0,4608
<b>AGCR totais</b>	19,25	21,06	3,387	0,2845

Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte; MS = matéria seca; AG= ácidos graxos; AGCC= ácidos graxos de cadeia curta; AGCR= ácidos graxos de cadeia curta e ramificada; EPM= erro padrão da média. \*Dados transformados por Log x + 1 para a análise estatística.

Tabela 3 - Resultados dos testes de índice de proliferação de linfócitos e relação CD4+:CD8+ em cães após o consumo dos alimentos experimentais.

	Tratamentos		EPM	Valor de p
	AC	AM		
<b>Índice de proliferação</b>	2,69	2,97	0,132	0,0071
<b>Relação CD4+:CD8+</b>	1,45	1,63	0,063	0,0098

Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte; EPM= erro padrão da média. Valores de p<0,05 foram considerados significativos.

Tabela 4 - Principais resultados de abundância relativa bacteriana (%).

Filo	Média dos tratamentos		Valor de p
	AC	AM	
<b>Actinobacteria</b>	3,54±1,81	0,87±0,46	<0,0001
<b>Bacteroidetes</b>	15,43±2,12	18,44±2,44	<0,0001
<b>Firmicutes</b>	57,51±3,10	61,51±3,00	<0,0001
<b>Fusobacteria</b>	18,81±1,42	13,23±1,46	0,0284
<b>Proteobacteria</b>	0,89±0,13	0,84±0,12	0,2911
<b>Cluster XIVa</b>			
<b>Família: Lachnospiraceae</b>	8,38±1,22	10,34±1,47	<0,0001
<b>Gênero: <i>L. Clostridium</i></b>	0,66±0,08	0,93±0,11	0,0002
<b>Gênero: <i>L. Ruminococcus</i></b>	4,35±0,79	5,34±0,96	<0,0001
<b>Gênero: <i>Lachnospiraceae</i></b>	3,00±0,33	3,59±0,39	<0,0001
<b>Gênero</b>			
<b><i>Faecalibacterium</i></b>	3,27±0,89	5,77±1,52	<0,0001
<b><i>Bifidobacterium</i></b>	3,51±3,11	0,57±0,52	<0,0001

Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte.

#### 4. Discussão

No presente estudo não foram observadas diferenças para as variáveis: CDAs dos nutrientes, escore fecal, produção fecal e produtos fermentativos nas fezes. Por outro lado, foram observadas diferenças para as variáveis de imunidade e microbiota fecal, o que pode demonstrar ação prebiótica do extrato de malte. O consumo de prebióticos, geralmente, resulta no aumento da produção de AGCC e ácido lático, que podem promover benefícios ao hospedeiro, como melhora da resposta do sistema imune (DENG et al., 2015), no entanto, sabe-se que os prebióticos podem atuar por diferentes mecanismos de ação (STERCOVA et al., 2016). Na literatura foram localizados outros estudos com cães nos quais também não foram observadas

alterações nessas variáveis após a ingestão de prebióticos comumente utilizados (SWANSON et al., 2002; RENTAS et al., 2020). Por outro lado, também já foi observado que a inclusão de alguns prebióticos no alimento de cães pode alterar o CDA de um ou mais nutrientes (FLICKINGER et al., 2003).

A inclusão de extrato de malte não alterou as concentrações dos produtos de fermentação e nem o pH das fezes. O tempo de adaptação aos alimentos é algo importante que deve ser levado em consideração, pois este deve ser suficiente para que os prebióticos consigam modular o microbioma intestinal e, por consequência, alterem os produtos de fermentação e a microbiota fecal. No presente estudo, optou-se por utilizar 29 dias de adaptação aos alimentos, tempo similar ao que outros autores empregaram (THEODORO et al., 2019; RENTAS et al., 2020) e, 60 dias de *washout*, tempo maior que o usual, para garantir que um tratamento não interferisse na resposta do outro.

Em relação a abundância dos filos bacterianos, os resultados aqui encontrados foram similares a outros estudos, sendo o Firmicutes o mais abundante em ambos os tratamentos, porém com maior média para o AM (HANDL et al., 2011, 2013). Bactérias responsáveis pela produção de ácido lático, como as do gênero *Bifidobacterium*, são microrganismos de interesse, pois assim como os carboidratos, o ácido lático também pode ser utilizado como substrato por algumas bactérias para produção de AGCC (HANDL et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2019). Para este gênero foi observada maior abundância nas fezes dos cães que consumiram o AC.

Dentre os gêneros encontrados, alguns eram pertencentes ao *cluster Clostridium XIVa*, como: *L. Clostridium*, *L. Ruminococcus* e *Lachnospiraceae*, para os quais foram observadas maiores médias para o tratamento AM (SUCHODOLSKI et al., 2008; SUCHODOLSKI, 2011). Este *cluster* é responsável pela produção de AGCC e outros metabólitos benéficos ao epitélio intestinal e ao sistema imune do hospedeiro (HANDL et al., 2011). Algumas bactérias do gênero *Faecalibacterium* também podem contribuir para o aumento na produção de AGCC, e o tratamento AM também apresentou maiores médias para este gênero (BLAKE et al., 2016).

O aumento da abundância (%) de gêneros que são compostos por bactérias produtoras de AGCC pode estar relacionado com os resultados de imunidade

encontrados no presente estudo, pois foram observadas maiores médias para o tratamento AM, tanto para proliferação como para fenotipagem de linfócitos, pois sabe-se que uma das formas de atuação dos AGCCs no organismo é através do aumento da população de células T (Blake et al., 2016). É importante destacar que no presente estudo apesar de não ter sido observada diferença nas concentrações de AGCCs (butírico, propiônico, acético e totais) isso não significa que não houve aumento na produção desses compostos após a ingestão do AM, pois sabe-se que diferentes prebióticos, comumente utilizados na alimentação de cães, aumentam a produção de AGCCs, entretanto, diferenças de concentração não são detectadas quando analisadas nas fezes devido a sua rápida absorção pelos colonócitos (CAMPBELL et al., 1997).

Em relação ao índice de proliferação de linfócitos, os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com outros dados da literatura para cães saudáveis. Em estudo realizado por Bruin et al. (2007) foi observado que esse índice para cães saudáveis se manteve entre 0,5 e 4,8 ao longo de 24 meses, o que também demonstra variação nesses resultados com o tempo. Em outro estudo realizado por Alarça et al. (2016) com cães saudáveis e dois alimentos experimentais, um controle e outro que continha 45g/kg de xantofila, foram observados valores de índice de proliferação de 1,56 para o grupo controle e 1,69 para o grupo que recebeu o alimento com xantofila.

A relação CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> encontrada no presente estudo foi similar à de algumas pesquisas publicadas, como no estudo de Chew et al. (2000), no qual foram observados valores de relação CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> de 1,21 para o grupo que recebeu um alimento que continha em sua composição 50mg de betacaroteno e 0,85 para o grupo controle, que recebeu um alimento que não continha betacaroteno, sendo importante ressaltar que foi observada diferença para essa variável.

## **5. Conclusões**

Conclui-se que o extrato de malte apresentou características de um aditivo prebiótico, pois modulou a microbiota de cães saudáveis e, este efeito provavelmente apresentou relação com a melhora nas variáveis linfocitárias, sem alterar o aproveitamento de nutrientes, produção e escore fecal.

## 6. Referências bibliográficas

AAFCO. **Association of American Feed Control Officials**. Washington, DC: Official Publication, 2019.

ALARÇA, L. G. et al. Dietary lutein supplementation on diet digestibility and blood parameters of dogs. **Ciência Rural**, v. 46, n. 12, p. 2195–2201, 2016.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis**. Gaithersburg, EUA: AOAC Internacional, 2006.

BETTENHAUSEN, H. M. et al. Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. **Food Research International**, v. 113, p. 487–504, 2018.

BLAKE, A. B.; SUCHODOLSKI, J. S. Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 3, p. 37–42, 2016.

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

CHEW, B. P. et al. Dietary B-carotene stimulates cell-mediated and humoral immune response in dogs. **Biochemical and Molecular Action of Nutrients Research Communication**, v. 130, n. 8, p. 1910–1913, 2000.

DE BRUIN, T. et al. Lymphocyte proliferation to collagen type I in dogs. **Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 54, p. 292–296, 2007.

DENG, P.; SWANSON, K. S. Future aspects and perceptions of companion animal nutrition and sustainability. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 823–834, 2015.

FEDIAF. **FEDIAF - The European Pet Food Industry Federation. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs**. Bruxelas, BE: The European Pet Food Industry Federation, 2021.

FERREIRA, E. M. et al. Nutrient digestibility and ruminal fatty acid metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 30–39, 2016.

FLICKINGER, E. A. et al. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2008–2018, 2003.

GUPTA, M.; ABU-GHANNAM, N.; GALLAGHAR, E. Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 318–328, 2010.

HANDL, S. et al. Faecal microbiota in lean and obese dogs. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, v. 84, p. 332–343, 2013.

HANDL, S. et al. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 301–310, 2011.

LAFLAMME, D. P. Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. **Canine Practice**, v. 22, n. 4, p. 10–15, 1997.

MEINTS, B.; HAYES, P. M. Breeding Naked Barley for Food, Feed, and Malt. In: GOLDMAN, I. (Ed.). **Plant Breeding Reviews**. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2020. 43p. 95–119.

MICHEL, K. E. et al. Correlation of a feline muscle mass score with body composition determined by dual-energy X-ray absorptiometry. **The British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 57–59, 2011.

NOGUEIRA, J. P. de S. et al. Dietary supplementation of a fiber-prebiotic and saccharin-eugenol blend in extruded diets fed to dogs. **Journal of Animal Science**, v. 97, p. 4519–4531, 2019.

PAIK, J.; LOW, N. H.; INGLEDEW, W. M. Malt Extract: Relationship of Chemical Composition to Fermentability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 49, n. 1, p. 8–13, 1991.

PRYCE, J. D. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analist**, v. 94, p. 1121–1151, 1969.

RENTAS, M. F. et al. Galactoligosaccharide and a prebiotic blend improve colonic health and immunity of adult dogs. **PLoS ONE**, v. 15, n. 8, p. e0238006, 2020.

ŠIMIĆ, G. et al. Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of malting and hullless barley grain and malt extracts. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 35, n. 1, p. 73–78, 2017.

STERCOVA, E. et al. Effects of live yeast dietary supplementation on nutrient

digestibility and fecal microflora in beagle dogs. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 2909–2918, 2016.

SUCHODOLSKI, J. S. Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 5, p. 1520–1530, 2011.

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

SWANSON, K. S. et al. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 5, p. 980–989, 2002.

THEODORO, S. de S. et al. Effects of the solubility of yeast cell wall preparations on their potential prebiotic properties in dogs. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. e0225659, 2019.

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

WALTER, M.; SILVA, L. P.; PERDOMO, D. M. X. Biological response of rats to resistant starch. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 252–257, 2005.

WALTHAM. **The WALTHAM™ Faeces Scoring System**. [s.l: s.n.].