

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Manoela Munhoz Colombo

**Influência de flavonóides cítricos sobre a microbiota
intestinal de cães: abordagem colônica *in vitro***

ARARAQUARA
2024

MANOELA MUNHOZ COLOMBO

Influência de flavonóides cítricos sobre a microbiota intestinal de cães: abordagem colônica *in vitro*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química

Orientador: Prof. Dr. André Capaldo Amaral
Coorientadora: Profa. Dra. Kátia Sivieri

ARARAQUARA
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

C687e Colombo, Manoela Munhoz

Influência de flavonóides cítricos sobre a microbiota intestinal de cães: abordagem colônica *in vitro*/Manoela Munhoz Colombo. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2025.

65f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

Orientador: prof. Dr. André Capaldo Amaral

1. Microbiota. 2. Cães. 3. Eriocitrina. 4. Disbiose. I. Título.

CDU 577.4

Comitê de Ética no Uso de Animais
Protocolo nº: 068.22
Data: 07/12/2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

MANOELA MUNHOZ COLOMBO

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 24 de outubro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. ANDRÉ CAPALDO AMARAL (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA



Profª Drª ALINE BUDA DOS SANTOS VAZ
Universidade de Araraquara - UNIARA

gov.br

Documento assinado digitalmente
ALINE BUDA DOS SANTOS VAZ
Data: 11/11/2024 12:39:16-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profª Drª SUSANA NOGUEIRA DINIZ
Universidade Anhanguera – São Paulo

gov.br

Documento assinado digitalmente
SUSANA NOGUEIRA DINIZ
Data: 04/11/2024 19:26:11-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à CAPES pelo apoio para execução do mestrado.

Agradeço a empresa Ingredients by Nature pelo apoio financeiro e por conceder seu produto, Eriomin®.

Agradeço à UNESP Araraquara pelo acesso ao laboratório, onde foi possível realizar o experimento.

Agradeço à UNIARA pela oportunidade de cursar o meu mestrado e me proporcionar experiências incríveis quanto aluna.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. André Capaldo Amaral, pelos inúmeros ensinamentos ao longo dessa trajetória e por toda sua dedicação e atenção comigo.

Agradeço à minha coorientadora Profa. Dra. Kátia Sivieri por contribuir imensamente com o projeto, sempre me recebendo com muito carinho.

Agradeço aos colegas de laboratório, Felipe e Mateus pelo auxílio durante toda a execução do experimento.

Agradeço as queridas funcionárias da secretaria da UNIARA-PPGBio, Sandra e Rosana, que sempre estão dispostas a ajudar todos os alunos.

Agradeço ao a Profa. Dra. Aline Buda por comporem minha banca avaliadora e contribuírem com meu aprendizado.

Agradeço aos tutores dos animais participantes do projeto.

Agradeço aos meus pais, Marcos e Marinete, pela educação e todo o amor que sempre me deram.

Agradeço ao meu marido, José Roberto, pela cumplicidade e amor.

Agradeço à Deus, que me concedeu o dom da vida, guiando sempre todos os meus passos com muita sabedoria.

E a minha filha, Catharina, que trouxe em pouco tempo novos valores para minha vida.

*Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e de repente,
você estará fazendo o impossível.*

São Francisco de Assis

RESUMO

O microbioma intestinal é composto por uma comunidade de microrganismos que desempenham um papel fundamental nas interações fisiológicas e patológicas entre a microbiota intestinal (MI) e seu hospedeiro. No entanto, diversas doenças, como a enteropatia crônica (EC), podem impactar negativamente o microbioma, levando a quadros de disbiose. Diante das dificuldades no tratamento da disbiose em cães e das evidências positivas sobre o uso de flavonoides cítricos na medicina humana e veterinária, o presente trabalho realizou uma análise *in vitro* da ação prebiótica de um flavonóide cítrico chamado eriocitrina na MI intestinal de cães saudáveis e com enteropatia crônica. A MI foi coletada a partir de amostras de fezes de seis cães de raças distintas, com idades e pesos variados, que foram divididos em dois grupos: Cães Saudáveis (CS) e Cães Doentes (CD). Para o experimento *in vitro*, utilizou-se o método de fermentação colônica por 48 horas, permitindo a análise da ação do flavonóide em duas doses diferentes, a partir dos Grupos Controle (GC), Tratamento 1 (GT1) e Tratamento 2 (GT2). Os resultados mostraram estímulo no crescimento de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* em cães saudáveis, enquanto apenas *Lactobacillus spp.* foi estimulado em cães doentes após a administração *in vitro*, sugerindo uma ação prebiótica. Entretanto, os metabólitos apresentaram uma ação inibitória para os cães saudáveis em ambas as doses testadas. Os resultados desta pesquisa indicam um potencial promissor para a estimulação do crescimento bacteriano em cães saudáveis, mas o efeito inibitório sobre os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) deve ser investigado. Futuros estudos são necessários para compreender a ação da eriocitrina na MI de cães.

Palavras-chave: microbiota; cães; eriocitrina; disbiose.

ABSTRACT

The intestinal microbiome is composed of a community of microorganisms that play a fundamental role in the physiological and pathological interactions between IM and its host. However, various diseases, such as chronic enteropathy (CE), can negatively impact the microbiome, leading to dysbiosis. Given the challenges in treating dysbiosis in dogs and the positive evidence regarding the use of citrus flavonoids in human and veterinary medicine, this study conducted an *in vitro* analysis of the prebiotic action of a citrus flavonoid called eriocitrin on the intestinal microbiota of healthy dogs and those with chronic enteropathy. The microbiota was collected from fecal samples of six dogs of different breeds, ages, and weights, which were divided into two groups: Healthy Dogs (HD) and Sick Dogs (SD). For the *in vitro* experiment, a colonic fermentation method was used for 48 hours, allowing the analysis of the flavonoid's action at two different doses, based on the Control Groups (CG), Treatment 1 (GT1), and Treatment 2 (GT2). The results showed stimulation of the growth of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* in healthy dogs, while only *Lactobacillus spp.* was stimulated in sick dogs after *in vitro* administration, suggesting a prebiotic effect. However, the metabolites exhibited an inhibitory effect on healthy dogs at both tested doses. The results of this research indicate a promising potential for stimulating bacterial growth in healthy dogs, but the inhibitory effect on short-chain fatty acids (SCFAs) needs further investigation. Future studies are necessary to understand the action of eriocitrin on the microbiota of dogs.

Keywords: microbiota; dogs; eriocitrin; dysbiosis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estrutura química básica dos flavonóides. Anéis aromáticos (A e B) e anel heterocíclico (C). 26
- Figura 2-** Estrutura química da Eriocitrina. 27
- Figura 3-** Demonstração esquemática do preparo do inóculo fecal. 34
- Figura 4-** Preparação do inóculo fecal. 1) Amostra homogeneizada após ser colocada no agitador. 2) Amostras sendo colocadas nos tubos. 3) Todas as amostras separadas para a centrifugação. 4) Centrifugação. 5) Inóculo fecal pronto e colocado em um único recipiente. 34
- Figura 5-** Demonstração esquemática do preparo do meio de fermentação. 35
- Figura 6** - Representação esquemática dos valores utilizados em cada grupo experimental (GC, GT1 e GT2) e suas respectivas triplicatas. 36
- Figura 7-** Representação do frasco de fermentação colônica e itens adicionados a ele: 7ml de Água Milli-Q, 56ml de meio basal, 7ml de inóculo fecal, adição do Eriomin. Resultando em 76ml de solução. 36
- Figura 8** - 1) Adição do Eriomin® aos frascos. 2) Frascos após adição do Eriomin®, meio basal, inóculo fecal e água Milli-Q, totalizando 70ml. 3) Indução da anaerobiose dos frascos com borbulhamento de nitrogênio. 4) Amostras em banho-maria à 37°C por 48 horas. 37
- Figura 9-** Representação da diluição da solução do frasco de fermentação colônica, realizado para cada grupo experimental separadamente e suas respectivas triplicatas, para a inoculação nos meios de culturas específicos para cada bactéria a ser analisada neste experimento. 38
- Figura 10** - Representação da inoculação das diluições nos meios de cultivo para o crescimento bacteriano, realizado para cada grupo experimental separadamente e suas respectivas triplicatas. 38
- Figura 11-** Representação gráfica em barras referente à média da população de *Lactobacillus* spp. expressa em Média Log UFC/ μ L (\pm DP) nos grupos CS e CD e respectivos tratamentos (* $p > 0,01$ e ** $p > 0,05$). 40
- Figura 12-** Representação gráfica em barras referente à média da população de *Bifidobacterium* spp. expressa em Média Log UFC/ μ L (\pm DP) nos grupos CS e CD e respectivos tratamentos GT1 e GT2 (* $p > 0,01$ e ** $p > 0,05$). 41

Figura 13- Representação gráfica em barras referente à média da população de Bactérias totais expressa em Média Log UFC/ μ L (\pm DP) nos grupos CS e CD e respectivos tratamentos GT1 e GT2 (* $p > 0,01$ e ** $p > 0,05$). 42

Figura 14- Representação gráfica em barras referente à média da população de Clostridium spp. expressa em Média Log UFC/ μ L (\pm DP) nos grupos CS e CD e respectivos tratamentos GT1 e GT2 (* $p > 0,01$ e ** $p > 0,05$). 43

Figura 15- Representação gráfica em barras referente à média da população de Bacteroidetes expressa em Média Log UFC/ μ L (\pm DP) nos grupos CS e CD e respectivos tratamentos GT1 e GT2 (* $p > 0,01$ e ** $p > 0,05$). 44

Figura 16- Representação em gráfico de barras da produção do metabólito ácido acético produzido pelas bactérias na fermentação colônica dos grupos experimentais GSC e GDC e tratamentos GT1 e GT2 dados representados pela Média (\pm DP). 45

Figura 17- Representação em gráfico de barras da produção do metabólito ácido propiônico produzido pelas bactérias na fermentação colônica dos grupos experimentais GSC e GDC e tratamentos GT1 e GT2 dados representados pela Média (\pm DP). 46

Figura 18 - Representação em gráfico de barras da produção do metabólito ácido butírico produzido pelas bactérias na fermentação colônica dos grupos experimentais GSC e GCD e tratamentos GT1 e GT2 dados representados pela Média (\pm DP). 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição e quantidade em gramas dos reagentes utilizados para preparo do tampão para o inóculo.....	33
Tabela 2- Descrição e quantidade em gramas dos reagentes utilizados para o preparo do meio basal da fermentação colônica.	35

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
CD	Cães Doentes
CEUA	Conselho de ética animal
CS	Cães Saudáveis
EC	Enteropatias crônicas
FNT-α	Fator de necrose tumoral alfa
GC	Grupo controle
GSC	Grupo saudáveis controle
GDC	Grupo doente controle
GT1	Grupo tratamento 1
GT2	Grupo tratamento 2
GST1	Grupo Saudável Tratamento 1
GDT1	Grupo Doente Tratamento 1
GDT2	Grupo Doente Tratamento 2
IL – 10	Interleucina 10
IL – 12	Interleucina 12
IL – 1ra	Interleucina 1 ra
IL – 23	Interleucina 23
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
LPS	Lipossacarídeo
MI	Microbiota intestinal
Mini-xGI	Fermentação colônica in vitro em 48h
MLog \pmDP	Média logarítmica das UFC com desvio padrão
NF-kB	Fator nuclear kappa beta
TGI	TGI

SUMÁRIO

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 MICROBIOTA INTESTINAL DE CÃES	21
3.2 ENTEROPATIA CRÔNICA	22
3.3 PREBIÓTICOS	24
3.4 FLAVONÓIDES	26
3.4.1 Eriocitrina.....	27
3.4.2 Biodistribuição e Farmacocinética da Eriocitrina	28
3.4.3 Efeitos na Microbiota Intestinal	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 ANIMAIS	30
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	31
4.2.1 Obtenção das Amostras	32
4.2.2 Preparo do Inóculo Fecal	32
4.2.3 Preparo do Meio de Fermentação	34
4.2.4 Adição do Flavonóide Cítrico	35
4.2.5 Fermentação Colônica <i>In Vitro</i> 48h (MINI-xGI)	36
4.2.6 Análise da Produção de Metabólitos	37
4.2.7 Composição da MI.....	37
4.2.8 Análise Estatística.....	39
5 RESULTADOS	39

5.1 IMPACTO DO ERIOMIN® NA MI	39
5.1.1 Lactobacillus spp.	39
5.1.2 Bifidobacterium spp.	40
5.1.3 Bactérias Totais	41
5.1.4 Clostridium spp.	42
5.1.6 Ácido Acético	44
5.1.7 Ácido Propiônico	45
5.1.8 Ácido Butírico	46
6 DISCUSSÃO	48
8 Referências	59
9. ANEXOS	65
Anexo 1 – Aprovação do comitê de ética no uso de animais (CEUA)	65

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal (MI) é composta por diversas colônias de bactérias, vírus, fungos, protozoários e archaea, os quais se encontram por todo o TGI dos mamíferos. Ela é essencial para a saúde uma vez que participa dos processos fisiológicos vitais e do desenvolvimento do hospedeiro (JARRET *et al.*, 2021), realizando a modulação do sistema imune, a proteção contra patógenos, além de auxiliar na função da barreira intestinal e fornecer metabólitos que são benéficos para o organismo (ZIESE e SUCHODOLSKI, 2021). Estudos demonstram que a MI está ligada não somente à saúde, mas também a sua relação com algumas doenças, como por exemplo as enteropatias crônicas (EC) e obesidade (KIM *et al.*, 2017; REDDY *et al.*, 2019).

Um estudo realizado por Suchodolski e seus colaboradores em 2008 demonstrou uma diferença na concentração de bactérias presentes em cada segmento do intestino a partir de uma análise do conteúdo luminal coletado dos seguintes segmentos intestinais: duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto, conferindo a eles um microbioma distinto. Segundo Sender e colaboradores (2016), ao longo de todo o TGI (TGI) há uma grande variação entre a concentração de bactérias presentes e essa mudança é decorrente de vários fatores, como por exemplo: a absorção de água, que concentra as bactérias no cólon; o crescimento de bactérias durante o tempo de trânsito; e a eliminação de bactérias da superfície da mucosa.

A compreensão mais aprofundada a respeito dos mecanismos que regulam as interações fisiológicas e patológicas entre a MI e o hospedeiro representa um quesito imprescindível, e potencialmente benéfico, para o avanço da medicina humana e veterinária. Interesse especial existe sobre a caracterização dos processos fisiopatológicos, considerando o estabelecimento dos fundamentos que venham nortear o desenvolvimento tanto de procedimentos diagnósticos como terapêuticos, devidamente subsidiados pelos mecanismos de ação, segurança e a eficácia terapêutica (JARRET *et al.*, 2021).

A inflamação intestinal está envolvida em diversas doenças, entre elas as EC em cães. Trata-se de uma alteração crônica que perdura 3 semanas ou mais,

imunomediada e multifatorial, que apresenta como principais manifestações clínicas a diarreia crônica e êmese. Sua patogenia é complexa e está relacionada a fatores genéticos juntamente com diversos gatilhos ambientais que contribuem para sua manifestação, alterando a permeabilidade intestinal, impactando negativamente o perfil da MI e levando à ativação inadequada da resposta imunológica intestinal. A classificação da EC é pautada na resposta ao tratamento clínico: a responsiva a dieta, responsiva aos antibióticos e a enteropatia responsiva aos imunossupressores, já aquelas que não respondem ao tratamento imunomodulador são classificadas como enteropatia não responsiva, sua natureza multifatorial torna o tratamento um desafio (WHITE *et al.*, 2017; KOPPER *et al.*, 2021; HEILMANN e STAINER, 2018; HILL E ALENGHA, 2021).

O impacto causado na MI decorrente das EC gera um desequilíbrio entre as diferentes bactérias que habitam o lúmen intestinal, ocasionando a diminuição de umas ao passo que há o aumento de outras. Este desequilíbrio é chamado de disbiose (PILLA e SUCHODOLSKI, 2020; ENCK e MAZURAK, 2018).

As abordagens para o tratamento da EC dependerão da gravidade e da cronicidade da doença. A primeira estratégia envolve o ajuste do manejo alimentar, aliado a tratamentos que promovam a redução da inflamação da mucosa, visando a normalização da MI. O uso de prebióticos e probióticos são terapias que podem modificar a MI e exercer efeitos benéficos na resposta imunológica do hospedeiro, contribuindo para a melhora da saúde da mucosa intestinal (JERGENS E HEILMANN, 2022).

Em estudo realizado por Kawabata e seus colaboradores em 2018, utilizando camundongos com colite, foi adicionado à dieta a suplementação com flavonóides cítricos. Ao fim do experimento, notou-se a melhora do comprometimento da barreira intestinal e os sinais de inflamação no cólon desses animais, demonstrando assim efeitos positivos de seu uso.

Estudos em humanos e animais utilizando flavonóides cítricos, também demonstram efeitos benéficos na MI, evidenciando que esses compostos podem contribuir com a normalização da sua composição e função (STEVENS *et al.*, 2019; JEWELL *et al.*, 2022; SAINI *et al.*, 2022).

Como citado por Cano e Arna (2024), o mercado de nutracêuticos para cães e gatos tem crescido nos últimos anos, refletindo um aumento no interesse pela caracterização dos possíveis benefícios associados à ingestão de polifenóis. Esses compostos têm sido relacionados a efeitos benéficos no combate a doenças crônicas e disfunções em animais de companhia.

A confirmação e caracterização dos efeitos benéficos dos flavonóides cítricos sobre a MI de cães possibilita a exploração do seu potencial como adjuvante terapêutico na prevenção e/ou redução da progressão das EC (JEWELL *et al.*, 2022; SAINI *et al.*, 2022).

A eriocitrina é um flavonoide cítrico extraído da casca do limão, que demonstrou resultados promissores como prebiótico e na modulação da inflamação intestinal em humanos e camundongos (Yao *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022). No entanto, sua aplicação ainda não foi investigada em estudos com cães. A presente pesquisa propôs avaliar a ação do Eriomin® na MI de cães saudáveis e de cães com enterite crônica EC.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo da presente pesquisa é avaliar o efeito de flavonóides cítricos sobre a MI intestinal de cães saudáveis e com enteropatia crônica utilizando um modelo *in vitro* de fermentação colônica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar a MI de cães saudáveis e de cães com enteropatia crônica.
- ✓ Determinar o efeito do flavonóide cítrico através da microbiologia e análise da produção de AGCC em cada um dos grupos analisados, ou seja, em cães saudáveis e com enteropatia crônica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MICROBIOTA INTESTINAL DE CÃES

O microbioma intestinal tem um papel importante na manutenção da saúde do TGI do hospedeiro, sua função compreende a defesa contra patógenos intestinais exógenos, auxílio no desenvolvimento de um epitélio saudável e do sistema imunológico (BLAKE e SUCHODOLSKI, 2016).

A MI de cães, principalmente no intestino grosso, é constituída por bactérias anaeróbias estritas e facultativas, ela fornece nutrientes para o hospedeiro por meio de processos fermentativos e metabólicos, os carboidratos complexos transitam pelo intestino delgado sem serem digeridos atingindo o intestino grosso, esse segmento intestinal nos cães está ligado à absorção de água e eletrólitos, mas também a degradação de nutrientes por meio da fermentação microbiana, resultando na produção de alguns metabólitos, dentre eles os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) benéficos, os quais promovem energia para as células epiteliais, regulam a motilidade intestinal e possuem propriedades anti inflamatórias (SUCHODOLSKI, 2021; BLAKE e SUCHODOLSKI, 2016; DESCHAMPS *et al.*, 2022).

Um estudo realizado por Suchodolski e seus colaboradores em 2008 demonstrou uma diferença na concentração de bactérias presentes em cada segmento do intestino a partir de uma análise do conteúdo luminal coletado dos seguintes segmentos intestinais: duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto, conferindo a eles um microbioma distinto. Segundo Sender e colaboradores (2016), essa mudança é decorrente de vários fatores, como por exemplo: a absorção de água, que concentra as bactérias no cólon; o crescimento de bactérias durante o tempo de trânsito; e a eliminação de bactérias da superfície da mucosa.

Em 2021, You e Kim compararam a MI de 96 cães saudáveis de acordo com sua raça, idade e escore de condição corporal e o estudo demonstrou que há diferença entre as MIs presentes entre os perfis de cães, sugeriram também que *Fusobacterium* é um potencial indicador para diferenciar as raças caninas e que *F. perfoetens* pode ser correlacionado de maneira positiva com cães mais idosos podendo promover um envelhecimento mais saudável.

Outro estudo que realizou uma revisão de literatura sistemática sobre a correlação do tamanho dos cães e suas particularidades (tamanho, volume e motilidade) do TGI, aponta que quaisquer que sejam os tamanhos dos cães, a MI de cães saudáveis é formada predominantemente por três filos bacterianos principais, são eles: *Firmicutes* (o mais abundante) Bacteroidetes e *Fusobacterium*, apesar de apresentarem diferenças nas concentrações dessas bactérias para cada tamanho de cão (DESCHAMPS *et al.*, 2022).

Cada um dos filos presentes desempenha uma função para o organismo do hospedeiro: *Firmicutes*, sua principal função é a produção de butirato, Bacteroidetes reduzem o nível de oxigênio intestinal e promovem o crescimento de bactérias anaeróbicas estritas, *Fusobacterium* são importantes para o metabolismo intestinal de animais que ingerem maior quantidade de proteína, pois realizam a degradação dos compostos nitrogenados (aminoácidos), ao contrário do que é encontrado em humanos esse filo é abundante em cães adultos saudáveis, Proteobacteria, também envolvidos no metabolismo de proteínas, carboidratos e vitaminas, ele inclui organismos patogênicos como *Escherichia coli* e *Campylobacter* e por fim Actinobacteria, filo menos abundante em cães e o gênero mais importante encontrado é o *Bifidobacterium* (DONG *et al.* 2022).

3.2 ENTEROPATIA CRÔNICA

As alterações gastrointestinais correspondem entre 20 e 30% dos atendimentos clínicos veterinários, podendo acometer todas as raças e idades de cães. Por esse motivo, é importante que o Médico Veterinário saiba diferenciar enteropatias agudas de crônicas (JERGENS e HEILMANN, 2022). Os pacientes que apresentam diarreia há 3 semanas ou mais, após exclusão de doenças extra e intra intestinais como por exemplo alterações renais, hepáticas, hormonais (hipoadrenocorticismo), infecciosas, parasitárias e neoplásicas são diagnosticados com alterações crônicas, ou seja, EC (DANDRIEUX, 2016).

A EC é uma doença multifatorial, caracterizada por uma resposta imunológica exacerbada da mucosa intestinal e pela redução da tolerância a dietas e aos componentes da MI em animais geneticamente suscetíveis. Há evidências de que,

após o nascimento, a MI colonizadora desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da imunidade da mucosa (JERGENS e HEILMANN, 2022).

Quando o TGI do hospedeiro sofre injúrias no início da vida, como por exemplo pacientes que contraem doenças como a Parvovirose, a MI pode ser comprometida, resultando em maior susceptibilidade a patologias inflamatórias, facilitando o desenvolvimento de doenças ao longo da vida ou possivelmente uma MI disbiótica (JERGENS e HEILMANN, 2022).

O diagnóstico da EC pode ser realizado por meio da endoscopia digestiva, um procedimento minimamente invasivo que permite a avaliação macroscópica do TGI, além da coleta de biópsias para análise histopatológica. Esse exame é fundamental para excluir outros diagnósticos diferenciais, como linfoma intestinal e enteropatias infecciosas. O padrão inflamatório histopatológico mais comum observado na EC é o infiltrado linfoplasmocitário (DANDRIEUX, 2016) (HODEL, BRUGGER e KOOK, 2024)

Após confirmação da presença da inflamação gastrointestinal as enteropatias podem ser classificadas em 4 categorias de acordo com suas respostas ao tratamento (HODEL, BRUGGER e KOOK, 2024):

- **Enteropatia responsiva à dieta:** cães que apresentaram remissão dos sinais clínicos após ajuste na dieta.
- **Enteropatia responsiva a antibióticos:** cães que apresentaram remissão dos sinais clínicos após uso de antibióticos.
- **Enteropatia responsiva aos imunomoduladores:** remissão dos sintomas mediante administração de medicações imunomoduladoras ou imunossupressoras.
- **Enteropatia não responsiva:** pacientes que não apresentam melhora dos sinais clínicos mediante tratamentos.

A EC pode provocar alterações na MI intestinal, como o aumento na quantidade de bactérias anaeróbias facultativas do filo *Proteobactérias* e a diminuição do filo *Firmicutes*. Essas mudanças são características de disbiose. Vale ressaltar que muitas doenças, tanto localizadas quanto sistêmicas, estão associadas à disbiose,

que é definida como uma alteração na composição do microbioma, afetando sua função (PILLA e SCHODOLSKI, 2021).

No estudo realizado por Giraetta *et al.*, 2020, foi observada uma alteração na composição da MI intestinal nas amostras de mucosa colônica de pacientes com alterações crônicas no TGI. Os pesquisadores notaram uma redução no número de bactérias nas criptas intestinais da região do cólon, um padrão semelhante ao descrito em humanos com colite ulcerativa. Acredita-se que a MI presente nas criptas desempenha um papel crucial na homeostase da mucosa intestinal, promovendo a imunomodulação e atuando como um reservatório de bactérias, que facilita a recolonização do intestino após injúrias, como a administração de antibióticos ou infecções.

Outro estudo (ALSHAWAQFEH *et al.*, 2017), teve como objetivo calcular o índice de disbiose dos pacientes. Ao comparar amostras de pacientes com alterações intestinais crônicas com pacientes saudáveis, constatou-se que os grupos bacterianos comumente alterados são Proteobactérias, principalmente *E. Coli* e a redução dos *Firmicutes*, principalmente *Faecalibacterium* e *Ruminococcus blautia*.

A redução na concentração de *Clostridium hiranunonis* está sendo associado à disbiose (SUCHODOLSKI, 2021), ele é o principal conversor de ácidos biliares primários em secundários nos cães, que são essenciais para a digestão de lipídios no lúmen intestinal, além de desempenhar um papel importante na homeostase da mucosa por sua ação antimicrobiana, quando em concentrações reduzidas leva a mudança da MI (disbiose) (JERGENS e HEILMANN, 2022). O uso de antibióticos de amplo espectro pode induzir a redução de *Clostridium hiranunonis*, assim como inflamações crônicas do TGI. Outra bactéria importante é o *Faecalibacterium prausnitzii*, que produz ácidos graxos de cadeia curta e peptídeos anti-inflamatórios, frequentemente reduzidos em doenças intestinais caninas (SUCHODOLSKI, 2021).

3.3 PREBIÓTICOS

O Consenso de Prebióticos publicado em 2017 os define como substratos seletivamente utilizados pela MI do hospedeiro que conferem benefícios à saúde, como por exemplo a inibição de patógenos e estimulação imunológica no TGI.

Para um composto ser classificado como prebiótico ele deve ser resistente ao pH ácido do estômago, não pode ser hidrolisado por enzimas de mamíferos e não deve ser absorvido no TGI, pode ser fermentado pela MI e estimular o crescimento ou atividade das bactérias intestinais. Em cães e gatos, alguns benefícios para a saúde foram alcançados com a administração de prebióticos, como por exemplo, redução de infecções e inflamações, respostas positivas na doença inflamatória intestinal, melhora na sensibilidade à insulina e melhora da consistência fecal (SCHMITZ e SUCHODOLSKI, 2016; DAVARI *et al.*, 2019).

O prebiótico será degradado no cólon pelas bactérias ali presentes, sua estrutura e a composição bacteriana do intestino determinam os produtos da metabolização, os quais são chamados de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) dentre eles os principais são: acetato, butirato e propionato. Esses metabólitos determinarão os efeitos do prebiótico no organismo do hospedeiro e seus benefícios à saúde. Fornecem energia para os colonócitos e com isso promovem uma melhora na função da barreira epitelial a partir do fortalecimento das junções celulares e estimulam a função dos linfócitos T, aumentando a proteção contra inflamações da mucosa (KIM, TITGEMEYER e ALDRICH, 2023) (DAVARI *et al.*, 2019).

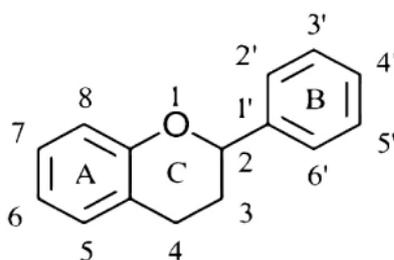
Os AGCC podem se difundir pela circulação sanguínea através dos enterócitos, permitindo que não atue apenas no TGI, mas também em órgãos distantes. São essenciais para a saúde intestinal, pois podem modular diversas atividades metabólicas como a função dos colonócitos, homeostase intestinal, ganho de energia, sistema imunológico, apetite dentre outros (DAVARI *et al.*, 2019).

Os polifenóis vegetais, como os flavonóides, constituem uma classe de compostos que pode ser classificada como prebióticos, aproximadamente 90-95% dos polifenóis da dieta não são absorvidos no intestino delgado, atingindo o cólon onde haverá uma biotransformação pela MI colônica. Os benefícios à saúde promovidos pelos polifenóis ocorrem a partir da metabolização microbiana e metabólitos produzidos, não dos compostos originais (GIBSON *et al.*, 2017).

3.4 FLAVONÓIDES

As frutas cítricas são uma excelente fonte compostos bioativos benéficos para a saúde tanto de humanos como de animais, um exemplo são os compostos fenólicos, os quais podem ser classificados em dois grupos: não flavonóides (ácidos fenólicos, taninos hidrolisados, estilbenos entre outros) e os flavonóides, uma classe de metabólitos polifenólicos secundários e amplamente encontrados em plantas. Os flavonóides são compostos por um esqueleto de 15 carbonos, sendo estruturado em dois anéis aromáticos, um anel heterocíclico e o grupo flavona representado pela Figura 1. E de acordo com os padrões de substituição de um anel heterocíclico, podem ser divididos em subgrupos como: flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, flavan-3-ols e antocianinas (SAINI, 2022; MONTESERRAT *et al.*, 2014).

Figura 1 Estrutura química básica dos flavonóides. Anéis aromáticos (A e B) e anel heterocíclico (C).



Fonte: STEVENS *et al.*, 2019

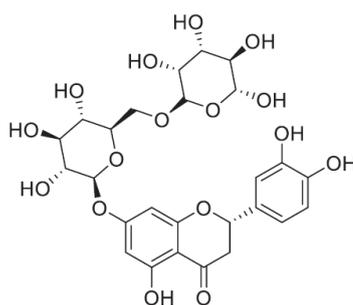
Nos alimentos geralmente são apresentados como glicosídeos ou conjugados de ácidos orgânicos, os efeitos benéficos das flavonas cítricas estão relacionados à sua estrutura bioquímica, como por exemplo o número e a posição dos grupos hidroxila nos anéis A e B e a presença da porção de açúcar. Os fenólicos ligados ao grupo hidroxila no anel aromático e as ligações com os carboidratos não são atingidos pela digestão estomacal e intestinal, a maioria dos flavonoides é pouco absorvida no intestino delgado e altamente metabolizada no intestino grosso. Chegam ao cólon como substrato para a MI do cólon, onde pela ação das bactérias intestinais haverá a degradação das moléculas de açúcar (desglicosilação) acarretando a liberação das agliconas (flavonóides) que serão absorvidas por difusão passiva pelo epitélio intestinal e metabolizadas (MONTESERRAT *et al.*, 2014; MOSELE, MACIÀ e MOTILVA, 2015; STEVENS *et al.*, 2019).

3.4.1 Eriocitrina

No albedo das frutas cítricas mediterrâneas é onde se encontra a maior concentração de flavanona-7-O-glicosídeos, são elas: naringina, eriocitrina, hesperidina e narirutina (SAINI, 2022).

Diferente de outros flavonóides como a nariginina e hesperidina, a eriocitrina (eriodictiol-7-O-rutinosídeo) representada na Figura 2, tem sido considerada como o antioxidante mais potente em doenças crônicas decorrentes do estresse oxidativo, demonstrando importantes propriedades antioxidantes, anticancerígenas e antialérgicas, está presente nas frutas cítricas, encontrada principalmente na casca do limão e da lima (FERREIRA *et al.*, 2021; YAO *et al.*, 2022).

Figura 2- Estrutura química da Eriocitrina.



Fonte: YAO *et al.*, 2022

Diversas atividades biológicas e farmacológicas têm sido atribuídas à eriocitrina, como por exemplo redução do perfil lipídico, potencial antidiabético, citoproteção em patologias induzidas pelo estresse oxidativo celular por meio da redução dos fatores inflamatórios como NF- κ B, FNT- α , IL-1 β , IL-6 (YAO *et al.*, 2022)

Em 2021, Galvez e seus colaboradores demonstraram em um estudo que a ingestão de extrato de limão rico em eriocitrina foi capaz de fornecer uma quantidade maior de metabólitos de flavanona de fase II circulantes quando comparado com concentrações mais altas dos extratos ricos em hesperidina, sugerindo que a ingestão de extrato de limão pode fornecer um limiar de concentração circulante suficiente de

metabólitos para exercer benefícios à saúde após o consumo a longo prazo, mesmo naqueles indivíduos que são chamados de baixo produtor.

A literatura relata a eficácia da eriocitrina para colites, como demonstrado em um experimento com camundongos realizado por Guo e seus colaboradores em 2019, onde a eriocitrina inibiu efetivamente a produção de citocinas pró inflamatórias e nas análises histopatológicas foi confirmado que ela protegeu significativamente o cólon da inflamação induzida no experimento.

Existem evidências de que a atividade biológica da eriocitrina está fortemente relacionada com os seus metabólitos, identificados como eriodictiol, hesperidina e homoeriodictiol, além da capacidade de modulação da MI pelo aumento de bactérias benéficas e diminuição de bactérias nocivas e estimulação da produção de ácidos graxos de cadeia curta no cólon de camundongos (MENG *et al.*, 2023).

3.4.2 Biodistribuição e Farmacocinética da Eriocitrina

O metabolismo da eriocitrina é determinado principalmente pelo seu grau de conjugação com moléculas de açúcar e a remoção destas pelas enzimas e bactérias intestinais. Uma pequena parcela das flavononas agliconas livres são absorvidas por difusão passiva pelos enterócitos no intestino delgado e as formas glicosiladas serão absorvidas no cólon após passar por um processo de hidrólise pela MI colônica, transformando-se na forma agliconada e absorvida pelos enterócitos do cólon, onde passarão por um pequeno grau de metabolização de fase II – conjugação (metilação, sulfatação e glicoronidação) formando o eriodictiol, parte dele chegará ao fígado onde será transformado principalmente em homoeriodictiol e hesperidina, esse processo contribui para o aparecimento de metabólitos na corrente sanguínea, que serão filtrados pelos rins e excretados pela urina (MOSELE, MACIÀ e MOTILVA, 2015; STEVENS *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2021).

Uma fração relevante dos flavonoides não é absorvida no intestino delgado e juntamente com os metabólitos conjugados que retornam ao lúmen intestinal pela circulação entero-hepática atingem o intestino grosso, onde os compostos estarão sujeitos à ação da MI colônica (MONTESERRAT *et al.*, 2014). Eriocitrina então pode

ser metabolizada pela MI intestinal em eriodictiol e ácido 3,4 – droxihidrocinâmico que são absorvidos (YAO *et al.*, 2022; MENG *et al.*, 2023).

3.4.3 Efeitos na Microbiota Intestinal

Estudos demonstram que a eriocitrina apresenta efeitos protetores sob condições inflamatórias e de estresse oxidativo nos camundongos (YAO *et al.*, 2022). Já outros estudos realizados em humanos evidenciam a influência dos flavonóides na MI do cólon em humanos (LI *et al.*, 2022).

Grande parte desse composto não é absorvido pelo intestino delgado, portanto 90% desse composto é metabolizado para MI do cólon (LI *et al.*, 2022). No lúmen do cólon, juntamente com os conjugados excretados pela bile, os polifenóis sofrerão ação das atividades enzimáticas da MI e a partir disso haverá a produção dos metabólitos, os quais são de baixo peso molecular, conferindo a eles maior potencial de ação (CANDELLONE *et al.*, 2020).

Os principais metabólitos produzidos são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) dentre eles: ácido acético que é um importante regulador do pH do cólon que auxilia a manter a homeostase colônica, ácido butírico e propiônico utilizados como nutrientes para as células epiteliais intestinais e pela MI colônica facilitando a absorção de nutrientes, o metabolismo energético e a manutenção da barreira intestinal, conferindo uma melhora na imunidade (LI *et al.*, 2022).

Como a inflamação, o estresse oxidativo e as perturbações da MI estão presentes em diversas doenças gastrointestinais e metabólicas, os flavonóides cítricos podem contribuir para a manutenção do equilíbrio intestinal a partir da modulação da MI previnem ou até mesmo restauram alterações mediante algumas doenças, auxiliam na eliminação de radicais livres, aumentam as bactérias comensais benéficas como as *Bifidobactérias spp.* e *Lactobacilos spp.*, além de limitar a translocação de bactérias patogênicas (MONTESERRAT *et al.*, 2014; MOSELE, MACIÀ e MOTILVA, 2015; STEVENS *et al.*, 2019).

Um estudo realizado por CANDELLONE, *et al.*, 2020 relatou que o polifenol em doses baixas reduzem a inflamação associada aos danos de mucosa do cólon pelo mecanismo de supressão para a produção de citocinas inflamatórias pelas células

dendríticas, a partir da inibição da secreção de citocinas inflamatórias mediada por LPS, incluindo IL-6, IL-23 e IL-12 enquanto aumentam a produção de IL-10 e IL-1ra, além de limitarem o crescimento de bactérias patogênicas e promoverem o crescimento de bactérias benéficas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para execução da presente pesquisa, o projeto foi submetido à prévia autorização e aprovado (número de protocolo 068.22) pelo Conselho de Ética Animal (CEUA) da Universidade de Araraquara - UNIARA (Anexo 1).

Para realização do experimento os animais foram selecionados 6 animais, divididos em 2 grupos: Saudáveis e Doentes. Para o grupo experimental “Cães Saudáveis” (CS) foram selecionados 3 cães de raças variadas, sendo dois machos e uma fêmea, com idades entre 4 e 6 anos e peso médio de 12kg. Cada animal participante desse grupo se alimenta com ração comercial de marcas variadas e estão sob tutela de diferentes tutores. Os três cães passaram por avaliação física com um Médico Veterinário, foram realizados exames como hemograma, bioquímicos da função hepática e renal, além do exame coproparasitológico para exclusão de doenças. Todos os animais do grupo controle apresentaram uma avaliação física positiva e resultados dos exames dentro dos valores de referência para a espécie.

No grupo experimental “Cães Doentes” (CD) foram selecionados 3 cães da raça Shih-Tzu, fêmeas, com idades entre 3 a 6 anos e peso médio de 6kg, apresentando episódios de diarreia e vômito há mais de 6 meses. Foram descartadas doenças sistêmicas que podem causar a mesma sintomatologia, como por exemplo alterações renais, hepática, hemoparasitose e parasitas intestinais. Foi realizada endoscopia digestiva de todos os animais presentes no grupo e a partir do exame histopatológico foi constatado alterações linfoplasmocitárias. A partir da associação do resultado da biópsia e as alterações gastrointestinais das pacientes, foram diagnosticadas com enteropatia crônica. Todos os pacientes se alimentam com alimentação natural formulada por um médico veterinário, no momento do experimento todos os pacientes

encontravam-se estáveis das alterações gastrointestinais, ou seja, sem êmese ou diarreia.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

Experimentos *in vitro* possibilitam estudar novos produtos veterinários, os parâmetros nesse modelo de estudo podem ser ajustados conforme a necessidade da pesquisa, como por exemplo: tipo de matriz alimentar, idade, raça do cão, tamanho corporal, mimetizar situações fisiológicas ou patológicas (DESCHAMPS *et. al.*, 2022). Os efeitos das fontes de fibra na saúde intestinal são avaliados utilizando um inóculo fecal canino, através da mensuração das taxas de produção e concentrações dos produtos finais da fermentação é possível avaliar a metabolização e os efeitos do produto na composição da MI (DONADELLI *et. al.*, 2019). Todos os tipos de modelos *in vitro* intestinais, dos mais simples aos mais complexos, podem ser úteis para orientar o desenvolvimento de novos produtos (DESCHAMPS *et. al.*, 2022).

Neste trabalho, o experimento *in vitro* adotado para simulação do TGI de cães foi a fermentação colônica *in vitro* pelo período de 48h (MINI – xGI), seguindo protocolo descrito previamente por Burrilo-Pérez e colaboradores e por Ghyselinck e colaboradores, ambos no ano de 2021.

Os grupos experimentais foram separados entre CS e CD, sendo cada um deles separados subgrupos: Grupo Controle (GC), Grupo Tratamento 1 (GT1) onde foi administrado a dose de 0,007g de Eriomin® *in vitro* e Grupo Tratamento 2 (GT2) onde foi administrado a dose de 0,0014g de Eriomin® *in vitro*. O experimento foi realizado em triplicata para cada um dos subgrupos, aumentando assim a confiabilidade dos resultados e tornando possível a análise estatística.

A metodologia a seguir será descrita de forma única, referindo aos grupos experimentais apenas como GC, GT1 e GT2, pois foi executada seguindo o mesmo protocolo para ambos os grupos experimentais (CS e CD) sendo executada primeiramente a fermentação do CS e posteriormente CD, facilitando assim a compreensão dessa etapa para o leitor.

Os resultados serão abordados para cada grupo bacteriano analisado. A análise dos resultados foi realizada a partir do cálculo da média logarítmica das UFC

de cada triplicata e desvio padrão (MLog \pm DP) entre as colônias formadas para cada grupo experimental, sendo o primeiro GS que compreende os animais saudáveis e seus subgrupos separados por: Grupo Saudáveis Controle (GSC), Grupo Saudáveis Tratamento 1 (GST1) e Grupo Saudáveis Tratamento 2 (GST2) e o segundo denominado de GD composto pelos animais doentes, seus subgrupos foram denominados de Grupo Doente Controle (GDC), Grupo Doente Tratamento 1 doentes (GDT1), Grupo Doente Tratamento 2 (GDT2).

A produção de metabólitos foi mensurada a partir dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos pelas bactérias, nesse estudo analisamos o ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico produzidos em cada um dos grupos experimentais, em suas respectivas triplicatas, a partir de suas médias com desvio padrão (DP).

4.2.1 Obtenção das Amostras

As amostras fecais foram coletadas pelos tutores em suas residências, após a defecação espontânea dos animais, armazenadas em um pote coletor estéril sob refrigeração e encaminhadas imediatamente ao laboratório instalado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (UNESP). As amostras foram armazenadas em geladeira durante o preparo do meio de fermentação e do inóculo fecal para iniciar a fermentação colônica.

4.2.2 Preparo do Inóculo Fecal

A partir das amostras fecais coletadas, foi preparado o inóculo fecal utilizado no processo de fermentação *in vitro*.

O tampão salino tamponado com fosfato (PBS 0,1 molar) foi preparado a partir dos reagentes descritos na **Tabela 1**. Após a pesagem e homogeneização dos reagentes, o pH da solução (1L) foi ajustado para 7,2 e o tampão foi autoclavado a 121°C por 15 minutos, nesta solução foram adicionadas às amostras fecais juntamente com o Glicerol em proporções adequadas, caracterizando assim o inóculo fecal.

Tabela 1- Descrição e quantidade em gramas dos reagentes utilizados para preparo do tampão para o inóculo.

Reagente	1 L de tampão PBS 0,1molar (g)
NaCL	80,0
KCL	2,0
Na₂HPO₄	11,49
KH₂PO₄	2,59

Fonte: Elaborado pela autora (2024)

O inóculo fecal foi realizado separadamente para cada animal doador (Figura 3), a partir de 10g de fezes adicionados a 100ml do tampão preparado (valor corresponde à 10% do volume de fezes) juntamente com 300ml de Glicerol (valor referente à 30% do volume de fezes).

As amostras foram homogeneizadas no agitador de amostras por 10 minutos em 150 rpm e colocadas em ependorfes para serem centrifugadas por 15 minutos a 4°C em 5000 rpm.

Após a centrifugação houve a formação de um sobrenadante, o qual foi utilizado para formação de um pool entre as amostras de todos os animais a partir de sua transferência para um becker (Figura 4). Esse pool é correspondente ao inóculo fecal utilizado para a fermentação *in vitro*.

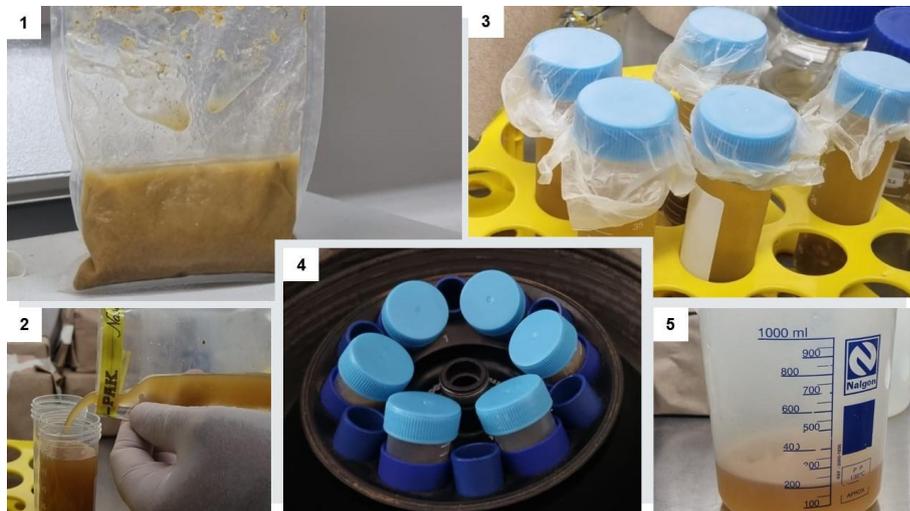
Figura 3- Demonstração esquemática do preparo do inóculo fecal.

Preparo do inóculo fecal



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Figura 4- Preparação do inóculo fecal. 1) Amostra homogeneizada após ser colocada no agitador. 2) Amostras sendo colocadas nos tubos. 3) Todas as amostras separadas para a centrifugação. 4) Centrifugação. 5) Inóculo fecal pronto e colocado em um único recipiente.



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

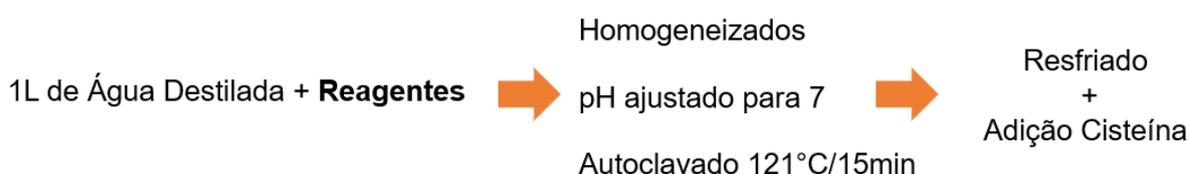
4.2.3 Preparo do Meio de Fermentação

A partir do meio de fermentação foi possível realizar a fermentação *in vitro*. Os reagentes utilizados para o seu preparo estão descritos na **Tabela 2**, os quais foram adicionados à 1L de água destilada, homogeneizados, ajustado o pH para 7,0 e autoclavada a 121°C por 15 minutos. Após retirar da autoclave, e resfriado em

temperatura ambiente, a cisteína foi adicionada considerando sua sensibilidade ao calor.

Figura 5- Demonstração esquemática do preparo do meio de fermentação.

Meio de Fermentação



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Tabela 2- Descrição e quantidade em gramas dos reagentes utilizados para o preparo do meio basal da fermentação colônica.

Reagentes	1L de meio basal (g)
K₂HPO₄	5,9
KH₂PO₄	18,5
NaHCO₃	2,3
Extrato de levedura	2,3
Peptona	2,3
Cisteína	0,6
Tween 80	2,3

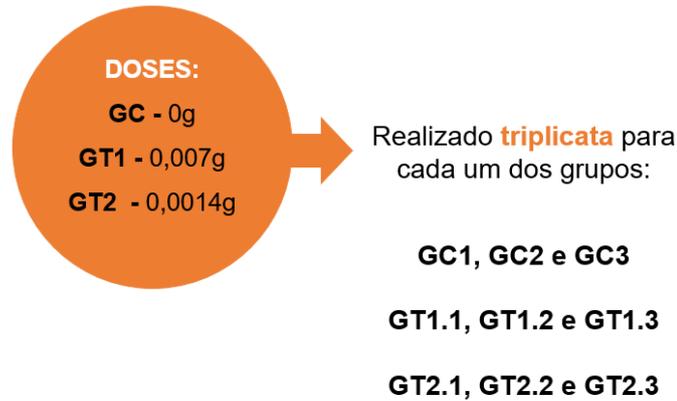
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.2.4 Adição do Flavonóide Cítrico

O produto utilizado na pesquisa foi o Eriomin®, fornecido pela empresa Ingredients by Nature (Montclair, CA, EUA). Sua composição foi descrita por César e colaboradores em 2022, contendo 70% de eriocitrina, 5% hesperidina, 4% naringina, 1% didimina e 20% de fibras.

Em ambos os grupos experimentais, o GC não recebeu a adição de Eriomin®, o GT1 recebeu a dose de 0,007g e o GT2 recebeu a dose de 0,0014g (Figura 6). A dose utilizada foi definida a partir do cálculo de extrapolação de doses de humanos para animais, descrito por Nair e Jacob (2016).

Figura 6 - Representação esquemática dos valores utilizados em cada grupo experimental (GC, GT1 e GT2) e suas respectivas triplicatas.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

4.2.5 Fermentação Colônica *In Vitro* 48h (MINI-xGI)

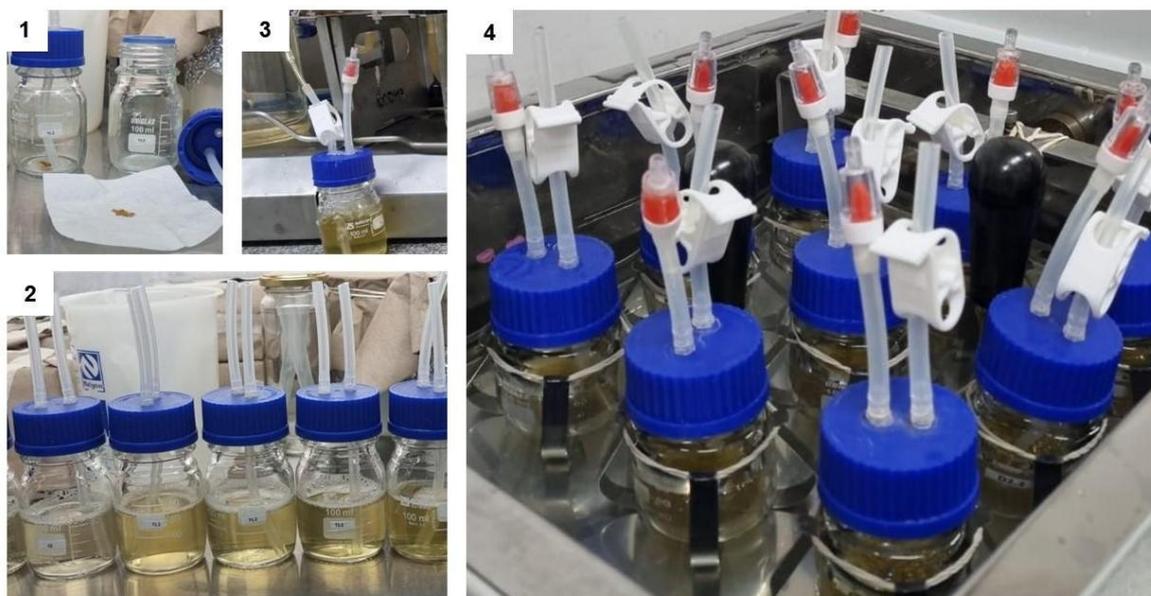
Após a identificação dos frascos entre GC, GT1 e GT2 e suas respectivas triplicatas, foram adicionados a eles o Eriomin®, 7 ml de água Milli-Q, 56 ml de meio basal e 7ml de inóculo fecal (Figura 7). Na sequência os frascos foram fechados e induzidos a anaerobiose por meio do borbulhamento de nitrogênio por 1 minuto. Amostras incubadas em banho maria a 37°C por 48h com agitação 6rpm, após esse período as amostras foram retiradas, resfriadas e mantidas em geladeira por 24 horas demonstrado na Figura 8.

Figura 7- Representação do frasco de fermentação colônica e itens adicionados a ele: 7ml de Água Milli-Q, 56ml de meio basal, 7ml de inóculo fecal, adição do Eriomin. Resultando em 76ml de solução.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 8 - 1) Adição do Eriomin® aos frascos. 2) Frascos após adição do Eriomin®, meio basal, inóculo fecal e água Milli-Q, totalizando 70ml. 3) Indução da anaerobiose dos frascos com borbulhamento de nitrogênio. 4) Amostras em banho-maria à 37°C por 48 horas.



Fonte: Própria autora

4.2.6 Análise da Produção de Metabólitos

Após a simulação da fermentação colônica, as amostras de cada triplicata foram coletadas e armazenadas a -20°C para análise dos metabólitos (ácidos graxos de cadeia curta) gerados após a inoculação do flavonóide cítrico. Para a quantificação dessa produção foi adotado o protocolo utilizado por Medeiros e colaboradores (2022). Uma alíquota de cada grupo experimental foi distribuída em ependorfes separadamente e encaminhadas para a determinação da concentração (mmol/L) de ácidos acético, propiônico e butírico por meio de um cromatógrafo a gás.

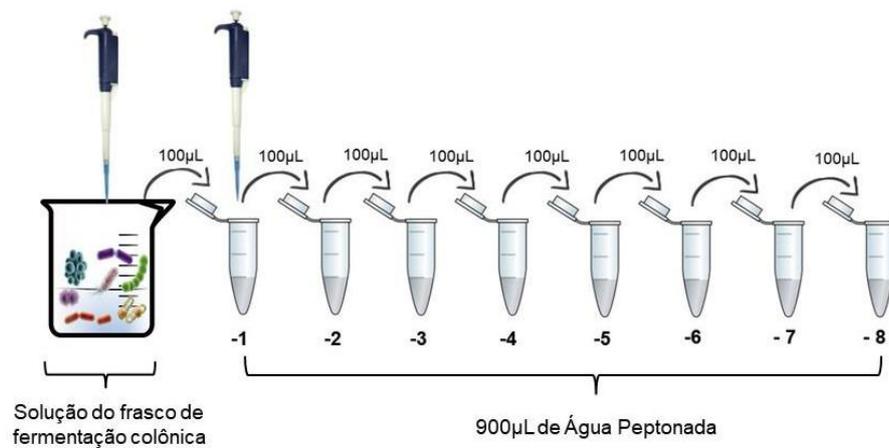
4.2.7 Composição da MI

A análise da composição da MI intestinal baseou-se nas bactérias *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp., Aeróbios totais e facultativos (Bactérias Totais), *Clostridium* spp. e *Bacteroidetes* spp.

Foi realizado uma diluição da solução presente no frasco de fermentação colônica a partir da coleta de 100µL adicionados em 900µL de água peptonada,

diluições seriadas foram preparadas em concentrações -1 até -8, demonstrado na Figura 9, para os primeiros filos citados acima, já para os *Bacteroidetes spp* foram realizadas diluições de -4 até -9 (Figura 9) e inoculadas (Figura 10) em meios de culturas específicos (Tabela 3) para cada bactéria.

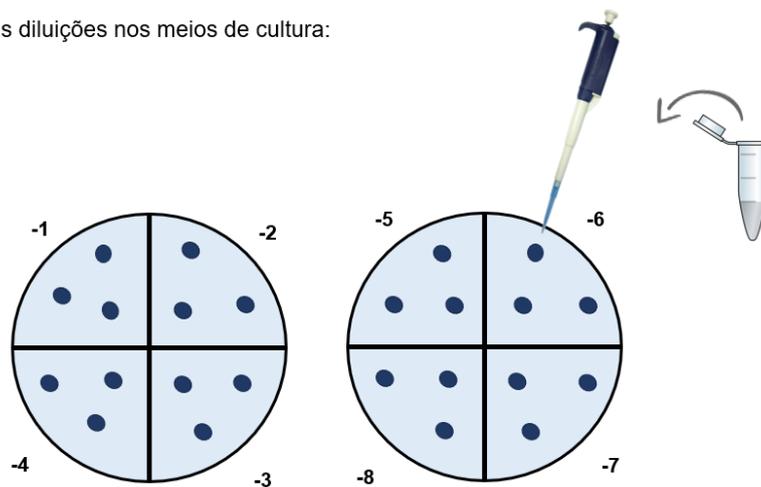
Figura 9- Representação da diluição da solução do frasco de fermentação colônica, realizado para cada grupo experimental separadamente e suas respectivas triplicatas, para a inoculação nos meios de culturas específicos para cada bactéria a ser analisada neste experimento.



Fonte: Própria autora.

Figura 10 - Representação da inoculação das diluições nos meios de cultivo para o crescimento bacteriano, realizado para cada grupo experimental separadamente e suas respectivas triplicatas.

Inoculação das diluições nos meios de cultura:



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Tabela 3 - Meios de cultura utilizados para as análises microbiológicas

Gênero	Meio de Cultura
<i>Lactobacillus</i> spp.	Ágar MRS
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Ágar RCA
Aeróbios Totais e Facultativos	Ágar PCA
<i>Clostridium</i> spp.	Ágar RCA
<i>Bacteroidetes</i> spp.	Ágar MacConkey

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Após término do plaqueamento, foram colocadas em uma caixa de anaerobiose por 72 horas em estufa a 37°C. Exceto os Bacteroidetes, que permaneceram em estufa por 48 horas. Após esses períodos, foram retiradas da estufa e armazenadas em geladeira até a execução da contagem manual das unidades de colônias bacterianas formadas (UFC) para cada grupo de bactérias e tratamento demonstrado na Figura 6.

4.2.8 Análise Estatística

O experimento foi conduzido em triplicatas dos grupos experimentais, portanto os dados são apresentados como média \pm DP. Os resultados foram comparados por testes estatísticos, a partir da análise de variância (ANOVA) e pós teste Tukey, considerando o nível de significância de 5% ($p \geq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 IMPACTO DO ERIOMIN® NA MI

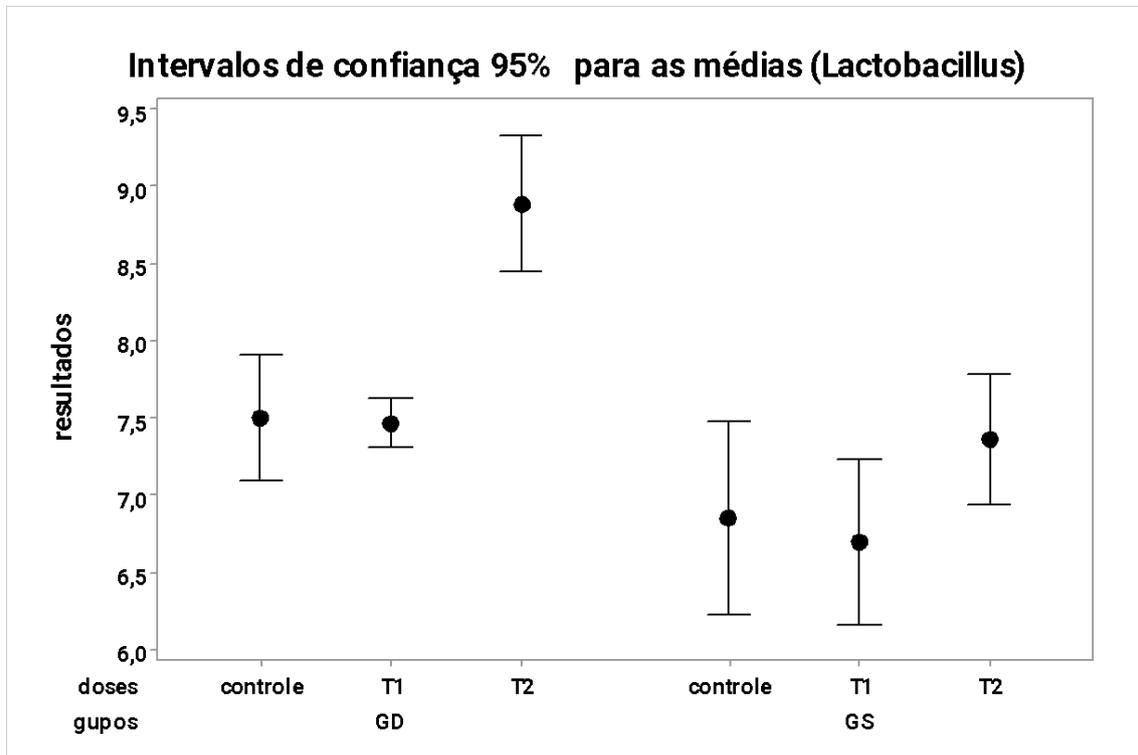
5.1.1 *Lactobacillus* spp.

O Eriomin® promoveu o crescimento de *Lactobacillus* spp. no grupo que compreende os CD.

Em CD, demonstrou intervalo de confiança (i.c.) igual a 95% para as médias, que não são superpostas na dose 0,0014g confirmando que houve um estímulo para produção desse grupo bacteriano na referida dose.

Para CS, houve uma superposição do i.c. 95% o que indica igualdade entre as médias, ou seja, não houve diferença estatística entre tratamentos e grupo controle. (Figura 11).

Figura 11- Representação gráfica em barras referente à média da população de *Lactobacillus* spp. expressa em Média Log UFC/ μ L (\pm DP) nos grupos CS e CD e respectivos tratamentos (* $p > 0,01$ e ** $p > 0,05$).

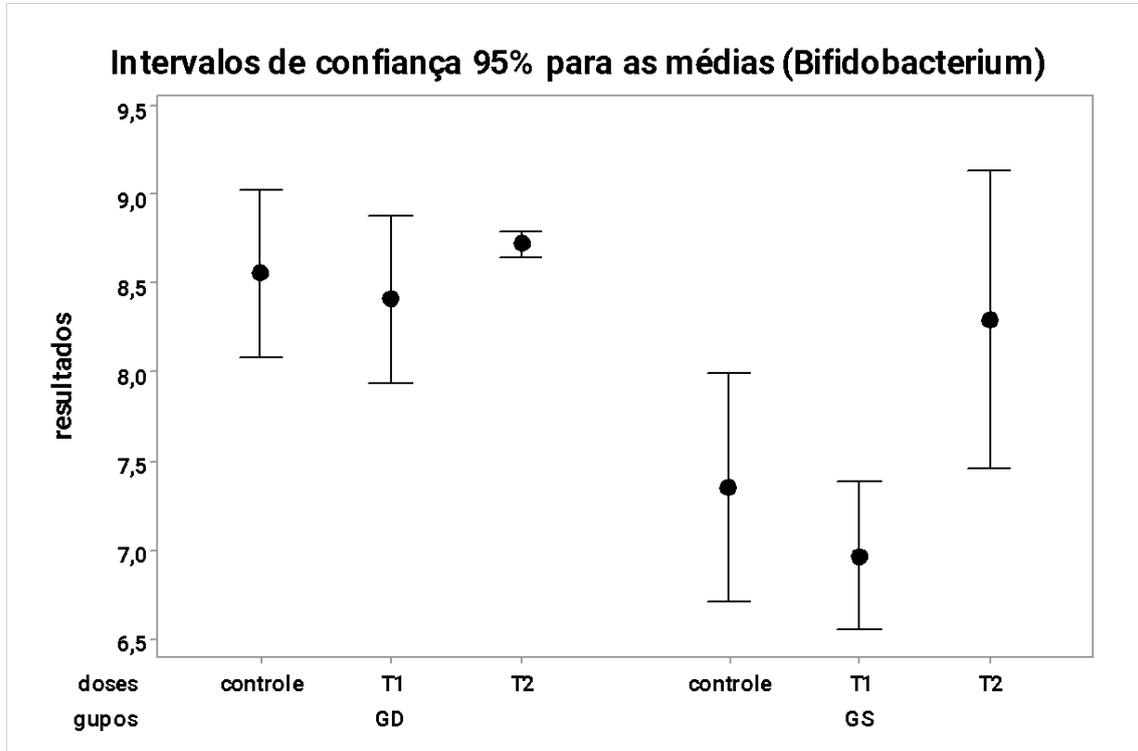


5.1.2 *Bifidobacterium* spp.

Em animais sadios, não houve superposição dos i.c. 95% o que indica uma diferença estatística entre as médias, demonstrando que o Eriomin® principalmente na maior dose (GST2) estimulou a produção de *Bifidobacterium* em cães saudáveis.

Para os animais doentes, não houve diferença estatística entre os tratamentos e grupo controle (Figura 12).

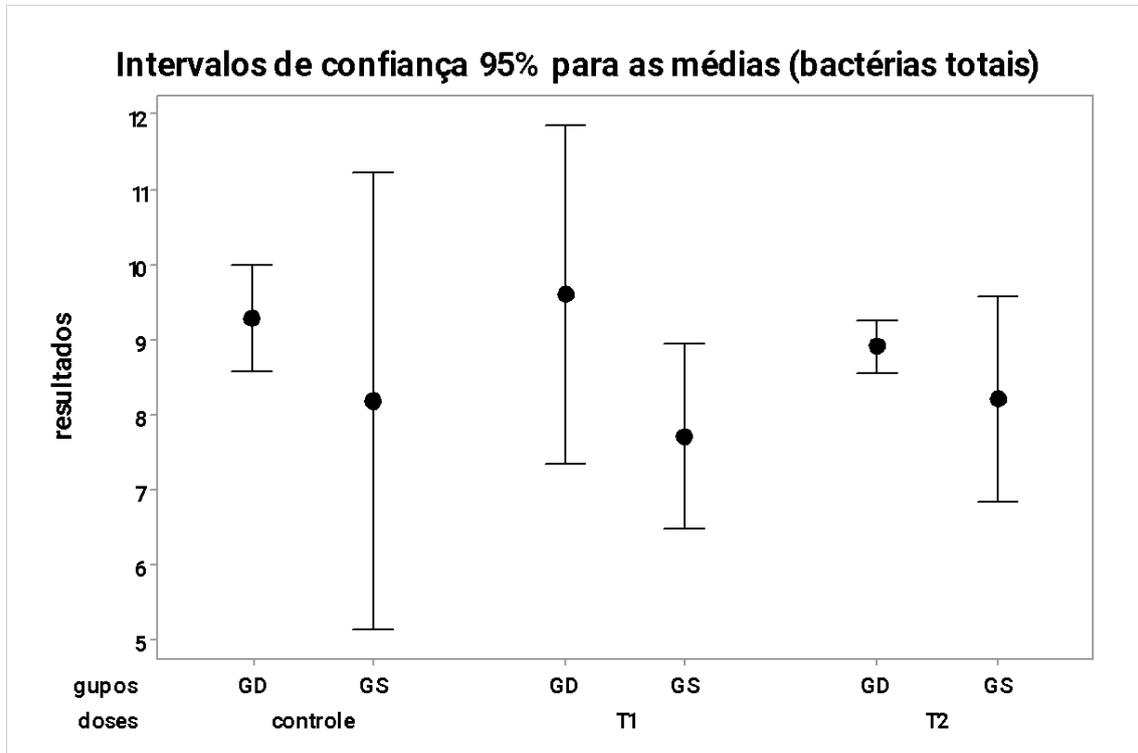
Figura 12- Representação gráfica em barras referente à média da população de *Bifidobacterium* spp. expressa em Média Log UFC/ μ L (\pm DP) nos grupos CS e CD e respectivos tratamentos GT1 e GT2 (* $p > 0,01$ e ** $p > 0,05$).



5.1.3 Bactérias Totais

Não houve diferença estatística entre os tratamentos instituídos, i.c. 95% para as médias são superpostos entre todos os grupos, conclui-se que o Eriomin® não influenciou na concentração de Bactérias Totais presentes na MI destes cães (Figura 13).

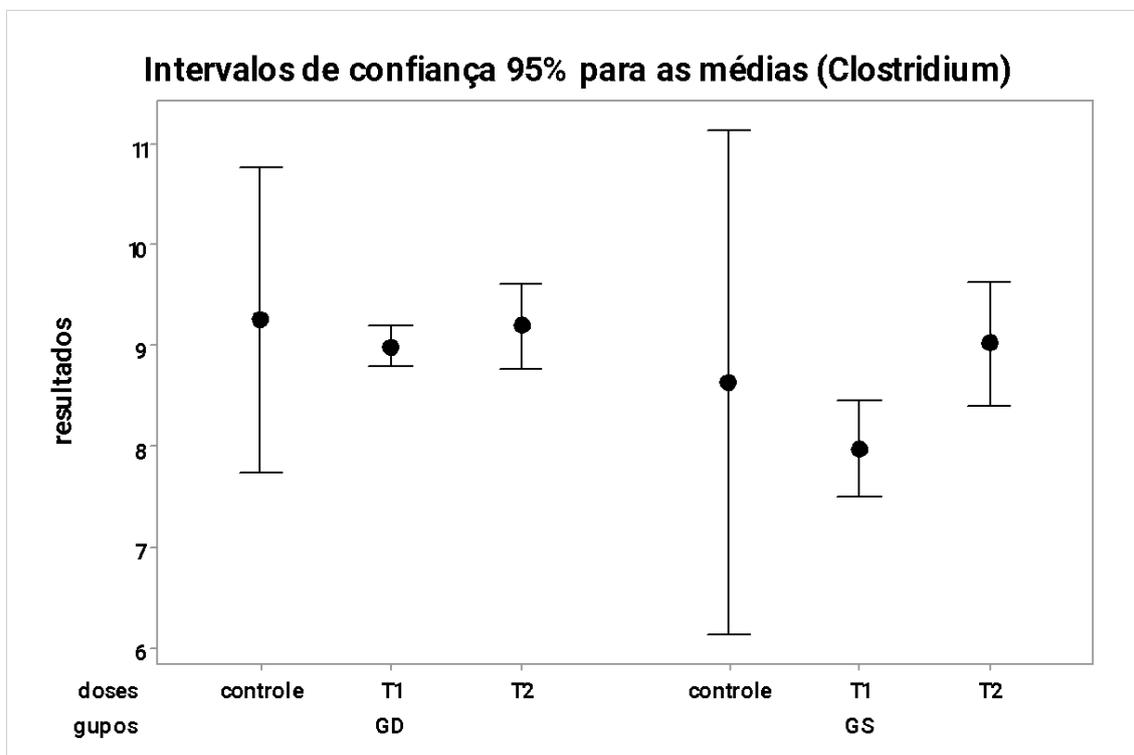
Figura 13- Representação gráfica em barras referente à média da população de Bactérias totais expressa em Média Log UFC/ μ L (\pm DP) nos grupos CS e CD e respectivos tratamentos GT1 e GT2 (* $p > 0,01$ e ** $p > 0,05$).



5.1.4 *Clostridium* spp.

O Eriomin® não influenciou na concentração de *Clostridium* spp. presente na MI do grupo CD, i.c. 95% para as médias que se apresentam superpostas no gráfico. Para o grupo CS, houve diferença para as médias entre GT1 e GT2 com i.c. não sendo superpostas (FIGURA 14).

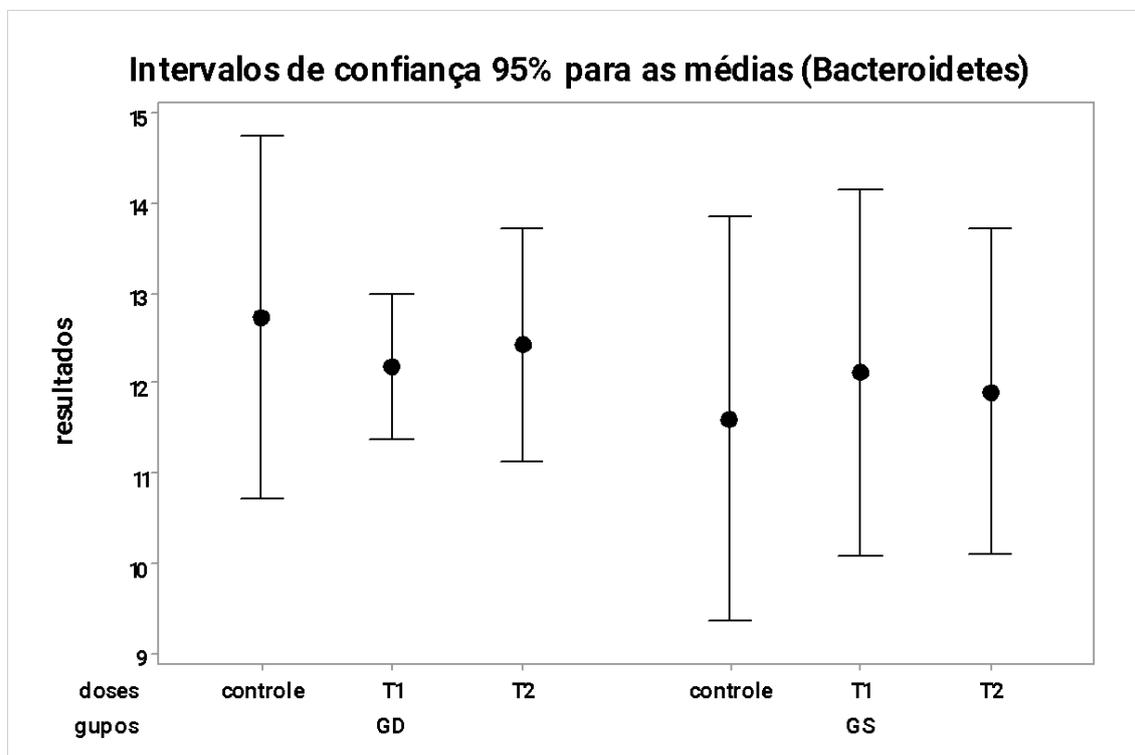
Figura 14- Representação gráfica em barras referente à média da população de Clostridium spp. expressa em Média Log UFC/ μ L (\pm DP) nos grupos CS e CD e respectivos tratamentos GT1 e GT2 (* $p > 0,01$ e ** $p > 0,05$).



5.1.5 Bacteroidetes

Para ambos os grupos (CS e CD) o Eriomin® não estimulou o crescimento de Bacteroidetes nas duas doses testadas, i.e. 95% para as médias que se apresentam superpostas entre os grupos (Figura 15).

Figura 15- Representação gráfica em barras referente à média da população de Bacteroidetes expressa em Média Log UFC/ μ L (\pm DP) nos grupos CS e CD e respectivos tratamentos GT1 e GT2 (* $p > 0,01$ e ** $p > 0,05$).

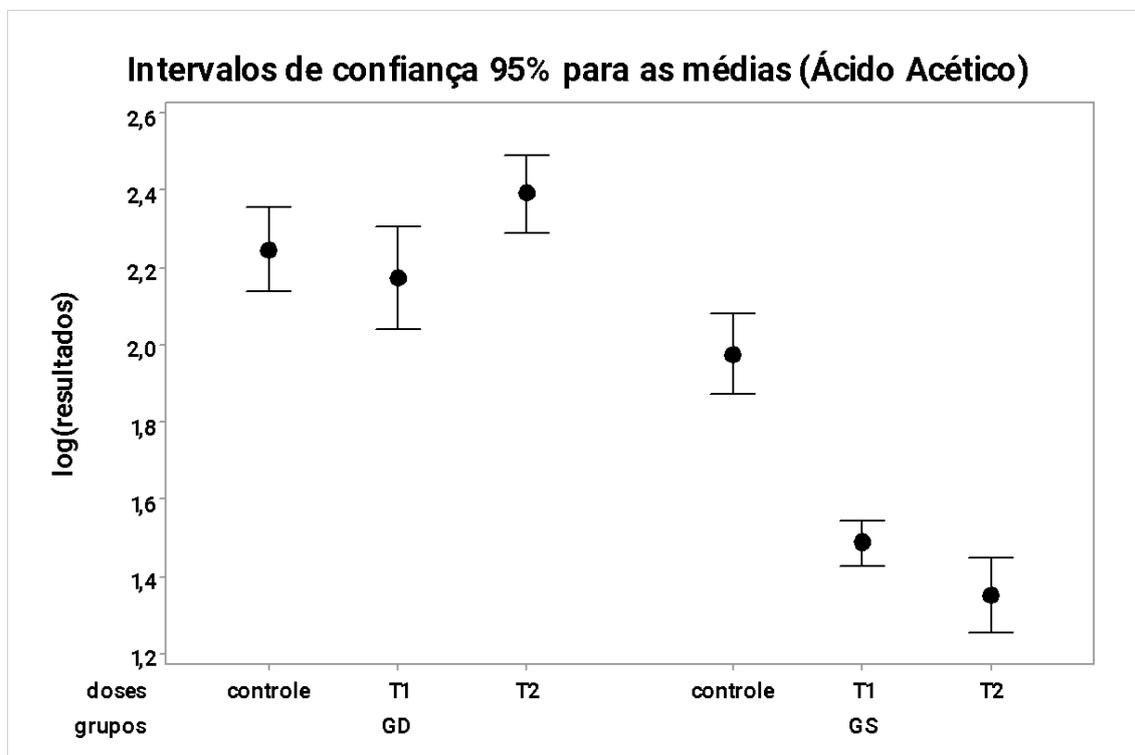


5.1.6 Ácido Acético

Quando comparado tratamentos e GSC, em cães saudáveis após o tratamento com menor dose de Eriomin® houve uma redução da concentração dos AGCC assim como para a maior dose. Demonstrando um potencial inibitório para a produção desses metabólitos em ambas as doses.

Em relação aos cães doentes, não houve diferença estatística entre os tratamentos instituídos e grupo controle. Porém ao comparar GDT1 e GDT2 houve diferença estatística, ao analisar o gráfico é possível notar um aumento de GT2 quando comparado ao GDC (Figura 16).

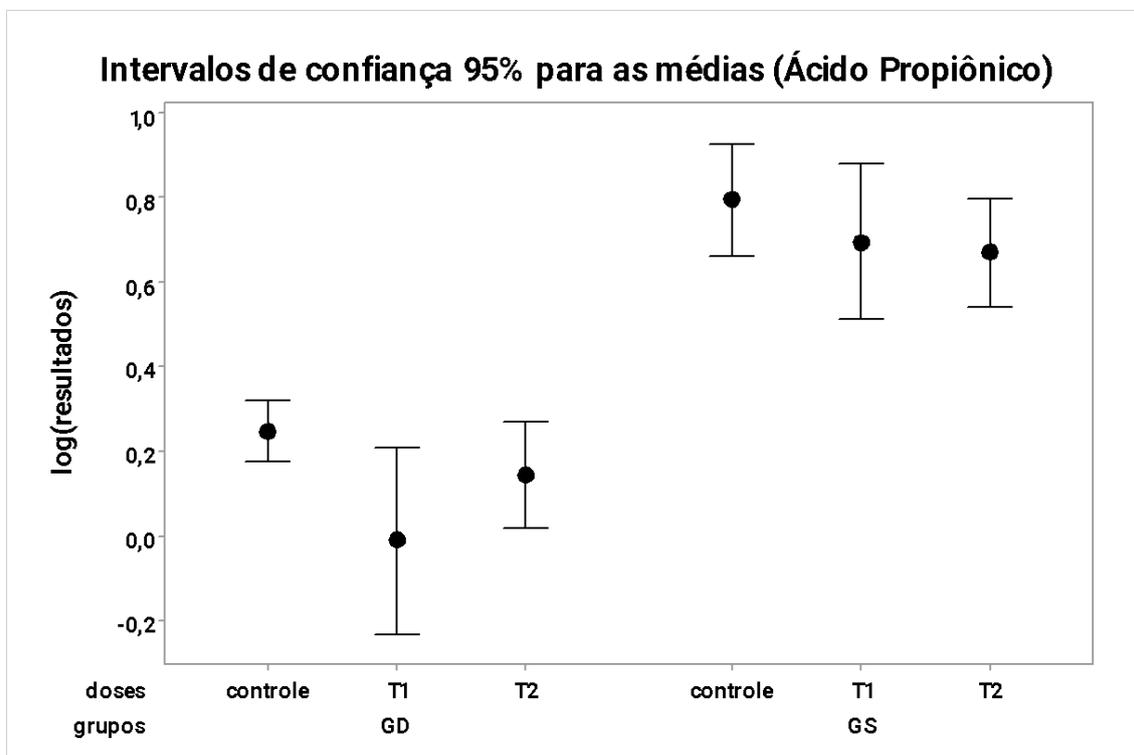
Figura 16- Representação em gráfico de barras da produção do metabólito ácido acético produzido pelas bactérias na fermentação colônica dos grupos experimentais GSC e GDC e tratamentos GT1 e GT2 dados representados pela Média (\pm DP).



5.1.7 Ácido Propiônico

Ao realizar a análise estatística, é possível concluir que o Eriomin® não exerceu influência sob a MI dos grupos CS e CD (Figura 17).

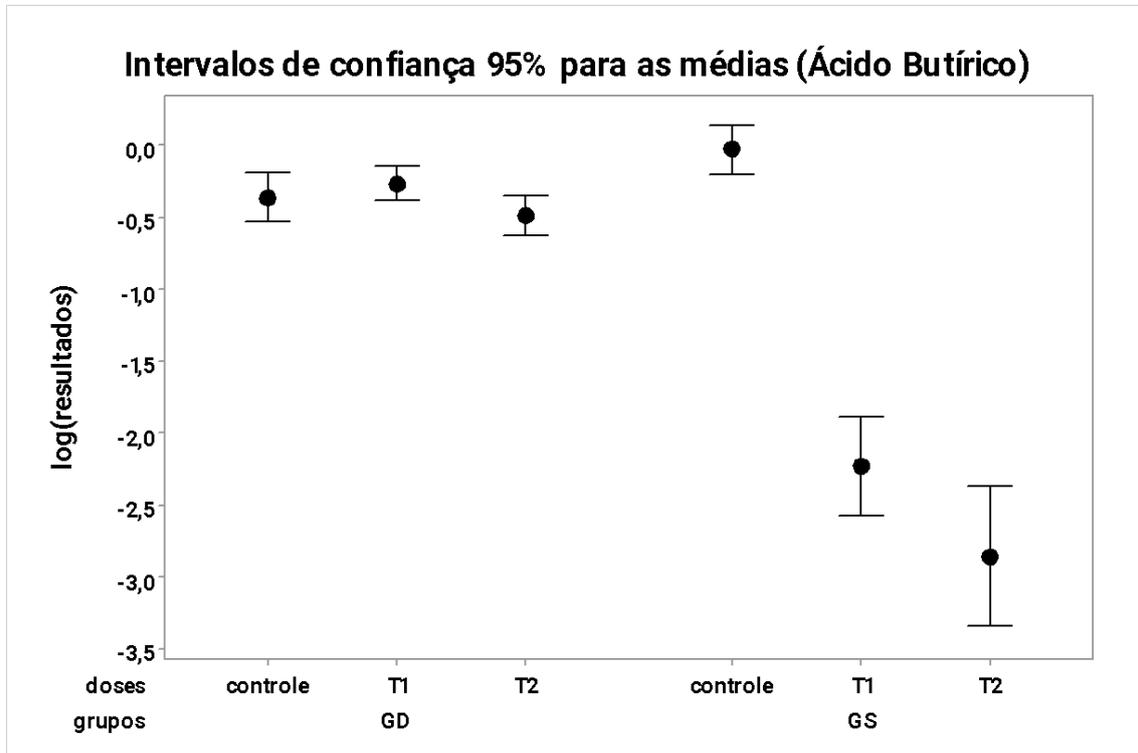
Figura 17- Representação em gráfico de barras da produção do metabólito ácido propiônico produzido pelas bactérias na fermentação colônica dos grupos experimentais GSC e GDC e tratamentos GT1 e GT2 dados representados pela Média (\pm DP).



5.1.8 Ácido Butírico

Ao instituir o tratamento com Eriomin®, GST1 e GST2 apresentaram menor concentração de ácido butírico, caracterizando um potencial de inibição da produção desse AGCC. No grupo CD não houve diferença estatística entre GDC, GDT1 e GDT2 (Figura 18).

Figura 18 - Representação em gráfico de barras da produção do metabólito ácido butírico produzido pelas bactérias na fermentação colônica dos grupos experimentais GSC e GCD e tratamentos GT1 e GT2 dados representados pela Média (\pm DP).



6 DISCUSSÃO

Ensaio *in vitro* são descritos como uma alternativa para estudo de novos produtos veterinários que tem como foco o TGI de cães, possibilitando a compreensão da metabolização e impactos na composição da MI (DESCHAMPS *et al.*, 2022). Há relatos na literatura do uso desse método aplicado ao estudo dos polifenóis, demonstrando o seu metabolismo e modulação MI, são modelos simples e estáticos, sistemas fechados que utilizam frascos selados contendo suspensões de material fecal e mantidos sob condições anaeróbias (MONTESERRAT *et al.*, 2014). Mediante as evidências da literatura, a presente pesquisa propôs uma análise a partir da fermentação colônica *in vitro* para estudar o efeito do Eriomin® na MI intestinal de cães saudáveis e posteriormente em cães com enteropatia crônica.

A análise de amostras fecais não fornece informações completas sobre a MI intestinal, como por exemplo, as bactérias aderidas à mucosa ou então as diferentes concentrações bacterianas presentes em cada segmento intestinal, além da interferência fisiológica pela ação do pH, movimentos peristálticos, muco, temperatura e tempo de permanência em cada segmento intestinal. Porém, as análises realizadas na maioria das pesquisas sobre MI são a partir das amostras fecais (SUCHODOLSKI, 2021; SENDER, 2016). Assim como grande parte das pesquisas, o presente trabalho também realizou análises a partir das amostras fecais, portanto, ao interpretar os resultados, deverá ser levado em consideração as limitações descritas anteriormente.

A cultura microbiológica é útil para algumas bactérias que são cultiváveis, porém existem limitações, uma vez que o método de cultura em placas consegue quantificar um número limitado de bactérias, como por exemplo *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Clostridium* spp. (SCHMITZ e SUCHODOLSKI, 2016). Lembrando que a maioria das bactérias intestinais, principalmente no intestino grosso, são anaeróbias e requerem meios de crescimento especiais, os métodos de cultura utilizados convencionalmente nos laboratórios de análises clínicas subestimam o número de bactérias intestinais (SUCHODOLSKI, 2021). Os métodos moleculares substituíram amplamente a cultura devido à sua capacidade de identificar bactérias não cultiváveis, assim como o sequenciamento do gene do RNA ribossômico 16S (rRNA) utilizado pela maioria dos estudos (PILA e SUCHODOLSKI, 2021).

A presente pesquisa, foi realizada a partir da cultura da MI em um meio de anaerobiose, garantindo, assim, o crescimento das bactérias *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., Bacteroidetes e Bactérias totais presentes no cólon, para avaliação da ação do Eriomin® na MI dos cães saudáveis e doentes. Apesar das limitações desse método de análise, ele permite avaliar os impactos do Eriomin® na MI de cães, o qual ainda não foi aplicado a essa espécie. Realizar o sequenciamento do gene RNA ribossômico 16s (rRNA) garantiria maior acurácia dos resultados, no entanto, por questões financeiras, não foi possível realizá-lo neste momento da pesquisa.

A partir dos grupos controle foi possível caracterizar a MI dos cães saudáveis e doentes, uma vez que não houve intervenção do Eriomin® nessas amostras. Os grupos bacterianos *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp. e Bactérias totais não apresentaram diferença estatística entre GSC e GDC.

Um ponto importante a ser discutido neste momento é a alimentação dos pacientes presentes em CS e CD, que se diferem. Enquanto os animais participantes do CS ingeriram ração comercial, os animais CD estavam se alimentando com alimentação natural. Análises metagenômicas demonstram que a composição nutricional da dieta do cão pode influenciar as populações microbianas e os metabólitos presentes no intestino (CANO e ARNA, 2024). Tanto os alimentos comerciais formulados quanto os naturais (sendo a proteína animal o principal suplemento proteico nesta modalidade) influenciam a abundância e a diversidade da MI de maneiras distintas (HUANG *et al.*, 2020).

Um estudo realizado por LI *et al.* (2017) teve como objetivo comparar diferentes proporções de proteína e carboidrato na dieta e seu impacto na MI de cães obesos e magros. Os resultados demonstraram que os macronutrientes da dieta resultaram em diferenças no perfil taxonômico da MI, principalmente dentro dos Filos Firmicutes e Bacteroidetes. Onde o primeiro apresentou-se em maior abundância, especialmente na Família *Clostridiaceae* (dentre elas, *C. perfringens*, *C. hiranunonis* e *C. butircus*), enquanto o segundo foi significativamente menos abundante em cães com dieta rica em proteína e pobre em carboidratos.

KIM *et al.*, 2017 compararam a MI de cães alimentados com uma dieta natural composta por 90% de carne crua, variando a origem da proteína (canguru, bovina, frango e pato) e 10 % de vegetais e dois tipos de ração comercial, cuja proteína bruta variava entre 18% e 21%. A análise de diversidade da MI constatou diferenças significativas entre a MI intestinal dos grupos, cães com dieta à base de alimentos naturais apresentaram maior riqueza e diversidade em comparação ao grupo que ingeriu ração comercial.

Porém, no trabalho publicado sobre o índice de disbiose (ALSHAWAQFEH *et al.*, 2017) demonstrou que esse índice não é influenciado por fatores como idade, peso corporal e sexo. A alimentação dos animais nesse estudo não foi padronizada, e os autores observaram que ela não parece interferir nas análises da MI de cães doentes e saudáveis. Os resultados obtidos corroboram com pesquisas anteriores realizadas pelos mesmos autores, reforçando que a dieta não parece ser um fator limitante para essas análises. No entanto, ressaltam a necessidade de novos estudos para investigar a influência da dieta nessas análises, mencionando a falta de padronização na alimentação dos animais participantes como um fator limitante para essa pesquisa.

Com base nas informações encontradas na literatura, conclui-se que é importante considerar a base alimentar de cada um dos grupos experimentais para realizar a comparação entre as concentrações bacterianas e a produção de metabólitos, apesar de haver relatos que a alimentação não leva a um impacto na interpretação da presença de disbiose intestinal. Contudo, esse fator não impede a análise do comportamento do Eriomin® nas diferentes situações: cães saudáveis e doentes.

Considerando que diversas doenças localizadas ou sistêmicas estão associadas à disbiose (PILLA e SCHODOLSKI, 2021) os animais do grupo experimental CS foram submetidos a uma triagem por meio de exames físicos e laboratoriais, que comprovaram um bom estado geral de saúde, excluindo assim a presença de doenças. Mediante essa constatação, foi considerado que a MI ali encontrada é uma representação da homeostase intestinal.

O polifenol utilizado no experimento demonstrou uma atividade distinta em cada grupo experimental, as mudanças observadas podem ser atribuídas ao impacto dele na MI. No entanto, não podemos concluir que as diferenças entre os grupos sejam exclusivamente decorrentes da doença, devido ao viés relacionado à alimentação. Portanto, pode ser necessária uma nova análise que padronize a alimentação dos grupos, a fim de estabelecer uma comparação mais precisa entre cães saudáveis e doentes.

Nos cães do grupo controle com enteropatia crônica participantes deste experimento as concentrações de Bifidobacterium e de Bacteroidetes foram maiores do que nos animais saudáveis, resultado que diverge das informações encontradas na literatura que descreve sobre a redução na concentração de Bacteroidetes em pacientes com disbiose intestinal (REAGAÓN, 2023).

Os Bacteroidetes são responsáveis por promover um ambiente anaeróbio no intestino (DONG *et al.*, 2022), uma maior concentração desse grupo bacteriano em GDC é interessante para a MI, pois promove um ambiente ideal para a manutenção da MI intestinal saudável. Apresentar um aumento em sua concentração após a administração do Eriomin® seria um resultado positivo, porém, não foi capaz de estimular o crescimento em ambos os grupos experimentais após sua administração.

Como pacientes com EC comumente apresentam disbiose intestinal, caracterizada pela redução do filo Firmicutes e aumento de Proteobactérias (PILLA e SUCHODOLSKI, 2021; ALSHAWAQFEH *et al.*, 2017), esperávamos resultados diferentes dos encontrados. Entretanto, os pacientes participantes do experimento apesar de diagnosticados com EC, no momento da coleta das fezes estavam com a doença controlada, a partir da alimentação específica e restrita, além da utilização de imunomoduladores para controle da inflamação intestinal, tratamento esse que corrobora com a literatura (HODEL, BRUGGER e KOOK, 2024).

A contagem das bactérias totais demonstrou que não houve diferença estatística entre grupos GSC e GDC. Alshawaqfeh e seus colaboradores em 2017, demonstrou que existe uma diferença significativamente maior das bactérias totais em cães doentes do que em cães saudáveis, portanto, esse é mais um indício que os cães participantes do grupo CD não apresentam disbiose.

Em relação à resposta aos tratamentos com o polifenol, a não indução do crescimento desse grupo bacteriano pode ser considerada um efeito positivo. Isso se deve ao fato de que incluem bactérias que não são benéficas para o hospedeiro e podem causar alterações indesejadas (ALSHAWAQFEH *et al.*, 2017). Assim, ao não estimular o crescimento dessas bactérias, o Eriomin® demonstra que não induziu efeitos deletérios sobre a MI intestinal

Através dos dados levantamos a hipótese que a MI dos animais com EC está em equilíbrio decorrente da resposta ao tratamento instituído. Mudanças na MI mediante progressão ou controle da doença são esperadas e descritas pela literatura (JERGENS e HEILMANN, 2022), havendo a possibilidade de acompanhá-las com índice de disbiose proposto por ALSHAWAQFEH *et al.*, 2017. Porém, como não executamos o sequenciamento genético dessas amostras, não há como comprovarmos essa hipótese.

O Consenso de Prebióticos publicado em 2017 descreve os flavonóides, dentro deles a eriocitrina, como agentes prebióticos devido sua estrutura e ação benéfica a partir da metabolização microbiana resultando na produção de metabólitos. Diversos estudos apontam os efeitos benéficos dos flavonóides para a MI intestinal, além do controle da inflamação intestinal (MOSELE, MACIÀ e MOTILVA, 2015; STEVENS *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2022), que é atribuído pela inibição da secreção de citocinas inflamatórias (LI *et al.*, 2022). Mediante os resultados positivos da eriocitrina nesses estudos, foi criada a hipótese da sua ação benéfica para cães, motivando a realização da presente pesquisa almejando compreender e identificar a ação prebiótica do Eriomin® para esses animais.

Segundo a literatura, os prebióticos devem estimular o crescimento de bactérias como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. as quais têm grande capacidade de produzir os AGCC (GIBISON, 2017; DAVARI *et al.*, 2019; PERINI *et al.*, 2023).

Um estudo realizado por ATUAHENE *et al.* 2024 analisou os efeitos da Bromelina, Lentinula edodes e Quercitina (flavonóide) na MI de cães saudáveis *in vivo*, que provocou o aumento da concentração de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.

e levou ao aumento da produção de AGCC, sendo considerado, portanto, como um prebiótico.

No presente estudo, observou-se que nos grupos onde foram administrados o Eriomin® *in vitro* houve um aumento da concentração de *Lactobacillus spp.* Em CS ambas as doses estimularam o crescimento, já no grupo CD apenas a maior dose promoveu o crescimento.

Além disso, o aumento da concentração de *Bifidobacterium spp.* foi observado somente em CS. Ao analisar as concentrações bacterianas, conclui-se que o composto apresentou propriedades prebióticas na MI em ambos os grupos experimentais. No entanto, o estímulo ao crescimento de *Bifidobacterium spp.* foi significativo apenas em cães saudáveis, demonstrando uma resposta diferente entre os grupos.

Na literatura é descrito que um prebiótico pode ter ação seletiva para aumento da concentração de certas bactérias, como por exemplo FOS e MOS promovem proliferação de *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, enquanto GOS e inulina favorecem apenas *Bifidobacterium spp.* (PERINI *et al.*, 2018)

Neste momento, surge uma questão importante: o Eriomin® promoveu o crescimento de diferentes grupos bacterianos nos diferentes grupos experimentais?

Uma hipótese que levantamos em relação ao grupo CD é que a eriocitrina possa ter contribuído para normalizar a concentração de *Lactobacillus spp.* na MI intestinal dos cães doentes, uma vez que não houve estímulo para a produção de AGCC nesse grupo experimental. Isso sugere que, em vez de promover um aumento desse microrganismo, o polifenol pode ter facilitado a homeostase do ambiente intestinal. Porém, a única maneira de comprovarmos essa teoria seria realizando o sequenciamento genético das amostras.

O polifenol analisado nesta pesquisa apresentou melhor impacto sob a MI quando administrado em sua maior dose (0,0014g), entretanto os resultados encontrados, não correspondem com aqueles relatados em literatura, que descrevem melhores resultados mediante menores doses administradas.

A eficácia da eriocitrina em menores doses foi descrita por FERREIRA *et al.*, 2020 e GALVEZ *et al.*, 2021. Diversos estudos relatam efeitos benéficos dos compostos fenólicos, eriocitrina, em relação a saúde intestinal. Alguns sugerem que o consumo contínuo de doses mais baixas de eriocitrina pode exercer efeitos benéficos à saúde (GALVEZ *et al.*, 2021), efeitos antioxidantes no lúmen gastrointestinal reduzindo efeitos deletérios provocados por radicais livres ao epitélio e em nível celular (MOSELE, MACIÀ e MOTILVA, 2015), e que a adição de eriocitrina à dieta altera os metabólitos flavonóides em cólon de camundongos, levando a uma alteração da MI e aumentando a produção de ácidos graxos de cadeia curta (MENG, 2023).

A proantocianidina, um polifenol, foi avaliada por SCARSELLA *et al.*, 2020 na MI intestinal de cães. As modificações na abundância relativa dos táxons da MI variaram entre as doses, mostrando que a dose mais alta induz mudanças mais significativas. Esse resultado é consistente com o encontrado no presente estudo, onde uma maior concentração de eriocitrina promoveu o crescimento bacteriano. Isso sugere que cães podem necessitar de doses mais elevadas de polifenóis em comparação com humanos ou roedores.

Outra consideração a ser feita em relação às doses é que o Eriomin® se mostrou dose/dependente, não promovendo modificação na MI intestinal dos cães na menor concentração.

Porém ainda é necessário aumentar a acurácia desses resultados para confirmação. Lembrando que, para concluir a atividade prebiótica de um composto, é necessário realizar a avaliação de toda a diversidade microbiana e não apenas basear a análise no aumento da abundância de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (GIBISON, 2017).

Em relação ao *Clostridium* spp., não houve diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e tratamentos, ou seja, a eriocitrina não estimulou ou reduziu sua concentração na MI. Porém ao comparar as doses administradas no grupo CS, houve diferença estatística entre elas, ressaltando mais uma vez a evidência do Eriomin® ter um efeito dose/dependente.

Geralmente esse gênero está associado a patógenos, porém é importante lembrar que o *Clostridium hiranunonis* em cães, é o principal conversor de ácidos biliares primários em secundários. Devido a essa importante função, uma diminuição em sua abundância pode levar a mudanças na MI intestinal, o que é muito comum de acontecer nas EC. Diversos estudos demonstram que a diminuição de sua abundância está relacionada à disbiose. Por outro lado, o crescimento exacerbado de *Clostridium difficile* está sendo relacionado à disbiose (SUCHODOLSKI, 2021).

Portanto, não estimular o crescimento de *Clostridium spp.* é um ponto positivo para o Eriomin® uma vez que dentro deste filo existem diversas cepas patogênicas (SUCHODOLSKI, 2021). Por outro lado, seria interessante concluir qual é o efeito dele em relação às espécies de *Clostridium spp.*

MOSELE, MACIÀ e MOTILVA (2015) relatam que a ausência de diferenças a nível de filo não implica necessariamente a falta de efeitos prebióticos. Muitas vezes, essas mudanças se tornam evidentes em níveis mais específicos, como classe, família, gênero ou espécie.

Por esse motivo, seria importante realizar a análise filogenética das bactérias e dos metabólitos produzidos (SUCHODOLSKI, 2021). Se o Eriomin® demonstrar a capacidade de normalizar a presença de *C. hiranunonis* em cães com EC, isso poderá indicar uma ação prebiótica significativa, especialmente em casos de DII. Essa investigação ajudaria a esclarecer o impacto do polifenol na MI intestinal e seus possíveis benefícios para a saúde dos cães.

Os resultados encontrados referentes ao aumento de *Lactobacillos spp.* e *Bifidobacterium spp.* corroboram com o resultado descrito por MENG em 2023, em um experimento realizado com camundongos, onde notou um aumento do filo Firmicutes e Actinobactérias na presença da eriocitrina. Por outro lado, o mesmo estudo relata que a eriocitrina reduziu o crescimento de Bacteroidetes, diferente do experimento executado nesta pesquisa, onde não houve influência sobre eles.

Um estudo realizado por BARITUGO *et al.*, 2023 demonstrou que, geralmente, os níveis AGCC são mais elevados em animais saudáveis do que naqueles com EC,

uma vez que essa condição reduz a diversidade da MI, diminuindo as cepas produtoras de AGCC.

Ao comparar a produção de AGCC nos grupos controle (GSC e GDC), observou-se que, em cães doentes, houve uma maior concentração de ácido acético em comparação aos animais saudáveis. Em contrapartida, as concentrações de ácido propiônico e butírico foram maiores nos cães saudáveis.

Assim como ocorre com os grupos bacterianos, a alimentação também influencia na produção dos AGCC. Por exemplo, a concentração de acetato e propionato apresenta uma correlação positiva com a quantidade de fibra na dieta (SCARSELLA *et al.*,2020). Portanto, as diferenças nas concentrações de AGCC observadas entre os grupos controle não podem ser atribuídas exclusivamente a presença ou ausência de EC.

Os resultados desta pesquisa indicam que o Eriomin® acarretou uma influência positiva nos microorganismos que compõem a MI tanto de cães saudáveis quanto de cães com EC, sugerindo que esse composto exerce uma função prebiótica, justificando novas pesquisas para potencialmente ser destinado aos cães.

Porém, ao analisar os metabólitos gerados na presença do flavonóide cítrico nota-se que a produção dos AGCC não foi estimulada em nenhuma dose utilizada nas duas categorias de cães avaliados. Além de apresentar um potencial inibitório para a produção de ácido acético e ácido butírico em cães saudáveis

Uma das principais funções de um prebiótico é estimular a produção AGCC, sendo os principais aqueles que foram analisados neste experimento (GIBSON, 2017). No estudo realizado por Meng (2023), foi descrito que a eriocitrina pode aumentar significativamente as concentrações de butirato, porém nenhuma diferença estatística foi observada em relação ao acetato e propionato. Essas informações corroboram em parte com os presentes resultados, uma vez que o propionato não foi estimulado em ambos os grupos experimentais e o butirato foi inibido em CS e não sofreu influência em CD.

Como mencionado anteriormente, a ausência de influência na produção de metabólitos pelo grupo CD reforça a hipótese de que a normalização da concentração

de *Lactobacillus spp.* na MI de cães com EC pode estar relacionada à ação do Eriomin®. Isso sugere que o composto pode ter promovido uma homeostase na MI desse grupo, exercendo sua função prebiótica.

O impacto da redução da produção de AGCC em cães saudáveis é uma questão que merece investigação, pois pode trazer malefícios à saúde do animal. Os AGCC são fundamentais para o bem-estar dos cães, por exemplo, o acetato é absorvido e transportado por todo o organismo pela veia porta, servindo como fonte de energia para os tecidos. O propionato, por sua vez, é convertido em glicose pelo fígado, enquanto o butirato é um dos produtos da fermentação mais importantes para a saúde intestinal, sendo a principal fonte de energia para os colonócitos (DONADELLI, TITGEMEYER e ALDRICH, 2019). Além disso, o butirato desempenha um papel crucial na prevenção do câncer de cólon e influencia diversas funções celulares que afetam a saúde do cólon, como as vias anticarcinogênicas e anti-inflamatórias, responsáveis por reduzir o estresse oxidativo. Ele também é reconhecido como um coadjuvante importante na melhoria dos sintomas de DII e na promoção da saciedade. Portanto, a redução na produção de AGCC pode ter consequências significativas e deve ser cuidadosamente monitorada (DONADELLI, TITGEMEYER e ALDRICH, 2019).

Realizar um novo experimento utilizando doses maiores do Eriomin® para avaliar a resposta da MI seria interessante, pois assim será possível avaliar se há um maior estímulo ao crescimento dos microorganismos e à produção de metabólitos.

7 CONCLUSÃO

O aumento de *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* em animais saudáveis após o tratamento com Eriomin® é um forte indicativo de sua função prebiótica. No entanto, a análise dos AGCC revela um resultado preocupante: observou-se uma redução na concentração de AGCC após sua administração, com efeitos adversos mais evidentes em doses mais elevadas. Isso levanta a questão sobre os benefícios reais da eriocitrina para a MI de cães.

O método de fermentação *in vitro* utilizado permitiu a avaliação dos efeitos do Eriomin na MI de cães, promovendo a compreensão da ação desse composto antes de realizar sua aplicação *in vivo*. Métodos *in vitro* são grandes alternativas para o desenvolvimento de novos produtos para o mercado veterinário, promovendo maior segurança para estudos realizados.

Para os animais doentes, o tratamento aparentemente contribuiu para normalizar a concentração de *Lactobacillus spp.* e não provocou redução nas concentrações de AGCC. Futuros estudos devem considerar a utilização de diferentes doses e a realização do sequenciamento do gene RNA ribossômico 16s (rRNA), além de uma padronização adequada entre os grupos doentes e saudáveis.

Mais pesquisas sobre a eriocitrina em cães são necessárias para estabelecer sua relação com a MI. Embora os resultados iniciais sejam promissores ao estimular microrganismos considerados benéficos, o potencial de redução dos AGCC não pode ser ignorado e merece uma investigação mais aprofundada.

8 Referências

ALSHAWAQFEH, M. K. et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 11, 1 nov. 2017.

ATUAHENE, D. et al. The Canine Gut Health: The Impact of a New Feed Supplement on Microbiota Composition. *Animals*, v. 14, n. 8, 1 abr. 2024.

ÁVILA-GÁLVEZ, M. Á. et al. New insights into the metabolism of the flavanones eriocitrin and hesperidin: A comparative human pharmacokinetic study. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 1–20, 1 mar. 2021.

BARROS DE MEDEIROS, Viviane Priscila *et al*, *Spirulina platensis* biomass enhances the proliferation rate of *Lactobacillus acidophilus* 5 (La-5) and combined with La-5 impact the gut MI of medium-age healthy individuals through an *in vitro* gut microbiome model, **Food Research International**, v. 154, n. October 2021, p. 110880, 2022.

BLAKE, A. B.; SUCHODOLSKI, J. S. Importance of gut MI for the health and disease of dogs and cats. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 3, p. 37–42, 1 jul. 2016.

CANDELLONE, A. et al. Acute diarrhea in dogs: Current management and potential role of dietary polyphenols supplementation. *Antioxidants*MDPI, , 1 ago. 2020.

CESAR, T. B.; RAMOS, F. M. M.; RIBEIRO, C. B. Nutraceutical Eriocitrin (Eriomin®) Reduces Hyperglycemia by Increasing Glucagon-Like Peptide 1 and Downregulates Systemic Inflammation: A Crossover-Randomized Clinical Trial. **Journal of Medicinal Food**, v. 25, n. 11, p. 1050–1058, 1 nov. 2022.

DANDRIEUX, J. R. S. Inflammatory bowel disease versus chronic enteropathy in dogs: are they one and the same? *Journal of Small Animal Practice*Blackwell Publishing Ltd, , 1 nov. 2016.

DAVANI-DAVARI, D. et al. **Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications.** *Foods*MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , 1 mar. 2019.

DESCHAMPS, C. et al. **From Chihuahua to Saint-Bernard: how did digestion and MI evolve with dog sizes.** *International Journal of Biological Sciences* Ivyspring International Publisher, , 2022.

DESCHAMPS, C. et al. In Vitro Models of the Canine Digestive Tract as an Alternative to In Vivo Assays: Advances and Current Challenges. *AltexALTEX Edition*, , 2022.

DÍAZ-REGAÑÓN, D. et al. Characterization of the Fecal and Mucosa-Associated MI in Dogs with Chronic Inflammatory Enteropathy. 2023.

DONADELLI, R. A.; TITGEMEYER, E. C.; ALDRICH, C. G. Organic matter disappearance and production of short- and branched-chain fatty acids from selected fiber sources used in pet foods by a canine in vitro fermentation model. *Journal of Animal Science*, v. 97, n. 11, p. 4532–4539, 4 nov. 2019.

DONG, B.; GAZZANO, A.; GARRIGUES, Q. **Gut MI development in the growing dog: A dynamic process influenced by maternal, environmental and host factors.** [s.l: s.n.].

DUEÑAS, M. et al. **A survey of modulation of gut MI by dietary polyphenols.** *BioMed Research International* Hindawi Publishing Corporation, , 22 fev. 2015.

FERREIRA, P. S. et al. Low doses of eriocitrin attenuate metabolic impairment of glucose and lipids in ongoing obesogenic diet in mice. *Journal of Nutritional Science*, 2020.

FERREIRA, P. S. et al. Pharmacokinetics and Biodistribution of Eriocitrin in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 69, n. 6, p. 1796–1805, 17 fev. 2021

GHYSELINK, J., Verstrepen, L., Moens, F., Van Den Abbeele, P., Bruggeman, A., Said, J., Smith, B., Barker, L. A., Jordan, C., Leta, V., Chaudhuri, K. R., Basit, A. W., & Gaisford, S. (2021). Influence of probiotic bacteria on gut MI composition and gut wall function in an in-vitro model in patients with Parkinson's disease. *International journal of pharmaceutics*: X, 3, 100087.

GIARETTA, P. R. et al. Bacterial Biogeography of the Colon in Dogs With Chronic Inflammatory Enteropathy. *Veterinary Pathology*, v. 57, n. 2, p. 258–265, 1 mar. 2020

GIBSON, G. R. et al. **Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics.** *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* Nature Publishing Group, , 1 ago. 2017.

GUO, G. et al. Anti-inflammatory effects of eriocitrin against the dextran sulfate sodium–induced experimental colitis in murine model. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 33, n. 11, 1 nov. 2019.

HASHIMOTO-HILL, Seika; ALENGHAT, Theresa. Inflammation-Associated MI Composition Across Domestic Animals. *Frontiers in Genetics*, v. 12, n. June, 2021.

HEILMANN, Romy M.; STEINER, Jörg M. Clinical utility of currently available biomarkers in inflammatory enteropathies of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.32, n. 5, p. 1495–1508, 2018.

HODEL, S.; BRUGGER, D.; KOOK, P. H. Long-term evaluation of the initial response to therapy in 60 dogs with chronic inflammatory enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1 set. 2024.

HUANG, Z. et al. The canine gastrointestinal microbiota: early studies and research frontiers. *Gut Microbes* Taylor and Francis Inc., , 3 jul. 2020.

JACKSON, M. I. et al. **Canine chronic enteropathy—Current state-of-the-art and emerging concepts.** [s.l: s.n.].

JACKSON, M. I. et al. Canine chronic enteropathy—Current state-of-the-art and emerging concepts. [s.l: s.n.].

JARETT, Jessica K.; KINGSBURY, Dawn D.; DAHLHAUSEN, Katherine E.; *et al.* Best Practices for Microbiome Study Design in Companion Animal Research. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 8, n. April, p. 1–15, 2021.

JEWELL, Dennis E. *et al.*, Feeding Fiber-Bound Polyphenol Ingredients at Different Levels Modulates Colonic Postbiotics to Improve Gut Health in Cats, *Animals*, v. 12, n.13, p. 1–12, 2022.

KAWABATA, A. et al. **Citrus kawachiensis Peel Powder Reduces Intestinal Barrier Defects and Inflammation in Colitic Mice.** [s.l: s.n.]. v. 66

KIM, H. S.; TITGEMEYER, E. C.; ALDRICH, C. G. Evaluation of Fermentability of Whole Soybeans and Soybean Oligosaccharides by a Canine In Vitro Fermentation Model. *Fermentation*, v. 9, n. 5, 1 maio 2023.

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

KOPPER, Jamie J. *et al.*, Harnessing the Biology of Canine Intestinal Organoids to Heighten Understanding of Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis and Accelerate Drug Discovery: A One Health Approach, **Frontiers in Toxicology**, v. 3, n. November, p. 1–13, 2021.

LI, Q. et al. Effects of the dietary protein and carbohydrate ratio on gut microbiomes in dogs of different body conditions. *mBio*, v. 8, n. 1, 1 jan. 2017.

MENG, X. et al. Metabolism of eriocitrin in the gut and its regulation on gut MI in mice. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 12 jan. 2023.

MOSELE, J. I.; MACIÀ, A.; MOTILVA, M. J. **Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: A review.** *Molecules* MDPI AG, , 1 set. 2015.

NAIR, A.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

PÉREZ-BURILLO, S., Molino, S., Navajas-Porras, B., Valverde-Moya, Á. J., Hinojosa-Nogueira, D., López-Maldonado, A., Pastoriza, S., & Rufián-Henares, J. Á. (2021). An in vitro batch fermentation protocol for studying the contribution of food to gut MI composition and functionality. *Nature protocols*, 16(7), 3186–3209.

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. S. **The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet.** *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* W.B. Saunders, , 1 maio 2021.

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. S. **The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease.** *Frontiers in Veterinary Science*Frontiers Media S.A., , 14 jan. 2020.

REDDY, Kondreddy Eswar; KIM, Hye Ran; JEONG, Jin Young; *et al.* Impact of breed on the fecal microbiome of dogs under the same dietary condition. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 1947–1956, 2019

RUIZ-CANO, D.; ARNAO, M. B. Beneficial Effects of Nutraceuticals, Especially Polyphenols on Canine Health. *Pets*, v. 1, n. 3, p. 228–254, 28 set. 2024.

SAINI, R. K. *et al.* **Bioactive Compounds of Citrus Fruits: A Review of Composition and Health Benefits of Carotenoids, Flavonoids, Limonoids, and Terpenes.** *Antioxidants*MDPI, , 1 fev. 2022.

SCARSELLA, E. *et al.* Interplay between neuroendocrine biomarkers and gut microbiota in dogs supplemented with grape proanthocyanidins: Results of dietary intervention study. *Animals*, v. 10, n. 3, 1 mar. 2020

SCHMITZ, S.; SUCHODOLSKI, J. **Understanding the canine intestinal MI and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence?** *Veterinary Medicine and Science*Wiley-Blackwell, , 1 maio 2016

SENDER, Ron; FUCHS, Shai; MILO, Ron. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS Biology**, v. 14, n. 8, p. 1–14, 2016.

STEVENS, Yala *et al.*, The intestinal fate of citrus flavanones and their effects on gastrointestinal health, **Nutrients**, v. 11, n. 7, 2019.

SUCHODOLSKI, J. S. **Analysis of the gut microbiome in dogs and cats.** *Veterinary Clinical Pathology*American Society for Veterinary Clinical Pathology, , 1 fev. 2022.

SUCHODOLSKI, J. S. **Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats.** *Veterinary Journal*Bailliere Tindall Ltd, , 1 set. 2016.

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

WHITE, Robin; ATHERLY, Todd; GUARD, Blake; *et al.* Randomized, controlled trial evaluating the effect of multi-strain probiotic on the mucosal MI in canine idiopathic inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, v. 8, n. 5, p. 451–466, 2017.

YAO, L. *et al.* **Eriocitrin: A review of pharmacological effects.** **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson s.r.l., , 1 out. 2022.

YOU, I. W.; KIM, M. J. Comparison of gut MI of 96 healthy dogs by individual traits: Breed, age, and body condition score. **Animals**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2021.

ZIESE, Anna Lena; SUCHODOLSKI, Jan S. Impact of Changes in Gastrointestinal MI in Canine and Feline Digestive Diseases. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 51, n. 1, p. 155–169, 2021

9. ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do comitê de ética no uso de animais (CEUA)

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Parecer do projeto sob o protocolo: 068.22

Título do Projeto: "Efeito de flavonóides sobre a microbiota intestinal de cães com disbiose. Estudo *in vitro*".

Pesquisador responsável: Manoela Munhoz Colombo

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito de flavonóides sobre a microbiota intestinal de cães com disbiose. Estudo *in vitro*", sob orientação da discente de Pós-Graduação Manoela Munhoz Colombo e colaboração do Prof. Dr. André Capaldo Amaral, Profa. Dra. Kátia Siveri e Ingrid Cristina Saldanha foi analisado por este Comitê.

O trabalho tem por objetivo, "avaliar os efeitos de flavonóides cítricos sobre a microbiota intestinal de cães com disbiose utilizando um modelo *in vitro* de microbioma intestinal. Através do procedimento de colonoscopia será realizada uma coleta *in loco* da microbiota presente em cólon ascendente. Almeja-se, com a confirmação do sucesso do método proposto, elevar a confiabilidade e acurácia das pesquisas científicas que utilizam a referida microbiota em experimentos *in vitro*".

Para isso "*serão utilizados 4 cães machos e fêmeas, de idade de 1 a 15 anos, com peso médio de 4 a 45kg.*"

A análise do referido projeto encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** em situação de *ad referendum* por este Comitê, devendo ser reparado o seguinte ponto:

- Quando não se aplicar a metodologia, escrever "**NÃO SE APLICA**".

Os autores, ao concluírem o trabalho devem encaminhar ao CEUA-UNIARA o Relatório Final de Atividades, na íntegra contendo os resultados e conclusões obtidas.

Araraquara, 07 de dezembro de 2022.

Relator/Colegiado