

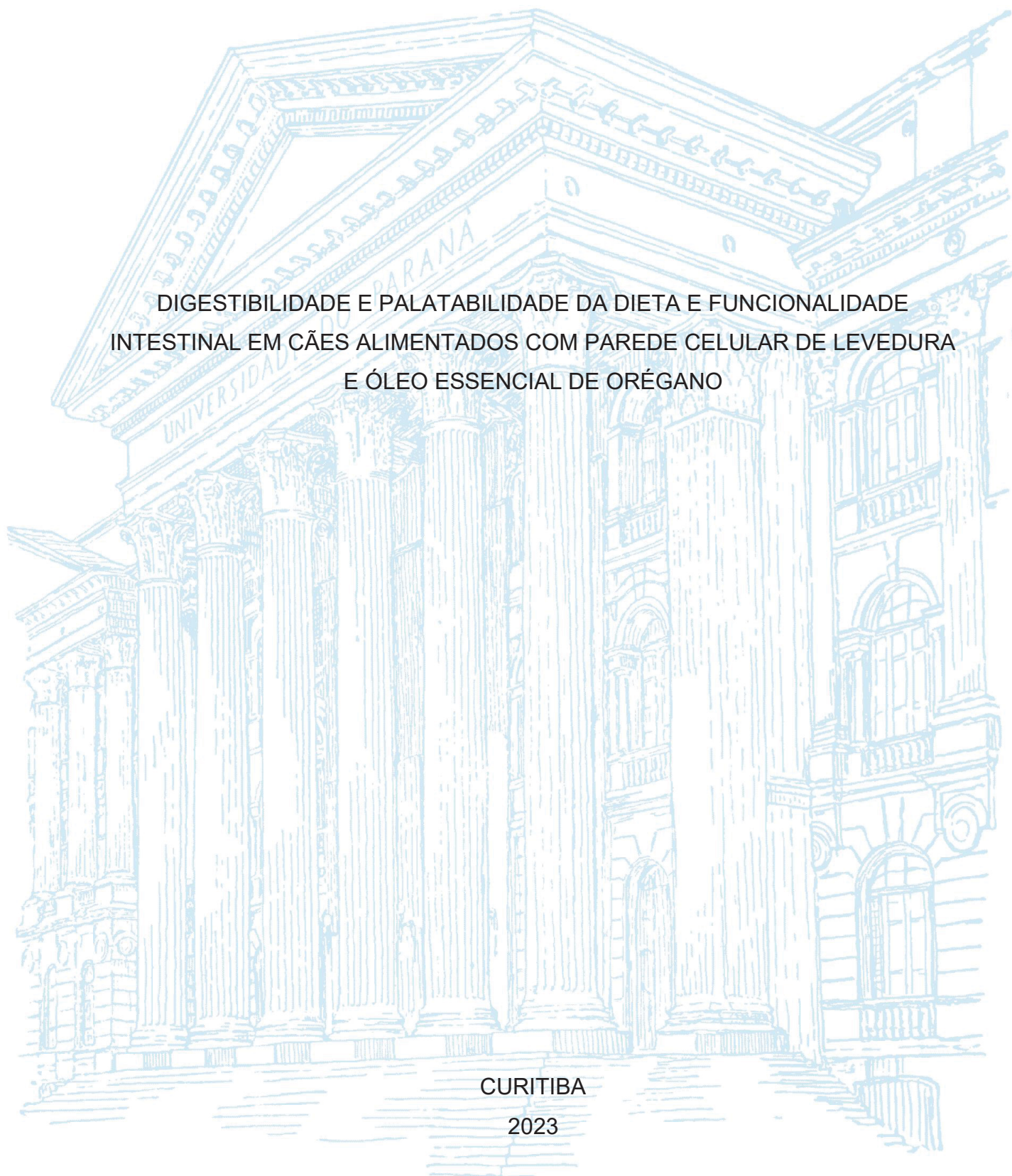
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NAYARA MOTA MIRANDA SOARES

DIGESTIBILIDADE E PALATABILIDADE DA DIETA E FUNCIONALIDADE  
INTESTINAL EM CÃES ALIMENTADOS COM PAREDE CELULAR DE LEVEDURA  
E ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

CURITIBA

2023



NAYARA MOTA MIRANDA SOARES

DIGESTIBILIDADE E PALATABILIDADE DA DIETA E FUNCIONALIDADE  
INTESTINAL EM CÃES ALIMENTADOS COM PAREDE CELULAR DE LEVEDURA  
E ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Profa. Dra. Ananda Portella Félix

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Soares, Nayara Mota Miranda

Digestibilidade e palatabilidade da dieta e funcionalidade intestinal em cães alimentados com parede celular de levedura e óleo essencial de orégano / Nayara Mota Miranda Soares. – Curitiba, 2023.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Profª Drª Ananda Portella Félix

1. Prebióticos. 2. Microbiota. 3. Aditivos. 4. Cães. I. Félix, Ananda Portella. II. Universidade Federal do Paraná. Programa Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NAYARA MOTA MIRANDA SOARES** intitulada: **Digestibilidade e palatabilidade da dieta e funcionalidade intestinal em cães alimentados com parede celular de levedura e óleo essencial de orégano**, sob orientação da Profa. Dra. ANANDA PORTELLA FÉLIX, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de Fevereiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

15/02/2023 08:10:05.0

ANANDA PORTELLA FÉLIX

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

15/02/2023 12:56:03.0

SIMONE GISELE DE OLIVEIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/02/2023 12:25:34.0

MÁRCIA DE OLIVEIRA SAMPAIO GOMES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Dedico este trabalho aos  
meus pais, Sueli e Roque,  
e ao meu irmão, Guilherme.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roque e Sueli, e ao meu irmão, Guilherme, por todo apoio, incentivo e confiança. Vocês são essenciais em minha vida. Obrigada por tudo.

Ao meu namorado, Lucas, pelo apoio, confiança e cumplicidade. Obrigada por permanecer ao meu lado independentemente da situação e por me apoiar nas diversas escolhas realizadas.

A toda minha família, pela participação sempre que possível.

Aos meus amigos da graduação, escola e de infância, por estarem acompanhando essa trajetória, mesmo que de longe.

Aos amigos da pós-graduação e a toda equipe do LENCAN, pelo auxílio, trabalho em equipe e companheirismo durante os anos.

À minha professora orientadora Dra. Ananda Félix, pelos ensinamentos, conversas e pela impecável orientação. Agradeço imensamente por estar sempre presente e disposta a ajudar.

A todos os professores que participaram dessa caminhada, contribuindo para minha formação profissional, acadêmica e pessoal.

Ao Departamento de Nutrição Animal da University of Zagreb, em especial a professora Dra. Diana Brozić. Agradeço por todo conhecimento transmitido e por terem me recepcionado tão bem desde o meu primeiro dia no departamento.

Aos cães do LENCAN. Obrigada por alegrarem os meus dias com seus jeitos tão adoráveis, carinhosos e únicos.

Aos animais, em especial aos meus cães Maya e Thor (*in memoriam*).

À Alltech pelo apoio e financiamento do estudo.

À CAPES, pelo apoio ao estudo.

A todos aqueles que, em algum momento, participaram desta trajetória.

“O conhecimento é o alimento da alma.” (PLATÃO)

## RESUMO

A eubiose intestinal e a nutrição balanceada são alguns dos requerimentos básicos para a funcionalidade intestinal. É de extrema importância que os animais se encontrem adequadamente nutridos e com a microbiota intestinal em equilíbrio para a manutenção dos processos fisiológicos. Para otimizar a funcionalidade intestinal, a inclusão de aditivos na dieta, como parede celular de leveduras e óleos essenciais, mostram-se de grande valia. A parede celular de leveduras apresenta  $\beta$ -glucanas e mananligossacarídeo (MOS) em sua composição. As  $\beta$ -glucanas e o MOS podem modular a microbiota intestinal por meio da fermentação seletiva e aderência às fímbrias do tipo I presentes em algumas bactérias (MOS) e modulação do sistema imune associado ao intestino ( $\beta$ -glucanas e MOS). Já os óleos essenciais, que são compostos bioativos extraídos de diferentes partes das plantas, apresentam diversas funções importantes para o animal, como efeito antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano e melhoria da funcionalidade intestinal. Dentre eles, o óleo essencial de orégano é composto principalmente pelos isômeros fenólicos carvacrol e timol, os quais possuem amplo espectro de ação nas estruturas bacterianas. Diante disso, objetivou-se avaliar os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e palatabilidade da dieta e a funcionalidade intestinal em cães alimentados com parede celular de levedura e óleo essencial de orégano. Para isso, foram avaliadas três dietas secas extrusadas para cães adultos contendo 0 (dieta controle), 1,5 e 3,0 kg/ton de um blend de parede celular de levedura e óleo essencial de orégano (PCO). Foram utilizados 18 cães adultos, sendo alimentados durante 20 dias com as dietas experimentais. Houve redução na palatabilidade da dieta com a inclusão de 1,5 e 3,0 kg/ton de PCO ( $P < 0,05$ ), embora não tenha ocorrido recusa por nenhuma das dietas. O CDA da MS diminuiu com a inclusão de 3,0 kg/ton de PCO em comparação com a dieta controle ( $P < 0,05$ ). Foi encontrada redução do odor fecal dos animais alimentados com as dietas contendo PCO ( $P < 0,05$ ). Além disso, houve aumento na concentração de putrescina e cadaverina e redução na histamina e amônia ( $P < 0,05$ ) nas fezes dos cães alimentados com a dieta contendo 3,0 kg/ton de PCO. Por fim, houve aumento na diversidade bacteriana intestinal dos cães alimentados com ambas as concentrações de PCO avaliadas ( $P < 0,05$ ), dado aumento nas concentrações de *Blautia* e *Faecalibacterium* e redução de *Streptococcus* ( $P < 0,05$ ), em comparação com o grupo controle. Concluindo, o blend de PCO promove uma melhoria de indicadores da funcionalidade intestinal, dada a modulação de microrganismos considerados benéficos e a redução de alguns produtos de fermentação intestinal.

Palavras-chave: Aditivos. Funcionalidade intestinal. Microbiota. Prebiótico.



## ABSTRACT

Gut eubiosis and balanced nutrition are some of the basic requirements for intestinal functionality. It is of paramount importance that the animals are adequately nourished and that the intestinal microbiota are in balance for the maintenance of physiological processes. To optimize intestinal functionality, the inclusion of additives in the diet, such as yeast cell wall and essential oils, are of great value. The yeast cell wall has  $\beta$ -glucans and mannanoligosaccharide (MOS) in its composition.  $\beta$ -glucans and MOS can modulate the gut microbiota through selective fermentation and adherence to type I fimbriae present in some bacteria (MOS) and modulation of the gut-associated immune system ( $\beta$ -glucans and MOS). Essential oils, which are bioactive compounds extracted from different parts of plants, have several important functions for the animal, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and intestinal functionality improvement effects. Among them, oregano essential oil is composed mainly by the phenolic isomers carvacrol and thymol, which have broad spectrum of action on bacterial structures. Therefore, the aim of this study was to evaluate the apparent digestibility coefficient (ATTD) and palatability of the diet and intestinal functionality in dogs fed yeast cell wall and oregano essential oil. Therefore, three dry extruded diets for adult dogs were evaluated, containing 0 (control diet), 1.5 and 3.0 kg/ton of a blend of yeast cell wall and oregano essential oil (YCO). Eighteen adult dogs were used and fed the experimental diets for 20 days. There was a reduction in diet palatability with the inclusion of 1.5 and 3.0 kg/ton of YCO ( $P < 0.05$ ), although no refusal of either diet occurred. The ATTD of DM decreased with the inclusion of 3.0 kg/ton of YCO compared to the control diet ( $P < 0.05$ ). Reduction of fecal odor was found in the animals fed the diets containing YCO ( $P < 0.05$ ), as all raters considered the odor of fresh feces from dogs supplemented with 3.0 kg/ton YCO as less fetid than feces from the control group. In addition, there was an increase in the concentration of putrescine and cadaverine and a reduction in histamine and ammonia ( $P < 0.05$ ) in the feces of dogs fed the diet containing 3.0 kg/ton of YCO. Finally, there was an increase in intestinal bacterial diversity of dogs fed both concentrations of YCO evaluated ( $P < 0.05$ ), given increased concentrations of *Blautia* and *Faecalibacterium* and reduced *Streptococcus* ( $P < 0.05$ ), compared to the control group. To conclude, the YCO blend promotes an improvement in indicators of gut functionality, given the modulation of microorganisms considered beneficial and the reduction of some gut fermentation products.

Keywords: Additives. Intestinal functionality. Microbiota. Prebiotic.

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO I – Considerações gerais**

FIGURA 1 – Estrutura simplificada da parede celular de levedura.....	18
FIGURA 2 – Ligação do MOS às fímbrias tipo I e seu efeito na microbiota intestinal.....	26
FIGURA 3 – Efeitos da fermentação seletiva promovida pelo MOS na microbiota intestinal.....	28
FIGURA 4 – Efeito dos óleos essenciais na modulação do fator Nrf2.....	32
FIGURA 5 – Alvos e ações dos óleos essenciais na célula bacteriana.....	33
FIGURA 6 – Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de orégano.....	36

### **CHAPTER II – Diet digestibility and palatability and intestinal functionality of dogs fed with a blend of yeast cell wall and oregano essential oil**

FIGURE 1 – Chao1 and Shannon index of fecal microbiota of dogs fed without (control) or with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).....	87
FIGURE 2 – Principal component analysis (PCOA) showing the different groupings of the treatments: control and 1.5 and 3.0 kg/ton of yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).....	88

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I – Considerações gerais**

TABELA 1 – Quimiotipos do óleo essencial de orégano com atividade antibacteriana.....	35
---	----

### **CHAPTER II – Diet digestibility and palatability and intestinal functionality of dogs fed with a blend of yeast cell wall and oregano essential oil**

TABLE 1 – Analyzed chemical composition (g/kg of dry matter) of the diets without (Control) and with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).....	83
TABLE 2 – Apparent total tract digestibility (ATTD), metabolizable energy (ME, MJ/kg), and fecal characteristics of dogs fed without (Control) or with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).....	84
TABLE 3 – Fecal concentration (dry matter basis) of short-chain (SCFA) and branched-chain (BCFA) fatty acids and biogenic amines of dogs fed without (Control) or with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).....	85
TABLE 4 – Percent averages of the peak area of the most abundant volatile organic compounds present in the feces of dogs fed the without (Control) and with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).....	86
TABLE 5 – Relative abundance (%) of the most abundant phyla in the fecal microbiota of dogs fed without (Control) or with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).....	89
TABLE 6 - Relative abundance (%) of the most abundant genera in the fecal microbiota of dogs fed without (Control) or with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).....	90
TABLE 7- First choice and intake ratio of the control and experimental diets containing yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AGCC	- Ácido graxo de cadeia curta
ARE	- Elemento de resposta antioxidante
ATTD	- Coeficiente de Digestibilidade aparente
CIBDAI	- Índice de Atividade da Doença Inflamatória Intestinal Canina
CLRs	- Receptores de lectina do tipo C
COX2	- Ciclooxygenase 2
Cr3	- Receptor tipo 3 do sistema complemento
FDA	- Food and Drug Administration
GALT	- Sistema linfóide associado ao intestino
IFN- $\gamma$	- Interferon- $\gamma$
IL	- Interleucina
IPP	- Isopentenil difosfato
ITAM-like	- Domínio composto pelo imunorreceptor baseado na ativação de tirosina
LPS	- Lipopolissacarídeo
MALT	- Tecido imune associado a mucosa
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA	- Malondialdeído
MIP2	- Proteína inflamatória de macrófagos 2
MOS	- Mananoligossacarídeo
NF-kB	- Fator nuclear kB
Nrf2	- Fator nuclear derivado de eritróide 2
OE	- Óleo essencial
PLA2	- Fosfolipase A2
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
TH1	- Células T auxiliares 1
TNF $\alpha$	- Fator de necrose tumoral $\alpha$
UDP-glicose	- Difosfato de uridina-glicose
YCO/PCO	- Parede celular de levedura e óleo essencial de orégano

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	- Alfa
$\beta$	- Beta
$\gamma$	- Gama
$\mu$	- Micro ( $10^{-6}$ )

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 OBJETIVOS .....	17
1.1.1 Objetivos específicos.....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1 PAREDE CELULAR DE LEVEDURA.....	18
2.2 B-GLUCANAS .....	19
2.2.1 Caracterização .....	19
2.2.2 Reconhecimento pelo sistema imune e mecanismo de ação.....	21
2.2.3 Propriedades exercidas pela $\beta$ -glucana no organismo animal .....	22
2.3 MANANOLIGOSSACARÍDEOS (MOS).....	23
2.3.1 Caracterização .....	23
2.3.2 Produção e purificação.....	24
2.3.3 Efeitos do MOS no organismo animal .....	25
2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	29
2.4.1 Caracterização .....	29
2.4.2 Mecanismo de ação dos óleos essenciais .....	31
2.5 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO .....	34
2.5.1 Caracterização .....	34
2.5.2 Compostos bioativos .....	35
2.5.3 Mecanismo de ação e efeitos do OE de orégano no organismo animal .....	37
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>39</b>
<b>4 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>
<b>CHAPTER II – DIGESTIBILITY AND PALATABILITY OF THE DIET AND INTESTINAL FUNCTIONALITY OF DOGS FED WITH A BLEND OF YEAST CELL WALL AND OREGANO ESSENTIAL OIL.....</b>	<b>49</b>
INTRODUCTION.....	52
MATERIAL AND METHODS.....	54
RESULTS.....	60
DISCUSSION.....	62
CONCLUSION .....	70
REFERENCES.....	71

<b>LISTA GERAL DE REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS... </b>	<b>105</b>

## CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1 INTRODUÇÃO

Para atingir as necessidades energéticas mínimas de cada animal, as dietas são formuladas e balanceadas levando em consideração os macros e micronutrientes. É possível incluir na sua composição substâncias, chamadas de aditivos, que visam melhorar a saúde ou desempenho do hospedeiro. Segundo a Instrução Normativa nº 44/2015 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), aditivo é:

“Substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios ou atenda às necessidades nutricionais.” (Instrução Normativa nº 44/2015/MAPA)

O uso de aditivos na alimentação animal pode ter diferentes objetivos. De acordo com a Instrução Normativa nº 13/2004 (MAPA, 2004), os aditivos podem ser classificados em sensoriais, tecnológicos, zootécnicos, nutricionais e anticoccidianos. Dentre os aditivos zootécnicos encontram-se os prebióticos, que, perante a legislação, pertencem ao subgrupo de equilibradores da microbiota do trato digestório. Trata-se de ingredientes que, embora não sejam digeridos pelas enzimas digestivas do hospedeiro, são fermentados seletivamente pela microbiota do trato gastrointestinal do animal.

Um dos prebióticos amplamente utilizados na nutrição de cães são os extratos da parede celular de levedura, que são obtidos por meio da hidrólise ácida ou alcalina ou do tratamento térmico da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A parede celular de levedura é composta por  $\beta$ -glucanas, mananoligossacarídeos (MOS), proteínas, lipídeos, vitaminas e quitina, sendo que as  $\beta$ -glucanas, por representarem aproximadamente 24% da matéria seca, correspondem ao componente majoritário da parede celular de levedura. O MOS, por sua vez, constitui em média 14% da matéria seca da levedura, e, juntamente com os demais componentes, conferem o efeito de modulação da microbiota intestinal no hospedeiro (MUSCO et al., 2017).



Além dos prebióticos, outro aditivo que pode ser incluído na alimentação animal são os óleos essenciais (OE). Os OE são líquidos aromáticos e oleosos obtidos pela destilação a vapor ou hidro destilação de diferentes partes das plantas, como flores, sementes, folhas e raízes. De acordo com os compostos bioativos, os OE podem possuir efeito antibacteriano, anti-inflamatório, antioxidante, antiviral, antiparasitário, antimicótico e antitoxigênico. Um dos OE reconhecido por possuir intenso efeito antimicrobiano é o OE de orégano, constituído principalmente pelos compostos bioativos carvacrol, timol,  $\gamma$ -terpineno e p-cimeno (BURT, 2004).

A literatura acerca dos OE e de sua associação com prebióticos na nutrição canina ainda é escassa. Portanto, mostra-se a necessidade de mais estudos na área para análise dos efeitos tanto na dieta quanto na funcionalidade intestinal dos animais.

## 1.1 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da parede celular de levedura e OE de orégano sobre a dieta e a funcionalidade intestinal em cães.

### 1.1.1 Objetivos específicos

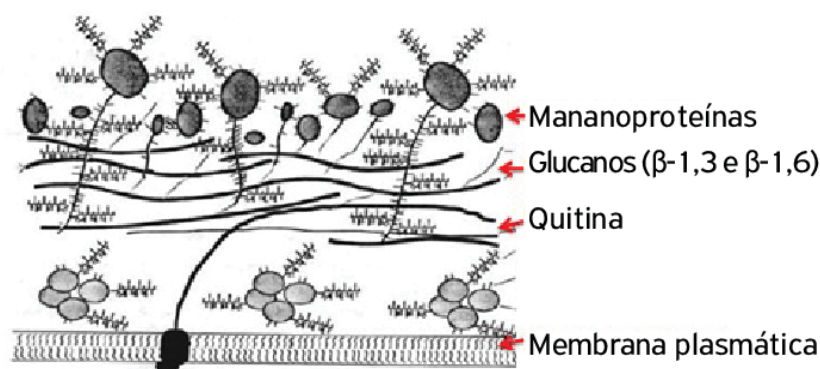
- Avaliar a digestibilidade e palatabilidade da dieta contendo parede celular de levedura e OE de orégano;
- Avaliar os produtos de fermentação intestinal e a microbiota fecal em cães alimentados com parede celular de levedura e OE de orégano.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PAREDE CELULAR DE LEVEDURA

As leveduras e fungos são revestidos por uma camada externa chamada de parede celular. Essa estrutura é responsável pela estabilidade osmótica e proteção física do microrganismo sendo constituída principalmente por  $\beta$ -glucanas e polímeros de mananos (LI et al., 2017), além de proteínas, lipídeos, vitaminas e quitina em menor quantidade (MUSCO et al., 2017) (FIGURA 1). Na camada mais externa da parede celular de levedura encontram-se polissacarídeos de manose ligados a proteínas, formando uma camada de mananoproteínas. Nesta camada ocorre a retenção de proteínas periplasmáticas, promovendo resistência às células e impedindo a entrada de enzimas produzidas por outros microrganismos. A camada mais interna, por sua vez, é formada por  $\beta$ -glucanas e quitina e é responsável pela manutenção da rigidez e do formato da célula. As  $\beta$ -glucanas representam o constituinte majoritário da parede celular de levedura, uma vez que a  $\beta$ -glucana com ligação glicosídica na posição  $\beta$ -1,3 representa seu principal componente estrutural (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008; BORCHANI et al., 2014).

FIGURA 1 – ESTRUTURA SIMPLIFICADA DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURA



FONTE: Lemos et al. (2016)

A parede celular da levedura *S. cerevisiae* é obtida principalmente por meio da fabricação de cervejas e da fermentação industrial de alimentos (LI et al., 2017). Novas técnicas foram desenvolvidas para separar e purificar os componentes da parede celular de levedura. Dessa forma, os extratos resultantes apresentam-se

mais purificados, possuem maior concentração solúvel de MOS, menor tamanho de partículas e maior solubilidade na água, quando comparados aos extratos convencionais da parede celular de levedura (THEODORO et al, 2019). A síntese e a degradação da parede celular de levedura são rigorosamente reguladas, as quais relacionam-se ao ciclo celular e às condições ambientais. A autólise da levedura é um processo complexo e pode ocorrer de forma induzida ou natural. Com este processo, diversos compostos intracelulares, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e longa, proteínas de diferentes pesos moleculares e polissacarídeos, são liberados para o meio de cultura através do transporte passivo (WANG et al., 2018).

Alguns estudos revelam os efeitos dos produtos derivados da parede celular da levedura na funcionalidade intestinal de cães. Considera-se que a inclusão de parede celular de levedura na dieta de cães é capaz de modular a microbiota fecal, os produtos de fermentação e a digestibilidade de nutrientes (STRICKLING et al., 2000; MIDDELBOSS et al., 2007). Ainda, a suplementação com produtos de fermentação do *S. cerevisiae* na dieta de cães alterou positivamente a microbiota intestinal, aumentando a capacidade imune e reduzindo os processos inflamatórios (LIN et al., 2019). Da mesma forma, Swanson et al. (2002) identificaram que a suplementação com 1g de MOS influenciou positivamente a microbiota intestinal de cães, ao encontrarem tendência para redução de bactérias aeróbias totais. Por fim, a suplementação com 0,2% de parede celular de levedura em cães submetidos a transição abrupta de dieta tendeu a aumentar o IgA fecal, embora não tenha alterado as características e a microbiota fecal (LIN et al., 2020).

## 2.2 B-GLUCANAS

### 2.2.1 Caracterização

$\beta$ -glucanas correspondem à um grupo de polímeros de D-glicose encontradas na parede celular de fungos, leveduras, bactérias, algas e cereais, as quais são classificadas como fibras dietéticas, já que não são digeridas pelas enzimas gástricas do hospedeiro (BASHIR e CHOI, 2017; VLASSOPOULOU et al., 2021). De acordo com a origem, cada  $\beta$ -glucana tem um tipo diferente de ligação, estrutura de ramificação, solubilidade e peso molecular, os quais afetam amplamente suas propriedades funcionais (BROWN e GORDON, 2005). Quando derivadas dos

fungos, as  $\beta$ -glucanas são encontradas naturalmente na parede celular dos filos Ascomycota e Basidiomycota, uma vez que o conteúdo desses polissacarídeos varia conforme as espécies fúngicas. Uma relevante fonte de  $\beta$ -glucanas é a parede celular da levedura *S. cerevisiae*, utilizada em ampla escala nas indústrias de panificação, cervejaria e sucroalcooleira (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008; BORCHANI et al., 2014; BORCHANI et al., 2016; VLASSOPOULOU et al., 2021).

Os polímeros de glicose diferenciam-se pelo tipo de ligação existente entre as unidades de glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a esta cadeia (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008). Glucanos com ligações glicosídicas na posição  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 são os principais componentes da parede celular de levedura e de fungos, uma vez que a  $\beta$ -1,3-glucana representa cerca de 85% do total de  $\beta$ -glucanas da parede celular (CHAE, et al., 2006; LIU et al., 2008). Além disso, as  $\beta$ -glucanas diferenciam-se conforme suas propriedades fisiológicas em solúveis e insolúveis: as solúveis reduzem a absorção de glicose e aumentam o tempo do trânsito intestinal, enquanto as insolúveis, como as  $\beta$ -glucanas derivadas de leveduras, reduzem o tempo do trânsito intestinal e aumentam o volume fecal (BASHIR e CHOI, 2017).

A  $\beta$ -glucana presente na levedura *S. cerevisiae* é sintetizada por meio da enzima  $\beta$ -glucana sintetase, a qual catalisa a polimerização da  $\beta$ -glucana utilizando como substrato o difosfato de uridina-glicose (UDP-glicose). Nesse sentido, a enzima rompe a  $\beta$ -glucana e o nível de  $\beta$ -glucanase aumenta no momento em que a concentração de glicose no meio é reduzida ou quando a taxa de crescimento celular é diminuída em decorrência da concentração limitada de glicose (KIM e YUN, 2006). Entretanto, o modo de biossíntese da  $\beta$ -1,6-glucana ainda é incerto, visto que a incubação de partes da membrana com UDP-glicose produz apenas  $\beta$ -1,3-glucana, ou produz  $\beta$ -1,6-glucana em baixa quantidade (AIMANIANDA et al., 2009). Os métodos clássicos de isolamento de  $\beta$ -glucanas englobam processos ácido-alcalinos e a oxidação das células por meio do hipoclorito de sódio. Devido ao fato de grande quantidade de  $\beta$ -glucanas serem degradadas ao longo deste processo, novos métodos foram desenvolvidos, como o de Liu et al. (2008). Os autores desenvolveram uma técnica eficiente para obtenção de  $\beta$ -glucana a partir de resíduos de leveduras, a qual leva em consideração os processos de autólise, extração por água e solventes orgânicos, homogeneização e hidrólise de protease.

### 2.2.2 Reconhecimento pelo sistema imune e mecanismo de ação

As  $\beta$ -glucanas são denominadas modificadores da resposta biológica devido à resposta imune que é gerada ao ser reconhecida pelo organismo. Em vertebrados, o reconhecimento ocorre em função de receptores específicos de superfície celular. Embora saiba-se que a dectina-1 é o principal receptor responsável pelo reconhecimento, outros receptores opsônicos e não opsônicos também contribuem com este processo, como o receptor tipo 3 do sistema complemento (Cr3), receptores *scavenger* e lactosilceramidas (BROWN e GORDON, 2001; BROWN e GORDON, 2005; BROWN, 2006; MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008).

A dectina-1, pertencente à família dos receptores de lectina do tipo C (CLRs), possui dois domínios: um de reconhecimento de carboidratos (capaz de reconhecer  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucanas e leveduras inteiras), e um domínio composto pelo imunorreceptor baseado na ativação de tirosina (ITAM-like), localizado na cauda citoplasmática (BROWN et al., 2003; HSIEH, 2020). A dectina-1 encontra-se em células mieloides, como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e em alguns linfócitos. Em possíveis locais de entrada de patógenos, como pulmões e intestino, a dectina-1 é expressa em altos níveis, característica condizente com a função deste receptor no sistema imune. Além de  $\beta$ -glucana, a dectina-1 também é capaz de reconhecer o zymosan, um extrato estimulador da parede celular da levedura *S. cerevisiae*, que tem sido usualmente utilizado como objeto de estudo da função imunológica da partícula fúngica (BROWN, 2006).

Quando a  $\beta$ -glucana é reconhecida pelo hospedeiro, a dectina-1 realiza a mediação da sinalização intracelular por meio do ITAM-like, induzindo a ativação de várias respostas celulares, como ativação e regulação da fosfolipase A2 (PLA2) e ciclooxigenase 2 (COX2), captação de ligante por endocitose e fagocitose e a produção de diversas citocinas e quimiocinas, incluindo fator de necrose tumoral (TNF), proteína inflamatória de macrófagos 2 (MIP2), interleucina 2 (IL-2), IL-10, IL-6, IL-12 e IL-23 (HSIEH, 2020). O estímulo à produção de IL-12 pode resultar na resposta protetora das células T auxiliares 1 (TH1) e na produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), levando à ativação das atividades fungicidas dos fagócitos. Além disso, por meio do estímulo à produção de IL-2 e IL-10, o reconhecimento da  $\beta$ -glucana pela dectina-1 pode favorecer o desenvolvimento de células T reguladoras, assim como

inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (em decorrência da ação específica da IL-10) (BROWN, 2006).

Outro receptor passível de reconhecer a  $\beta$ -glucana no organismo é o Cr3. Trata-se de uma integrina heterodimérica capaz de reconhecer outros ligantes endógenos e está relacionado a adesão e transmigração celular. Este receptor fagocítico é expresso por diversos tipos de leucócitos e possivelmente contribui para o reconhecimento da  $\beta$ -glucana por meio das células Natural Killers, as quais não expressam dectina-1 (BROWN, 2006).

O receptor lactosilceramida, por sua vez, ao interagir com a  $\beta$ -glucana, reforça o burst oxidativo (processo de metabolização do oxigênio molecular pelo sistema NADPH oxidase) e as funções antimicrobianas (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008). Por fim, os receptores *scavenger* correspondem a um grupo heterogêneo de moléculas relacionados a endocitose e fagocitose de células apoptóticas, que reconhecem a estrutura básica da  $\beta$ -glucana e lipoproteínas modificadas de baixa densidade (PEISER, MUKHOPADHYAY, GORDON, 2002).

### 2.2.3 Propriedades exercidas pela $\beta$ -glucana no organismo animal

Em razão da bioatividade, as  $\beta$ -glucanas exercem importantes propriedades no organismo animal. São reconhecidas por possuírem, principalmente, efeito imunomodulatório, ao estimularem atividade antitumoral, anti-inflamatório, antimutagênico, hipocolesterolêmico e hipoglicêmico (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008).

Diversos estudos demonstram a capacidade de imunomodulação das  $\beta$ -glucanas. Vetvicka e Oliveira (2014) comprovaram que a inclusão de 15 mg/kg/dia e 25 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucanas derivada de *S. cerevisiae* na dieta de cães potencializou a fagocitose e estimulou a secreção de IL-2 e a resposta celular e humoral. Da mesma forma, Hong et al. (2004), ao analisarem os efeitos da  $\beta$ -glucana derivada de levedura como adjuvante aos anticorpos monoclonais antitumorais em ratos com deficiência de Cr3, revelaram que a  $\beta$ -glucana foi degradada na medula óssea em partículas menores, as quais foram absorvidas pelo Cr3 dos granulócitos e conseqüentemente inibiram o crescimento de células tumorais.

Além do efeito antitumoral e no tratamento do câncer, as  $\beta$ -glucanas podem ser eficientes na proteção ao hospedeiro contra bactérias e protozoários e no

aumento da eficácia de antibióticos mesmo em infecções por bactérias resistentes (NOVAK e VETVICKA, 2009).

O uso de  $\beta$ -glucanas também mostra-se potencialmente eficaz em casos de distúrbios fisiológicos, como obesidade e enteropatias crônicas. Em cães obesos, a suplementação dietética com 0,1% de  $\beta$ -glucana derivada de levedura reduziu a concentração basal e média de glicose plasmática, a insulina basal e diminuiu as concentrações de triglicerídeos e colesterol, atingindo níveis que se assemelhavam aos de cães com escore de condição corporal ideal (FERREIRA et al., 2022). Em casos de enteropatia crônica, a inclusão de  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6-D-glucana na dieta de cães com doença inflamatória intestinal produziu rápido efeito terapêutico, ocasionou redução do Índice de Atividade da Doença Inflamatória Intestinal Canina (CIBDAI), melhorou os parâmetros histopatológicos, reduziu os níveis de IL-6, aumentou as concentrações de IL-10 e provocou períodos de remissão superior a seis meses (RYCHLIK et al., 2013).

Além de cães, o uso de  $\beta$ -glucanas na dieta de outras espécies também é evidenciada na literatura. Chae et al. (2006) demonstraram que a suplementação dietética de 0,03%  $\beta$ -glucana em frangos melhorou o desempenho de crescimento, a retenção de nutrientes e a capacidade imunológica dos animais. Da mesma forma, Dritz et al. (1995) relataram que os suínos alimentados com 0,025%  $\beta$ -glucana no pós desmame apresentaram aumento no ganho de peso diário e no consumo médio diário de alimento, quando comparado aos animais que não receberam  $\beta$ -glucana na alimentação.

## 2.3 MANANOLIGOSSACARÍDEOS (MOS)

### 2.3.1 Caracterização

O MOS corresponde a oligossacarídeos não digestíveis de cadeia curta linear, composto por 3 a 10 resíduos de manose (SINGH, GHOSH e GOYAL, 2017). Podem ser classificados em  $\alpha$  e  $\beta$ -MOS, sendo o  $\alpha$ -MOS derivado da hidrólise do  $\alpha$ -1,6-manano presente na parede celular de levedura, enquanto o  $\beta$ -MOS é originado pela ligação glicosídica  $\beta$ -1,4-manano (JANA et al., 2021). É considerado como um prebiótico não digestível, pois é um ingrediente seletivamente fermentado pela microbiota intestinal (PAWAR et al., 2017).

Em decorrência de suas propriedades físico-químicas, o MOS mostra-se como um ingrediente funcional benéfico para a saúde humana e animal, visto que exerce efeitos na microbiota intestinal e é um agente antitumoral, imunomodulador e antioxidante (SINGH, GHOSH e GOYAL, 2017).

### 2.3.2 Produção e purificação

Pequenas quantidades de MOS podem ser naturalmente encontradas em partes estruturais das plantas (JANA et al., 2021). Para produção em maior escala, o MOS pode ser obtido a partir de diversos mananos, como galactomananos, glucomananos e galactoglucomananos, e de resíduos industriais ricos em mananos, como o farelo de coco, torta de palmiste e borra de café residual (SINGH, GHOSH e GOYAL, 2017; SURYAWANSHI e KANGO, 2021).

A extração do MOS consiste em métodos químicos e físicos ou em métodos enzimáticos. Os métodos químicos e físicos englobam o tratamento hidrotérmico, tratamento com detergente e a hidrólise ácida ou alcalina da parede celular de levedura (*S. cerevisiae*) ou de galactomananos de origem vegetal (JANA et al., 2021). O tratamento hidrotérmico e a hidrólise ácida são as técnicas mais comumente empregadas quando os mananos já foram degradados a oligômeros (PRONYK, MAZZA e TAMAKI, 2011), sendo que os principais agentes da hidrólise são o ácido sulfúrico, anidrido acético e o ácido acético (JANA et al., 2021).

Outro método aplicável para produção do MOS é o enzimático, em que a manase, enzima responsável por clivar a ligação glicosídica presente no manano, pode ser de origem bacteriana ou fúngica. A manase bacteriana pode ser originada a partir de diferentes espécies de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Kitasatospora* e *Enterococcus*, conhecidas por serem produtoras ativas de  $\beta$ -manase. Com relação a manase de origem fúngica, os fungos *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Piptoporus*, *Schizophyllum commune* e alguns *Aspergillus* são aqueles associados à produção de enzimas mananolíticas (JANA et al., 2021).

A purificação do MOS é um processo importante em razão de seu uso como prebiótico e de seu papel como ingrediente funcional. Como os extratos resultantes da hidrólise enzimática ou físico-química dos mananos podem possuir uma mistura de MOS em diferentes graus de polimerização e possivelmente outros açúcares e



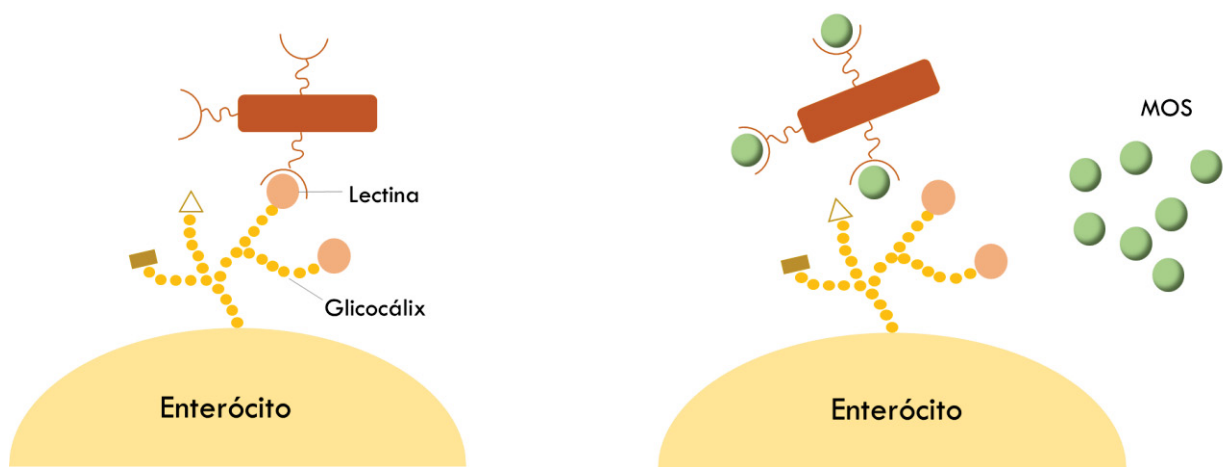
não açúcares indesejáveis, alguns métodos purificantes foram desenvolvidos, dentre eles cromatografia de exclusão por tamanho, filtração por membrana e coluna de carvão ativado. Contudo, tais métodos foram empregados em escala de laboratório, e ainda não em escala piloto (JANA et al., 2021).

### 2.3.3 Efeitos do MOS no organismo animal

O MOS apresenta diversas funções importantes no organismo animal. A atuação como prebiótico, antitumoral, anti-diabético, antioxidante, anti-inflamatório, imunomodulador, antialérgico, bem como a função em casos de obesidade, são algumas das propriedades elencadas do MOS na literatura (JANA et al., 2021; SURYAWANSHI e KANGO, 2021).

Uma importante propriedade do MOS é a capacidade de modular a microbiota intestinal, a qual ocorre devido à alguns fatores. O principal motivo é a capacidade de aderência às fímbrias do tipo I, que estão presentes na maioria das bactérias gram negativas, como *E. coli*, *Salmonella* sp. e *Klebsiella* sp. As fímbrias tipo I permitem a fixação da bactéria ao enterócito e exercem efeito aglutinante nestas células. Entretanto, a aglutinação é bloqueada pela D-manose, um receptor presente tanto no MOS quanto em bactérias como *E. coli* (GOUVEIA et al., 2013). Portanto, ao ligar-se com esse tipo de fímbria, o MOS impede a colonização intestinal por microrganismos considerados patogênicos (BRITO et al., 2004). Em estudo realizado por Gouveia et al. (2013), o qual buscaram analisar a ação do MOS em cães infectados experimentalmente com bactérias enteropatogênicas, o prebiótico em questão apresentou efeito na consistência fecal, promoveu uma recuperação da diarreia de forma mais rápida em cães suplementados com MOS, e reduziu o efeito da fímbria tipo I no epitélio intestinal do animal. A representação deste mecanismo de ação está ilustrada na FIGURA 2.

FIGURA 2 - LIGAÇÃO DO MOS ÀS FÍMBRIAS TIPO I E SEU EFEITO NA MICROBIOTA INTESTINAL



FONTE: adaptado de Lemos et al. (2014)

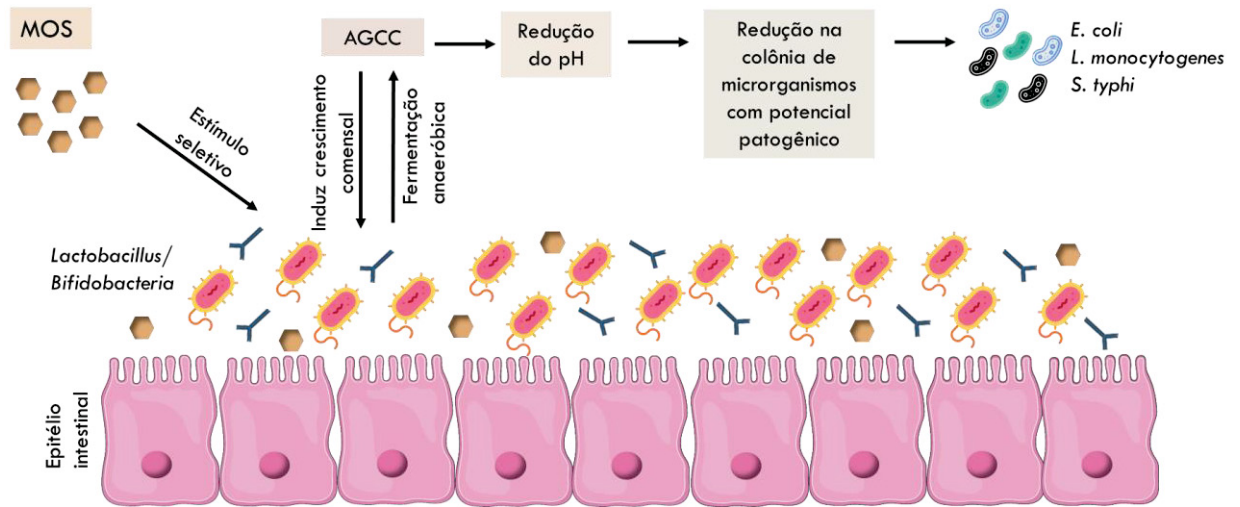
Outra forma com que o MOS modula a microbiota do intestino é por meio da fermentação seletiva (FIGURA 3), a qual beneficia o crescimento de determinados grupos bacterianos, como *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*, e conseqüentemente a produção de AGCC, como o acetato, butirato e propionato (MARY et al., 2019). As bactérias do gênero *Lactobacillus* ajudam a manter um ambiente entérico adequado pois suprimem o crescimento de bactérias patogênicas por meio da produção dos AGCC (SURYAWANSHI e KANGO, 2021). É importante ressaltar que esta forma de modulação da microbiota intestinal via fermentação seletiva é secundária, visto que o MOS é moderadamente fermentável. Além disso, devido à solubilidade parcial dos AGCC na membrana, esses produtos de fermentação intestinal podem alterar a integridade e fluidez da membrana dos patógenos, sendo mais um mecanismo de inibição de crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos (JANA et al., 2021).

Os AGCC são produzidos pela microbiota intestinal como resultado da fermentação de carboidratos não digestíveis (RÍOS-COVIÁN et al., 2016). Sabe-se que exercem importantes efeitos no ambiente intestinal, como redução do pH, redução de microrganismos potencialmente patogênicos, diminuição da solubilidade de ácidos biliares, aumento na absorção de minerais e redução da absorção de amônia (CHO e FINOCCHIARO, 2010; MINAMOTO et al., 2019). Os AGCC possuem propriedades anti-inflamatórias pois aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias (como IL-10 e TGF $\beta$ ), reduzem citocinas pró-inflamatórias (como

IL-6, IL-8, e TNF $\alpha$ ) e ativam o fator de transcrição Foxp3 (MINAMOTO et al., 2019). O Foxp3 é um marcador específico de células T reguladoras e sua ativação é de extrema importância para a supressão e regulação da inflamação intestinal (MAEDA et al., 2016). Reduções nas concentrações de AGCC, principalmente de propionato e butirato, relacionam-se com doenças do trato gastrointestinal, como doença inflamatória intestinal, pólipos colorretais e enteropatias responsivas a alimentos (LOUIS, HOLD e FLINT, 2014; RÍOS-COVIÁN et al., 2016; IGARASHI, H. et al, 2017; HIGUERAS, C. et al., 2022). Dentre os AGCC, o propionato é importante em decorrência de sua capacidade de modulação da inflamação, já que reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias. O butirato, por sua vez, é preferencialmente utilizado como fonte de energia aos colonócitos e é responsável por aumentar a produção de muco, culminando em alterações na adesão bacteriana e melhorias na integridade da barreira intestinal (MINAMOTO et al., 2019). Já o acetato é um ácido graxo de grande importância no que tange a habilidade da *Bifidobacterium* em inibir enteropatógenos (RÍOS-COVIÁN et al., 2016). Estudo conduzido por Vinolo et al. (2011) demonstrou que o butirato inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico tanto *in vitro* quanto *in vivo*, enquanto o propionato reduziu a produção destes mediadores somente *in vitro* e de forma menos potente do que o butirato (VINOLO et al., 2011).

Quanto a produção, os AGCC são advindos da quebra de carboidratos complexos em carboidratos simples. Estes açúcares simples são fermentados por agentes fermentativos primários, como Bacteroidetes, liberando acetato e propionato, os quais podem ser subsequentemente utilizados por agentes fermentativos secundários, como Firmicutes, para gerar butirato. Ainda, bactérias acetogênicas podem utilizar dióxido de carbono e o hidrogênio derivado das reações fermentativas para formar quantidades adicionais de acetato (SUN e O'RIORDAN, 2013; MINAMOTO et al., 2019).

FIGURA 3 – EFEITOS DA FERMENTAÇÃO SELETIVA PROMOVIDA PELO MOS NA MICROBIOTA INTESTINAL



FONTE: adaptado de Jana et al. (2021)

O MOS também é capaz de atuar sobre o sistema imune. Isso ocorre em decorrência de alguns fatores, como a atuação direta do MOS nos macrófagos para regular a produção de citocinas, o que leva à redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1a, IL-1b, IL-6 e fator estimulante de colônia de granulócitos, e ao aumento na expressão de mucina (FERENCZI et al., 2016). Além disso, ao modular a microbiota intestinal por mecanismos já descritos anteriormente, o MOS evita o dano da barreira epitelial e o crescimento de bactérias com potencial patogênico, contribuindo para o fortalecimento do sistema linfóide associado ao intestino (GALT) (FRANCO-ROBLES et al., 2020). O GALT é um componente especializado do tecido imune associado a mucosa (MALT), composto por folículos linfóides isolados, pelas placas de Peyer (grupo de folículos linfóides na mucosa do intestino delgado), pela lâmina própria e lúmen (FRANCO-ROBLES et al., 2020; MÖRBE et al., 2021). Nesta região ocorre interação entre as células do sistema imune e as bactérias intestinais, uma vez que as bactérias sinalizam às células sobre eventuais inflamações e essa interação determina se os elementos encontrados no intestino serão tolerados ou se irão desencadear uma resposta imune. O estudo realizado por Cervantes-Barragan et al. (2017) demonstrou que algumas bactérias presentes no GALT podem ajudar na produção de uma célula importante do sistema imune, chamada linfócito intraepiteliais duplo-positivo. Esta célula é responsável pelo reconhecimento de substâncias provenientes da

alimentação e de outras moléculas do exterior como próprio e não próprio, e, portanto, atua no bom funcionamento do sistema imune e do organismo.

O estudo desenvolvido por Pawar et al. (2017) revelou que a adição do MOS à dieta caseira não afetou a digestibilidade dos nutrientes, a fermentação intestinal e os antioxidantes eritrocitários. Entretanto, o prebiótico foi efetivo na melhoria do sistema imune e no perfil lipídico de cães, já que, possivelmente, os produtos de fermentação intestinal, como os AGCC, inibiram a síntese de colesterol no fígado e/ou causaram mobilização do colesterol plasmático ao fígado.

Outra característica do MOS é a atuação antitumoral. Como diversos tumores utilizam da glicose como fonte de energia, a manose apresenta um importante papel na prevenção de diversos tipos de câncer. Isso ocorre, pois, a manose e a glicose são transportados por meio do mesmo transportador proteico, fazendo com que a manose possa interferir na absorção de glicose (GONZALEZ et al., 2018). Jana e Kango (2020) demonstraram que o MOS derivado da torta de palmiste foi capaz de reduzir a viabilidade do adenocarcinoma de cólon humano em 74,19%. Da mesma forma, Ghosh et al. (2015) evidenciaram que o tratamento com 500 µg/mL de MOS reduziu as células do câncer de cólon (HT29) em 50% após 24 horas de incubação.

Além destes efeitos, os prebióticos, como o MOS, também podem atuar como possível método alternativo ao uso de antibióticos (FALCÃO-E-CUNHA et al., 2007). O estudo de Attia et al. (2015) revelou que o MOS pode substituir o uso de zinco-bacitracina em coelhos, desde o desmame até o abate, sem gerar efeitos negativos na performance, parâmetros sanguíneos e na morfologia tecidual.

## 2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

### 2.4.1 Caracterização

O termo óleos essenciais (OE) foi utilizado pela primeira vez por Paracelsus, quem nomeou cada composto ativo como “quinta essentia” (EDRIS, 2007). Estima-se que existam aproximadamente 3.000 OE reconhecidos, sendo 300 amplamente comercializados pelo mundo (SAKKAS e PAPADOPOULOU, 2017).

Os OE são produtos obtidos do metabolismo secundário de plantas (CARNEIRO et al., 2020). Trata-se de compostos bioativos naturais, voláteis em

temperatura ambiente, aromáticos e líquidos, extraídos de diferentes partes de plantas, como folhas, flores, sementes, raízes, botões, galhos, cascas, ervas, madeira e frutas. Portanto, estão intimamente relacionados com as características de fragrância e essência das plantas aos quais são extraídos (BRENES e ROURA, 2010). São frequentemente instáveis em algumas condições ambientais, como luz, temperatura, atividade de água e salinidade (CARNEIRO et al., 2020). Por serem voláteis, devem ser armazenados em recipientes herméticos escuros, para que não ocorra alterações composicionais (BURT, 2004). Além disso, os OE geralmente são líquidos oleosos em temperatura ambiente por conta da mistura dos compostos lipofílicos. Isso faz com que seu principal método de obtenção seja a destilação em água ou vapor (CARNEIRO et al., 2020).

Os compostos bioativos dos OE são sintetizados nas plantas por meio da ação das enzimas terpeno sintase, as quais utilizam substratos oriundos de duas vias metabólicas diferentes: (1) a dependente de mevalonato, que está localizada no citoplasma e pode ser responsável pela síntese de sesquiterpenos, e (2) as vias de metil-eritritol fosfato, localizada em plastídios e sugerida como responsável pela síntese de hemiterpenos, monoterpenos e diterpenos (PAZOUKI e NIINEMETS, 2016).

Os OE correspondem a uma mistura de compostos, que englobam hidrocarbonetos e compostos oxigenados. Os compostos oxigenados compreendem aos álcoois, fenóis, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, cumarinos, furocumarinos e óxidos. Os hidrocarbonetos, por sua vez, abrangem os terpenos, que são originados de combinações de vários compostos de cinco unidades básicas de carbonos, denominadas isopreno. Os terpenos são biossintetizados a partir do precursor isopentenil difosfato (IPP). Diversos IPPs são adicionados e formam o precursor de várias classes de terpenos, chamado de prenildifosfato. A modificação deste precursor por sintetases específicas do terpeno formam o esqueleto do terpeno e, por meio da reação redox, propriedades funcionais são adicionadas aos esqueletos dos diferentes terpenos (BAKKALI et al., 2008; UNUSAN, 2020).

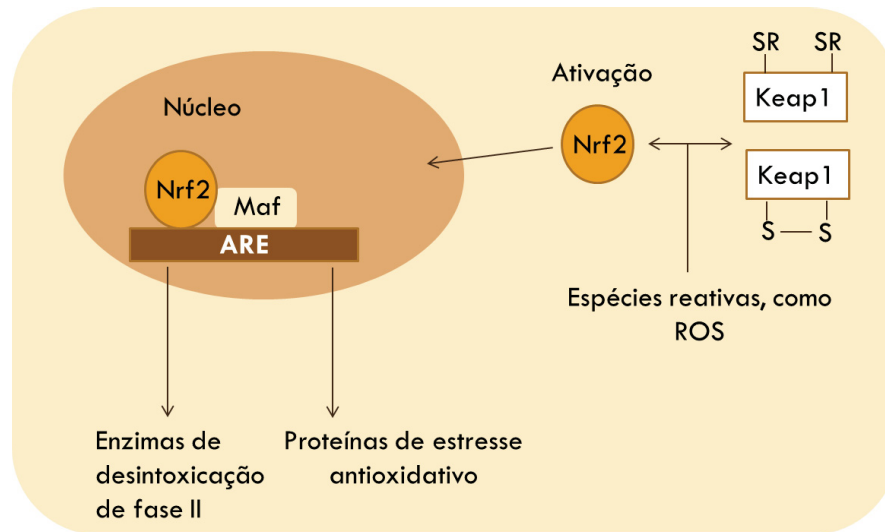
Os compostos bioativos de cada OE apresentam concentração variada (OMONIJO et al., 2018) de acordo com as condições ambientais, composição do solo e método de cultivo, estação do ano e dia em que a planta foi colhida, condições de armazenamento e de processamento, método de extração do óleo e análise dos compostos químicos (SAKKAS e PAPADOPOULOU, 2017).

#### 2.4.2 Mecanismo de ação dos óleos essenciais

Desde a antiguidade os OE são reconhecidos por atuarem em processos biológicos (ACAMOVIC e BROOKER, 2005). Diversos trabalhos foram publicados sobre as bioatividades dos OE. Dentre eles, pode-se citar a atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antitumoral, sedativo, imunomoduladora, antialérgica e gastroprotetora (SAKKAS e PAPADOPOULOU, 2017). Além disso, os OE atuam na saúde intestinal (OMONIJO et al., 2018) e também podem ser considerados como método alternativo ao uso de conservantes sintéticos em alimentos, embora seu uso neste contexto seja limitado por conta das características aromáticas (SAKKAS e PAPADOPOULOU, 2017).

A atuação do OE no estresse oxidativo ocorre devido a modulação do fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2), conforme ilustra a FIGURA 4. O Nrf2 é um fator de transcrição relacionado a defesa celular contra estresse oxidativo e eletrolítico (ZOU et al., 2016). Em condições normais, o Nrf2 encontra-se ligado à proteína inibitória Keap1, uma vez que esta proteína mantém o Nrf2 no citoplasma. Quando ocorre exposição a espécies reativas, como espécies reativas de oxigênio (ROS), o Nrf2 e a proteína Keap1 se dissociam, fazendo com que o Nrf2 transloque-se ao núcleo. Na região nuclear, o fator Nrf2 liga-se ao elemento de resposta antioxidante (ARE) e com pequenas proteínas Maf. Essa ligação é responsável por ativar proteínas antioxidantes e enzimas de desintoxicação, como glutathione peroxidase, catalase, glutathione S-transferase e superóxido dismutase, culminando na proteção da célula contra o estresse oxidativo (PAMPLONA e CONSTANTINI, 2011; OMONIJO et al., 2018). Dessa forma, o Nrf2 é capaz de proteger a integridade intestinal ao modular as citocinas pró inflamatórias e induzir a ação de enzimas de desintoxicação de fase II (KHOR et al., 2006).

FIGURA 4 – EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NA MODULAÇÃO DO FATOR Nrf2.



FONTE: adaptado de Pamplona e Constantini, 2011.

A atuação como anti-inflamatório acontece em função da redução da expressão do fator de transcrição NF-κB. Este fator é ativado em casos de inflamação através de citocinas pró inflamatórias, como ROS e lipopolissacarídeos (LPS). A ativação do NF-κB faz com que este fator transloque-se ao núcleo, o que induz a expressão de proteínas pró-inflamatórias, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas relacionadas a inflamação, apoptose e proliferação. Além disso, possivelmente ocorre interação entre as vias do NF-κB e do Nrf2. Dessa forma, a redução da expressão do NF-κB leva à importante atuação do OE como anti-inflamatório (OMONIJO et al., 2018).

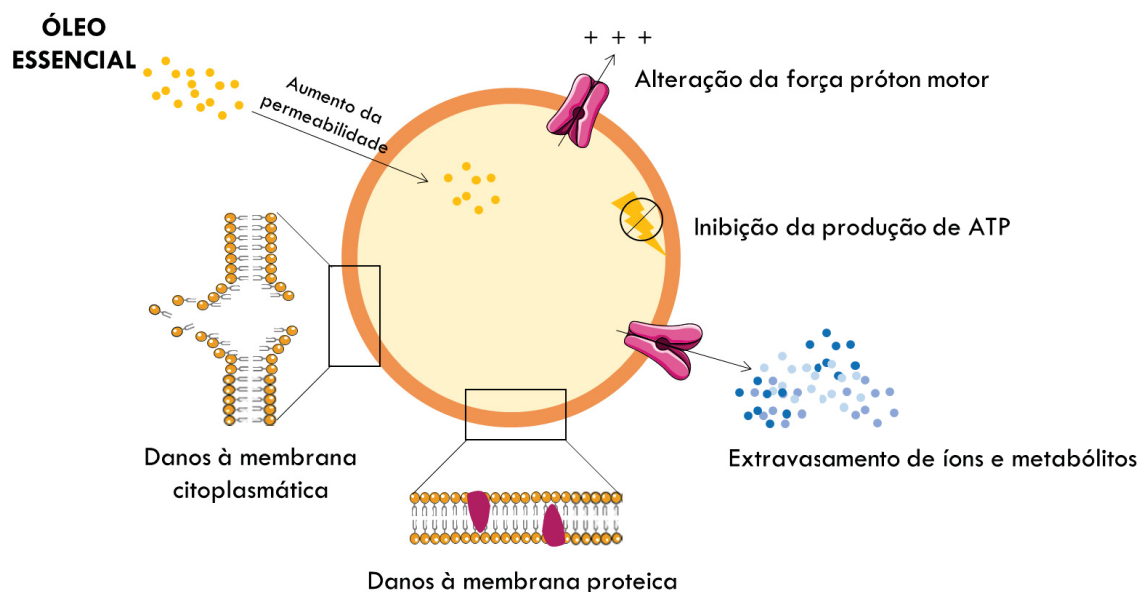
Já o efeito antimicrobiano decorre da composição dos OE e dos efeitos citotóxicos provocados em diferentes regiões na célula bacteriana. Os alvos bacterianos considerados locais de ação dos OE são indicados na FIGURA 5. Os OE exercem efeitos na parede celular, o que leva a alteração na integridade da membrana e na permeabilidade. Como os OE são compostos lipofílicos, ao atravessarem a membrana celular e citoplasmática, causam danos a membrana de polissacarídeos, ácidos graxos e a camada fosfolipídica, e tornam a membrana permeável. Além disso, os OE desestabilizam o potencial de membrana das células, resultando no vazamento de íons celulares ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  e  $\text{K}^+$ ) e na posterior inativação de sistemas metabólicos vitais nas células bacterianas, como respiração celular e síntese de ATP (BAKKALI et al., 2008; BROCHOT et al., 2017; MAURYA et al., 2021). Os danos na membrana plasmática também provocam efluxo de materiais



citoplasmáticos, como DNA, RNA e proteínas, além de interferirem no sistema de transporte de elétrons, na desintegração da bomba de próton e na depleção de ATP durante a biossíntese (MAURYA et al., 2021).

As bactérias gram-positivas, em relação as gram-negativas, são mais suscetíveis aos OE, pois as gram-negativas possuem uma membrana externa de LPS, o que confere maior resistência. Entretanto, o carvacrol e timol, além de atuarem em bactérias gram-positivas, também são capazes de desintegrar a camada mais externa das bactérias gram-negativas, aumentando a permeabilidade da membrana e sendo eficazes nesse grupo de bactérias (BURT, 2004; TEHRANI e SADEGHI, 2015).

FIGURA 5 – ALVOS E AÇÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NA CÉLULA BACTERIANA



FONTE: adaptado de Carneiro et al. (2020)

A atuação dos OE sobre a microbiota intestinal ocorre por conta da intensa ação antimicrobiana contra patógenos (BRENES e ROURA, 2010). Em estudo de Zeng et al. (2014), os suínos alimentados com OE apresentaram redução significativa de *E. coli* e bactérias anaeróbias totais no reto e aumento quantitativo de *Lactobacillus* no cólon e reto, quando comparado aos suínos que não receberam suplementação com OE. Em estudo com leitões após desmame, Wei et al. (2017) observaram que a suplementação de 100 mg/kg de carvacrol e timol (1:1)

proporcionou aumento quantitativo das bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e redução das bactérias pertencentes aos gêneros *Enterococcus* e *E. coli* no jejuno. Além disso, os resultados mostraram redução do estresse oxidativo intestinal, na microbiota e na barreira intestinal. Entretanto, a suplementação apresentou efeito limitado na inflamação intestinal induzida pelo desmame e na disfunção da barreira intestinal. O estudo de Zou et al. (2016) mostrou que o OE de orégano foi capaz de atuar na proteção contra estresse oxidativo por meio da modulação do Nrf2, podendo ajudar na supressão da inflamação intestinal e na melhoria da saúde dos animais. Campigotto et al. (2021) demonstraram que cães alimentados com um blend composto por 21,55 mg/g de carvacrol, 18,76 mg/g de timol, e 27,62 mg/g de cinamaldeído apresentaram redução na contagem bacteriana total, coliformes totais, *Salmonella* spp. e *E. coli*.

O efeito anti-mutagênico dos OE decorre da inibição da penetração de agentes mutagênicos nas células, da inativação dos mutagênicos por eliminação direta, da captura de radicais antioxidante produzidos por um mutagênico ou ativação de enzimas antioxidantes celulares, da inibição da conversão metabólica pelo P450 de pró-mutágenos em mutagênicos ou da ativação da desintoxicação enzimática de mutagênicos (BAKKALI et al., 2008).

Devido ao intenso uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais de produção e à preocupação com a resistência bacteriana, estuda-se a possibilidade de utilizar os OE como alternativa aos antibióticos. Estudos anteriores já avaliaram a possibilidade da substituição de antibióticos por OE na suinocultura, porém, um consenso ainda não foi atingido (OMONIJO et al., 2018).

## 2.5 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

### 2.5.1 Caracterização

O orégano é uma erva nativa da Europa, Norte da África e de áreas temperadas da África, pertencente à família Lamiaceae e sua espécie mais representativa é a *Origanum vulgare* (TABELA 1). Existem cinco subespécies do *O. vulgare* reconhecidas, porém, as mais comumente encontradas na Europa são *viridulum*, *viride* e *hirtum* (BAMPIDIS et al., 2019).

O OE de orégano é um líquido insolúvel em água, incolor a amarelo claro, com odor picante (BAMPIDIS et al., 2019). O conteúdo de óleos essenciais no *O. vulgare* pode variar de 0,5 – 2% até 7%, de acordo com a espécie, estação do ano em que a erva foi colhida e com o método de extração do óleo (LEYVA-LÓPEZ et al., 2017; SAKKAS e PAPADOPOULOU, 2017). Além disso, a temperatura de secagem também interfere no conteúdo de OE obtido. Novák et al. (2011) revelaram que uma maior quantidade de OE de *O. vulgare* spp *hirtum* foi obtido em temperaturas mais altas (40°C ou 45°C), em comparação ao método natural de secagem.

TABELA 1 – QUIMIOTIPOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Nome comum	Nome botânico	Composto bioativo	Referência
Óleo essencial de orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Timol	Marino e Comi (2001)
	<i>O. vulgare</i>	Carvacrol e timol	Bozin et al. (2006)
	<i>O. scabrum</i>	Carvacrol	Sokmen et al. (2004)
	<i>O. acutidens</i>	Carvacrol	Sokmen et al. (2004)
	<i>O. syriacum</i>	$\gamma$ -terpineno, carvacrol e p-cimeno	Alma et al. (2003)
	<i>O. compactum</i>	Carvacrol	Mith et al. (2014)
	<i>O. heracleoticum</i>	Carvacrol	Mith et al. (2014)
	<i>O. majorana</i>	Terpineno-4-ol	Mith et al. (2014)

FONTE: adaptado de Sakkas e Papadopoulou (2017)

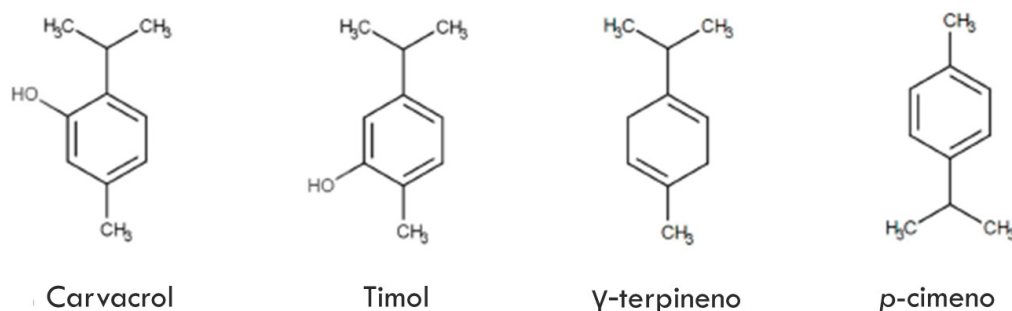
### 2.5.2 Compostos bioativos

Os principais componentes do OE de orégano são os terpenos, dentre eles os isômeros fenólicos carvacrol e timol, assim como seus precursores monoterpênicos em menor proporção (p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno), conforme representa a FIGURA 6. A concentração de seus principais constituintes pode chegar a 80% de carvacrol, 64% de timol e 52% de moléculas precursoras (SAKKAS e PAPADOPOULOU, 2017).

O carvacrol é um fenol monoterpênico, presente em diversas ervas, como o orégano e o tomilho. Pode ser sintetizado por meio de diferentes métodos, como sulfonação do p-cimeno seguido de fusão álcali (SUNTRES, COCCIMIGLIO e ALIPOUR, 2015). O timol, por sua vez, também é classificado como um fenol

monoterpênico e é encontrado em OE extraídos de plantas pertencentes à família Lamiaceae. É biossintetizado pela aromatização do  $\gamma$ -terpineno a p-cimeno, seguido da hidroxilação do p-cimeno (MARCHESI et al., 2016).

FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO



FONTE: adaptado de Leyva-López et al. (2017)

O carvacrol, timol e outros terpenoides, principais componentes do OE de orégano, são determinantes para a atividade antimicrobiana. Isso porque, esses compostos possuem potencial de lesar a membrana bacteriana por meio da sensibilização da bicamada fosfolipídica da membrana celular e do vazamento dos constituintes celulares (EBANI et al., 2017). Em adição, a posição dos grupos funcionais no carvacrol e timol, principalmente do grupo hidroxila do terpenoide fenólico, e a presença de elétrons deslocalizados, possuem relação estrita com a atividade antimicrobiana (ULTEE, BENNIK e MOEZELAAR, 2002). Os compostos fenólicos em questão apresentam efeito antimicrobiano similar, porém, conforme a posição de um ou mais grupos funcionais, a atuação sobre bactérias gram positivas ou gram negativas pode diferir (OMONIJO et al., 2018).

Em mamíferos, o carvacrol e o timol são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal, são conjugados, principalmente, com sulfato e ácido glicurônico e excretados pela urina. O  $\gamma$ -terpineno e p-cimeno, por sua vez, são possivelmente absorvidos pelo trato gastrointestinal e oxidados a metabólitos oxigenados polares. Os metabólitos hidroxilados e os ácidos carboxílicos resultantes podem ser excretados quando estão na forma conjugada ou podem prosseguir no processo de oxidação, e serem excretados via urina quando ocorre formação de metabólitos mais polares (BAMPIDIS et al., 2019).

Com relação a segurança e toxicidade, o órgão responsável pela fiscalização de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration – FDA) classifica o OE de orégano como “geralmente reconhecido como seguro”. Entretanto, a genotoxicidade do OE de orégano, do carvacrol e do timol ainda é incerta, visto que grande parte dos experimentos foram desenvolvidos *in vitro*. Para cães, a máxima concentração segura recomendada é de 106 mg/kg de ração e, para gatos 18 mg/kg de ração (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2017).

O estudo realizado por Llana-Ruiz-Cabello et al. (2017) buscou analisar, ineditamente, a toxicidade subcrônica *in vivo* do OE de orégano e seus componentes em ratos Wistar através da administração de 0, 50, 100 e 200 mg/kg de OE de orégano. Nenhuma morte ocorreu ao longo dos 90 dias experimentais, não foi observado diferença significativa entre os animais do grupo controle e do grupo teste e não foram encontrados efeitos adversos, mesmo na maior concentração testada.

### 2.5.3 Mecanismo de ação e efeitos do OE de orégano no organismo animal

O OE de orégano possui propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, além de efeitos antiespasmódicos. Algumas espécies são amplamente utilizadas como aromatizantes em alimentos e bebidas alcoólicas. Devido ao elevado conteúdo de compostos bioativos, o OE de orégano está relacionado aos efeitos acaricida e inseticida, assim como ação antibacteriana contra patógenos alimentares (SAKKAS e PAPADOPOULOU, 2017).

Dentre os alvos do carvacrol e do timol no microrganismo, o principal é a estrutura biossintética da parede celular bacteriana (YAP et al., 2014). Para isso, o carvacrol e o timol sensibilizam a parede celular, o que leva à lesão na membrana. Conforme explicado anteriormente, esta lesão culmina no colapso da integridade da membrana citoplasmática celular, o que, conseqüentemente, leva ao vazamento do conteúdo intracelular e a eventual morte bacteriana. Além disso, o vazamento causado pela lesão na membrana celular leva à coagulação do citoplasma e à destruição da membrana proteica. Outro mecanismo com que o carvacrol e o timol atuam sobre as bactérias é por meio da capacidade de adentrarem as membranas bacterianas compostas por ácidos graxos, já que a estrutura lipofílica desses compostos permite esta passagem. Com isso, causam expansão da membrana e o

consequente aumento da fluidez (OMONIJO et al., 2018). Helander et al. (1998) demonstraram que o carvacrol e o timol possuíram atividade inibitória sobre *E. coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium* ao desintegrarem a camada de LPS e reduzirem a quantidade de ATP intracelular.

Existe também a hipótese do modelo transportador de próton. Nesta hipótese, o carvacrol atua como um transportador transmembrana e troca seu próton hidroxila por um íon potássio, o que leva a dissipação do gradiente de pH e do potencial elétrico sobre a membrana, redução da força próton motriz e depleção de ATP. Como o potássio é responsável por diversos mecanismos enzimáticos importantes para o adequado funcionamento do organismo, a redução deste íon culmina em alguns problemas enzimáticos. Por isso, a bactéria precisará utilizar bombas iônicas para combater estes efeitos, uma vez que esta ativação requer grande quantidade de energia. Nesse sentido, a morte bacteriana não necessariamente ocorre, mas o dispêndio em excesso de energia leva ao comprometimento do crescimento bacteriano (OMONIJO et al., 2018).

O OE de orégano modula a inflamação ao inibir os mediadores pró-inflamatórios. Durante a inflamação, mediadores inflamatórios são produzidos, como citocinas, prostaglandinas, enzimas, ROS e outros. Quando a inflamação não é controlada, os mediadores pró-inflamatórios são acumulados e, em excesso, podem induzir processos patológicos. Han e Parker (2017) demonstraram que o OE de orégano induziu biomarcadores inflamatórios, como proteína quimioatraente de monócitos 1, molécula de adesão celular vascular 1, molécula de adesão celular intracelular 1 e proteína 10 induzida por interferon gama. Da mesma forma, Lima et al. (2013) indicaram que administração de 50 e 100 mg/kg de carvacrol atenuou a edema de pata e reduziu os níveis locais de IL-1b e prostaglandina E2 em ratos com inflamação induzida. No mesmo estudo, a administração de 100 mg/kg de carvacrol também diminuiu a expressão de mRNA de COX-2 e IL-1b.

Compostos polifenólicos, como o OE de orégano, interferem amplamente no estresse oxidativo. O OE de orégano reduz a produção de ROS e de malondialdeído (MDA), sendo o MDA correspondente a um produto final da peroxidação de ácidos graxos insaturados e é considerado como um indicador de estresse oxidativo (HO et al., 2013; ZOU et al., 216). Além disso, estudos prévios comprovam os efeitos do OE de orégano no estresse oxidativo, na expressão de enzimas antioxidantes e na produção de ROS (SHIHARI, SENGOTTUVELAN e NALINI, 2008; MUELLER et al.,

2012; WEI et al., 2015). Esse efeito é relacionado com o aumento da expressão de enzimas antioxidantes endógenas, como superóxido dismutase e catalase, por meio da modulação do fator Nrf2 (ZOU et al., 216).

Por fim, o OE de orégano também exerce influência no hospedeiro mesmo quando utilizado topicamente. Em relação à atividade bactericida e fungicida, estudos relatam que o OE de orégano apresenta potencial ação antibacteriana, quando usado topicamente, contra cepas de *Staphylococcus* sp. resistentes a meticilina (NOSTRO et al., 2004). Nardoni et al. (2017) testaram uma mistura de óleos essenciais derivadas de plantas mediterrâneas para tratamento de otite externa por *Malassezia* em cães atópicos e obtiveram resultados positivos em relação à sua eficácia. Os autores afirmaram também que, devido às propriedades complementares, a mistura de óleos essenciais mostrou-se como uma interessante opção de tratamento. Ainda em relação ao tratamento de otite em cães, o estudo realizado por Ebani et al. (2017) revelou que o OE de orégano apresentou resultados positivos contra bactérias do gênero *Staphylococcus* sp., e contra os fungos *Aspergillus niger* e *Rhodotorula* sp.

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os produtos derivados da parede celular do *Saccharomyces cerevisiae* e os óleos essenciais mostram-se como interessantes e promissores aditivos na nutrição de cães. Possuem importantes propriedades para a saúde do animal, principalmente em relação à funcionalidade intestinal, modulação do sistema imune e atuação como antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano. Entretanto, necessita-se de mais estudos para um melhor esclarecimento acerca da interação entre os produtos derivados da parede celular de levedura e os óleos essenciais, assim como para uma melhor compreensão sobre a segurança e toxicidade dos óleos essenciais.

#### 4 REFERÊNCIAS

ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n.3, p. 403–412, ago, 2005. <https://doi.org/10.1079/PNS2005449>

AIMANIANDA, V. et al. Cell Wall  $\beta$ -(1,6)-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae* - Structural characterization and in situ synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13401–13412, mai, 2009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807667200>

ATTIA, Y. A. et al. Performance, blood profile, carcass and meat traits and tissue morphology in growing rabbits fed mannanoligosaccharides and zinc-bacitracin continuously or intermittently. **Animal Science Papers and Reports**, v. 33, n. 1, p.85-101, jan, 2015.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, fev, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

BAMPIDIS, V. et al. Safety and efficacy of an essential oil from *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letsw. for all animal species. **EFSA Journal**, v.17, n.12, nov. 2019. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5909>

BORCHANI, C. et al. Enzymatic process for the fractionation of baker's yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*). **Food Chemistry**, v. 163, p. 108–113, nov, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.086>

BORCHANI, C. et al. Physical, functional and structural characterization of the cell wall fractions from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1149–1155, mar, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.106>

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, p. 1–14, jun, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007>

BRITO, B. G. de et al. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 645-652, mar-abr, 2004.

BROCHOT, A. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. **Microbiology Open**, v. 6, jan, 2017. <https://doi.org/10.1002/mbo3.459>

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition: a new receptor for beta-glucans. **Nature**, v. 413, p. 36–37, set, 2001. <https://doi.org/10.1038/35092620>

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 471–479, mar, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00505.x>



BROWN, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 33–43, jan, 2006. <https://doi.org/10.1038/nri1745>

BROWN, G. D. et al. Dectin-1 Mediates the Biological Effects of  $\beta$ -Glucans. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1119–1124, abr, 2003. <https://doi.org/10.1084/jem.20021890>

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, ago, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

CAPPELI, S. et al. Importância dos aditivos na alimentação de cães e gatos: Revisão. **Pubvet**, v.10, n.3, p.212-223, mar, 2016.

CARNEIRO, V. A. et al. Essential Oils as an Innovative Approach against Biofilm of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Bacterial Biofilms**, out, 2020. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.91833>

CERVANTES-BARRAGAN, L. et al. *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4+CD8 $\alpha\alpha$ + T cells. **Science**, v. 357, n. 6353, p. 806-810, ago, 2017. <https://doi.org/10.1126/science.aah5825>

CHAE, B. J. et al. Effects of supplementation of  $\beta$ -glucan on the growth performance and immunity in broilers. **Research in Veterinary Science**, v. 80, n. 3, p. 291–298, jun, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.07.008>

CHO, S. S.; FINOCCHIARO, E. T. **Handbook of prebiotics and probiotics ingredients: health benefits and food applications**. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010.

DRITZ, S. S. et al. Influence of dietary  $\beta$ -glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to *Streptococcus suis* infection in weanling pigs. *Journal of Animal Science*, v. 73, n. 11, p. 3341-3350, nov, 1995. <https://doi.org/10.2527/1995.73113341x>

EBANI, V. V. et al. Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils against Pathogens Responsible for Otitis Externa in Dogs and Cat. **Medicines**, v. 4, n. 21, abr, 2017. <https://doi.org/10.3390/medicines4020021>

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308–323, abr, 2007. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>

FALCÃO-E-CUNHA, L. et al. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. *World Rabbit Science*, v. 15, n. 3, p.127–140, jul, 2007. <https://doi.org/10.4995/wrs.2007.597>

FERENCZI, S. et al. Oligomannan Prebiotic Attenuates Immunological, Clinical and Behavioral Symptoms in Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease. **Scientific Reports**. 6, 34132, set, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep34132>

FERREIRA, C.S. et al. Metabolic variables of obese dogs with insulin resistance supplemented with yeast beta-glucan. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 14, jan, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03106-2>

FRANCO-ROBLES, E. et al. **Prebiotics and the Modulation on the Microbiota-GALT-Brain Axis**. In book: Prebiotics and Probiotics - Potential Benefits in Nutrition and Health. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89690>

GHOSH, A. et al. Recovery and purification of oligosaccharides from copra meal by recombinant endo- $\beta$ -mannanase and deciphering molecular mechanism involved and its role as potent therapeutic agent. **Molecular Biotechnology**, v. 57, n. 2, p. 111–127, fev, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9807-4>

GONZALEZ, P. S. et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy. **Nature**, v. 563, n. 7733, p. 719–723, nov, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0729-3>

GOUVEIA, E. M. M. F. et al. Action of phosphorylated mannanoligosaccharides on immune and hematological responses and fecal consistency of dogs experimentally infected with enteropathogenic Escherichia coli strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 499-504, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200027>

HAN, X.; PARKER, T. L. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model. **Biochimie Open**, v.4, p. 73–77, jun, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2017.02.005>

HELANDER, I. M et al. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590–3595, 1998. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>

HIGUERAS, C. et al. Short-Chain and Total Fatty Acid Profile of Faeces or Plasma as Predictors of Food-Responsive Enteropathy in Dogs: A Preliminary Study. **Animals**, v. 12, n. 1, p. 89, 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12010089>

HO, E. et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biology**, v.1, n. 1, p. 483–491, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.006>

HONG, F. et al. Mechanism by Which Orally Administered  $\beta$ -1,3-Glucans Enhance the Tumoricidal Activity of Antitumor Monoclonal Antibodies in Murine Tumor Models. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 2, p. 797-806, jul, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.797>

HSIEH, S.-L. (Ed.). Lectin in Host Defense Against Microbial Infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2020. <https://doi.org/doi:10.1007/978-981-15-1580-4>

IGARASHI, H. et al Analysis of fecal short chain fatty acid concentration in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 10, p. 1727–1734, out, 2017. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0165>

JANA, U. K.; KANGO, N. Characteristics and bioactive properties of mannoooligosaccharides derived from agro-waste mannans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 931–940, abr, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.304>

JANA, U. K. et al. Prebiotic mannoooligosaccharides: Synthesis, characterization and bioactive Properties. **Food Chemistry**, v. 342, abr, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128328>

KHOR, T. O. et al. Nrf2-Deficient Mice Have an Increased Susceptibility to Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. **Cancer Research**, v. 66, n. 24, p. 11580–11584, dez, 2006. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3562>

KIM, K. S.; YUN, H. S. Production of soluble  $\beta$ -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 3, p. 496–500, jul, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.020>

LEMOS, M. J. de et al. Uso de aditivo alimentar equilibrador da flora intestinal em aves de corte e de postura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-7, 2016. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000862014>

LEYVA-LÓPEZ, N. et al. Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 989, jun, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22060989>

LI, Z. et al. *Bacillus subtilis* and yeast cell wall improve the intestinal health of broilers challenged by *Clostridium perfringens*. **British Poultry Science**, v. 58, n. 6, p. 635–643, out, 2017. <https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1370697>

LIMA, M. D. S. et al. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1-3, p. 112–117, jan, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.040>

LIN, C.-Y. et al. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune function, and diet palatability in adult dogs. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 4, p. 1586–1599, abr, 2019. <https://doi.org/10.1093/jas/skz064>

LIN, C.-Y. et al. Supplementation of Yeast Cell Wall Fraction Tends to Improve Intestinal Health in Adult Dogs Undergoing an Abrupt Diet Transition. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, nov, 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.597939>

LIU, X.Y. et al. A new isolation method of  $\beta$ -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 239–247, mar, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.11.008>

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. et al. A subchronic 90-day oral toxicity study of *Origanum vulgare* essential oil in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.101, p.36-47, mar, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.001>

LOUIS, P.; HOLD, G. L.; FLINT, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 661–672, set, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrmicro334>

MAEDA, S. et al. Changes in Foxp3-Positive Regulatory T Cell Number in the Intestine of Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease and Intestinal Lymphoma. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 1, p. 102-112, jan, 2016. <https://doi.org/10.1177/0300985815591081>

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.  $\beta$ -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n.3, p. 631-650, jul./set. 2008.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, nov, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>

MARY, P. R. et al. Structural diversity and prebiotic potential of short chain  $\beta$ -mannooligosaccharides generated from guar gum by endo- $\beta$ -mannanase (ManB-1601). **Carbohydrate Research**, v.486, dez, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107822>

MAURYA, A. et al. Essential Oils and Their Application in Food Safety. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, 2021. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.653420>

MIDDELBOS, I. S. et al. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v.85, n.11, p. 3022–3032, nov, 2007. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0079>

MINAMOTO, Y. et al. Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, p. 1608–1618, 2019. <https://doi.org/10.1111/jvim.15520>

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004**. Aprova o regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal, segundo as boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 44, de 15 de dezembro de 2015**. Altera a Instrução Normativa SARC nº 13 de 2004 e Instruções Normativas MAPA nºs 15 e 30 de 2009 e 29 de 2010. Diário Oficial da União, 17 dez 2015.

MÖRBE, U. M. et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. **Mucosal Immunology**, v. 14, n. 4, p. 793-802, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>

MUELLER, K. et al. Influence of broccoli extract and various essential oils on performance and expression of xenobiotic- and antioxidant enzymes in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 4, p. 588–602, 2012. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005873>

MUSCO, N. et al. In vitro evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall fermentability using a dog model. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, p. 24–30, 2018. <https://doi.org/10.1111/jpn.12864>

NARDONI, S. et al. Traditional Mediterranean plants: characterization and use of an essential oils mixture to treat *Malassezia otitis externa* in atopic dogs. **Natural Product Research**, v. 31, n. 16, p.1891–1894, 2017. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1263853>

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, p. 191-195, jan, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00890-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00890-5)

NOVÁK, I. et al. Effect of the drying method on the composition of *Origanum vulgare* L. Subsp. *hirtum* essential oil analysed by gc-ms and sensory profile method. **Acta Alimentaria**, v. 40, p. 130–138, 2011. <https://doi.org/10.1556/aalim.40.2011.suppl.13>

NOVAK, M.; VETVICKA, V. Glucans as Biological Response Modifiers. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 9, p. 67-75, 2009. <https://doi.org/10.2174/187153009787582423>

OMONIJO, F. A. et al. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, v.4, n. 2, p.126-136, jun, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>

OUWEHAND, A. C. et al. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, n. 2, p.212–217, abr, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.01.007>

PAMPLONA, R.; CONSTANTINI, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, p. 843-863, out, 2011. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00034.2011>

PAWAR, M. M. et al. Effect of dietary mannanoligosaccharide supplementation on nutrient digestibility, hindgut fermentation, immune response and antioxidant indices in dogs. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 59, n. 11, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0136-6>

PAZOULI L.; NIINENETS Ü. Multi-substrate terpene synthases: Their occurrence and physiological significance. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1019, p. 1-16, jul, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01019>

PEISER, L.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. Scavenger receptors in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 1, p. 123-128, fev, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00307-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00307-7)

PRONYK, C. et al. Production of Carbohydrates, Lignins, and Minor Components from Triticale Straw by Hydrothermal Treatment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 59, p. 3788–3796, mar, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf104543a>

RÍOS-COVIÁN et al. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, fev, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>

RYCHLIK, A. et al. The effectiveness of natural and synthetic Immunomodulators in the treatment of inflammatory bowel disease in dogs. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 61, n. 3, p. 297–308, set, 2013. <https://doi.org/10.1556/avet.2013.015>

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 3, p. 429–438, mar, 2017. <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>

SINGH, S.; GHOSH, A.; GOYAL, A. Manno-oligosaccharides as prebiotic-valued products from agro-waste. **Biosynthetic Technology and Environmental Challenges**, p. 205–221, 2017. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9_12)

SRIHARI, T.; SENGOTTUVELAN, M.; NALINI, N. “Dose-dependent effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis,” **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 6, p. 787–794, jun, 2008. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.6.0015>

STRICKLING, J. A. et al. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 3, p. 205-219, ago, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00175-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00175-9)

SUN, Y.; O’RIORDAN, M. X. D. Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal Short-Chain Fatty Acids. **Advances in Applied Microbiology**, v. 85, p. 93–118, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00003-4>

SUNTRES, Z.E. et al. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.55, p.304–318, 2015.

SURYAWANSHI, R.K.; KANGO, N. Production of manno-oligosaccharides from various mannans and evaluation of their prebiotic potential. **Food Chemistry**, v. 334 127428, jan, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127428>

SWANSON, K. S. et al. Effects of Supplemental Fructooligosaccharides and Mannanligosaccharides on Colonic Microbial Populations, Immune Function. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 2, p. 1717S–1719S, jun, 2002. <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1717S>

TEHRANI, F.; SADEGHI, E. Effect of Mint Essential Oil on Growth of *Listeria monocytogenes* during the Ripening and Storage of Iranian White Brined Cheese. *J Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, v. 5, n. 7S, p. 150-154, 2015.

THEODORO, S. de S. et al. Effects of the solubility of yeast cell wall preparations on their potential prebiotic properties in dogs. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, e0225659, nov, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225659>

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, abr, 2002. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>

UNUSAN, N. Essential oils and microbiota: Implications for diet and weight control. **Trends in Food Science & Technology**, v. 104, p. 60–71, 2020 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.014>

VETVICKA, V.; OLIVEIRA, C. B(1-3)(1-6)-D-glucans Modulate Immune Status and Blood Glucose Levels in Dogs. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 8, p. 981-991, 2014. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2014/7862>

VINOLO, M. A. R. et al. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 22, n. 9, p. 849-855, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.07.009>

VLASSOPOULOU, M. et al. Effects of fungal beta-glucans on health – a systematic review of randomized controlled trials. **Food & Function**, v. 12, p. 3366–3380, mar, 2021. <https://doi.org/10.1039/D1FO00122A>

WANG, J. et al. Cell wall polysaccharides: before and after autolysis of brewer's yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 137, ago, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2508-6>

WEI, H.-K. et al. Oregano essential oil decreased susceptibility to oxidative stress-induced dysfunction of intestinal epithelial barrier in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1191–1199, out, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.035>

WEI, H. –K. et al. A carvacrol–thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. **Animal**, v. 11, n. 2, p. 193–201, 2017. <https://doi.org/10.1017/S1751731116001397>

YAP, P. S. X. et al. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, n. 1, fev, 2014. <https://doi.org/10.2174/1874285801408010006>

ZENG, Z. et al. Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 3, p. 279-85, out, 2014. <https://doi.org/10.1111/asj.12277>

ZOU, Y. et al. Oregano Essential Oil Induces SOD1 and GSH Expression through Nrf2 Activation and Alleviates Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in IPEC-J2 Cells. Hindawi Publishing Corporation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 5987183, dez, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5987183>



**CHAPTER II – DIGESTIBILITY AND PALATABILITY OF THE DIET AND  
INTESTINAL FUNCTIONALITY OF DOGS FED WITH A BLEND OF YEAST CELL  
WALL AND OREGANO ESSENTIAL OIL**

Artigo redigido conforme as normas da revista *Animal Feed Science and Technology*.

**Digestibility and palatability of the diet and intestinal functionality of dogs fed with a blend of yeast cell wall and oregano essential oil**

Nayara Mota Miranda Soares<sup>a</sup>, Taís Silvino Bastos<sup>a</sup>, Gislaine Cristina Bill Kaelle<sup>a</sup>,  
Renata Bacila Moraes dos Santos de Souza<sup>a</sup>, Simone Gisele de Oliveira<sup>a</sup>, Ananda Portella  
Félix<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Animal Science, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

1540, Rua dos Funcionários, Curitiba, Paraná, 80035-050, Brazil –  
nayaramota097@gmail.com (N.M.M. Soares)

1540, Rua dos Funcionários, Curitiba, Paraná, 80035-050, Brazil -  
tais.sbastoss@gmail.com (T.S. Bastos)

1540, Rua dos Funcionários, Curitiba, Paraná, 80035-050, Brazil -  
gislainebill@gmail.com (G.C.B. Kaelle)

1540, Rua dos Funcionários, Curitiba, Paraná, 80035-050, Brazil –  
renata.bacila@ufpr.br (R.B.M.S. Souza)

1540, Rua dos Funcionários, Curitiba, Paraná, 80035-050, Brazil - sgoliveira@ufpr.br  
(S.G. Oliveira)

1540, Rua dos Funcionários, Curitiba, Paraná, 80035-050, Brazil - apfelix@ufpr.br  
(A.P. Félix) \*Corresponding author.

**Highlights**

- Inclusion of YCO in the diet resulted in higher *Blautia* and *Faecalibacterium*.
- Dogs supplemented with YCO presented higher bacterial diversity in the gut.
- The inclusion of 3.0 kg/ton of YCO resulted in lower fecal histamine and ammonia.
- Fecal putrescine and cadaverine were higher in dogs fed 3.0 kg/ton YCO.

**Abstract**

Intestinal eubiosis and balanced nutrition are basic requirements for intestinal functionality, which can be optimized by including dietary additives such as prebiotics and essential oils. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of yeast cell wall and oregano essential oil on apparent total tract digestibility coefficients (ATTD) and palatability of diet, intestinal fermentation products, and fecal microbiota in dogs. Three dry extruded diets for adult dogs were evaluated, containing zero (control), 1.5, and 3.0 kg/ton of a blend with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO). Eighteen adult dogs were fed for 20 days with the experimental diets. There was a lower intake ratio of the diet containing 1.5 and 3.0 kg/ton of YCO ( $P < 0.05$ ), although there was no refusal by any of the diets. The ATTD of DM was the only coefficient that reduced with the inclusion of 3.0 kg/ton of YCO in comparison to the control diet ( $P < 0.05$ ). The fecal odor of dogs fed the diets containing YCO was less fetid than the control group ( $P < 0.05$ ). In addition, there was an increase in putrescine and cadaverine concentration and a reduction in histamine and ammonia ( $P < 0.05$ ) in the feces of dogs fed the diet containing 3.0 kg/ton of YCO. There was an increase in the intestinal bacterial diversity of dogs fed with both dietary concentrations of YCO evaluated ( $P < 0.05$ ). Dogs fed 1.5 and 3.0 kg/ton of YCO showed increased relative concentrations of *Blautia* and *Faecalibacterium* and decreased concentrations of *Streptococcus* ( $P < 0.05$ ), compared to the control group. To conclude, given the modulation of microorganisms considered beneficial and the lower levels of some nitrogen fermentative products, the blend with YCO leads to an improvement in intestinal functionality indicators.

**Keywords:** additives; intestinal fermentation products; microbiota.

*Abbreviations:* ATTD, apparent total tract digestibility coefficients; BCFA, branched-chain fatty acids; CF, crude fiber; CP, crude protein; DM, dry matter; DMf, fecal dry matter; GE, gross energy; IR, intake ratio; ME, metabolizable energy; OM, organic matter; OTUs, operational taxonomic units; YCO, yeast cell wall and oregano essential oil; PCoA, principal coordinate analysis; SCFA, short-chain fatty acids; SEM, standard error of the mean.

## **Introduction**

Maintaining gut functionality generally depends on diet composition and keeping a well-balanced gut microbiota (Pawar et al., 2017). In this context, many commercial foods already include prebiotics, which are additives that aim to improve intestinal functionality by modulating the gut microbiota (Cho and Finocchiaro, 2010, Ashaolu and Ashaolu, 2021).

According to the International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP), prebiotic is defined as “a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit” (Gibson et al., 2017). In other words, prebiotics are selectively fermented by the enzymes of unicellular organisms, leading to changes in the population and/or activity of the gut microbiota and provide an enabling environment for the growth of bacteria considered beneficial (Falcão-e-Cunha et al., 2007, Cappelli et al., 2016, Pawar et al., 2017, Ashaolu and Ashaolu, 2021). They can be extracted from natural sources, such as plants or yeast, or produced through acid or enzymatic hydrolysis of polysaccharides (Falcão-e-Cunha et al., 2007). One of the prebiotics widely used in the nutrition of dogs and cats is mannanoligosaccharides (MOS), a short-chain carbohydrate composed of 3 to 10 mannose residues, capable of modulating the intestinal microbiota. MOS is usually obtained through enzymatic, alkaline, or acidic hydrolysis of the cell wall mannans derived from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell wall or from plant galactomannans (Jana et al., 2021).

$\beta$ -glucans can also be obtained from *S. cerevisiae* cell wall, these are a group of glucose polymers that escape digestion and alter the composition of the gut microbiota, promoting immunomodulatory, anti-tumor, and antioxidative effects on the host (Vlassopoulou et al., 2021).  $\beta$ -glucans are classified as natural immunostimulators or biological response modifiers, since they interfere in various cell types and biological processes, such as effects on immune cells, regulation of stress or cholesterol levels (Vetvicka and Oliveira, 2014).

In addition to prebiotics, other natural additives such as essential oils (EO) can also contribute to gut functionality. EO are natural bioactive compounds extracted from plant parts, such as leaves, flowers, seeds, and roots. They are volatile, aromatic, and liquid, and in addition to promoting gut benefits, they have properties with antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant potential (Omonijo et al., 2018). An example is the oregano EO, obtained by drying leaves and flowers of *Origanum vulgare*, presenting the phenolic isomers carvacrol and thymol as main components, which constitute about 78-85% of EO (Malayoglu et al., 2010). These bioactive compounds are strongly related to important antimicrobial (especially against Gram-positive bacteria) and antioxidant properties of oregano EO (Sakkas and Papadopoulou, 2017). Given the above, it is possible that the combination of MOS and oregano EO has complementary effects on intestinal functionality in dogs.

To the authors knowledge, no research on the combination of prebiotics and EO in animal nutrition has been published. Therefore, the aim of this study is to evaluate the combined effects of yeast cell wall and oregano EO on nutrient digestibility, diet palatability, intestinal fermentation products, and fecal microbiota in dogs.

## **Material and methods**

The experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Agricultural Sciences Sector of the Federal University of Paraná under protocol number 022/2020.

### **Experiment I: Digestibility, fecal characteristics, intestinal fermentation products, and microbiota**

#### ***Animals and housing***

The experiment was performed at the Laboratory for Studies in Canine Nutrition (LENUCAN) at the Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil (25° 25' 40" S, 49° 16' 23" W). Eighteen adult Beagle, Whippet and mixed breed dogs (eight males and ten females), average of 4.5 years old and with a mean body weight of  $13.3 \pm 1.07$  kg were used. The animals were individually housed in covered masonry kennels with solarium (5 meters long x 2 meters wide), with outdoor access during most of the experimental period. During the period of fecal collection, the animals were kept only in the stalls, with access to bedding and water. The facilities had side walls with bars, which allowed limited interaction with other animals and humans.

The dogs were fed for 20 days, twice a day (7:30 am and 3:30 pm), in an amount sufficient to meet their energy requirements for maintenance, according to the equation proposed by the NRC (2006):  $130 \text{ kcal} \times \text{body weight (kg)}^{0.75}$ . Water was provided *ad libitum*.

### ***Experimental diets***

Three diets were evaluated: control (without the additive); diet containing 1.5 kg/ton of yeast cell wall and oregano EO (YCO) and diet containing 3.0 kg/ton of YCO (Advanced pet Biobalance FT, Alltech, Lexington, USA). The minimum concentration of MOS in the product was 25 g/kg and  $\beta$ -glucans 5830 mg/kg. Calcium carbonate was used as vehicle. The product was included by coating, together with oil and liquid palatability enhancer, after the diet extrusion process. The base diet of the experiment was a commercial complete food formulated to meet the nutritional needs of adult dogs according to The European Pet Food Industry Federation (FEDIAF, 2019). The diet contained the following ingredients: poultry by-products meal, meat meal, corn, soybean meal, poultry fat, pork liver hydrolysate, sodium chloride, citric acid, antioxidants (BHT, BHA), propionic acid, vitamin A, vitamin D3, vitamin E, vitamin B1, vitamin B6, vitamin B12, vitamin K3, nicotinic acid, folic acid, biotin, calcium pantothenate, zinc sulfate, calcium iodate, sodium selenite, copper sulfate, iron sulfate, manganese sulfate, and zinc oxide. The analyzed chemical composition of the diets is described in Table 1.

### ***Digestibility and metabolizable energy determination***

The animals were subdivided into groups, with 6 animals per group. Each group received an experimental diet, totaling 6 replicates per treatment. The digestibility assay was performed based on the total fecal collection method recommended by the Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 2016). The diets were provided in an adaptation period of 15 days, followed by 5 days of total fecal collection.

During the last 5 experimental days, the animals were kept only in the stalls and the feces were collected and weighed at least twice a day for digestibility analysis. Afterward, they were placed in individual plastic containers, previously identified, covered, and stored in

a freezer for further analysis. At the end of each collection period, feces from each repetition were thawed at room temperature and homogenized separately.

Feces were dried in a forced-ventilation oven (320-SE, Fanem, São Paulo, Brazil) at 55°C for 48-72 hours or until a constant weight was reached. After drying, feces and diets samples were ground using a Willey hammer mill (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA) with 1 mm sieves and subjected to chemical analysis. The analysis for diets and feces were: dry matter at 105°C (DM105), crude protein (CP, method 954.01), acid hydrolyzed ether extract (AEE method 954.02), ash (MM, 942.05), crude fiber (CF, method 962.10), calcium (method 927.02), phosphorus (method 984.27), nitrogen (N, method 954.01), and crude protein (CP), which was calculated as  $N \times 6.25$ , according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). Gross energy (GE) was determined using a bomb calorimeter (Parr Instrument Co., model 1261, Moline, IL, USA), and organic matter (OM) was established as 100% - % ash.

### ***Fecal characteristics, intestinal fermentation products, and microbiota***

Fecal characteristics were evaluated by: total DM content, fecal production, score, ammonia (Brito et al., 2010), odor, and pH (measured in 2 g of stool diluted in 20 mL of distilled water). The fecal score was measured always by the same researcher, assigning grades from 1 to 5, being: 1 = pasty and unformed feces; 2 = soft and poorly formed feces; 3 = soft, formed and moist feces; 4 = well-formed and consistent feces; 5 = well-formed, hard and dry feces (Carciofi et al., 2009).

For the evaluation of fecal odor, feces were sampled on the last day of collection at 08:30 h. Feces were randomly collected from three animals per treatment. The samples were homogenized and placed in equal amounts (40 g) in jars of the same size and volume, which were covered with plastic film containing the same number and size of holes, to preserve



odor. The evaluation was carried out by 17 people, by comparing the odor in relation to the control (standard) diet. Values were assigned in relation to the odor of the control diet, as follows: 1-Better than the control diet; 2-Same as the control diet; 3-Worse than the control diet. All participants rated the odor of the standard stool and subsequently the odor of the test samples. The test samples were identified as 'A' and 'B', in order to ensure the anonymity of the treatments to the participants.

On the 20<sup>th</sup> experimental day, fresh feces were collected and analyzed for short-chain (SCFA) and branched-chain fatty acids (BCFA), pH, ammonia, biogenic amines, and microbiota. For the analysis of SCFA and BCFA, 10 g of stool sample was weighed and mixed with 30 mL of 16% formic acid. This mixture was homogenized and stored in a refrigerator at 4°C for a period of 3 to 5 days. Subsequently, these solutions were centrifuged at 5,000 g in a centrifuge (2K15, Sigma, Osterodeam Hans, Germany) for 15 minutes. At the end of centrifugation, the supernatant was separated and centrifuged again. Each sample went through three centrifugations, and at the end of the last one, part of the supernatant was transferred to a properly labeled eppendorf for further freezing. Afterward, the samples were thawed and centrifuged again at 14,000 g for 15 minutes (Rotanta 460 Robotic, Hettich, Tuttlingen, Germany). Fecal SCFA were analyzed by gas chromatography (SHIMADZU, model GC-2014, Kyoto, Japan). A glass column (Agilent Technologies, HP INNO wax - 19091N, Santa Clara, USA) 30 m long and 0.32 mm wide was used. Nitrogen was the carrier gas, with a flow rate of 3.18 mL/min. The working temperatures were 200°C at injection, 240°C on the column (at the rate of 20°C/min) and 250°C at the flame ionization detector. Biogenic amines were analyzed according to Urrego (2017).

For the determination of the fecal microbiota, the commercial kit "ZR Fecal DNA MiniPrep®" from Zymo Research was used to extract DNA from the samples following the manufacturer's recommended protocol. The extracted DNA was quantified by

spectrophotometry at 260 nm. To evaluate the integrity of the extracted DNA, all samples were run by 1% agarose gel electrophoresis. A 250-base segment of the V4 hypervariable region of the 16S ribosomal rRNA gene was amplified using the universal primers 515F and 806R and the following PCR conditions: 94°C for 3 min; 18 cycles of 94°C for 45 sec, 50°C for 30 sec, and 68°C for 60 sec, followed by 72°C for 10 min. From these amplifications, the metagenomic library was built using the commercial kit "Nextera DNA Library Preparation Kit" from Illumina®. The amplifications were pooled and subsequently sequenced on the Illumina® "MiSeq" sequencer (Degnan and Ochman, 2012). The reads obtained on the sequencer were analyzed on QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) platform (Caporaso et al., 2010), following a workflow from removing low quality sequences, filtering, removing chimeras and taxonomic classification. Sequences were classified into bacterial genera by recognizing operational taxonomic units (OTUs); in this case, the homology between sequences when compared to a database. The 2017 update (SILVA 128) of the ribosomal sequence SILVA database (Yilmaz et al., 2014) was used to compare the sequences. To generate the classification of bacterial communities by OTU identification, 611 reads per sample were used, in order to normalize the data and not compare samples with different number of reads, thus avoiding bias in taxonomy. Metagenomic profiles were analyzed in STAMP software (Parks et al., 2014).

### ***Calculations and statistical analysis***

Based on laboratory results, we calculated the ATTD of the nutrients and the ME of the diets, according to AAFCO (2016). For this, we considered:

$$\text{ATTD} = (\text{g nutrient intake} - \text{g nutrient excreted}) / \text{g nutrient intake}$$

$$\text{ME (MJ/kg)} = \{ \text{kJ/g GE intake} - \text{kJ/g fecal GE} - [(\text{g CP intake} - \text{g fecal CP}) \times (5.23 \text{ kJ/g})] \} / \text{g feed intake}.$$

Data were analyzed according to a completely randomized design, totalizing 6 replicates per treatment. Data were analyzed for normality by the Shapiro-Wilk test and when this assumption was met, they were subjected to analysis of variance (ANOVA), considering  $P < 0.05$  as significant for the F test. Means were compared by Tukey's test ( $P < 0.05$ ). Non-parametric data were analyzed using Kruskal-Wallis test ( $P < 0.05$ ). Data were analyzed using the SAS statistical package (version 8, SAS Institute Inc., Cary, NC, United States of America).

Microbial diversity was estimated by Shannon and Chao1 indexes. Beta-diversity was analyzed by principal coordinate analysis (PCoA) using the Bray-Curtis dissimilarity method. Analysis of similarity (ANOSIM) was used to compare the overall microbiome profile among the groups considering  $P < 0.05$ .

## **Experiment II: Palatability assay**

### ***Animals and experimental procedures***

The experiment was conducted in the Laboratory for Canine Nutrition Studies (LENUCAN) of the Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil, under the same conditions previously described. Sixteen adult Beagle dogs (8 males and 8 females), 4.5 years old and with a mean body weight of  $11.3 \pm 1.07$  kg were used.

The palatability trial was conducted for two consecutive days, once a day, to evaluate the palatability of YCO compared to the control diet and between the different doses of the additive. Three comparisons were made: control vs 1.5 kg/ton of YCO (Test 1); control vs 3.0 kg/ton of YCO (Test 2), and 1.5 kg/ton of YCO vs 3.0 kg/ton of YCO (Test 3). Each test was conducted over two consecutive days.

Each animal was offered two feeders simultaneously, each containing an experimental diet. At each feeding, the animals received the daily energy requirement plus 30% of each

diet, based on the NRC (2006) recommendation for adult dogs in maintenance, thus ensuring the presence of leftovers. The food was available to the animals for 30 minutes or until they fully consumed one of the foods. On the second day of evaluation, the position of the feeders was alternated to avoid laterality.

The first feeder that the animal approached during the simultaneous offering of the diets was recorded as the first choice. The diet intake ratio (IR) was calculated using the equation:  $IR = [g \text{ consumed of A or B} / g \text{ total consumed (A+B)}] \times 100$ .

### ***Statistical analysis***

The data followed a completely randomized design. The IR results were compared by Student's t-test at 5% significance and the first choice by Chi-square test at 5%, totaling 32 replicates per test (two days x 16 dogs).

## **Results**

### **Experiment I: Digestibility assay, fecal characteristics, intestinal fermentation products, and microbiota**

There were no episodes of vomiting or diarrhea, and all dogs consumed the diets normally, without difference among treatments (average =  $198.9 \pm 43.91$  g DM/dog/day,  $P > 0.05$ ). The ATTD of the diets and fecal characteristics are presented in Table 2.

A significant reduction in fecal odor was identified in dogs supplemented with YCO ( $P < 0.05$ ). Of the 17 evaluators, 59% (n=10) judged the stool odor of dogs fed 1.5 kg/ton of YCO to be less fetid compared to the control group, 18% (n=3) to be equally fetid, and 24% (n=4) to be more fetid. On the other hand, 100% of the evaluators (n=17) considered the odor of feces from dogs fed 3.0 kg/ton of YCO as less fetid compared to feces from animals in the control group (not shown).

A significant reduction in the ATTD of DM was observed with the inclusion of 3.0 kg/ton of YCO compared to the control diet ( $P < 0.05$ ). However, the ATTD of other nutrients did not differ among diets ( $P > 0.05$ ). Regarding fecal characteristics, there was a reduction of ammonia in the feces of dogs fed 3.0 kg/ton of YCO as compared to both other diets. The other fecal characteristics, such as pH, DMf, fecal score, and fecal output ( $P > 0.05$ ; Table 2) were not different among three treatments.

There was no effect of YCO on the concentration of SCFA and BCFA in the feces of dogs ( $P > 0.05$ ) among treatments. However, in the feces of animals fed the diet containing 3.0 kg/ton of YCO there was an increase in the concentration of putrescine and cadaverine, as well as a reduction in histamine compared to control and 1.5 kg/ton YCO ( $P < 0.05$ , Table 3). Phenols concentrations were lower in the feces of dogs that consumed the diets with YCO compared to the control diet ( $P < 0.05$ , Table 4). However, the diets did not differ in the fecal concentration of indoles ( $P > 0.05$ , Table 4).

There was an increase in the intestinal bacterial diversity in dogs fed the two doses of YCO evaluated, relative to the control group ( $P < 0.05$ , Figure 1). Furthermore, the PCoA showed evident differentiation in bacterial communities among treatments ( $P < 0.05$ , Figure 2). The most abundant bacterial phyla in the dog feces were Bacteroidetes, Firmicutes, and Fusobacteria. Of these, there was a reduction in the phylum Bacteroidetes and an increase in Firmicutes in dogs fed 1.5 and 3.0 kg/ton of YCO, relative to the control group ( $P < 0.05$ ). There was also a reduction ( $P < 0.05$ ) in the phylum Fusobacteria in dogs fed 3.0 kg/ton YCO (Table 5).

There were 208 bacterial genera identified in the feces of dogs. Of these, 9 differed among treatments ( $P < 0.05$ , Table 6). Dogs fed 1.5 and 3.0 kg/ton of YCO showed higher relative abundance of *Blautia* and *Faecalibacterium* and lower abundance of *Streptococcus* ( $P < 0.05$ ) in the feces, compared to the control group. Also, the dogs fed with 3.0 kg/ton of

YCO showed higher fecal relative abundance of *Turicibacter* and lower *Bacteroides* and *Fusobacterium* compared to the other treatments ( $P < 0.05$ ) and the dogs fed 1.5 kg/ton of YCO showed a higher *Clostridium* and *Ruminococcus* and lower *Prevotella*, compared to the other treatments.

### **Experiment II: Palatability assay**

Palatability results are shown in Table 7. There was higher number of first choices for the diet containing 3.0 g/kg YCO, compared to the control diet ( $P < 0.05$ ). However, the IR was higher for the diets without the additive (control) and for the diet with 1.5 kg/ton of YCO, when compared to the 3.0 kg/ton of YCO diet ( $P < 0.001$ ). Despite this result, the animals that were supplemented with YCO did not refuse the diets throughout the study, which were normally consumed (average =  $198.9 \pm 43.91$  g DM/dog/day).

### **Discussion**

The use of functional ingredients by the pet food industry follows the growing concern of pet owners for the health and welfare of their pets. Due to the diverse properties of yeast cell wall components and EO, these become important additives to be studied and used in canine nutrition. In the present study, it was observed potential beneficial effects of adding the YCO blend to the diet on the intestinal functionality of dogs, given the modulation of the intestinal microbiota and reduction of fecal nitrogenous compounds.

The difference observed in the ATTD of DM with the inclusion of 3.0 kg/ton of YCO compared to the control diet is an unusual result and the numerical difference was not expressive. Possibly, the reduction observed in the ATTD of DM does not have a major nutritional impact, since ATTD of other nutrients or ME were not different.

Ammonia is the main metabolite originating from protein fermentation by the gut microbiota (Wang et al., 2019). When protein is not digested by host enzymes in the small

intestine, gut microorganisms can hydrolyze it using extracellular proteases and peptidases, which generates free amino acids and peptides that can be absorbed by microorganisms. After the deamination process, which is the catabolic step responsible for removing the amine group from amino acids, ammonia is produced (Blachier et al., 2007, Diether and Willing, 2019). Therefore, the luminal ammonia concentration in intestine can vary depending on the combined effects of enterocyte metabolism, microbial deamination, and microbial protein synthesis (Ashaolu and Ashaolu, 2021). It was found a reduction in ammonia concentration in the feces of dogs fed 3.0 kg/ton of YCO in comparison to the control group, possibly as a result of the reduction in the abundance of proteolytic microorganisms (Diether and Willing, 2019).

The reduction in fecal ammonia concentration corroborates with the result found related to fecal odor. Ammonia, as well as some biogenic amines, indoles, phenols, BCFA, are some of the volatile compounds responsible for foul fecal odor (Komarcheuski et al., 2018). Taking into consideration that a large part of the evaluators judged the odor of fresh feces from dogs fed YCO as less fetid compared to the control group, the possibility of using YCO for the improvement of fecal odor is evidenced. This information can be extended to other species, such as cats, since the study of Aquino et al. (2012) demonstrated that the inclusion of 0.2% yeast cell wall extract resulted in a slight improvement in stool odor of the cats evaluated.

The other fecal characteristics, such as pH, DMf, fecal score, and fecal production did not differ among treatments, contrary to Middelbos et al. (2007), who identified increased fecal pH and reduced fecal production in dogs fed yeast cell wall. On the other hand, the study of Swanson et al. (2002b) demonstrated that there was no difference related to fecal characteristics in dogs fed MOS, although a trend towards increased fecal pH was identified in animals receiving the prebiotic when compared to the control group. A possible

explanation for the fact that fecal pH did not differ among treatments in the present study is the amount of YCO added to the diet. The amount added may have been insufficient to generate changes in intestinal fermentation that could be measured by fecal pH (Félix et al., 2009).

The higher fecal concentration of some biogenic amines possibly occurred due to the amino acid fermentation by the colonic microbiota (Barry et al., 2014). This increase seems contradictory to the reduction in ammonia concentration and fecal odor in dogs fed 3.0 kg/ton of YCO. However, it is known that some polyamines, such as putrescine and cadaverine, are extremely important for the regulation of intestinal cell physiology, such as membrane stability, correct cell proliferation and differentiation (Diether and Willing, 2019, Bekebrede et al., 2020). Indeed, some studies have shown that dogs and humans with inflammatory bowel disease have reduced putrescine and spermidine concentrations. *Faecalibacterium*, one of the bacterial genera that presented higher abundance in dogs supplemented with YCO, is able to catalyze the transfer of the propylamine group from the amine donor S-adenosylmethioninamine to putrescine, producing spermidine and increasing putrescine concentrations (Rossi et al., 2017; Tofalo et al., 2019). In addition, a relevant result was the nearly five-fold reduction in histamine concentration in the YCO-fed dogs. Histamine is an important signaling agent for toxic agents in the gut, and its higher concentration is related to increased intestinal inflammatory processes (Smolinska et al., 2022). Thus, its reduction may be indicative of a protective effect of YCO in the gut, which may help control inflammatory processes.

Although there was a reduction in the mean concentration of phenols in the feces of dogs that consumed YCO diets compared to the control diet, there was no difference among the diets regarding indole production. On another hand, Swanson et al. (2002a) identified a tendency for reduced indole concentration in dogs supplemented with a mixture of



oligosaccharides (MOS + FOS) and observed no difference in phenol concentration in any of the treatments.

The differences observed in the concentrations of ammonia, biogenic amines, phenols, and indoles possibly occurred in response to changes in the gut microbiota. Animals fed 1.5 and 3.0 kg/ton of YCO showed an increase in alpha diversity when compared to the control group, represented by higher gut bacterial diversity and richness. Many factors exert influence on the diversity of gut microbiota, such as the type of diet ingested (Grzeskowiak et al., 2015, Kim et al., 2017 Pilla and Suchodolski, 2020), segment of the gastrointestinal tract, and the particularities of each animal, such as management, genetics, antibiotic administration, and environmental factors (Tizard and Jones, 2018).

In the present study, the influence of the YCO blend on the composition of the gut microbiota is perceived. One of the important properties of MOS is the ability to modulate the gut microbiota, which occurs mainly through the ability to adhere to type I fimbriae. This type of fimbriae is present in most gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. and some species of *Salmonella* sp. such as *S. typhimurium* and *S. enteritidis* (Muller et al., 1991). Type I fimbriae allow attachment of the bacteria to the enterocyte and exert an agglutinating effect on these cells. However, agglutination is blocked by D-mannose or  $\alpha$ -methylmannosidium and by concanavalin A. Therefore, by binding with this type of fimbria, MOS can limit intestinal colonization by potentially pathogenic microorganisms (Brito et al., 2004). Another mechanism of action of MOS on modulating gut microbiota is through selective fermentation, which benefits the growth of certain bacterial groups, such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, and the production of SCFA, such as acetate, propionate, and butyrate (Mary et al., 2019). Bacteria of the genus *Lactobacillus* help maintain a proper enteric environment, as they suppress the growth of potentially pathogenic bacteria through the production of SCFA (Suryawanshi and Kango, 2021). It is important to note that this

selective fermentation mechanism of the gut microbiota is secondary, as MOS is moderately fermentable (Zentek et al., 2002). Furthermore, due to the partial solubility of SCFA in the membrane, these gut fermentation products can alter the integrity and fluidity of the membrane of pathogens and is another mechanism for inhibiting the growth of microorganisms considered pathogenic (Jana et al., 2021). Although no increase in SCFA concentrations was observed in the present study, the overall results of gut microbiota and gut fermentation products are consistent with beneficial effects on gut functionality. Possibly, the SCFA concentration did not differ because they are rapidly absorbed in the gut and are metabolized by the intestinal epithelium, liver, and muscle (Strompfová et al., 2017, Félix et al., 2022), resulting in lower fecal concentration.

Another component of the yeast cell wall that could have had association with the modulation of gut microbiota and intestinal functionality is the  $\beta$ -glucans. It is known that  $\beta$ -glucans, a polymer of glucose monomers linked by  $\beta$ -glycosidic bond, exert biological properties on the organism (Du et al., 2019). One important effect is the immunomodulation, given the enhancement of phagocytosis of granulocytes, monocytes, macrophages and dendritic cells (Novak and Vetvicka, 2009). These immunocompetent cells express Dectin-1 receptor, which is one of the mechanisms of  $\beta$ -glucan action in the organism. When in the host,  $\beta$ -glucan bind to Dectin-1 receptor, stimulating the production of many cytokines or other mechanisms of immune and non-immune reactions (Jesenak et al., 2014).  $\beta$ -glucan can produce effects on the systemic immune system and interact with the gut-associated lymphoid tissue (GALT), strengthening it (Rice et al., 2005). In this way, another property of  $\beta$ -glucan is the positive effect on gastrointestinal functionality since  $\beta$ -glucan can produce SCFA through fermentation, modulating the gut microbiota (Chen et al., 2022).  $\beta$ -glucan can also improve the intestinal barrier function via up-regulating the tight-junction protein expressions, such as Occludin, Claudins and ZO-1 (Zhang et al., 2023). In a mice model of high-fat diet-

induced metabolic distress,  $\beta$ -glucan supplementation improved tight-junction proteins, resulting in the restoration of the intestinal barrier (Muthuramalingam et al., 2019).

The modulation of the intestinal microbiota found in this study probably resulted from both the action of yeast cell wall extracts and oregano EO, contributing to the increase in bacteria related to intestinal eubiosis and bacterial diversity. The antimicrobial action of EO and the modulation of the gut microbiota occurs due to the action of bioactive compounds on several targets in the bacterial cell, such as damage to the cell membrane, cytoplasmic membrane and protein membrane, extravasation of cell contents, coagulation of the cytoplasm and depletion of the proton motor force (Burt, 2004). In general, EO have a greater spectrum of action on Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria, since Gram-negative bacteria are more resistant to EO (Chao, Young, Oberg, 2000). However, the phenolic compounds carvacrol and thymol, recognized for having intense antimicrobial activity, have also action on Gram-negative bacteria, since they are able to disintegrate the outer membrane of Gram-negative bacteria, releasing lipopolysaccharides (LPS) and increasing the permeability of the cytoplasmic membrane (Helander et al., 1998). It is also possible that the variation in composition among EO is sufficient to vary the degree of susceptibility of Gram-negative and Gram-positive bacteria. Due to the hydrophobicity of EO and their compounds, the membrane polysaccharides, fatty acids, and phospholipid layer of the bacterial cell wall and mitochondria are injured, generating changes in structural conformation and making the membrane permeable (Brenes, Roura, 2010, Brochot et al., 2017).

In a study by Zeng et al. (2015), when evaluating the use of an EO blend consisting of 4.5% cinnamaldehyde and 13.5% thymol in weaned pigs, animals fed EO showed a significant reduction in *E. coli* and total anaerobic bacteria in the rectum and a quantitative increase in *Lactobacillus* in the colon and rectum, when compared to pigs that did not receive such supplementation. Extrapolating to other animal species, few studies encompass the use

of phytogetic compounds in canine nutrition. In one of these, it was shown that dogs fed a blend composed of 21.55 mg/g carvacrol, 18.76 mg/g, thymol, and 27.62 mg/g cinnamaldehyde showed a reduction in total bacterial count, total coliforms, *Salmonella* spp. and *E. coli*, revealing the important effect of these compounds on intestinal functionality (Campigotto et al., 2021).

Dogs fed 1.5 and 3.0 kg/ton of YCO showed a reduction in the phylum Bacteroidetes and an increase in Firmicutes, compared to the control group, probably as a result of modulation of microorganisms related to intestinal eubiosis. This result contradicts the findings of Van den Abbeele et al. (2020), since the authors identified a significant increase in the phyla Bacteroidetes and Actinobacteria when evaluating the effects of a *Saccharomyces cerevisiae*-based product, containing 27.5%  $\beta$ -glucans and 22.5% MOS, in an *in vitro* simulation of the canine gastrointestinal tract.

Of the 208 bacterial genera identified in dog feces in this study, 9 differed among treatments. *Faecalibacterium* and *Blautia* are known as butyrate producers and are associated with reduced inflammatory processes in the gut, being considered biomarkers of gut functionality (Bjerrum et al., 2006, Felix et al., 2022). Also, *Faecalibacterium prausnitzii*, the only known species of this genus, secretes metabolites that block the activation of NF- $\kappa$ B factor transcription, consequently resulting in the inhibition of the production of the pro-inflammatory cytokine interleukin 8 (Sokol et al., 2008).

It is important to highlight the increase in the relative abundance of *Clostridium* in the feces of dogs fed 1.5 kg/ton of YCO when compared to the control group. Although the genus *Clostridium* is recognized for having species with potential pathogenicity to animals, such as *C. difficile* and *C. perfringens* (Busch et al., 2015, Weese, 2020), studies reveal the beneficial effects of *C. hiranonis* by converting primary bile acids into secondary ones (Félix et al., 2022). Secondary bile acids control the growth of *C. difficile* spores and, in previous studies,

have been shown to stimulate the growth of *Fusobacterium* and *Faecalibacterium* and inhibit *E. coli* (Li et al., 2021), being a mechanism for modulating potentially pathogenic microorganisms. Considering that, it is important that future studies evaluate the effects of YCO on bacteria species in the gut.

The reduction in histamine concentrations in the feces of dogs fed YCO corroborates with the microbiota results found. Histamine is a biogenic amine recognized for the immediate type I hypersensitivity effects responsible for allergic reactions. Increased concentrations of histamine cause alterations in host immune responses with the microbiota and leads to a breakdown of homeostasis, contributing to the pathophysiology of gastrointestinal tract disorders. These disorders reduce the diversity of the gut microbiota, altering the microbial composition and setting up a condition of dysbiosis (Smolinska et al., 2022). The increase in bacterial diversity in the feces of dogs fed YCO is one of the main findings related to improved intestinal functionality. Dogs with gastroenteritis, such as inflammatory bowel disease and acute and chronic diarrhea, have lower diversity of the gut microbiota, characterizing dysbiosis (Suchodolski et al., 2012). Also, several studies show that dogs with gastroenteritis have reduced concentrations of key microorganisms such as *Faecalibacterium*, *Blautia* and *Turicibacter* and increased *Streptococcus* (Suchodolski et al., 2012, Minamoto et al., 2014, Vazquez-Baeza et al., 2016, AlShawaqfeh et al., 2017, Minamoto et al., 2019).

Regarding palatability, although yeast-derived products are known to make diets more palatable (Lin et al., 2019), the inclusion of YCO reduced feed consumption compared to the control diet in this trial. Such result may have occurred due to: (1) the organoleptic characteristics of oregano EO, which presents intense odor and flavor, and (2) the inclusion of the YCO blend by coating. Despite this result, there was no refusal of any of the diets, which were normally consumed during the study.

We did not find studies that evaluate the palatability of diets containing oregano EO in dogs. However, one study evaluating a blend of EO (copaiba, cashew nut shell, and peppers) also described a possible negative effect of the EO blend evaluated on diet palatability in dogs (Souza et al., 2023). Possibly, the inclusion of the YCO blend in the batter would have less influence on palatability. However, further studies are needed to confirm this hypothesis.

## **Conclusion**

Although the inclusion of 3.0 kg/ton of YCO reduces dietary DM digestibility and palatability, it does not alter the ATTD of other nutrients, including ME. Overall, dogs fed the blend containing yeast cell wall and oregano essential oil showed an improvement in indicatives of intestinal functionality, characterized by increased bacterial diversity, modulation of microorganisms considered beneficial, and a reduction in histamine, phenols, and ammonia concentrations, and fecal odor.

## **Credit authorship contribution statement**

**Nayara Mota Miranda Soares:** Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. **Taís Silvino Bastos:** Investigation, Data Curation, Writing – Review. **Gislaine Cristina Bill Kaelle:** Investigation. **Renata Bacila Morais dos Santos de Souza:** Writing – Review. **Simone Gisele de Oliveira:** Supervision, Writing - review & editing. **Ananda Portella Félix:** Conceptualization, Data Curation, Project administration, Writing - Review & Editing.

## **Declaration of competing interest**

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

We would like to acknowledge CAPES and Alltech for providing the additive blend used in this research and for the financial support.

## References

- AlShawaqfeh, M.K., Wajid, B., Minamoto, Y., Markel, M., Lidbury, J.A., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., 2017. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathies. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, 136. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix136>
- Aquino, A.A., Alves, M.P, Santos, J.P.F., Feliciano, M.A.R., Piccoli, R.H., Saad, F.M.O.B., 2012. Efeitos do extrato de parede de levedura em dieta seca sobre a microbiologia, ácidos graxos de cadeia curta e redução do odor das fezes de gatos adultos. *Cien. Anim. Bras.* 13, 479-486. <https://doi.org/10.5216/cab.v13i4.15354>
- Ashaolu, T. J., Ashaolu, J. O., 2021. Prebiotic peptides, their formation, fermentation in the gut, and health implications. *Biotechnol. Prog.* 37, e3142. <https://doi.org/10.1002/btpr.3142>
- Association of American Feed Control Officials - AAFCO, 2016. Dog and cat nutrient profiles. Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporated. AAFCO, Oxford, IN, USA.
- Association of the Official Analytical Chemists - AOAC, 1995. Official Methods of Analysis, 16.ed. AOAC, Washington, DC, USA.
- Barry, K.A., Hernot, D.C., Van Loo, J., Fahey Jr. D.C., de Godoy, M.R.C., 2014. Fructan supplementation of senior cats affects stool metabolite concentrations and fecal microbiota concentrations, but not nitrogen partitioning in excreta. *J. Anim. Sci.* 92, 4964–4971. <http://doi.org/10.2527/jas2013-751>

- Bekebrede, A.F., Keijer, J., Gerrits, W.J.J., Boer, V.C.J., 2020. The Molecular and Physiological Effects of Protein-Derived Polyamines in the Intestine. *Nutrients*. 12 (1), 197. <https://doi.org/10.3390/nu12010197>
- Bjerrum, L., Engberg, R.M., Leser, T.D., Jensen, B.B., Finster, K., Pedersen, K., 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poult. Sci.* 85, 1151-1164. <https://doi.org/10.1093/ps/85.7.1151>
- Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J.F., Tomé, D., 2007. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids*. 33, 547–562. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0477-9>
- Brenes, A., Roura, E., 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007>
- Brito, B.G., Vidotto, M.C., Berbel, M.M., Tagliari, K.C., 2004. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. *Cienc. Rural*. 34, 645-652
- Brito, C.B.M., Félix, A.P., Jesus, R.M., França, M.I., Oliveira, S.G., Krabbe, E.L., Maiorka, A., 2010. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159, 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.06.001>
- Brochot, A., Guilbot, A., Haddioui, L., Roques, C., 2017. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *Microbiol. Open*. 6, e459. <https://doi.org/10.1002/mbo3.459>



- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Busch, K., Suchodolski, J.S., Kühner, K.A., Minamoto, Y., Steiner, J.M., Mueller, R.S., Hartmann, K., Unterer, S., 2015. Clostridium perfringens enterotoxin and Clostridium difficile toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. *Vet. Rec.* 176, 253–253. <https://doi.org/10.1136/vr.102738>
- Campigotto, G., Jaguezeski, A.J., Alba, D.F., Giombelli, L.C.D., Rosa, G., Souza, C.F., Baldissera, M.D., Petrolli, T.G., Silva, A.S., 2021. Microencapsulated phytogenic in dog feed modulates immune responses, oxidative status and reduces bacterial (Salmonella and Escherichia coli) counts in feces. *Microb. Pathog.* 159, 105113. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105113>
- Carciofi, A.C., Oliveira, L., Valério, A., Borges, L.L., Carvalho, F., Brunetto, M.A., Vasconcellos, R.S. 2009. Comparison of micronized whole soybeans to common protein sources in dry dog and cat diets. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 151, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.01.002>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D.A., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Cappelli, S., Manica, E., Hashimoto, J.H., 2016. Importância dos aditivos na alimentação de cães e gatos: Revisão. *Pubvet.* 10, 212–223

- Chao, S.C., Young, D.G., Oberg, C.J., 2000. Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *J. Essent. Oil Res.* 12, 639-649. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712177>
- Chen, C., Huang, X., Wang, H., Geng, F., Nie, S., 2022. Effect of  $\beta$ -glucan on metabolic diseases: a review from the gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Food.* 47, 100907. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100907>
- Cho, S.S., Finocchiaro, E.T., 2010. Handbook of prebiotics and probiotics ingredients: health benefits and food applications. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Diether, N.E., Willing, B.P., 2019. Microbial Fermentation of Dietary Protein: An Important Factor in Diet-Microbe-Host Interaction. *Microorganisms.* 7, 19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010019>
- Du, B., Meenu, M., Liu, H., Xu, B., 2019. A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of  $\beta$ -Glucan. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4032. <https://doi.org/10.3390/ijms20164032>
- Falcão-E-Cunha, L., Castro-Solla, L., Maertens, L., Marounek, M., Pinheiro, V., Freire J., Mourão, J.L., 2007. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. *World Rabbit Sci.* 15, 127–140. <https://doi.org/10.4995/wrs.2007.597>
- FEDIAF, 2019. The European pet food industry federation. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. European pet food industry federation, Brussels, BE.
- Félix, A.P., Zanatta, C.P., Brito, C.B.M., Murakami, F.Y., França, M.I., Maiorka, A., Flemming, J.S., 2009. Suplementação de mananoligossacarídeos (MOS) e uma mistura de aluminossilicatos na qualidade das fezes de cães adultos. *Arch. Vet. Sci.* 14, 31-35. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v14i1.13229>

- Félix, A.P., Souza, C.M.M., De Oliveira, S.G., 2022. Biomarkers of gastrointestinal functionality in dogs: A systematic review and meta-analysis. *Ani. Feed Sci. Technol.* 283, 115183. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115183>
- Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G., 2017. Expert consensus document: the international scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Grzeskowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., Salminen, S., 2015. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe.* 34, 14e23. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002>
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von Wright, A., 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3590–3595. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>
- Jana, U.K., Suryawanshi, R.K., Prajapati, B.P., Kango, N., 2021. Prebiotic manooligosaccharides: Synthesis, characterization and bioactive properties. *Food Chem.* 342, 128328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128328>
- Jesenak, M., Banovcina, P., Rennerova, Z., Majtan, J., 2014. B-Glucans in the treatment and prevention of allergic diseases. *Allergol. Immunopathol.* 42, 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2012.08.008>
- Kim, J., An, J.U., Kim, W., Lee, S., Cho, S., 2017. Differences in the gut microbiota of dogs (*Canis lupus familiaris*) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform. *Gut Pathog.* 9,. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0218-5>

- Komarcheuski, A. S., Sabchuk, T.T., Bastos, T.S., Ostapechen, N., Merchiori, A., Oliveira, S.G., 2018. Avaliação das características fecais de cães suplementados com diferentes fontes e níveis de extrato de Yucca. Arch. Vet. Sci. 23, 1, Especial do IV Simpósio de Nutrição de Animais de Companhia, 23-24. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v23i1Esp.59930>
- Li, P., Piao, X., Ru, Y., Han, X., Xue, L., Zhang, H., 2012. Effects of Adding Essential Oil to the Diet of Weaned Pigs on Performance, Nutrient Utilization, Immune Response and Intestinal Health. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 25, 1617-1626. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12292>
- Li, Q., Larouche-Lebel, É., Loughran, K.A., Huh, T.P., Suchodolski, J.S., Oyama, M.A., 2021. Gut Dysbiosis and Its Associations with Gut Microbiota-Derived Metabolites in Dogs with Myxomatous Mitral Valve Disease. mSystems. 6, e00111-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00111-21>
- Lin, C.Y., Alexander, C., Steelman, A.J., Warzecha, C.M., Godoy, M.R.C., Swanson, K.S., 2019. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune function, and diet palatability in adult dogs. J. Anim. Sci. 97, 1586–1599. <https://doi.org/10.1093/jas/skz064>
- Malayoglu, H.B., Baysal, S., Misirlioğlu, Z., Polat, M., Yilmaz, H., Turan, N., 2010. Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat-soybean meal diets. Br. Poult. Sci. 51, 67-80. <https://doi.org/10.1080/00071660903573702>
- Mary, P.R., Prashanth, K.V.H., Vasu, P., Kapoor, M., 2019. Structural diversity and prebiotic potential of short chain  $\beta$ -mannooligosaccharides generated from guar gum by endo- $\beta$ -

- mannanase (ManB-1601). *Carbohydr. Res.* 486, 107822.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107822>
- Middelbos, I.S., Godoy, M.R., Fastinger, N.D., Fahey Jr, G.C., 2007. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. *J. Anim. Sci.* 85, 3022–3032. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0079>
- Minamoto, Y., Dhanani, N., Markel, M.E., Steiner, J. M., Suchodolski, J.S. 2014. Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Vet. Microbiol.* 174, 463–73.  
<https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.3.368>
- Minamoto, Y., Minamoto, T., Isaiah, A., Sattasathuchana, P., Buono, A., Rangachari, V.R., Mcneely, I.H., Lidbury, J., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., 2019. Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. *J. Vet. Intern. Med.* 33, 1608-1618. <https://doi.org/10.1111/jvim.15520>
- Muller, K.H., Collinson, K., Trust, T.J., Kay, W.W., 1991. Type 1 Fimbriae of *Salmonella enteritidis*. *J. Bacteriol.* 173, 4765-4772. <https://doi.org/10.1128/jb.173.15.4765-4772.1991>
- Muthuramalingam, K., Singh, V., Choi, C., Choi, S.I., Kim, Y.M., Unno, T., Cho, M., 2019. Dietary intervention using (1,3)/(1,6)- $\beta$ -glucan, a fungus-derived soluble prebiotic ameliorates high-fat diet-induced metabolic distress and alters beneficially the gut microbiota in mice model. *Eur. J. Nutr.* 59, 2617-2629.  
<https://doi.org/10.1007/s00394-019-02110-5>
- National Research Council – NRC. 2006. *Nutrient Requirements of Dogs*. National Academy Press. Washington, 428p.

- Novak, M., Vetvicka, V., 2009. Glucans as Biological Response Modifiers. *Endocr Metab Immune Disord - Drug Targets*. 9, 67-75. <https://doi.org/10.2174/187153009787582423>
- Omonijo, F.A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L., Yanga, C., 2018. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Anim Nutr*. 4, 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G., 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*. 30, 3123-3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Pawar, M.M., Pattanaik, A.K., Sinha, D.K., Goswami, T.K., Sharma, K., 2017. Effect of dietary mannanoligosaccharide supplementation on nutrient digestibility, hindgut fermentation, immune response and antioxidant indices in dogs. *J. Anim. Sci. Technol*. 59, 11. <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0136-6>
- Pilla, R., Suchodolski, J.S., 2020. The role of the canine gut microbiome and metabolome in health and gastrointestinal disease. *Front. Vet. Sci*. 6, 498. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00498>
- Rice, P.J., Adams, E.L., Ozment-Skelton, T., Gonzalez, A.J., Goldman, M.P., Lockhart, B.E., Barker, L.A., Breuel, K.F., DePonti, W.K., Kalbfleisch, J.H., Ensley, H.E., Brown, G.D., Gordon, S., Williams, D.L., 2005. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 314, 3. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.085415>
- Rossi, G., Cerquetella, M., Scarpona, S., Pengo, G., Fettucciari, K., Bassotti, G., Jergens, A.E., Suchodolski, J.S., 2017. Effects of probiotic bacteria on mucosal polyamines levels in dogs with IBD and colonic polyps: a preliminary study. *Benef. Microbes*. 9, 247–55. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0024>

- Sakkas, H., Papadopoulou, C., 2017. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 429-438. <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>
- SAS Institute Inc., 2011. SAS/STAT® 9.3 User's Guide, Cary, NC, USA.
- Smolinska, S., Winiarska, E., Globinska, A., Jutel, M., 2022. Histamine: A Mediator of Intestinal Disorders – A Review. *Metabolites.* 12, 895. <https://doi.org/10.3390/metabo12100895>
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H.M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P., 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 16731-16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
- Souza, R.B.M.S, Soares, N.M.M., Bastos, T.S., Kaelle, G.C.B., Oliveira, S.G., Félix, A.P., 2023. Effects of dietary supplementation with a blend of functional oils to fecal microbiota, and inflammatory and oxidative responses, of dogs submitted to a periodontal surgical challenge. *Anim. Feed Sci. Technol.* 295, 115527. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115527>
- Strompfová, V., Kubašová, I., Lauková, A., 2017. Health benefits observed after probiotic *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 application in dogs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 6309-6319. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8425-z>
- Suchodolski, J.S., Markel, M.E., Garcia-Mazcorro, J.F., Unterer, S., Heilmann, R.M., Dowd, S.E., Kachroo, P., Ivanov, I., Minamoto, Y., Dillman, E.M., Steiner, J.M., Cook, A.K., Toresson, L., 2012. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic

- inflammatory bowel disease. *PloS one.* 7, 1-13.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051907>
- Suryawanshi, R.K., Kango, N., 2021. Production of manooligosaccharides from various mannans and evaluation of their prebiotic potential. *Food Chem.* 334, 127428.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127428>
- Swanson, K.S., Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Merchen, N.R., Fahey Jr, G.C., 2002a. Effects of Supplemental Fructooligosaccharides and Mannanligosaccharides on Colonic Microbial Populations, Immune Function and Fecal Odor Components in the Canine. *J. Nutr.* 132, 1717S–1719S. <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1717S>
- Swanson, K.S., Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Healy, H.P., Dawson, K.A., Merchen, N.R., Fahey Jr, G.C., 2002b. Supplemental Fructooligosaccharides and Mannanligosaccharides Influence Immune Function, Ileal and Total Tract Nutrient Digestibilities, Microbial Populations and Concentrations of Protein Catabolites in the Large Bowel of Dogs. *J. Nutr.* 132, 980-9. <https://doi.org/10.1093/jn/132.5.980>
- Tizard, I.R., Jones, S.W., 2018. The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats. *Vet. Clin. N. Am. - Small Anim. Pract.* 48, 307–322.  
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.008>
- Tofalo, R., Cocchi, S., Suzzi, G., 2019. Polyamines and Gut Microbiota. *Front. Nutr.* 6, 16.  
<https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00016>
- Urrego, M.I.G., 2017. Digestibilidade, produtos da fermentação e compostos voláteis nas fezes de cães buldogue francês alimentados com diferentes fontes proteicas na dieta. University of São Paulo, Pirassununga, SP. 72p. Available from:  
<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-18042017-134924/>
- Van Den Abbeele, P., Duysburgh, C., Rakebrandt, M., Marzorati, M., 2020. Dried yeast cell walls high in beta-glucan and mannan-oligosaccharides positively affect microbial



- composition and activity in the canine gastrointestinal tract in vitro. *J. Anim. Sci.* 98, 1–10. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa173>
- Vazquez-Baeza, Y., Hyde, E.R., Suchodolski, J.S., 2016. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nat. Microbiol.* 1, 1-5. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.177>
- Vetvicka, V., Oliveira, C., 2014. B(1-3)(1-6)-D-glucans Modulate Immune Status and Blood Glucose Levels in Dogs. *Br. J. Pharm. Res.* 4, 981-991. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2014/7862>
- Vlassopoulou, M., Yannakoulia, M., Pletsas, V., Zervakisc, G.G., Kyriacou, A., 2021. Effects of fungal beta-glucans on health – a systematic review of randomized controlled trials. *Food Funct.* 12, 3366–3380. <https://doi.org/10.1039/D1FO00122A>
- Wang, X., Gibson, G.R., Costabile, A., Sailer M., Theis, S., Rastall, R.A., 2019. Prebiotic supplementation of in vitro fecal fermentations inhibits proteolysis by gut bacteria, and host diet shapes gut bacterial metabolism and response to intervention. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, e02749-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02749-18>
- Weese, J.S., 2020. Clostridium (Clostridioides) difficile in animals. *J. Vet. Diagn. Invest.* 32, 213–221. <https://doi.org/10.1177/104063871989908>
- Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F.O., 2014. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic. Acids Res.* 42, D1, D643-D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Zeng, Z., Xu, X., Zhang, Q., Li, P., Zhao P., Li, Q., Liu, J., Piao, X., 2015. Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. *Anim. Sci. J.* 86, 279-285. <https://doi.org/10.1111/asj.12277>

- Zhang, X., Zhang, Y., He, Y., Zhu, X., Ai, Q., Shi, Y., 2023.  $\beta$ -glucan protects against necrotizing enterocolitis in mice by inhibiting intestinal inflammation, improving the gut barrier, and modulating gut microbiota. *J. Transl. Med.* 21, 14. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03866-x>
- Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T., 2002. Intestinal Effects of Mannanooligosaccharides, Transgalactooligosaccharides, Lactose and Lactulose in Dogs. *J. Nutr.* 132, 1682S-1684S. <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1682S>

**Table 1.**

Analyzed chemical composition (g/kg of dry matter) of the diets without (Control) and with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).

Item	Control	1.5 kg/ton YCO	3.0 kg/ton YCO
Dry matter	922.3	922.1	924.7
Crude protein	184.6	184.4	183.9
Ether extract in acid hydrolysis	113.7	121.4	114.9
Ash	7.43	7.18	8.23
Crude fiber	3.90	3.97	3.75
Calcium	1.90	1.89	1.91
Phosphorus	1.05	1.02	1.11
Gross energy (MJ/Kg of dry matter)	19.59	19.69	19.52

**Table 2.**

Apparent total tract digestibility (ATTD), metabolizable energy (ME, MJ/kg), and fecal characteristics of dogs fed without (Control) or with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).

Item	Control	1.5 kg/ton YCO	3.0 kg/ton YCO	SEM <sup>1</sup>	P-value
<b>ATTD</b>					
Dry matter	0.757 <sup>a</sup>	0.754 <sup>ab</sup>	0.735 <sup>b</sup>	0.0061	0.023
Organic matter	0.786	0.789	0.770	0.0076	0.182
Crude protein	0.801	0.800	0.787	0.0066	0.271
Ether extract	0.875	0.883	0.892	0.0073	0.289
Gross energy	0.797	0.795	0.781	0.0052	0.077
ME (MJ/kg of dry matter)	15.55	15.59	15.29	0.0636	0.109
<b>Fecal characteristics</b>					
Dry matter (g/kg)	319.2	323.3	338.6	0.782	0.215
Production <sup>2</sup>	0.73	0.76	0.78	0.017	0.488
pH	5.57	5.48	5.48	0.072	0.868
Ammonia (g/kg)	0.54 <sup>a</sup>	0.54 <sup>a</sup>	0.32 <sup>b</sup>	-	0.018
Score <sup>3</sup>	4.0	4.0	4.0	-	0.632

<sup>1</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>2</sup> Production = g feces produced/g DM consumed/animal/day.

<sup>3</sup> Score: 1 = pasty and unformed feces to 5 = well-formed, hard and dry feces. Score analyzed by Kruskal-Wallis (P<0.05).

<sup>a,b</sup> Means in the same line with no letter in common differ by Tukey's test (P<0.05).

**Table 3.**

Fecal concentration (dry matter basis) of short-chain (SCFA) and branched-chain (BCFA) fatty acids and biogenic amines of dogs fed without (Control) or with yeast cell wall and organo essential oil (YCO).

Item	Control	1.5 kg/ton YCO	3.0 kg/ton YCO	SEM <sup>1</sup>	P-value
<i>SCFA (μmol/g)</i>					
Acetate	35.97	31.85	32.54	1.779	0.284
Propionate	20.12	22.09	19.32	0.975	0.142
Butyrate	3.66	3.55	3.86	0.459	0.957
Total	59.75	57.48	55.72	2.383	0.537
<i>BCFA (μmol/g)</i>					
Isobutyrate	0.32	0.27	0.33	0.003	0.999
Valerate	0.07	0.03	0.03	0.001	0.999
Total	0.39	0.30	0.35	0.003	0.999
<i>Biogenic amines (mg/kg)</i>					
Tiramine	2.16	2.67	3.70	0.709	0.199
Putrescine	30.80 <sup>b</sup>	26.93 <sup>b</sup>	42.52 <sup>a</sup>	3.295	0.007
Cadaverine	5.96 <sup>b</sup>	4.11 <sup>b</sup>	25.84 <sup>a</sup>	3.63	0.002
Histamine	26.53 <sup>a</sup>	16.67 <sup>b</sup>	5.83 <sup>c</sup>	4.917	0.035
Serotonine	0.00	0.20	0.00	0.001	0.391
Espermidine	37.78	37.63	34.93	2.357	0.651
Tryptamine	0.00	0.23	0.00	0.117	0.391

<sup>1</sup> SEM = standard error of the mean.

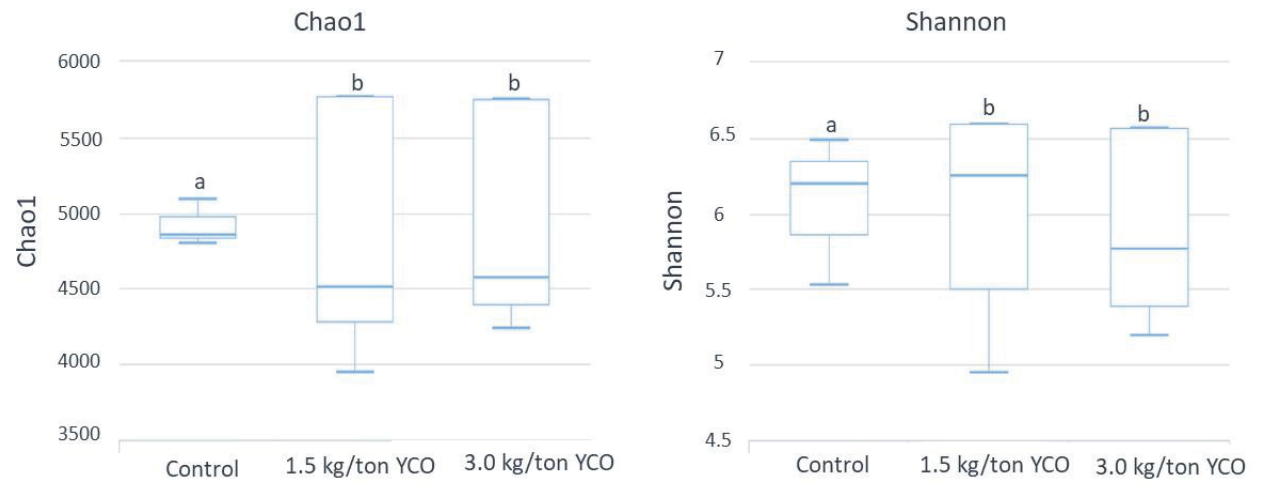
<sup>a,b</sup> Means followed by different letters differ by Tukey's test (P<0.05).

**Table 4.**

Percent averages of the peak area of the most abundant volatile organic compounds present in the feces of dogs fed the without (Control) and with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).

Item	Control	1.5 kg/ton YCO	3.0 kg/ton YCO	P-value <sup>1</sup>
Phenols	0.4020	0	0	0.023
Indols	1.9980	1.2550	0.8993	0.615

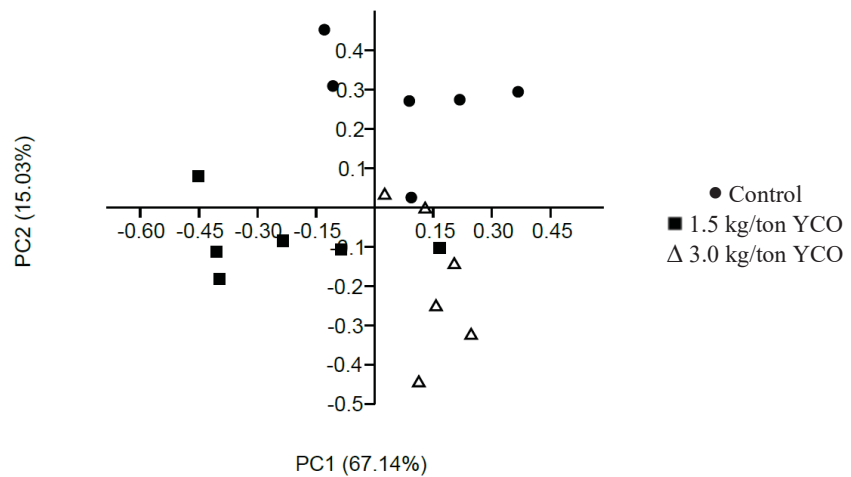
<sup>1</sup> P-value = probability by Kruskal-Wallis test (P<0.05).



**Figure 1.**

Chao1 and Shannon index of fecal microbiota of dogs fed without (control) or with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).

<sup>a,b</sup>Different letters indicate difference by the Kruskal-Wallis test ( $P < 0.05$ ).



**Figure 2.**

Principal component analysis (PCoA) showing the different groupings of the treatments: control and 1.5 and 3.0 kg/ton of yeast cell wall and oregano essential oil (YCO). The effect of the treatments explains 67.14% of the variation in the data. The three groups differed according to the ANOSIM analysis ( $P < 0.05$ ).



**Table 5.**

Relative abundance (%) of the most abundant phyla in the fecal microbiota of dogs fed without (Control) or with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).

Item	Control	1.5 kg/ton YCO	3.0 kg/ton YCO	SEM <sup>1</sup>	P-value
Actinobacteria	1.45 <sup>b</sup>	4.47 <sup>a</sup>	3.13 <sup>a</sup>	1.752	0.489
Bacteroidetes	55.38 <sup>a</sup>	31.98 <sup>c</sup>	42.63 <sup>b</sup>	2.701	<0.001
Firmicutes	34.15 <sup>b</sup>	54.28 <sup>a</sup>	48.23 <sup>a</sup>	3.144	0.001
Fusobacteria	5.55 <sup>a</sup>	5.89 <sup>a</sup>	2.18 <sup>b</sup>	0.923	0.023
Proteobacteria	2.48	2.44	1.54	0.386	0.185
Tenericutes	0.14	0.10	0.06	0.001	0.243

<sup>1</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>a,b</sup> Means followed by different letters differ by Tukey's test (P<0.05).

**Table 6.**

Relative abundance (%) of the most abundant genera in the fecal microbiota of dogs fed without (Control) or with yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).

Item	Control	1.5 kg/ton YCO	3.0 kg/ton YCO	SEM <sup>1</sup>	P-value
<i>Bacteroides</i>	12.21 <sup>a</sup>	12.65 <sup>a</sup>	3.66 <sup>b</sup>	2.214	0.019
<i>Blautia</i>	6.05 <sup>b</sup>	11.47 <sup>a</sup>	10.55 <sup>a</sup>	1.531	0.006
<i>Clostridium</i>	1.78 <sup>b</sup>	2.72 <sup>a</sup>	1.67 <sup>b</sup>	0.219	0.007
<i>Faecalibacterium</i>	2.00 <sup>b</sup>	3.05 <sup>ab</sup>	3.90 <sup>a</sup>	0.382	0.011
<i>Fusobacterium</i>	5.54 <sup>a</sup>	5.88 <sup>a</sup>	2.18 <sup>b</sup>	0.927	0.024
<i>Prevotella</i>	36.92 <sup>a</sup>	16.47 <sup>b</sup>	37.09 <sup>a</sup>	4.201	0.004
<i>Ruminococcus</i>	0.34 <sup>b</sup>	1.53 <sup>a</sup>	0.43 <sup>b</sup>	0.287	0.018
<i>Streptococcus</i>	0.99 <sup>a</sup>	0.01 <sup>b</sup>	0.01 <sup>b</sup>	0.029	0.009
<i>Turicibacter</i>	4.25 <sup>b</sup>	7.39 <sup>b</sup>	13.21 <sup>a</sup>	1.667	0.005

<sup>1</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>a,b</sup> Means followed by different letters differ by Tukey's test (P<0.05).

**Table 7.**

First choice and intake ratio of the control and experimental diets containing yeast cell wall and oregano essential oil (YCO).

Item	Test 1		Test 2		Test 3	
	Control	1.5 kg/ton YCO	Control	3.0 kg/ton YCO	1.5 kg/ton YCO	3.0 kg/ton YCO
First choice <sup>1</sup>	46.9	53.1	31.2	68.8*	46.9	53.1
Intake ratio <sup>2</sup>	80.4**	19.6	74.8**	25.2	87.3**	12.7

<sup>1</sup> First choice by Chi-square test (P<0.05).

<sup>2</sup> Intake ratio by Student t-test (P<0.05).

\* P<0.05 \*\* P<0.01

## LISTA GERAL DE REFERÊNCIAS

ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n.3, p. 403–412, ago, 2005. <https://doi.org/10.1079/PNS2005449>

AIMANIANDA, V. et al. Cell Wall  $\beta$ -(1,6)-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae* - Structural characterization and in situ synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13401–13412, mai, 2009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807667200>

ALSHAWAQFEH, M. K. et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathies. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 11, nov, 2017. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix136>

AQUINO, A. A. et al. Efeitos do extrato de parede de levedura em dieta seca sobre a microbiologia, ácidos graxos de cadeia curta e redução do odor das fezes de gatos adultos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 479-486, out-dez, 2012. <https://doi.org/10.5216/cab.v13i4.15354>

ASHAOLU, T. J.; ASHAOLU, J. O. Prebiotic peptides, their formation, fermentation in the gut, and health implications. **Biotechnology Progress**, v. 37, n. 3, e3142, mar, 2021. <https://doi.org/10.1002/btpr.3142>

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS - **AAFCO**. Dog and cat nutrient profiles. Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporated. AAFCO, Oxford, IN, USA, 2016.

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - **AOAC**. Official Methods of Analysis, 16.ed. AOAC, Washington, DC, USA, 1995.

ATTIA, Y. A. et al. Performance, blood profile, carcass and meat traits and tissue morphology in growing rabbits fed mannanoligosaccharides and zinc-bacitracin continuously or intermittently. **Animal Science Papers and Reports**, v. 33, n. 1, p.85-101, jan, 2015.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, fev, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

BAMPIDIS, V. et al. Safety and efficacy of an essential oil from *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letsw. for all animal species. **EFSA Journal**, v.17, n.12, nov. 2019. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5909>

BARRY, K. A. et al. Fructan supplementation of senior cats affects stool metabolite concentrations and fecal microbiota concentrations, but not nitrogen partitioning in excreta. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 11, p. 4964–4971, nov, 2014. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7510>

BEKEBREDE, A. F. et al. The Molecular and Physiological Effects of Protein-Derived Polyamines in the Intestine. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 197, jan, 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12010197>

BJERRUM, L. et al. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. **Poultry Science**, v. 85, n. 7, p. 1151-1164, jul, 2006. <https://doi.org/10.1093/ps/85.7.1151>

BLACHIER, F. et al. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. **Amino Acids**, v. 33, p. 547–562, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0477-9>

BORCHANI, C. et al. Enzymatic process for the fractionation of baker's yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*). **Food Chemistry**, v. 163, p. 108–113, nov, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.086>

BORCHANI, C. et al. Physical, functional and structural characterization of the cell wall fractions from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1149–1155, mar, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.106>

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, p. 1–14, jun, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007>

BRITO, B. G. de et al. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 645-652, mar-abr, 2004.

BRITO, C. B. M. et al. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, n. 3-4, p. 150-155, ago, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.06.001>

BROCHOT, A. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. **Microbiology Open**, v. 6, jan, 2017. <https://doi.org/10.1002/mbo3.459>

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition: a new receptor for beta-glucans. **Nature**, v. 413, p. 36–37, set, 2001. <https://doi.org/10.1038/35092620>

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 471–479, mar, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00505.x>

BROWN, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 33–43, jan, 2006. <https://doi.org/10.1038/nri1745>

BROWN, G. D. et al. Dectin-1 Mediates the Biological Effects of  $\beta$ -Glucans. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1119–1124, abr, 2003. <https://doi.org/10.1084/jem.20021890>

- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, ago, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- BUSCH, K. et al. Clostridium perfringens enterotoxin and Clostridium difficile toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. **Veterinary Record**, v. 176, n. 10, p. 253–253, mar, 2015. <https://doi.org/10.1136/vr.102738>
- CAMPIGOTTO, G. et al. Microencapsulated phytogenic in dog feed modulates immune responses, oxidative status and reduces bacterial (Salmonella and Escherichia coli) counts in feces. **Microbial Pathogenesis**, v. 159, 105113, out, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105113>
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, p. 335-336, abr, 2010. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- CAPPELI, S. et al. Importância dos aditivos na alimentação de cães e gatos: Revisão. **Pubvet**, v.10, n.3, p.212-223, mar, 2016.
- CARCIOFI, A. C. et al. Comparison of micronized whole soybeans to common protein sources in dry dog and cat diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 151, n. 3-4, p. 251–260, mai, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.01.002>
- CARNEIRO, V. A. et al. Essential Oils as an Innovative Approach against Biofilm of Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus. **Bacterial Biofilms**, out, 2020. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.91833>
- CERVANTES-BARRAGAN, L. et al. Lactobacillus reuteri induces gut intraepithelial CD4+CD8 $\alpha\alpha$ + T cells. **Science**, v. 357, n. 6353, p. 806-810, ago, 2017. <https://doi.org/10.1126/science.aah5825>
- CHAE, B. J. et al. Effects of supplementation of b-glucan on the growth performance and immunity in broilers. **Research in Veterinary Science**, v. 80, n. 3, p. 291–298, jun, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.07.008>
- CHAO, S. C.; YOUNG, D. G.; OBERG, C. J. Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 5, p. 639-649, dez, 2000. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712177>
- CHEN, C. et al. Effect of  $\beta$ -glucan on metabolic diseases: a review from the gut microbiota perspective. **Current Opinion in Food Science**, v. 47, 100907, out, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100907>
- CHO, S. S.; FINOCCHIARO, E. T. **Handbook of prebiotics and probiotics ingredients: health benefits and food applications**. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010.

DIETHER, N.E.; Willing, B. P. Microbial Fermentation of Dietary Protein: An Important Factor in Diet-Microbe-Host Interaction. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, jan, 2019. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010019>

DRITZ, S. S. et al. Influence of dietary  $\beta$ -glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to *Streptococcus suis* infection in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 11, p. 3341-3350, nov, 1995. <https://doi.org/10.2527/1995.73113341x>

DU, B. et al. A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of  $\beta$ -Glucan. **International Journal of Molecular Science**, v. 20, n. 16, 4032, ago, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20164032>

EBANI, V. V. et al. Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils against Pathogens Responsible for Otitis Externa in Dogs and Cat. **Medicines**, v. 4, n. 21, abr, 2017. <https://doi.org/10.3390/medicines4020021>

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308–323, abr, 2007. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>

FALCÃO-E-CUNHA, L. et al. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. **World Rabbit Science**, v.15, n. 3, p.127–140, jul, 2007. <https://doi.org/10.4995/wrs.2007.597>

FEDIAF. The European Pet Food Industry Federation. **Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs**. European Pet Food Industry Federation, Brussels, BE, 2019.

FÉLIX, A. P. et al. Suplementação de mananoligossacarídeos (MOS) e uma mistura de aluminossilicatos na qualidade das fezes de cães adultos. **Archives of Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 31-35, 2009. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v14i1.13229>

FÉLIX, A. P.; SOUZA, C. M. M., OLIVEIRA, S. G. de. Biomarkers of gastrointestinal functionality in dogs: A systematic review and meta-analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 283, 115183, jan, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115183>

FERENCZI, S. et al. Oligomannan Prebiotic Attenuates Immunological, Clinical and Behavioral Symptoms in Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease. **Scientific Reports**. 6, 34132, set, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep34132>

FERREIRA, C.S. et al. Metabolic variables of obese dogs with insulin resistance supplemented with yeast beta-glucan. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 14, jan, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03106-2>

FRANCO-ROBLES, E. et al. **Prebiotics and the Modulation on the Microbiota-GALT-Brain Axis**. In book: Prebiotics and Probiotics - Potential Benefits in Nutrition and Health. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89690>

GHOSH, A. et al. Recovery and purification of oligosaccharides from copra meal by recombinant endo- $\beta$ -mannanase and deciphering molecular mechanism involved and its role as potent therapeutic agent. **Molecular Biotechnology**, v. 57, n. 2, p. 111–127, fev, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9807-4>

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 & Hepatology**, v. 14, p. 491-502, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

GONZALEZ, P. S. et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy. **Nature**, v. 563, n. 7733, p. 719–723, nov, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0729-3>

GOUVEIA, E. M. M. F. et al. Action of phosphorylated mannanoligosaccharides on immune and hematological responses and fecal consistency of dogs experimentally infected with enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 499-504, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200027>

GRZESKOWIAK, Ł. et al. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. **Anaerobe**, v. 34, p. 14-23, ago, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002>

HAN, X.; PARKER, T. L. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model. **Biochimie Open**, v.4, p. 73–77, jun, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2017.02.005>

HELANDER, I. M et al. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590–3595, 1998. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>

HIGUERAS, C. et al. Short-Chain and Total Fatty Acid Profile of Faeces or Plasma as Predictors of Food-Responsive Enteropathy in Dogs: A Preliminary Study. **Animals**, v. 12, n. 1, p. 89, 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12010089>

HO, E. et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biology**, v.1, n. 1, p. 483–491, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.006>

HONG, F. et al. Mechanism by Which Orally Administered  $\beta$ -1,3-Glucans Enhance the Tumoricidal Activity of Antitumor Monoclonal Antibodies in Murine Tumor Models. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 2, p. 797-806, jul, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.797>

HSIEH, S.-L. (Ed.). Lectin in Host Defense Against Microbial Infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2020. <https://doi.org/doi:10.1007/978-981-15-1580-4>



IGARASHI, H. et al Analysis of fecal short chain fatty acid concentration in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 10, p. 1727–1734, out, 2017. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0165>

JANA, U. K.; KANGO, N. Characteristics and bioactive properties of manooligosaccharides derived from agro-waste mannans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 931–940, abr, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.304>

JANA, U. K. et al. Prebiotic manooligosaccharides: Synthesis, characterization and bioactive Properties. **Food Chemistry**, v. 342, abr, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128328>

JESENAK, M. et al. B-Glucans in the treatment and prevention of allergic diseases. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 42, n. 2, p. 149-156, mar-abr, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2012.08.008>

KHOR, T. O. et al. Nrf2-Deficient Mice Have an Increased Susceptibility to Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. **Cancer Research**, v. 66, n. 24, p. 11580–11584, dez, 2006. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3562>

KIM, J. et al. Differences in the gut microbiota of dogs (*Canis lupus familiaris*) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform. **Gut Pathogens**, v. 9, n. 68, nov, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0218-5>

KIM, K. S.; YUN, H. S. Production of soluble  $\beta$ -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 3, p. 496–500, jul, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.020>

KOMARCHEUSKI, A. S. et al. Avaliação das características fecais de cães suplementados com diferentes fontes e níveis de extrato de *Yucca*. In : IV Simpósio de Nutrição de Animais de Companhia, 2018. **Anais...** Archives of Veterinary Science, v. 23, n. 1, p. 23-24. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v23i1Esp.59930>

LEMONS, M. J. de et al. Uso de aditivo alimentar equilibrador da flora intestinal em aves de corte e de postura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-7, 2016. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000862014>

LEYVA-LÓPEZ, N. et al. Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 989, jun, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22060989>

LI, P. et al. Effects of Adding Essential Oil to the Diet of Weaned Pigs on Performance, Nutrient Utilization, Immune Response and Intestinal Health. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 11, p. 1617-1626, jul, 2012. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12292>

LI, Z. et al. *Bacillus subtilis* and yeast cell wall improve the intestinal health of broilers challenged by *Clostridium perfringens*. **British Poultry Science**, v. 58, n. 6, p. 635–643, out, 2017. <https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1370697>

LI, Q. et al. Gut Dysbiosis and Its Associations with Gut Microbiota-Derived Metabolites in Dogs with Myxomatous Mitral Valve Disease. **MSystems**, v. 6, n. 2, e00111-21, abr, 2021. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00111-21>

LIMA, M. D. S. et al. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1-3, p. 112–117, jan, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.040>

LIN, C.-Y. et al. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune function, and diet palatability in adult dogs. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 4, p. 1586–1599, abr, 2019. <https://doi.org/10.1093/jas/skz064>

LIN, C-Y. et al. Supplementation of Yeast Cell Wall Fraction Tends to Improve Intestinal Health in Adult Dogs Undergoing an Abrupt Diet Transition. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, nov, 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.597939>

LIU, X.Y. et al. A new isolation method of  $\beta$ -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 239–247, mar, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.11.008>

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. et al. A subchronic 90-day oral toxicity study of *Origanum vulgare* essential oil in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.101, p.36-47, mar, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.001>

LOUIS, P.; HOLD, G. L.; FLINT, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 661–672, set, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrmicro334>

MAEDA, S. et al. Changes in Foxp3-Positive Regulatory T Cell Number in the Intestine of Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease and Intestinal Lymphoma. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 1, p. 102-112, jan, 2016. <https://doi.org/10.1177/0300985815591081>

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.  $\beta$ -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n.3, p. 631-650, jul./set. 2008.

MALAYOĞLU, H. B. et al. Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat-soybean meal diets. **British Poultry Science**, v. 51, n. 10, p. 67-80, mar, 2010. <https://doi.org/10.1080/00071660903573702>

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, nov, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>

MARY, P. R. et al. Structural diversity and prebiotic potential of short chain  $\beta$ -mannooligosaccharides generated from guar gum by endo- $\beta$ -mannanase (ManB-

1601). **Carbohydrate Research**, v.486, dez, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107822>

MAURYA, A. et al. Essential Oils and Their Application in Food Safety. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, 2021. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.653420>

MIDDELBOS, I. S. et al. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v.85, n.11, p. 3022–3032, nov, 2007. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0079>

MINAMOTO, Y. et al. Prevalence of Clostridium perfringens, Clostridium perfringens enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 174, n. 3-4, 463–473, dez, 2014.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.10.005>

MINAMOTO, Y. et al. Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, p. 1608–1618, 2019. <https://doi.org/10.1111/jvim.15520>

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004**. Aprova o regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal, segundo as boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 44, de 15 de dezembro de 2015**. Altera a Instrução Normativa SARC nº 13 de 2004 e Instruções Normativas MAPA nºs 15 e 30 de 2009 e 29 de 2010. Diário Oficial da União, 17 dez 2015.

MÖRBE, U. M. et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. **Mucosal Immunology**, v. 14, n. 4, p. 793-802, 2021.  
<https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>

MUELLER, K. et al. Influence of broccoli extract and various essential oils on performance and expression of xenobiotic- and antioxidant enzymes in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 4, p. 588–602, 2012.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114511005873>

MULLER, K. H. et al. Type 1 Fimbriae of Salmonella enteritidis. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 15, p. 4765-4772, ago, 1991.  
<https://doi.org/10.1128/jb.173.15.4765-4772.1991>

MUSCO, N. et al. In vitro evaluation of Saccharomyces cerevisiae cell wall fermentability using a dog model. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, p. 24–30, 2018. <https://doi.org/10.1111/jpn.12864>

MUTHURAMALINGAM, K. et al. Dietary intervention using (1,3)/(1,6)-β-glucan, a fungus-derived soluble prebiotic ameliorates high-fat diet-induced metabolic distress

and alters beneficially the gut microbiota in mice model. **European Journal of Nutrition**, v. 59, p. 2617-2629, out, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02110-5>

NARDONI, S. et al. Traditional Mediterranean plants: characterization and use of an essential oils mixture to treat *Malassezia* otitis externa in atopic dogs. **Natural Product Research**, v. 31, n. 16, p.1891–1894, 2017. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1263853>

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – **NRC**. Nutrient Requirements of Dogs. National Academy Press. Washington, 428p, 2006.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, p. 191-195, jan, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00890-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00890-5)

NOVÁK, I. et al. Effect of the drying method on the composition of *Origanum vulgare* L. Subsp. *hirtum* essential oil analysed by gc-ms and sensory profile method. **Acta Alimentaria**, v. 40, p. 130–138, 2011. <https://doi.org/10.1556/aalim.40.2011.suppl.13>

NOVAK, M.; VETVICKA, V. Glucans as Biological Response Modifiers. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 9, p. 67-75, 2009. <https://doi.org/10.2174/187153009787582423>

OMONIJO, F. A. et al. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, v.4, n. 2, p.126-136, jun, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>

OUWEHAND, A. C. et al. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, n. 2, p.212–217, abr, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.01.007>

PAMPLONA, R.; CONSTANTINI, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, p. 843-863, out, 2011. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00034.2011>

PARKS, D.H. et al. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123-3124, nov, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>

PAWAR, M. M. et al. Effect of dietary mannanoligosaccharide supplementation on nutrient digestibility, hindgut fermentation, immune response and antioxidant indices in dogs. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 59, n. 11, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0136-6>

PAZOULI L.; NIINENETS Ü. Multi-substrate terpene synthases: Their occurrence and physiological significance. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1019, p. 1-16, jul, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01019>

PEISER, L.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. Scavenger receptors in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 1, p. 123-128, fev, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00307-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00307-7)

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. S. The role of the canine gut microbiome and metabolome in health and gastrointestinal disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. 498, jan, 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00498>

PRONYK, C. et al. Production of Carbohydrates, Lignins, and Minor Components from Triticale Straw by Hydrothermal Treatment. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p. 3788–3796, mar, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf104543a>

RICE, P. J. et al. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 3, p.1079-1086, set, 2005. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.085415>

RÍOS-COVIÁN et al. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, fev, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>

ROSSI, G. et al. Effects of probiotic bacteria on mucosal polyamines levels in dogs with IBD and colonic polyps: a preliminary study. **Beneficial Microbes**, v. 9, n. 2, p. 247–55, out, 2017. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0024>

RYCHLIK, A. et al. The effectiveness of natural and synthetic Immunomodulators in the treatment of inflammatory bowel disease in dogs. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 61, n. 3, p. 297–308, set, 2013. <https://doi.org/10.1556/avet.2013.015>

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 429–438, mar, 2017. <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>

SAS Institute Inc. SAS/STAT® 9.3 User's Guide, Cary, NC, USA, 2011.

SINGH, S.; GHOSH, A.; GOYAL, A. Manno-oligosaccharides as prebiotic-valued products from agro-waste. *In*: **Biosynthetic Technology and Environmental Challenges**, 2017, p. 205–221. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9_12)

SMOLINSKA, S. et al. Histamine: A Mediator of Intestinal Disorders – A Review. **Metabolites**, v. 12, n. 10, p. 895, set, 2022. <https://doi.org/10.3390/metabo12100895>

SOKOL, H. et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 43, p. 16731-16736, out, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>

SOUZA, R. B. M. S. et al. Effects of dietary supplementation with a blend of functional oils to fecal microbiota, and inflammatory and oxidative responses, of dogs submitted to a periodontal surgical challenge. **Animal Feed Science and**

**Technology**, v. 295, 115527, jan, 2023.  
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115527>

SRIHARI, T.; SENGOTTUVELAN, M.; NALINI, N. Dose-dependent effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 6, p. 787–794, jun, 2008.  
<https://doi.org/10.1211/jpp.60.6.0015>

STRICKLING, J. A. et al. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 3, p. 205-219, ago, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00175-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00175-9)

STROMPFOVÁ, V.; KUBAŠOVÁ, I.; LAUKOVÁ, A. Health benefits observed after probiotic *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 application in dogs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 6309-6319, jul, 2017.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8425-z>

SUCHODOLSKI, J. S. et al. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. **PloS one**, v. 7, p. 1-13, dez, 2012.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051907>

SUN, Y.; O'RIORDAN, M. X. D. Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal Short-Chain Fatty Acids. **Advances in Applied Microbiology**, v. 85, p. 93–118, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00003-4>

SUNTRES, Z.E. et al. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.55, p.304–318, 2015.

SURYAWANSHI, R.K.; KANGO, N. Production of manooligosaccharides from various mannans and evaluation of their prebiotic potential. **Food Chemistry**, v. 334 127428, jan, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127428>

SWANSON, K. S. et al. Effects of Supplemental Fructooligosaccharides and Mannanligosaccharides on Colonic Microbial Populations, Immune Function and Fecal Odor Components in the Canine. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 2, p. 1717S–1719S, jun, 2002a. <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1717S>

SWANSON, K. S. et al. Supplemental Fructooligosaccharides and Mannanligosaccharides Influence Immune Function, Ileal and Total Tract Nutrient Digestibilities, Microbial Populations and Concentrations of Protein Catabolites in the Large Bowel of Dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 5, p. 980-989, fev, 2002b. <https://doi.org/10.1093/jn/132.5.980>

TEHRANI, F.; SADEGHI, E. Effect of Mint Essential Oil on Growth of *Listeria monocytogenes* during the Ripening and Storage of Iranian White Brined Cheese. **J Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**, v. 5, n. 7S, p. 150-154, jan, 2015.

THEODORO, S. de S. et al. Effects of the solubility of yeast cell wall preparations on their potential prebiotic properties in dogs. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, e0225659, nov, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225659>

TIZARD, I. R.; JONES, S. W. The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 48, n. 2, p. 307–322, mar, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.008>

TOFALO, R.; COCCHI, S.; SUZZI, G. Polyamines and Gut Microbiota. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, fev, 2019. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00016>

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, abr, 2002. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>

UNUSAN, N. Essential oils and microbiota: Implications for diet and weight control. **Trends in Food Science & Technology**, v. 104, p. 60–71, out, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.014>

URREGO, M. I. G. **Digestibilidade, produtos da fermentação e compostos voláteis nas fezes de cães buldogue francês alimentados com diferentes fontes proteicas na dieta**. 2017. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-18042017-134924/>

VAN DEN ABEELE, P. et al. Dried yeast cell walls high in beta-glucan and mannan-oligosaccharides positively affect microbial composition and activity in the canine gastrointestinal tract in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 6, jun, 2020. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa173>

VAZQUEZ-BAEZA, Y. et al. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1-5, out, 2016. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.177>

VETVICKA, V.; OLIVEIRA, C. B(1-3)(1-6)-D-glucans Modulate Immune Status and Blood Glucose Levels in Dogs. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 8, p. 981-991, 2014. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2014/7862>

VINOLO, M. A. R. et al. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 9, p. 849-855, set, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.07.009>

VLASSOPOULOU, M. et al. Effects of fungal beta-glucans on health – a systematic review of randomized controlled trials. **Food & Function**, v. 12, p. 3366–3380, mar, 2021. <https://doi.org/10.1039/D1FO00122A>

WANG, J. et al. Cell wall polysaccharides: before and after autolysis of brewer's yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 137, ago, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2508-6>

WANG, X. et al. Prebiotic supplementation of in vitro fecal fermentations inhibits proteolysis by gut bacteria, and host diet shapes gut bacterial metabolism and response to intervention. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 9, abr, 2019. <https://doi.org/10.1128/AEM.02749-18>

WEESE, J. S. Clostridium (Clostridioides) difficile in animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 2, p. 213–221, mar, 2020. <https://doi.org/10.1177/104063871989908>

WEI, H.-K. et al. Oregano essential oil decreased susceptibility to oxidative stress-induced dysfunction of intestinal epithelial barrier in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1191–1199, out, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.035>

WEI, H. –K. et al. A carvacrol–thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. **Animal**, v. 11, n. 2, p. 193–201, 2017. <https://doi.org/10.1017/S1751731116001397>

YAP, P. S. X. et al. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, n. 1, fev, 2014. <https://doi.org/10.2174/1874285801408010006>

YILMAZ, P. et al. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D643-D648, jan, 2014. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>

ZENG, Z. et al. Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 3, p. 279-85, out, 2014. <https://doi.org/10.1111/asj.12277>

ZENTEK, J.; MARQUART, B.; PIETRZAK, T. Intestinal Effects of Mannanooligosaccharides, Transgalactooligosaccharides, Lactose and Lactulose in Dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1682S-1684S, jun, 2002. <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1682S>

ZHANG, X. et al.  $\beta$ -glucan protects against necrotizing enterocolitis in mice by inhibiting intestinal inflammation, improving the gut barrier, and modulating gut microbiota. **Journal of Translational Medicine**, v. 21, n. 14, jan, 2023. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03866-x>

ZOU Y. et al. Oregano Essential Oil Induces SOD1 and GSH Expression through Nrf2 Activation and Alleviates Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in IPEC-J2 Cells. Hindawi Publishing Corporation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 5987183, dez, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5987183>



## ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo número 022/2020, referente ao projeto de pesquisa “Avaliação das características fecais, digestibilidade dos nutrientes, produtos finais fermentativos, população microbiana, concentração de IgA fecal e palatabilidade da dieta em cães adultos suplementados com fitobióticos”, sob a responsabilidade de Ananda Portella Félix – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em 03/07/2020.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	Setembro/2020 até Outubro/2020
Espécie/Linhagem	<i>Canis lupus familiaris</i> (canino)
Número de animais	16
Peso/Idade	14,5 kg/65 meses
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Laboratório de Estudos em Nutrição Canina da Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, Brasil.

\*A autorização para início da pesquisa se torna válida a partir da data de emissão deste certificado.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol number 022/2020, regarding the research project “Evaluation of fecal characteristics, digestibility of nutrients, final fermentative, microbial products, concentration of fecal IgA and diet palatability in adult dogs supplemented with phytobiotics” under Ananda Portella Félix – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 03/07/2020.

Purpose	Research
Validity	September/2020 until October/2020
Specie/Line	<i>Canis lupus familiaris</i> (canine)
Number of animals	16
Weight/Age	14.5 kg/65 months
Sex	Male and female
Origin	Laboratorio de Estudos em Nutrição Canina of the Federal University of Paraná, Curitiba/PR, Brazil.

\*The authorization to start the research becomes valid from the date of issue of this certificate.

Curitiba, 28 de julho de 2020

Simone Tostes de Oliveira Stedile  
Coordenadora CEUA-SCA