

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**ADICIÓN DE PULPA DE CITRUS Y POMAZA DE MANZANA EN DIETAS PARA
PERRO: INFLUENCIA SOBRE LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN, DIGESTIÓN,
CARACTERÍSTICAS FECALES Y POBLACIONES BACTERIANAS**

por

María Carolina DELUCA COYTO

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias. Orientación: Higiene, Inspección, Control y Tecnología de los Alimentos.

MODALIDAD: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

MONTEVIDEO
URUGUAY
2017

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dra. Analía Pérez

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Sebastián Brambillasca

Tercer Miembro:

Dra. Claudia Della Cella

Cuarto miembro (co-tutor):

Dr. Alejandro Britos

Fecha:

Autor:

María Carolina Deluca

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Martín Fraga, perteneciente al Instituto de Investigaciones Biológicas, Clemente Estable, por su aporte fundamental y enseñanza.

A Cecilia Cajarville, por su apoyo, colaboración y enseñanzas a lo largo de todos estos años.

A Sebastián Brambillasca y Alejandro Britos, por el aporte de conocimientos, apoyo, enseñanza, tiempo y dedicación que me brindaron y brindan a todos los estudiantes y tesisas a lo largo de todos estos años.

A Lucia Reyes por su colaboración.

Y especialmente a Azul, Naranjita, Blanquita, Verde, Negro, Simón y Rosado, que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	5
1. RESUMEN	6
2. SUMMARY	7
3. INTRODUCCIÓN	8
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
4.1 Concepto y definición de fibra.....	9
4.2 Clasificación de la fibra.....	9
4.3 Características de fermentación de las fibras.....	10
4.4 Prebióticos.....	12
4.5 Fuentes de fibras tradicionales y fibras de fruta.....	13
4.6 Microbiota del aparato digestivo de monogástricos.....	14
4.7 Importancia de la fibra alimentaria en medicina veterinaria.....	15
4.7.1 <u>Diabetes, obesidad y control de peso</u>	15
4.7.2 <u>Diarrea y Constipación</u>	16
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	19
6.1 Objetivo general.....	19
6.2 Objetivos particulares.....	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS	19
7.1 Experimento 1: fermentabilidad <i>in vitro</i>	19
7.1.1 <u>Diseño experimental</u>	19
7.1.2 <u>Preparación del inóculo</u>	20
7.1.3 <u>Técnica de producción de gas <i>in vitro</i></u>	20
7.2 Experimento 2: prueba de alimentación <i>in vivo</i>	21
7.2.1 <u>Diseño experimental</u>	21
7.2.2 <u>Análisis de laboratorio</u>	22
7.2.2.1 Medición de pH fecal.....	22
7.2.2.2 Determinación de consistencia (score) fecal.....	22
7.2.2.3 Análisis químico.....	22
7.2.2.4 Análisis microbiológico.....	23
7.2.3 <u>Determinación de digestibilidad aparente</u>	23
7.3 Análisis estadístico	23
8. RESULTADOS	24
8.1 Experimento 1.....	24
8.2 Experimento 2.....	25
9. DISCUSIÓN	27
9.1 Experimento 1.....	27
9.2 Experimento 2.....	28
10. CONCLUSIONES	29
11. BIBLIOGRAFÍA	30

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Tabla 1. Composición química de sustratos usados en el experimento 1 y dietas usadas en el experimento 2.....	23
Tabla 2. Parámetros de la fermentación <i>in vitro</i> de las fuentes de fibra Incubadas solas.....	24
Tabla 3. Efecto de la inclusión de fibra en las características fecales y la digestibilidad aparente de nutrientes.....	26
Tabla 4. Efecto de la fibra en la dieta sobre la población bacteriana fecal.....	27
Figura 1. Parámetros de fermentación <i>in vitro</i> de pulpa de citrus (PC) y pomaza de manzana (PM) combinadas con un alimento para perros pre-digerido en niveles de 0, 30, 50 y 70 g/kg de MS.....	25

1 RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial efecto prebiótico de la pulpa de citrus (PC) y la pomaza de manzana (PM) incluidas en dietas de perros. Para ello se realizó primero un experimento *in vitro* para evaluar la fermentabilidad de dietas para perros con niveles crecientes de PC o PM. Luego, en un experimento *in vivo* se determinó digestibilidad, características de las heces y poblaciones bacterianas fecales en perros alimentados con dietas suplementadas con PC o PM. En el experimento *in vitro* se mezcló un alimento comercial pre-digerido con 0, 30, 50 y 70 g/kg de materia seca (MS) de PC o PM. Se incubaron las mezclas o estas fuentes de fibra solas con heces frescas en un medio anaerobio y se determinaron parámetros de fermentación. En el experimento *in vivo*, se alimentaron 6 perros adultos sanos con un alimento comercial con o sin la adición de 70 g/kg de PC o de PM suministradas frescas y se determinó digestibilidad de los nutrientes, características fecales (pH, consistencia, frecuencia de defecación, peso, concentración de amoníaco) y poblaciones bacterianas fecales. En el experimento 1 (*in vitro*), la producción de gas aumentó linealmente ($P < 0,001$) y cuadráticamente ($P < 0,001$) con el aumento del nivel de fibra; además, se alcanzó antes la mitad de la producción de gas asintótica ($t_{1/2}$) con PM ($P = 0,006$) que con PC. En el experimento 2 (*in vivo*) la inclusión de PC y PM resultó en el aumento de la excreción de heces ($P = 0,005$) y frecuencia de defecación ($P < 0,001$), disminución del pH fecal ($P < 0,001$) y valores de digestibilidad ($P < 0,01$), aunque no se produjeron cambios ni en la consistencia fecal, concentración de amoníaco o en las poblaciones bacterianas fecales. La suplementación de las dietas con PC y PM frescas fue efectiva para estimular la fermentación en intestino grueso, pero deprimió la digestión de los nutrientes.

2 SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the potential prebiotic effect of citrus pulp and apple pomace included in diets for dogs. To do this, an *in vitro* experiment was carried out to evaluate fermentability of diets for dogs with increasing levels of citrus pulp (CIT) or apple pomace (APP). Afterwards, in an *in vivo* experiment, digestibility, faecal characteristics and faecal bacterial populations were determined in dogs' diets supplemented with CIT or APP. In the *in vitro* experiment, a pre-digested dog food was mixed with 0, 30, 50 and 70 g/kg of either CIT or APP. Mixtures of these sources of fiber alone were incubated with fresh faeces in an anaerobic media and fermentation parameters were studied. In the *in vivo* experiment, 6 adult dogs were fed with a commercial dog food mixed or not with 70 g/kg of fresh CIT or APP and nutrient digestibility, fecal characteristics (pH, consistency, defecation frequency, weight, ammonia concentration) and faecal bacterial populations were determined. In the *in vitro* experiment, gas production increased linearly ($P < 0.001$) and quadratically ($P < 0.001$) with the increase of the level of fiber; in addition, half time of the production of asymptotic gas ($t_{1/2}$) with APP ($P = 0.006$) was reached earlier than with CIT. In the *in vivo* experiment the inclusion of CIT and APP resulted in higher faecal outputs ($P = 0.005$) and defecation frequency ($P < 0.001$), and lower faecal pH ($P < 0.001$) and digestibility values ($P < 0.01$). Faecal consistency, ammonia levels and microbial population in the faeces did not differ among treatments. The addition of fresh CIT and APP to diets for dogs was effective to stimulate the fermentation in the hindgut, but depressed the apparent digestibility of nutrients.

3 INTRODUCCIÓN

La industria de alimentos para mascotas ha aumentado significativamente en los últimos años y sigue en continuo crecimiento. Las perspectivas para el mercado siguen siendo positivas: Packaged Facts proyecta ventas globales de la industria de animales domésticos de los Estados Unidos llegarán a casi US\$ 100 billones en el año 2020 (Petfood industry, 2016b). A nivel mundial, Euromonitor esperó que las ventas de alimentos para mascotas llegaran a US\$ 88 billones en el 2016, por encima de US\$ 78 billones en 2015 (cerca de US\$ 31 billones de esas ventas de alimentos para mascotas del año pasado estaban en los EE.UU., según Euromonitor, aunque la Oficina de Estadísticas Laborales de Estados Unidos tiene la cifra en alrededor de US\$ 26,8 billones) (Petfood industry, 2016b). Durante el 2011 Uruguay importó cerca de 22 millones de kilos de comida para mascotas (perros y gatos), lo que generó una facturación de US\$ 21 millones. Esto significa que 5,5 millones de kilos se produjeron en Uruguay, ya que el 80% de los alimentos para mascotas se importan y el 20% se producen en Uruguay, pero el número total de kilos es mucho mayor, ya que muchas comidas para perros y gatos se producen y ofrecen fuera del sistema formal (El Observador, 2012). Según datos de la Dirección Nacional de Aduanas, en el 2016 se importaron US\$ 32.676.087,1 y 32.905.881,5 kg de alimentos para perros y gatos acondicionados para la venta al por menor.

La alimentación en perros y gatos plantea objetivos muy diferentes a los animales de producción. Los animales de compañía son considerados parte de la familia, son tratados como tales y no como simples mascotas, desarrollando un fuerte vínculo emocional entre humanos y animales, compartiendo el mismo ambiente, alimentación y estilo de vida que sus dueños. Como consecuencia los dueños de mascotas buscan maneras para mejorar la calidad de vida, salud y longevidad de sus animales de compañía. Es así que en los últimos años, además del objetivo de suministrar la cantidad de nutrientes adecuada, también se busca la prevención y tratamiento de enfermedades específicas como obesidad, diabetes, urolitiasis, insuficiencia renal y cardíaca (Boixeda de Miquel, 2000). Para satisfacer las demandas de los consumidores, y haciéndose eco de la comercialización específica de los alimentos funcionales para los seres humanos (Petfood Industry, 2016a), se incluyen en los alimentos comerciales para mascotas ingredientes funcionales como antioxidantes, omega 3, prebióticos, probióticos y fibras fermentables. Estos compuestos tienen efectos beneficiosos sobre el bienestar general o específicamente sobre la función digestiva, de las articulaciones y del sistema inmunológico. “Un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas” (Ashwell M., 2002).

Particularmente, el papel de la fibra es cada vez más importante, ya que se la ha utilizado para modificar la calidad de las heces (constipación y diarrea) y para control del peso. Además recientemente se ha indicado que la fibra puede actuar sobre la microbiota intestinal y ser útil para el tratamiento de ciertas enfermedades. Las fuentes de fibra de granos de cereales (fibra de maíz, salvado de arroz), granos enteros de cereales (ej. avena, cebada) y frutas, han recibido una atención creciente por la industria de alimentos y dueños de mascotas como ingredientes funcionales.

4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Concepto y definición de fibra

Si bien no existe todavía una definición única de fibra dietética que englobe los diferentes componentes y sus funciones, Trowell y col. (1976) la definieron como restos de polisacáridos de pared celular de plantas comestibles, lignina y sustancias asociadas resistentes a la hidrólisis por las enzimas del tracto digestivo humano. Más recientemente y específicamente en mascotas, bajo el término fibra dietética se consideran una cantidad de hidratos de carbono complejos que resisten la actividad enzimática del intestino delgado pero que son fermentadas por la microflora del intestino grueso (Gross y col., 2010). El término es ambiguo ya que incluye un conjunto heterogéneo de moléculas distintas, algunas de las cuales no son polisacáridos, como es el caso de la lignina.

Los componentes que forman parte de la fibra de los alimentos incluyen polisacáridos de las paredes celulares como celulosa y hemicelulosa, polisacáridos no celulósicos como pectinas, mucilagos, gomas vegetales (NRC, 2006), oligosacáridos y almidón resistente (Gross y col., 2010) y un constituyente no polisacárido de paredes celulares (lignina) (NRC, 2006).

Existen diferentes métodos analíticos para caracterizar y cuantificar diferentes tipos de fibra de los alimentos. Los métodos de análisis de la fibra con detergentes como fibra detergente ácido (FDA) que incluye esencialmente celulosa y lignina, y fibra detergente neutro (FDN) que incluye principalmente lignina, celulosa y hemicelulosa, que originalmente se desarrolló para los forrajes, puede utilizarse para los alimentos de mascotas, siempre que se incluya un tratamiento con amilasa previo al análisis de FND. Pero los resultados no son del todo satisfactorios ya que la FDA puede recuperar parcialmente pectinas y puede solubilizar parte de la lignina, recuperando una cantidad variable de la pared celular vegetal. Otras alternativas son los métodos de determinación de la fibra dietética total (FDT) y en un segundo paso fibra insoluble y soluble. Estos son métodos bastante caros y consumen mucho tiempo (De Olivera y col., 2012). El procedimiento de FDT falla en la recuperación y medición de los sacáridos de bajo peso molecular tales como fructooligosacáridos. El método de fibra cruda (FC) representa solo el 5 al 20% del total de la fibra en un alimento, y como tal, subestima la verdadera concentración de la fibra dietética (NRC, 2006).

4.2 Clasificación de la fibra

La fibra puede ser clasificada según sus propiedades, por su tasa de fermentación, fracciones digeribles y no digeribles, solubilidad en agua, capacidad de retención de agua y viscosidad. Las diferentes propiedades de la fibra, influyen en las funciones fisiológicas del organismo animal (Gross y col., 2010), en las enfermedades gastrointestinales y sistémicas, y efectos adversos que la fibra pueda producir (Escudero y González, 2006).

Una forma de caracterizar las diferentes fuentes de fibra es a través de la magnitud en que pueden ser fermentadas por la microbiota del tracto gastrointestinal. Las fuentes de fibra se describen desde lenta a rápidamente fermentables. Las rápidamente fermentables producen mayor volumen de AGV y gases en menos tiempo, en oposición con las de fermentación lenta (Gross y col., 2010). La magnitud

de fermentación o degradación bacteriana, depende de la conformación de los polímeros y su asociación estructural con componentes no hidrocarbonados polifenólicos como la lignina (fracción de fibra unida a la lignina se vuelve indigerible). Además la capacidad de retención de agua y las propiedades de intercambio de iones pueden influir sobre la magnitud de la fermentación (McDonald y col., 2013). La propiedad de fermentabilidad es la más importante porque de ella dependen múltiples efectos, tanto locales como sistémicos (Escudero y González, 2006). A medida que la velocidad de fermentación de la fibra aumenta, disminuye el tiempo de tránsito gastrointestinal y el volumen de heces, aumenta la excreción de ácidos biliares fecales y las heces se tornan más blandas y húmedas (Gross y col., 2010). Además, la fermentabilidad de las fibras está relacionada estrechamente con la solubilidad de las mismas (Escudero y González, 2006). Las fibras que se fermentan más rápidamente son solubles, tales como las pectinas, gomas, galactanos, mananos, fructanos, mucílagos y β -glucanos (Gross y col., 2010). Las fibras solubles al contacto con el agua forman un retículo de gran viscosidad y geles donde queda atrapada el agua (Escudero y González, 2006). Sin embargo las dietas con un alto contenido de fibra de alta viscosidad como psyllium y goma guar, prolongan el vaciado gástrico, y enlentecen el tránsito de la digesta a través del intestino delgado de humanos y perros (Eastwood, 1992; Lewis y col. 1994). Por otra parte, otro tipo de fibra como el almidón resistente tiene baja capacidad de retención de agua en comparación con otras fibras (NRC, 2006). Todas las fibras retienen agua hasta cierto punto; sin embargo, las fibras solubles tienen una mayor capacidad de retención (Gross y col., 2010).

Las fibras insolubles o poco solubles como la lignina, celulosa y hemicelulosa, son capaces de retener el agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad; esto produce un aumento de la masa fecal que acelera el tránsito intestinal. Esto tiene su efecto en el tratamiento y prevención de la constipación crónica (Escudero y González, 2006), prevención de intestino irritable (Gross y col., 2010) y también contribuye a disminuir la concentración y el tiempo de contacto de potenciales carcinogénicos con la mucosa del colon (Escudero y González, 2006). En muchos alimentos para perros y gatos pueden incluirse diferentes fuentes de fibra, y por tanto combinarse diferentes relaciones de fibras rápida y lentamente fermentables. Los principales fuentes de fibra que se añaden específicamente para proporcionar fibra en alimentos para perros y gatos, y sus propiedades son: salvado de trigo, de arroz, de maíz, de avena y pulpa de remolacha, con baja viscosidad y solubilidad, y moderada fermentabilidad; celulosa y cascara de soja, maní, avena y arroz, con baja viscosidad, solubilidad y fermentabilidad; psyllium con moderada fermentabilidad y solubilidad, y alta viscosidad; goma guar y arábica, pectinas y fibra de soja con alta solubilidad, viscosidad y fermentabilidad.

4.3 Características de fermentación de las fibras

A pesar de que la fibra no puede ser digerida por las enzimas digestivas de los mamíferos, sí puede ser fermentada por la microbiota que habita en el tubo digestivo. La fermentación de la fibra en el intestino grueso tiene como productos finales AGV, CO_2 , CH_4 y H_2 , siendo el ácido butírico el mayor sustrato energético para los colonocitos de rata (Roediger, 1982). Estos productos de fermentación (AGV), se relacionan con la salud intestinal, dado que provocan un aumento en la superficie del epitelio intestinal, además de estar relacionado con una disminución de la incidencia de cáncer de colon en humanos (Young y Gibson, 1991).

La energía aportada por los ácidos grasos volátiles (AGV) producto de la fermentación de fibras es menor al 5% de los requerimientos energéticos del perro (Gross y col., 2010). A pesar de que la fibra no se considera esencial para los perros debido a que no obtienen cantidades importantes de energía, es necesario añadir niveles hasta de 5% de fibra a las dietas para individuos sanos (Gross y col., 2010). Tradicionalmente la fibra se ha utilizado en perros y gatos para modificar la calidad de las heces (como laxante), para el control del peso y obesidad. Recientemente se ha indicado que la fibra además puede actuar sobre la microbiota intestinal promoviendo efectos beneficiosos.

Además de la caracterización química de los diferentes tipos de fibra, el estudio de las cinéticas de fermentación y sus productos finales es útil para predecir su utilización potencial en las dietas de monogástricos. Williams y col., (2005) realizaron un estudio *in vitro* utilizando 45 sustratos a base de carbohidratos, utilizando como inóculo heces de lechones destetados; encontraron que hay una gran variación en las cinéticas de fermentación, en el total de AGV producidos, y las proporciones entre ácidos, entre sustratos y que no se puede asumir la fermentabilidad de un determinado sustrato sin una evaluación previa. La solubilidad, además, pareció tener poca influencia sobre las características fermentativas de los sustratos, ya que dentro de la categoría de fibra insoluble hubo diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de fermentación. Los resultados obtenidos *in vitro* nos dan una idea cualitativa de que productos finales se espera que se produzca *in vivo* (por ej. valores más altos de butirato) y la cinética de fermentación.

Según resultados de un estudio de fermentación *in vitro* realizado por Bosch y col., (2008), la pectina cítrica fue moderadamente fermentable indicado por la tasa máxima de producción de gas (R_{max}), en comparación con pectina de remolacha azucarera, fructanos y gomas que fueron rápidamente fermentados con una mayor R_{max} , mientras que la cascara de maní y la fibra de trigo fueron pobremente fermentables, indicado por la menor cantidad de gas producido. Como antecedente, en nuestro laboratorio, se realizó una prueba de fermentación *in vitro*, donde se evaluaron varias fuentes de fibra a distintos niveles, utilizando inóculo fecal de perros. Los resultados indican que la inulina produjo el mayor volumen de gas seguido por la pulpa de citrus y de manzana, mientras que la celulosa produjo el menor volumen de gas (Deluca y col., 2010). Esto significa que la producción de gas y la velocidad de fermentación aumentan cuanto mayor sea la cantidad de fibra soluble de la fuente de fibra.

Con respecto a los productos de fermentación generados con distintas fuentes de fibra, la pectina cítrica produjo mayores cantidades de butirato a las 72 hs de incubación, que fructanos, goma arábiga, goma guar, cascara de maní, fibra de soja, fibra de trigo, y fibra, pulpa y pectina de remolacha azucarera (Bosch y col., 2008). Además, efectos beneficiosos de la pulpa de citrus y la pomaza de manzana sobre la microbiota intestinal y metabolitos microbianos han sido reportados previamente a través de pruebas *in vivo* e *in vitro* (Sunvold y col., 1995a, 1995b; Swanson y col., 2001; Biagi y col., 2010).

Utilizando pectina de citrus y de manzana, y pomaza de manzana como fuentes de fibra fermentable en pruebas *in vitro* (Swanson y col., 2001; Biagi y col., 2010), y pectinas de citrus seca en una prueba *in vivo* (Biagi y col., 2010), se observaron niveles de ácido acético y butírico más altos, y niveles de amoníaco más bajos que

el control en prueba de fermentación *in vitro*. Además, estos autores reportaron una reducción de los coliformes *in vivo* comparado con el conteo de bacterias al inicio de la prueba (Biagi y col., 2010).

Otros estudios indican que la pomaza de manzana produjo la más alta concentración de gas e intermedia de AGV comparado con otras fuentes de fibra de fruta y vegetales, pero junto con pulpa de zanahoria y linaza tuvo la más alta desaparición de materia orgánica (más alta fermentabilidad); la pectina cítrica tuvo la más alta producción de AGV, producción de gas, desaparición de materia orgánica, que psyllium y celulosa (Solka flocc[®]) (Swanson y col., 2001). La pulpa de citrus junto con lactulosa, y goma guar produjo la mayor concentración total de AGV, en prueba de fermentación *in vitro*, en comparación con otros sustratos fibrosos como pulpa de remolacha, FOS, goma de algarrobo, goma arábiga, fibra de avena o salvado de arroz (Sunvold y col., 1995b). Además, el inóculo fecal de perros alimentados con pulpa de citrus tuvo una mayor desaparición de materia orgánica (DMO) y una menor relación acetato/propionato que los alimentados con fibra lentamente fermentable. Por otra parte, la fermentación *in vitro* de sustratos fibrosos, aumentó con la utilización de inóculos fecales de perros y gatos suplementados con fibras fermentables (Sunvold y col., 1995a).

Las fibras fermentables también pueden disminuir el olor de las heces mediante la reducción de la concentración fecal de metabolitos provenientes del catabolismo proteico en el colon (Swanson y col., 2002a, 2002b; Flickinger y col., 2003; Biagi y col., 2010). En un estudio *in vitro* realizado con inóculo fecal canino (heces frescas), se encontró que la administración de FOS en la dieta reduce los valores de pH, la concentración de amoníaco, aumenta la producción de AGV con mayor aumento en la concentración de ácido butírico y puede mejorar el metabolismo de la microbiota intestinal (Pinna y col., 2016). Estos tipos de fibra pueden mejorar la salud intestinal en algunas situaciones negativas. Por ejemplo, el aumento del flujo de proteínas al colon proporciona más sustratos fermentables para bacterias patógenas como *Clostridium spp.*, que degradan aminoácidos y producen mal olor fecal (Macfarlane y col., 1986). Dietas ricas en proteínas y de baja digestibilidad generan aumentos en la presencia de amoníaco, aumentan la concentración de putrescina, reducen los recuentos de lactobacilos y enterococos, tienden a aumentar el recuento de *C. perfringens* y reducen las concentraciones de AGV totales (Pinna y col., 2016).

4.4 Prebióticos

Una clasificación de la fibra se refiere a la habilidad de ciertos microorganismos en el intestino para usar la fibra como sustrato. Esta fibra utilizada como sustrato para ciertos microorganismos benéficos es clasificada como “fibra prebiótica” (Gross y col., 2010), siendo la definición de prebiótico “Ingrediente selectivamente fermentado que permite cambios específicos, tanto en la composición como en la actividad de la microflora gastrointestinal que confiere beneficios sobre el bienestar y la salud del huésped” (Gibson y col., 2010). Según World Gastroenterology Organisation “son sustancias de la dieta (fundamentalmente polisacáridos no amiláceos y oligosacáridos no digeribles por enzimas humanas) que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas” (Corso y col., 2015). La fibra prebiótica, en particular, puede ayudar a restaurar o mantener un equilibrio saludable de bacterias benéficas y prevenir organismos patógenos que aumentan o

contribuyen a condición de enfermedad (Gross y col., 2010). El prebiótico debe estar disponible para ciertos grupos de bacterias, siendo los géneros más representativos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Muchos de los oligosacáridos no digeribles parecen conferir el grado de fermentación selectiva que se requiere (hacia bifidobacterias) (Gibson y col., 2010). Los oligosacáridos son carbohidratos que consisten en tres a nueve unidades de sacárido, mientras que los polisacáridos se componen de 10 o más unidades de sacárido. Algunos prebióticos se encuentran naturalmente en varios alimentos tales como los puerros, espárragos, achicoria, alcachofas, ajos, cebollas, trigo y avena, así como la soja. Sin embargo, la ingesta total de estas fuentes es pequeña. Una ruta eficaz para lograr una ingesta de promoción de la salud es la fortificación de los alimentos consumidos con ingredientes prebióticos. Los prebióticos son, pues, una subcategoría de ingredientes de alimentos funcionales y puede ser agregado a muchos alimentos, incluidos los yogures, cereales, panes, galletas, postres lácteos, helados, cremas para untar, bebidas, así como en alimentos y suplementos para animales (Gibson y col., 2010). Los tres criterios necesarios para un efecto prebiótico son los siguientes (Gibson y col., 2004): 1) que sean resistentes a la acidez gástrica, la hidrólisis por enzimas digestivas de mamíferos y a la absorción gastrointestinal. 2) Que sean fermentados por la microflora intestinal selectivamente y 3) estimular el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales asociados con la salud y el bienestar. Los prebióticos usados en la alimentación de perros tales como fructooligosacáridos (FOS) (Middelbos y col., 2007) (Flickinger y col., 2003), mananoligosacáridos (MOS) (Swanson y col., 2002a) (Grishop y col., 2004), pectina de cítricos y de manzana (Biagi y col., 2010) o ingredientes ricos en fibra soluble, tales como pulpa de remolacha que contiene pectina (oligosacáridos pécticos) (Biagi y col., 2010) (Middelbos y col., 2007), y pared celular de levaduras (contiene MOS) (Middelbos y col., 2007), pueden provocar el aumento de las concentraciones a nivel intestinal de lactobacilos, bifidobacterias y enterococos, y la reducción de *C. perfringens*, *E. coli* y coliformes.

4.5 Fuentes de fibras tradicionales y fibras de fruta

Las fuentes tradicionales de fibras dietéticas incluyen pulpa de remolacha y celulosa. La pulpa de remolacha contiene componentes de fibra insoluble y soluble en una proporción deseable. La celulosa se compone de fibra insoluble y poco fermentable siendo el 99,4% de la FDT (Sunvold y col., 1995c). La pulpa de remolacha es una fibra moderadamente fermentable (Sunvold y col., 1995a, 1995b) con 68,4% de FDT de la cual el 80,5% es fibra insoluble y el 19,5% es soluble con una relación 4,1/1 de fibra insoluble/soluble (Sunvold y col., 1995c). Si bien tiene composición variable es a menudo alta en pectinas, hemicelulosa y celulosa. Contiene 16% de polisacáridos viscosos (FDT menos la FND), 31% de hemicelulosa y polisacáridos no viscosos (FND menos FAD), y 25% de celulosa (FAD menos lignina detergente ácido) (Fahey y col., 1990b). Otros autores informaron para la pulpa de remolacha concentraciones menores (22%) de hemicelulosa y polisacáridos no viscosos, siendo la FND 46,8% y la FAD 24,6% (Bosch y col., 2008). Estos datos ponen de manifiesto las variaciones que pueden ocurrir en los subproductos de las plantas, que determinan sus propiedades de fermentación y físico químicas. La composición de los productos vegetales se ve afectada por el suelo y las condiciones ambientales durante el crecimiento, la madurez en la cosecha y parte de la planta incluida en la preparación del subproducto (De Godoy y col., 2013).

Las pulpas y pomazas de frutas son subproductos del procesamiento de jugos de fruta y puré, que se deshidratan, y posteriormente se procesan y se muelen. Una forma de deshidratación utilizada comúnmente es mezclándolas con una solución de hidróxido de calcio que degrada pectinas y permite la liberación del zumo, para luego ser secadas a temperatura de 80 a 180 ° C (Martínez Pascual y Fernández Carmona, 1980). Una característica general de las fibras de frutas es su mayor contenido de pectinas y hemicelulosa en relación a la celulosa, acompañado de bajo contenido de grasa y proteínas (<1%). Los productos a base de fruta tienen buenas propiedades de unión al agua. Este atributo puede ser ventajoso en matrices de comidas húmedas para mascotas, donde se requiere un alto contenido de agua, pero baja actividad de agua y textura firme (De Godoy y col., 2013). Según Swanson y col., (2001), en un modelo de fermentación *in vitro* canino, la pulpa de manzana tenía la concentración más grande de FDT (79%), siendo el 85,8% insoluble y 14,2% soluble. La proporción de fibra soluble y la producción de AGV de la pomaza de manzana, fue en segundo lugar con respecto a la pulpa de zanahoria que tenía la mayor proporción de fibra soluble y por tanto una menor relación I/S, con respecto a las fuentes de fibra nuevas evaluadas. Pero en comparación con las fuentes de fibra estándares, la pectina cítrica fue la que produjo la mayor concentración de AGV ya que esta es una fibra soluble. Según Sunvold y col., (1995c), que realizó un modelo de fermentación *in vitro* en varias especies (gato, perro, caballo, cerdo, ganado y humano), en todas estas especies la pulpa de citrus y pectina cítrica tuvieron la mayor desaparición de la materia orgánica (DMO), es decir que fueron más extensamente digeridos o fermentados por las bacterias (>80%), y la mayor producción total de AGV, que pulpa de remolacha y celulosa. En este estudio reportaron que la pulpa de citrus tenía 70% de FDT, siendo el 54,4% insoluble y el 45,6% soluble, es decir una relación 1,2/1 de fibra insoluble/soluble.

4.6 Microbiota del aparato digestivo de monogástricos

El colon es un área densamente colonizada, con niveles bacterianos que van de 10^{11} a 10^{12} UFC/ml, encontrándose mayores niveles de anaerobios estrictos que de anaerobios facultativos. Dentro del grupo de los anaerobios estrictos los géneros que se encuentran son *Bacteroides*, *Clostridium* y otros géneros como *Ruminococcus*, *Butyrovibrio*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Atopobium* y *Peptococci*. Dentro de las bacterias anaerobias facultativas se incluyen géneros como *Lactobacillus*, *Enterococci*, *Streptococcus* y de la familia *Enterobacteriaceae*. En el colon la población de levaduras es relativamente bajo, de 10^2 a 10^4 UFC/ml (Rastall, 2004).

A su vez el ciego, colon medio y recto tienen variaciones en cuanto a densidad de colonización bacteriana. En este sentido, el inóculo proveniente del recto de cerdos, en una prueba de fermentación *in vitro*, mostró la mayor producción de gas, comparado con el colon medio que mostró una producción de gas intermedia, y el ciego que mostró la más baja producción de gas (Bauer y col., 2004).

En términos de salud los microorganismos más importantes serían las bacterias acidolácticas, dentro de las cuales *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son los géneros de mayor interés y son indicadores de una población bacteriana con mayor actividad benéfica (Flickinger y col., 2000). Estas bacterias benéficas son barreras para la infección, producen agentes antimicrobianos y compiten con las patógenas por la ocupación de receptores, nutrientes y espacio (Rastall, 2004).

4.7 Importancia de la fibra alimentaria en medicina veterinaria

El manejo de la fibra dietética en cuanto al tipo y nivel de inclusión en la dieta, es importante en el tratamiento de enfermedades específicas en perros y gatos, como obesidad y control del peso, diabetes, diarrea y constipación.

4.7.1 Diabetes, Obesidad y control de peso:

Estudios realizados en diferentes países (por ejemplo Inglaterra, Australia, EE.UU) han estimado la incidencia de sobrepeso y obesidad en la población de perros entre 22% y 40% (Bosch y col., 2009).

El exceso de peso corporal (sobrepeso y obesidad) es uno de los trastornos médicos más comunes de los perros, y está vinculado a disminución de longevidad y una variedad de condiciones asociadas como patologías osteoarticulares, lípidos sanguíneos alterados, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus (German y col., 2010; Deng y col., 2013).

Muchos estudios en humanos y en caninos han puesto de manifiesto los beneficios de la fibra dietética, especialmente la fibra soluble, que resulta en la disminución de la hiperglucemia postprandial, mayor sensibilidad a la insulina, y alteración en la liberación de péptidos gastrointestinales (Deng y col., 2013). Puede ayudar en la mitigación y prevención de la obesidad, ya que puede aumentar y mantener la saciedad y evitar la sensación de hambre en los perros (Bosch y col., 2009).

Tradicionalmente, en la nutrición de animales de compañía el ingrediente más popularmente utilizado como fuente de hidratos de carbono fermentable es la pulpa de remolacha. La fibra fermentable y soluble aumentan la viscosidad digestiva, aumentan la saciedad, reducen la tasa de captación de glucosa, los niveles de colesterol en sangre, promueven el crecimiento de bacterias comensales del intestino (Skinkė y Januškevičius, 2015).

Fuentes de fibra alternativa como los granos enteros de cereales de avena y cebada están recibiendo atención creciente. Son buenas fuentes de β -glucanos, que tienen efecto en disminución de la glicemia y los lípidos en plasma, en humanos y animales. Por lo tanto el uso de avena y cebada como ingredientes funcionales en los alimentos para mascotas puede ser beneficiosa en el control o prevención de la obesidad, diabetes mellitus y dislipidemia (De Godoy y col., 2013). En un estudio realizado por Adolphe y col., (2012) en perros adultos se investigó los efectos del consumo de hidratos de carbono complejos de cebada, maíz, guisantes y arroz, en la respuesta glucémica, la salud cardiovascular y marcadores de estrés oxidativo. Este estudio sugiere que el consumo de hidratos de carbono complejos puede tener un efecto protector sobre la salud cardiovascular y el estrés oxidativo relacionado con la hiperglucemia (De Godoy y col., 2013).

Se realizó un estudio donde se evaluó el efecto de la inclusión de fibra fermentable y viscosa en la dieta, sobre la glicemia, insulina y secreción de péptido-1 similar al glucagón (GLP-1), en respuesta a una exposición oral de glucosa cuatro horas después de su consumo (“efecto de segunda comida”). En este estudio se encontró que una comida con fibra de alta fermentación (5% pectina+3% scFOS), tiene el potencial de disminuir la respuesta de la glucosa en sangre, en una consecuente

comida (efecto de segunda comida). Y una comida con fibra de alta viscosidad (4% psyllium y 4% pectina), alteró la respuesta de glucosa (menor), insulina (mayor) y GLP-1 (mayor) inmediatamente después de la comida, pero sus efectos en una comida posterior no son conocidas. Debido a que GLP-1 es conocida para retrasar el vaciado gástrico y estimular la secreción de insulina, este puede contribuir al efecto de la segunda comida por el consumo de fibra dietética fermentable. Debido a que las dietas ricas en fibra dietética viscosa disminuyen el vaciado gástrico y retrasan las tasas de digestión y absorción de macronutrientes en el tracto gastrointestinal, pueden alterar las respuestas de glucosa e insulina inmediatamente después de una comida. El potencial para provocar un efecto de segunda comida, probablemente, depende del tipo y la dosis de fibra dietética. Las fibras que provocan el efecto de segunda comida pueden ser utilizadas para mejorar la hiperglicemia postprandial en los perros obesos o diabéticos (Deng y col., 2013).

En otro estudio se evaluó el efecto del tipo de fibra dietética en las hormonas relacionadas con la saciedad y la ingesta voluntaria de alimentos. Los perros alimentados con una dieta alta en fibra fermentable (8,5% de pulpa de remolacha azucarera+2% de inulina) mostraron una ingesta voluntaria de alimentos menor al final del estudio. La inclusión de fibra fermentable en las dietas caninas puede contribuir a la prevención o mitigación de la obesidad a través de sus efectos sobre la saciedad (Bosch y col., 2009). Los AGV producto de la fermentación de la fibra puede afectar la saciedad a través de la estimulación en la producción y secreción de hormonas de la saciedad gastrointestinales como péptido tirosina-tirosina (PYY) y GLP-1. Tanto PYY y GLP-1 contribuyen a aumentar el tiempo de vaciado gástrico y el tiempo de tránsito del intestino delgado, prolongando la distensión gástrica y las señales de saciedad y prolongando el contacto entre nutrientes y receptores del intestino delgado que participan en el mantenimiento de la saciedad. Un retraso en el vaciamiento gástrico también retrasa la digestión del almidón y la posterior absorción de la glucosa, de ese modo se mantiene las concentraciones de glucosa e insulina postprandial más estables (Bosch y col., 2009).

Hay que tener en cuenta que un mayor aporte de fibra implica una menor digestibilidad de la proteína, por lo que, para compensarlo, las dietas para el manejo de la obesidad deben tener un mayor nivel de proteínas. Además, es importante mantener la proporción adecuada de fibra de fermentación rápida, ya que se ha demostrado que cuando el nivel es muy elevado, además de tener un efecto en la saciedad, puede dar lugar a flatulencias y diarrea.

Por otro lado se ha demostrado que la fibra de fermentación lenta, como la celulosa y la cáscara de maní, permite aumentar el volumen del bolo alimenticio en el tracto gastrointestinal (GI) sin aportar calorías adicionales. Por tanto, es posible que la fibra sea beneficiosa para disminuir las calorías ingeridas con el alimento. Es posible que la combinación de diferentes tipos de fibras tenga varios efectos (Gross y col., 2010).

4.7.2 Diarrea y constipación

La dieta puede ser útil en el manejo de la diarrea, contribuyendo a controlar la aparición y gravedad de la misma. La fibra, debido a sus características físicas, es capaz de aumentar o disminuir el tránsito intestinal. La fibra soluble tiene la capacidad de absorber agua en el tracto GI formando un gel viscoso y disminuyendo así el agua libre, lo que contribuye a normalizar la consistencia fecal. Este gel viscoso también prolonga el tiempo de tránsito intestinal disminuyendo el vaciado

gástrico y absorbe las toxinas de la luz intestinal, por lo que puede ser beneficioso para el tratamiento de la diarrea osmótica (Wara y Datz, 2014).

El epitelio colónico puede absorber activamente Na contra gradientes electroquímicos, dándole la capacidad de deshidratar las heces. Algunos de los principales estímulos para la absorción de Na en el colon de los mamíferos son AGV. El butirato es más eficaz que el acetato o propionato en la mejora de la absorción de Na. Éste es la principal fuente de energía del colonocito, estimula la producción de moco, absorción de iones como sodio, cloro y absorción de agua y la formación de bicarbonato, de importancia para limitar el desarrollo de la diarrea aguda. Estimula la proliferación celular normal del colonocito, aumentando el espesor de la mucosa intestinal y favoreciendo la absorción de lo antes mencionado (Roedinger, 1982 y 1994; Buddington y col., 1999; William y col., 2001; Escudero y González, 2006; McDonald y col., 2013).

Muchos agentes patógenos en el tracto gastrointestinal, incluyendo *C. perfringens*, *C. difficile*, *Salmonella spp.* y *E. coli* causan diarrea. Las bifidobacterias son importantes para la salud gastrointestinal ya que producen ácidos grasos de cadena corta que disminuyen el pH intestinal e inhiben el crecimiento de bacterias patógenas. También se cree que producen sustancias antibacterianas que son activos contra los clostridios, *E. coli* y otras bacterias patógenas. Los cambios en los tipos y proporciones de las bacterias en los cachorros pueden influir en su resistencia a las enfermedades. En los cachorros jóvenes, las poblaciones bacterianas en el tracto GI se establecen gradualmente, y pueden ser influenciados por la dieta y el medio ambiente. Por lo tanto, fibras prebióticas, que apoyan el crecimiento de bifidobacterias, debería inducir beneficios en la salud del huésped (Gross y col., 2010).

Los desequilibrios en la flora intestinal se han relacionado con enfermedades tales como la alergia, enfermedad inflamatoria intestinal y la diarrea. Cuando se interrumpe la tolerancia normal a la flora intestinal, una respuesta alterada puede ocurrir en el sistema inmunitario intestinal, que puede iniciar y mantener la enfermedad inflamatoria intestinal o desencadenar el desarrollo de respuestas alérgicas (Gross y col., 2010).

Cuando se sospecha una hipersensibilidad alimentaria se recomienda utilizar una dieta con proteína novel o hidrolizada (Wara y Datz, 2014). En algunos casos puede ser útil suplementar estas dietas con fibra para regularizar la motilidad intestinal, el equilibrio hídrico y normalizar la microbiota (Gross y col., 2010). Además el butirato tiene efecto antialérgico (Corzo y col., 2015).

También se recomienda la suplementación con fibra, como coadyuvante en el tratamiento dietético, cuando la diarrea se debe a enfermedad inflamatoria intestinal (EII) de intestino grueso (colitis). Las propiedades gelificantes y de unión de los ácidos grasos y ácidos biliares desconjugados en las fibras solubles pueden ser beneficiosas. Suele aconsejarse el uso preferente de fibra soluble (fermentable) en lugar de fibra insoluble (no fermentable) porque las fibras más solubles generan butirato, la principal fuente de energía para el colonocito (favoreciendo la absorción de Na y agua, estimulando el recambio de colonocitos), y otros ácidos grasos de cadena corta, que pueden bajar el pH luminal del colon, lo que impide el crecimiento de patógenos. La administración de fibra prebiótica como oligofructosa a perros disminuye las concentraciones de amoníaco y aminos fecales y aumenta el número

de bifidobacterias en las heces de los perros. Las bacterias benéficas pueden inducir un patrón antiinflamatorio de citoquinas (aumenta las concentraciones de IL-10, TGF- β , y disminuye IL-12p70, IL-23, TNF- α) (Seifert y Waltz, 2007; Marks, 2013).

Se pueden obtener diferentes efectos en el intestino grueso, según el tipo y cantidad de fibra. Las fibras muy poco fermentables, como la celulosa, actúan de manera similar a los laxantes formadores de masa o volumen, contribuyendo a dilatar la luz del colon y aumentando la velocidad de tránsito fecal (Davenport y col., 2010). Otras fibras, como el *psyllium*, forman un gel viscoso (por su elevada capacidad de absorber agua) y facilitan el paso de las heces a través del intestino. Con las dietas bajas en fibra y muy digestibles se puede reducir la cantidad de heces, pero no se estimula la motilidad ni el tránsito fecal (Davenport y col., 2010). La deshidratación suele contribuir a la aparición del estreñimiento y por eso, la administración de alimento húmedo y/o la fluidoterapia también está indicada en el manejo del estreñimiento (Wara y Datz, 2014).

En síntesis, bajo el término fibra se incluyen una cantidad de hidratos de carbono complejos que resisten la actividad enzimática del intestino delgado pero que son fermentados por la microflora del intestino grueso, y un constituyente no polisacárido de paredes celulares (lignina). La fibra puede ser clasificada en lentamente fermentables a rápidamente fermentables, solubles e insolubles, de alta y baja capacidad de retención de agua y viscosidad. Siendo la proporción de fibra soluble de la fuente de fibra lo que determina la producción de gas y velocidad de fermentación. Uno de los productos finales de la fermentación es el ácido butírico, siendo este el mayor sustrato energético para los colonocitos. La fibra fermentable puede mejorar la salud intestinal. Esta también puede ser clasificada como fibra prebiótica, ya que puede ayudar a restaurar o mantener un equilibrio saludable de bacterias benéficas (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*), y prevenir organismos patógenos que aumentan o contribuyen a una condición de enfermedad. Fuentes de fibras frutales como manzana y cítricos pueden utilizarse como alternativa de las fuentes de fibra tradicionales.

5 HIPÓTESIS

La inclusión de pulpa de citrus y pomaza de manzana frescas en dietas para perros puede mejorar la fermentación intestinal y tener un impacto positivo en el ecosistema microbiano intestinal como ha sido demostrado para productos deshidratados.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar la potencial actividad prebiótica de la pulpa de citrus y la pomaza de manzana al ser incluidas frescas en dietas para perros.

6.2 Objetivos particulares

- Evaluar las características de fermentación *in vitro* de dos fuentes de fibra (pulpa de citrus y pomaza de manzana) añadidas en diferentes niveles a un alimento para perros pre-digerido.
- Determinar si la suplementación de un alimento para perros con pulpa de citrus y pomaza de manzana en fresco afecta la digestibilidad de los nutrientes, las características de las heces y las poblaciones microbianas fecales.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos experimentos: un ensayo en el que se evaluó la fermentabilidad *in vitro* y un ensayo de alimentación *in vivo*. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Experimentación y Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria, UdelaR.

7.1 Experimento 1: fermentabilidad *in vitro*

En este ensayo se evaluó la cinética de producción de gas *in vitro* de mezclas de un alimento comercial pre-digerido con niveles crecientes de pulpa de citrus (PC) o pomaza de manzana (PM) y estas fuentes de fibra solas.

Estos sustratos fueron incubados mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, utilizando como inóculo materia fecal proveniente de 3 perros clínicamente sanos pertenecientes a la Unidad Experimental de Nutrición Canina (UENC) del Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria, alimentados con un alimento comercial (AC).

7.1.1 Diseño experimental

Se realizaron mezclas del AC para perros pre-digerido (PRED), con PC y PM. Estas mezclas que fueron utilizadas como sustrato de fermentación (total de 3 sustratos), se prepararon de tal forma de probar cuatro niveles diferentes de inclusión de fuentes de fibra: 0, 30, 50 y 70 g/kg de pulpa de citrus o de pomaza de manzana, en base de materia seca. También se utilizaron como sustratos PC y PM solas. El material que se utilizó como fibra fue la pulpa y cascara que queda después de la compresión de la fruta (naranja y manzana) en forma mecánica en el proceso de elaboración de jugos. Con el fin de asegurar la frescura y calidad higiénica del material, se recogió inmediatamente después de la extracción del jugo, fue picado en el laboratorio, y se almacenó a -20°C durante todo el estudio. La pre-digestión del

alimento comercial se realizó mediante la hidrólisis en dos etapas de un alimento comercial para perros (Purina Excellent, Nestlé, B.A., Argentina) con pepsina y pancreatina, según el procedimiento descrito por Cone y col. (2005). El residuo de la pre-digestión se filtró con una gasa de nylon con poros de 43 micras, y se secó en estufa a 55° durante 48 hs al igual que las fuentes de fibra. Todos estos sustratos fueron molidos al tamaño de 1 mm previo a la realización de las mezclas.

7.1.2 Preparación del inóculo

El inóculo fecal para inocular los frascos de fermentación se preparó utilizando heces obtenidas a partir de 3 perros adultos enteros de raza Cocker Spaniel (2 hembras, 1 macho; peso promedio de 12,6 ± 0,4 kg). Los animales se alojaron en jaulas de 2 m por 2 m y se les administró alimento comercial (Purina Excellent 27 g MS/kg de PV^{0,75}) durante 12 días antes de la recolección fecal. Las heces se recogieron inmediatamente después de la defecación, colocadas en bolsas de plástico selladas bajo condiciones anaerobias, que se transportaron al laboratorio en menos de 1 hora entre la colecta y la inoculación. Se formó un pool cuantitativo de heces para proporcionar un único inóculo representativo. Las heces se diluyeron (1/5 peso/volumen) con suero fisiológico estéril y homogenizaron usando un mezclador de mano, luego se filtraron a través de 4 capas de paño de quesería. El líquido se obtuvo y se agitó bajo flujo continuo de CO₂ hasta la inoculación en las botellas.

7.1.3 Técnica de producción de gas *in vitro*

La producción de gas *in vitro* se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Theodorou y col. (1994) modificado por Mauricio y col. (1999). Se colocó 0,5 g MS de cada sustrato en frascos de fermentación de 100 mL y se adicionó 41 mL de un medio de incubación (buffer) propuesto por Williams y col., (2005). Cada sustrato se incubó por triplicado, además de 3 botellas sin sustrato y con inóculo como blancos de fermentación (un total de 30 botellas). El medio de incubación consistió en 3 soluciones descritas por William y col., (2005): 38 mL de una solución basal (macro y micro minerales, ácidos grasos volátiles y hemina), 0,5 mL de una solución tampón de fosfato y vitaminas, y 0,5 mL de una solución reductora. Estas soluciones se añadieron por separado en cada botella mediante flujo continuo de CO₂ para eliminar el aire del interior del frasco e inmediatamente se sellaron con tapones de goma y precinto de aluminio. Los frascos herméticamente sellados con el sustrato y el medio permanecieron a 4° C por 8 horas antes de la inoculación para que el sustrato se hidrate con el medio de incubación. Dos horas antes de la inyección del inóculo los frascos fueron colocados en un baño maría a 39°C en el que permanecieron hasta el final del período de incubación y se añadió 2 mL de una solución tampón de bicarbonato. Cada botella se inoculó con 10 mL de heces diluidas. Todas las manipulaciones se realizarán bajo continuo flujo de CO₂.

La presión generada dentro de los frascos se midió en las botellas a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48 y 67 hs después de la inoculación, con un transductor fijado a un medidor de presión (840 065, Sper Scientific, Scottsdale, Az, EEUU), y fue registrada en unidades psi. El volumen de gas en mL se predijo a partir de valores de psi. Para este propósito en un ensayo previo, el volumen de gas se midió con una jeringa y al mismo tiempo la presión del gas se registró en psi de cada botella, según el procedimiento descrito por Theodorou y col. (1994). Entonces el volumen de gas en mililitros se calculó a partir de la presión utilizando la ecuación:

$$\text{Volumen (ml)} = 4,0289 \times \text{psi} + 0,1687 \times \text{psi}^2 \quad (n = 34; R^2 = 0,9822)$$

El volumen de gas acumulado que se registró durante la fermentación se relacionó con la MO incubada (volumen acumulado de materia orgánica). Los datos para la producción de gas acumulado se ajustaron al modelo (Groot y col., 1996):

$$G = A/[1 + (C/t)^B]$$

Donde G es el gas total producido (ml/g de MO); A es la producción de gas asintótica (ml/g de MO); B es la característica de conmutación de la curva; C es el tiempo en el que se alcanza la mitad de la asíntota ($t^{1/2}$) y t es el tiempo (h). La tasa máxima de fermentación (R_{\max}) y el tiempo en el que se produce (T_{\max}) se calcularon de acuerdo a Bauer y col. (2001):

$$R_{\max} = [A \times (C^B) \times B \times (T_{\max}^{-(B-1)})] / [(1 + (C^B) \times (T_{\max}^{(-B)})]^2$$

$$T_{\max} = C \times [((B-1)/(B+1))^{(1/B)}]$$

7.2 Experimento 2: Prueba de alimentación *in vivo*

Este ensayo se realizó para estudiar la influencia de la PC y PM (incluidas en fresco en la dieta de perros) sobre la digestión de los nutrientes, las características fecales (pH, concentración de amoníaco, frecuencia de defecación, consistencia, cantidad diaria total de heces) y las poblaciones bacterianas de las heces.

7.2.1 Diseño experimental

Seis perros adultos de raza Cocker Spaniel adultos y sanos (3 machos y 3 hembras; $12,7 \pm 0,7$ kg de peso), alojados en caniles individuales (2 m por 2 m) fueron asignados aleatoriamente a tres dietas de acuerdo con un diseño de 2 cuadrados latinos simultáneos (3 perros, 3 tratamientos, 3 periodos). Los alimentos utilizados en este experimento fueron los mismos utilizados en el Experimento 1, pero en este caso el alimento comercial se utilizó sin pre digerir, y las fuentes de fibra se utilizaron frescas. Las dietas consistieron en:

Tratamiento 1 = Alimento comercial (100 % de la MS)

Tratamiento 2= Alimento comercial (93 % de la MS) + pulpa de citrus (7 % de la MS)

Tratamiento 3 = Alimento comercial (93 % de la MS) + pomaza de manzana (7 % de la MS)

Cada perro fue alimentado diariamente con 27 g de MS/kg $PV^{0,75}$ representando de 178g a 211 g de AC por animal en base seca y de 186 g a 221 g en fresco. La PC y PM se administraron mezcladas con el alimento comercial sustituyendo el 7% de la MS requerida por cada animal, representando en base seca de 13 g a 14 g, en fresco 94 g a 102 g de PC, y 70 g a 78 g de PM en fresco por animal por día. Las dietas se suministraron en partes iguales a las 9 hs y a las 16 hs. Los animales tuvieron libre acceso al agua fresca y potable durante todo el experimento.

Cada período experimental consistió en 5 días de adaptación al alimento y 4 días de recolección de heces. En los primeros 3 días del periodo de recolección, las defecaciones de cada animal fueron chequeadas diariamente a cada hora entre las 9 y a las 19 hs, donde inmediatamente de su defecación se realizó medición de pH, se

determinó la consistencia de las heces excretadas y frecuencia de defecación. Las heces recolectadas entre las 9 y las 19 hs fueron pesadas y se almacenaron congeladas a -20°C para su posterior análisis químico. Además, se midió la cantidad total de alimento consumido a las 9 y a las 16 hs. El cuarto día (noveno día de cada período) una muestra individual de heces se recolectó inmediatamente después de la defecación para el estudio de poblaciones bacterianas.

7.2.2 Análisis de laboratorio

7.2.2.1 Medición de pH fecal

La medición del pH de las heces se realizó en forma individual inmediatamente después de la defecación; diluyendo 1 g de heces en 10 mL de agua destilada, y utilizando un pH-metro digital (Echem Instruments Pte. Ltd.; OAKTON, Singapur).

7.2.2.2 Determinación de consistencia (score) fecal

El score fecal se determinó según el método descrito por Strickling y col. (2000), de forma individual y por cada defecación inmediatamente de su recolección. Se basa en la clasificación visual subjetiva de las heces según su consistencia y forma, considerando una escala de valores numéricos de cinco puntos dentro de una misma defecación, donde 1 representa que más de dos tercios de las heces son líquidas y sin forma, 5 es que más de dos tercios de las heces son firmes.

El total de heces individuales se pesaron y colocaron en bolsas de plástico las cuales se les retiró el aire y fueron selladas e inmediatamente congeladas a -20°C y agrupadas representando cada perro y período. Estas fueron descongeladas al momento de la realización de su análisis químico posterior.

7.2.2.3 Análisis químicos

Las muestras de heces de los 3 días (pool fecal individual por período), el alimento y las fuentes de fibra fueron desecadas y molidas, realizándose los análisis por triplicado; determinando el contenido en materia seca (MS), Proteína Bruta (PB, N x 6.25), Cenizas (Cen), Extracto etéreo (EE) de acuerdo con las normas del AOAC (1990). Materia Orgánica (MO) se calculó por la diferencia: $MO=100-Cen$. Los contenidos en fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) se determinaron de forma secuencial con un analizador de fibra ANKOM 220 (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA) usando bolsas de nylon porosas selladas y α amilasa termoestable. Muestras fecales individuales por período fueron descongeladas y se analizaron para el contenido de amoníaco por destilación directa (Hesta y col., 2003).

La composición química analizada de los alimentos utilizados en el estudio es presentada en la tabla 1.

Tabla 1. Composición química de sustratos usados en el experimento 1 y dietas usadas en el experimento 2 (g/kg, en base de la MS).

	Experimento 1			Experimento 2		
	PRED	PC	PM	AC	AC+PC	AC+PM
Materia seca	929,7	145,0	210,0	928,5	679,7	746,2
Materia orgánica	945,8	964,8	982,5	929,7	930,3	931,3
Cenizas	54,2	35,2	17,5	70,3	69,7	68,7
Proteína cruda	140,3	61,0	26,5	243,6	229,0	223,9
Fibra neutro detergente	318,3	220,0	340,2	105,7	113,7	122,2
Fibra ácido detergente	80,5	162,7	237,7	47,5	56,3	61,5

Nota: PRED, control pre-digerido de alimento comercial seco para perros; PC, pulpa de citrus; PM, pomaza de manzana; AC, alimento comercial para perros; AC + PC, alimento comercial para perros suplementado con 70 g/kg MS de pulpa de citrus; AC+PM, alimento comercial para perros suplementado con 70 g/kg MS de pomaza de manzana.

7.2.2.4 Análisis microbiológico

Para el cultivo bacteriano se recolectó una muestra fecal única por perro el último día de cada periodo experimental (día 9). Se mezcló 1g de heces frescas inmediatamente después de la excreción con 10mL de solución salina fosfatada estéril que contenía 0,5 g/L de cisteína y fue mezclada en un stomacher (Seward, Reino Unido). Se realizaron diluciones en serie (10^{-2} a 10^{-9}) por triplicado y sembraron en diferentes medios de cultivo para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Las bacterias analizadas fueron: aerobios totales, anaerobios totales, lactobacilos, bacterias ácido lácticas, enterococos, coliformes, *Clostridium perfringens*. Los aerobios totales fueron cultivados en medio Agar Soya Trypticasa (TSA; Difco, inc., Detroit, EEUU) y anaerobios totales en TSA con 0,5g/l de cisteína. El medio Agar Rogosa se utilizó para el recuento de lactobacilus (Merck, Darmstadt, Alemania) según Swanson y col. (2002a); deMan- Rogosa- Sharpe (MRS) agar (Merck, Darmstadt, Germany) para bacterias ácido lácticas; mEnterococcus agar (Becton Dickinson, Massachusetts, EEUU) para enterococos; McConkey Agar (Merck, Darmstadt, Germany) para coliformes; y Sulfito de Polimixina Sulfadiazina (SPS) agar (Difco, inc., Detroit, MI, EEUU) para *Clostridium perfringens*. Todos los medios de cultivo se incubaron a 37°C por 48hs, TSA/cisteína y las placas de SPS fueron incubadas en jarra de anaerobiosis (Oxoid, Reino Unido), MRS y Rogosa en atmosfera microaerofílica, mientras que el resto de las placas se incubaron en condiciones aerobias. Los recuentos bacterianos se expresaron como \log_{10} UFC por gramo de heces frescas.

7.2.3 Determinación de digestibilidad aparente

La digestibilidad aparente de nutrientes (MS, MO, PB, FND, FAD) se calculó como:

Digestibilidad aparente (%) = $[\text{Nutrientes ingeridos (g)} - \text{Nutrientes fecales excretados (g)}] / \text{Nutrientes ingeridos (g)} \times 100$

7.3 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento MIXED de software SAS (versión 8.2; SAS institute, Cary, NC, EEUU). En el experimento 1, los efectos de la inclusión de fuentes de fibra y el nivel fueron testeados mediante el modelo:

$$Y_{ij} = \mu + F_i + L_j + (F \times L)_{ij} + e_{ij}$$

Donde Y es la variable probada; μ es la media; F_i es el efecto fijo de la fuente de fibra ($i=PC$ o PM); L_j es el efecto fijo del nivel de inclusión ($j=0, 30, 50$ o 70 g/kg); $(F \times L)_{ij}$ es la interacción entre fuente de fibra y nivel de inclusión y e_{ij} los términos de error. Fueron testeados efectos lineales y cuadráticos para los niveles de inclusión. Además, los parámetros de fermentación de PM y PC incubadas solas fueron comparados.

Para el experimento *in vivo*, el modelo utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + P_j + T_k + e_{ijk}$$

Donde Y es la variable testada, μ es la media, D_i el efecto aleatorio del perro ($n=6$), P_j es el efecto fijo del período ($n=3$), T_k es el efecto fijo del tratamiento ($k= AC, AC+PC$ o $AC+PM$), y e_{ijk} es el error residual. Las medias fueron separadas mediante contrastes ortogonales (comparaciones lineales independientes entre los grupos, Doncaster y Davey, 2007) con el fin de estudiar los efectos de la inclusión de la fibra en la dieta (AC vs. $AC + PC + AC + PM$) y la fuente de fibra utilizada ($AC + PC$ frente $AC + PM$). Las poblaciones microbianas fecales fueron comparadas entre los tratamientos tras la transformación logarítmica de los recuentos microbianos, por el procedimiento NPAR1WAY de SAS. Para valores por debajo del límite de detección, se utilizó 1×10^2 como valor de recuento.

Diferencias entre medias con valores de $P \leq 0,05$ fueron aceptadas como significativamente distintas, mientras que valores de $P < 0,10$ y $> 0,05$ fueron considerados tendencias.

8 RESULTADOS

8.1 Experimento 1

Las características fermentativas de PM y PC , incubadas solas se muestran en la Tabla 2. Ambas fuentes de fibra presentan valores similares de producción de gas, sin embargo la pomaza de manzana presenta un valor inferior del tiempo en alcanzar la mitad de la asíntota ($t_{1/2}$; $p=0,006$), y una mayor tasa máxima fermentación R_{max} ($p=0,048$).

Tabla 2. Parámetros de la fermentación <i>in vitro</i> de las fuentes de fibra incubadas solas.	Fuente de fibra			
	PC	PM	EEM	P
<i>Parámetros de fermentación</i>				
Volumen de gas acumulado (mL/g MO)	120,95	129,75	6,09	0,365
$t_{1/2}$ (h)	8,21	5,46	0,36	0,006
R_{max} (mL/h)	10,84	14,08	1,04	0,048
T_{max} (h)	0,78	1,33	0,31	0,276

Nota: PC, Pulpa de citrus; PM, pomaza de manzana; EEM, Error estándar de las medias; las mediciones se basaron en tres repeticiones por sustrato; $t_{1/2}$, Tiempo en que se alcanza la mitad del valor asíntótico; R_{max} , Tasa máxima de fermentación; T_{max} , tiempo en que se produce R_{max} .

Los efectos de cada fuente de fibra añadidos a PRED y los niveles de inclusión utilizados (0, 30, 50 y 70 g / kg MS) se presentan en la figura 1. Debido a que no existieron interacciones significativas entre las fuentes de fibra y los niveles de inclusión para los parámetros estudiados, el aumento del nivel de inclusión produjo

respuestas similares para ambas fuentes de fibra. La producción de gas (volumen de gas acumulado) aumentó con la inclusión de fibra (p lineal $< 0,001$, p cuadrática $< 0,001$). Además, el tiempo en alcanzar la mitad del valor asintótico ($t_{1/2}$) de producción de gas fue mayor ($p = 0,004$) con la inclusión de ambas fuentes de fibra pero con la inclusión de PC tendió a ser mayor ($p = 0,078$) que PM y el tiempo necesario para alcanzar la R_{max} (T_{max}) tendió a ser mayor ($p = 0,073$) con la inclusión de ambas fuentes de fibra.

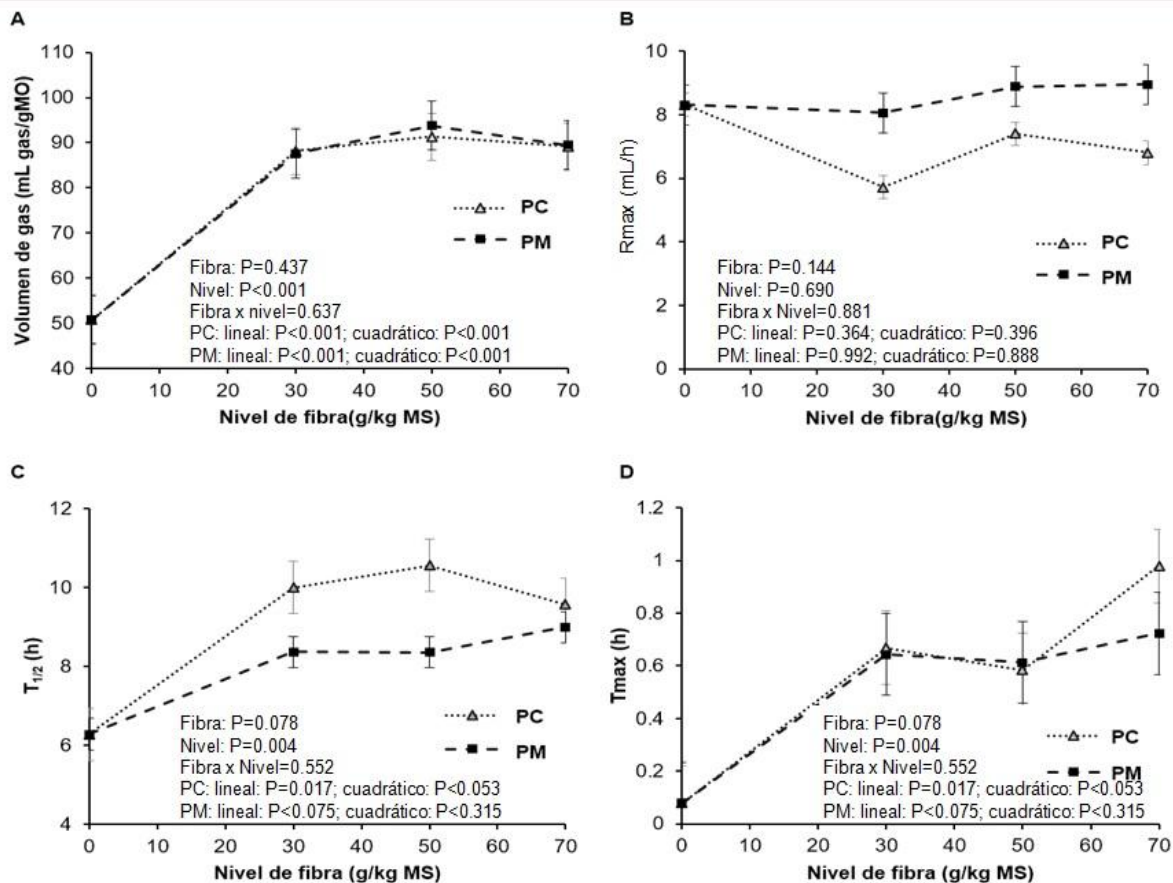


Figura 1. Parámetros de fermentación *in vitro* de pulpa de citrus (PC) y pomaza de manzana (PM) combinadas con un alimento para perros pre-digerido en niveles de 0, 30, 50 y 70 g/kg de MS. Cuadrante A: Volumen de gas acumulado; Cuadrante B: tasa máxima de producción de gas; Cuadrante C: tiempo en el que se alcanza la mitad del valor asintótico; Cuadrante D: tiempo en que se produce la tasa máxima de producción de gas; (medias \pm ESM; las mediciones se basaron en tres réplicas por fuente de fibra y nivel).

8.2 Experimento 2

Los parámetros fecales y la digestibilidad aparente de los nutrientes para los diferentes tratamientos se presentan en la Tabla 3. La adición de las fuentes de fibra en las dietas llevó a una mayor producción de heces ($p = 0,005$) y una mayor frecuencia de defecación ($p < 0,001$), con un menor contenido en materia seca de las heces ($p = 0,004$) sin variar la consistencia fecal. Se observó un menor pH fecal ($p < 0,001$) con la adición de fibra a la dieta, pero la concentración de amoníaco de las heces fue similar entre los tratamientos. La digestibilidad aparente de todos los nutrientes disminuyó con la adición de ambas fuentes de fibra y la cuantificación de los distintos grupos microbianos no fue influenciada por la adición de PC ni por la de PM (Tabla 4).

Tabla 3. Efecto de la inclusión de fibra en las características fecales y la digestibilidad aparente de nutrientes.

	Tratamientos			EEM	Contrastes, P	
	AC	AC + PC	AC + PM		Fibra	Fuente
Parámetros fecales						
Heces frescas (g/d)	95,6	148,0	146,0	20,92	0,005	0,912
Heces secas (g/d)	35,7	46,3	45,7	7,22	0,035	0,909
MS fecal (%)	38,1	31,2	31,7	0,16	0,004	0,814
Frecuencia de defecación (d ⁻¹)	1,17	1,83	1,78	0,11	<0,001	0,735
Consistencia (1:líquido; 5:firme)	4,41	4,32	4,24	0,22	0,147	0,777
pH fecal	6,99	6,58	6,51	0,05	<0,001	0,245
Amoníaco (mg N-NH ₃ /g MS)	2,23	1,92	2,14	0,18	0,375	0,391
Digestibilidad aparente (%)						
Materia seca	84,90	81,07	80,42	1,171	0,004	0,645
Materia orgánica	88,67	84,53	84,12	0,937	<0,001	0,713
Proteína bruta	86,15	83,41	81,68	1,243	0,007	0,202
Fibra neutro detergente	50,72	36,05	32,85	3,282	<0,001	0,466
Fibra ácido detergente	45,10	26,37	23,25	3,583	<0,001	0,548

Nota: AC, Alimento comercial para perros; AC + PC, Alimento comercial suplementado con 70 g/kg MS de pulpa de citrus; AC + PM, Alimento comercial suplementado con 70 g/kg MS de pomaza de manzana; EEM, Error estándar de las medias; Contrastes valor-p, probabilidad de contrastes; Fibra, efecto de inclusión de fibra (AC vs AC + PC + AC + PM); Fuentes, efecto de fuente de fibra (AC + PC vs AC + PM).

Tabla 4. Efecto de la inclusión de fibra en la dieta sobre la población bacteriana fecal (UFC log₁₀/g heces frescas)*.

	Tratamientos			Valores-p
	AC	AC + PC	AC + PM	
Aerobios totales	8,31 (6,48-8,93)	7,95 (6,66-9,48)	7,92 (6,89-8,88)	0,834
Anaerobios totales	8,60 (6,00-9,51)	8,50 (6,95-9,89)	7,71 (6,38-8,93)	0,623
Bacterias ácido lácticas	8,25 (5,45-9,41)	8,24 (6,45-9,28)	7,65 (6,08-9,11)	0,823
Lactobacilos	6,18 (5,30-8,98)	7,59 (4,00-9,00)	6,23 (4,48-8,63)	0,692
Enterococos #	6,10 (<2,00-7,48)	5,39 (5,00-8,30)	6,81 (4,77-7,62)	0,672
Coliformes	8,41 (6,46-9,34)	8,15 (6,63-9,10)	7,91 (6,70-9,15)	0,895
<i>Clostridium perfringens</i> #	7,53 (<2,00-8,23)	7,00 (<2,00-7,85)	6,74 (<2,00-8,93)	0,490

Nota: *Se reportan los valores medios para cada tratamiento; los valores mínimos y máximos se muestran entre paréntesis; AC, alimento comercial para perros; AC + PC, alimento comercial suplementado con 70 g/kg MS de PC; AC + PM, alimento comercial suplementado con 70 g/kg MS de PM; p, probabilidad de efecto de la dieta como se determinó mediante la prueba de Kruskal-Wallis; #se constataron cuatro valores por encima de los límites de detección.

9 DISCUSIÓN

9.1 Experimento 1

Según los resultados obtenidos de R_{max} , y teniendo en cuenta otros experimentos (Bosch y col., 2008; Deluca y col., 2010;), se puede decir que la pulpa de citrus y pomaza de manzana son fuentes de fibra moderadamente fermentable. Ambas fuentes de fibra mejoraron el grado de fermentación de la microbiota, al ser combinadas con el alimento comercial pre-digerido, evidenciándose por el aumento del volumen de gas producido. Sin embargo, la fermentación se hizo más lenta con el agregado de PC y PM, evidenciándose por una mayor T_{max} y $t_{1/2}$, en comparación con el PRED incubado solo. Esto se puede deber a que el origen del inóculo fue proporcionado por perros que recibían alimento sin el adición de fuentes de fibra. Por lo tanto la microbiota necesitó adaptarse al sustrato fibroso. Las dos fuentes de fibras incubadas con el PRED tuvieron similares perfiles de fermentación a los niveles testeados, aunque PM incubada sola se fermentó más rápido que PC, evidenciándose por $t_{1/2}$ menor. En suma, se encontró una mejora en la actividad

fermentativa para esas fuentes de fibra que puede implicar un beneficio para la salud intestinal en concordancia con otros estudios (Sunvold y col., 1995a, 1995b; Bosch y col., 2008; Biagi y col., 2010; Pinna y col., 2016).

9.2 Experimento 2

Las fuentes de fibra al ser utilizadas frescas, provocaron un aumento en el volumen de las heces, a pesar que los niveles de fibra (FND y FAD) de la dieta no eran mayores que 12% y 6% respectivamente para las fibras suplementadas. Estos niveles de fibra utilizados fueron similares o por encima que niveles utilizados en otros experimentos (Fahey y col., 1990a; De-Olivera y col., 2012). El exceso de fibra puede diluir el contenido de energía y nutrientes de la dieta, pudiendo producir dificultad para que el animal pueda satisfacer sus necesidades (Gross y col., 2010). Además puede causar disminución de la ingesta, debido a que disminuye la palatabilidad de la dieta (NRC, 2006). Sin embargo, no se produjeron rechazos de las dietas, siendo estas consumidas en su totalidad, incluso al aumentar el volumen con la suplementación. La suplementación con ambas fuentes de fibra en la alimentación, dio como resultado un aumento en la frecuencia de defecación, de acuerdo con los reportes de otros autores que encontraron una disminución del tiempo de tránsito gastrointestinal con fuentes de fibra moderadamente fermentables como pulpa de remolacha (Fahey y col., 1990a). Además, se ha reportado que el gas y el aumento del volumen fecal producido por la fermentación de la fibra, ejerce efecto de distensión de la pared intestinal, provocando aumento de la motilidad (Escudero y Gonzalez, 2006). De esta forma, un mayor volumen, contenido de humedad, y frecuencia de defecación de las heces, se produce como consecuencia del aumento del nivel de fibra de la dieta (Fahey y col., 1990b, 1990a; Walkshlag y col., 2011). Por otra parte, los AGV producto de la fermentación de la fibra, ejercen un efecto osmótico en el colon (NRC, 2006). Concentraciones altas o bajas de AGV aumentan el contenido de agua en las heces (NRC, 2006). Las fibras lentamente fermentables, son las más eficaces para aumentar el volumen de las heces, ya que son capaces de retener el agua en su matriz estructural (Gross y col. 2010).

Las dietas fibrosas produjeron la cantidad de heces más alta, en comparación con las dietas no fibrosas, debido a que las heces tenían mayor masa seca, y mayor salida de agua junto con las heces; esto puede estar relacionado con el aumento de componentes menos digeribles (fracción de fibra poco fermentable), interferencia en la digestión y la alta capacidad de retención de agua de las fuentes de fibra (Sunvold y col., 1995b; Swanson y col., 2001; de Godoy y col., 2013). Los polisacáridos viscosos como pectinas, gomas, y β -glucanos producen geles que pueden disminuir la absorción de nutrientes (Schneeman, 1987), reducir las interacciones de las partículas de alimentos con enzimas digestivas y las superficies epiteliales llevando a disminución de la digestibilidad (Gross y col., 2010). De acuerdo con otros autores, el bajo contenido en % de MS fecal está asociado con heces más húmedas y valores bajos de digestibilidad (Twomey y col., 2003a, 2003b; Carciofi y col., 2006; Beloshapka y col., 2012). Pero algo importante a destacar es que el score fecal no se vio afectado con los tratamientos, la inclusión de PM y PC en fresco a ese nivel no afectó la calidad de las heces, ya que el consumo de fibra en exceso puede llegar a producir diarrea (Bowling y col., 1993).

Como respuesta positiva encontrada al efecto de la suplementación con fibra, son los valores más bajos de pH en las heces, en concordancia con los volúmenes de

gas superiores obtenidos en la prueba *in vitro*, lo que sugiere una actividad fermentativa alta con producción de ácidos orgánicos en el intestino grueso (Flickinger y col., 2003; Twomey y col., 2003a, 2003b; Biagi y col., 2010; Beloshapka y col., 2012). Los valores bajos de pH en el intestino pueden tener un efecto protector contra las bacterias patógenas intestinales (Seifert y Waltz, 2007). Sin embargo el amoníaco fecal no se redujo con la adición de fibra y las poblaciones bacterianas fecales fueron similares entre los tratamientos, por lo que no podemos confirmar que la suplementación produzca aumento de la masa bacteriana e incorporación del amoníaco por parte de las bacterias, como reportaron otros autores (Silvio y col., 2000; Flickinger y col., 2003; Biagi y col., 2010).

La digestibilidad aparente disminuyó por la inclusión de ambas fuentes de fibra, como reportaron otros autores (Fahey y col., 1990b; Lewis y col., 1994). El aumento de la fermentación microbiana afecta la digestibilidad de la proteína bruta, debido al incremento de la proteína microbiana excretada en las heces (NRC, 2006). La disminución de la digestibilidad aparente de la PB, se podría deber a una disminución de la digestión de la proteína a nivel intestinal, pero no a un aumento de la masa bacteriana fecal, ya que no se observaron diferencias en los recuentos de aerobios y anaerobios fecales entre los tratamientos. Este hecho hay que tenerlo en cuenta cuando se utilizan estos subproductos para formular dietas para perros en crecimiento. La reducción de la digestibilidad de la FND y FAD fue la más evidente, con una reducción de 30% y 40% respectivamente. A pesar que PM y PC produjeron la mayor fermentación según los resultados obtenidos en la prueba *in vitro*, esto no se vio reflejado en los valores de digestibilidad de la prueba *in vivo* que debieron ser más altos para las fracciones de fibra. Pero hay que considerar que con los datos obtenidos de fermentación *in vitro* utilizando inóculos fecales del recto, se sobrestima la fermentación a nivel del colon, que es donde se espera que ocurra la mayoría de la fermentación en los perros (Bosch y col., 2008). Y el tránsito intestinal en los perros de raza pequeña dura menos que la duración de la prueba *in vitro*, por lo que pudieron haber quedado fracciones sin digerir. El aumento del nivel de fibra de la dieta que contiene fracciones lentamente fermentable o insoluble como la FAD pudo haber influido en los valores de digestibilidad de la fibra (Muir y col., 1996; Zentek, 1996; Sunvold y col., 1995b; Fahey y col., 1990a; Burkhalter y col., 2001).

10 CONCLUSIONES

Para concluir, la pulpa de citrus y pomaza de manzana incluidas en dietas para perros pueden ser útiles para mejorar la actividad fermentativa del intestino grueso, dando lugar a la producción de heces bien formadas, a pesar de reducciones en la digestibilidad de nutrientes. Estos subproductos adicionados en fresco, pueden ser considerados en la formulación de dietas caseras, pero sería necesario aumentar la concentración de los nutrientes (por ej., proteínas) ya que hay que considerar la reducción de la digestibilidad. Por otra parte serían necesarios más estudios que consideren otros niveles adecuados de fibra, adicionada a los alimentos.

11 BIBLIOGRAFIA

- 1) Adolphe JL, Murray DD, Huang Q, Silver TI, Weber LP (2012). Postprandial impairment of flow-mediated dilation and elevated methylglyoxal after simple but not complex carbohydrate consumption in dogs. *Nutr Res*; 32:273–284.
- 2) [AOAC] Association of Official Analytical Chemist (1990). Official methods of analysis. 15a ed. Arlington, USA, AOAC; 1230 p.
- 3) Ashwell M. (2002). Concepts of Functional Foods. International Life Sciences Institute (ILSI). Europe Concise Monograph Series. Disponible en: http://ilsi.eu/wp-content/uploads/sites/3/2016/06/C2002Con_Food.pdf Fecha de consulta: 26/7/17.
- 4) Bauer E, Williams BA, Bosch MW, Voigt C, Mesenthin R, Verstegen MWA (2004). Differences in microbial activity of digesta from three sections of the porcine large intestine according to *in vitro* fermentation of carbohydrate-rich substrates. *J Sci Food Agric*; 84:2097-2104.
- 5) Bauer E, Williams BA, Voigt C, Mosenthin R, Verstegen MWA (2001). Microbial activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable carbohydrates. *Anim Sci*. 73:313–322.
- 6) Beloshapka AN, Wolffi Ak, Swason KS (2012). Effect of polydextrose on faecal characteristics, microbiota and fermentative end products in healthy adult dogs. *Brit J Nut*; 108:638-644.
- 7) Biagi G, Cipollini I, Grandi M, Zaghini G (2010). Influence of some potential prebiotics and fibre rich foodstuffs on composition and activity of canine intestinal microbiota. *Anim Feed Sci Technol*; 159:50–58.
- 8) Boixeda de Miquel I (2000). Introducción a la alimentación canina y felina. Visión del mercado. XVI Curso de Especialización FEDNA. Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Barcelona, España, pp. 185 – 192.
- 9) Bosch G, Pellikaan WF, Rutten PGP, van der Poel AFB, Verstegen MWA, Hendriks WH (2008). Comparative *in vitro* fermentation activity in the canine distal gastrointestinal tract and fermentation kinetics of fiber sources. *J Anim Sci*; 86:2979–2989.
- 10) Bosch G, Verbrugghe A, Hesta M, Holst JJ, van der Poel AFB, Janssens GPJ, Hendriks WH (2009). The effects of dietary fibre type on satiety-related hormones and voluntary food intake in dogs. *British J Nutr*; 102:318–325.
- 11) Bowling TE, Ralmundo AH, Grimble GK, Silk DAB (1993). Reversal by short-chain fatty acids of colonic fluid secretion induced by enteral feeding. *Lancet*; 342:1266-1268.
- 12) Buddington RK, Buddington KK, Sunvold GD (1999). The influence of fermentable fiber on the small intestine of the dog: intestinal dimensions and transport of glucose and proline. *Am J Vet Res*; 60:354-358.
- 13) Burkhalter TM, Merchen NR, Bauer LL, Murray SM, Patil AR, Brent JL, Fahey Jr GC (2001). The ratio of insoluble to soluble fiber components in soybean hulls affects

ileal and total-tract nutrient digestibilities and fecal characteristics of dogs. J Nutr; 131:1978–1985.

14) Carciofi AC, Pontieri R, Ferreira CF, Prada F (2006). Avaliação de dietas com diferentes fontes protéicas para cães adultos. Rev Bras Zootec; 35:754–760.

15) Cone JW, Jongbloed AW, Van Gelder AH, de Lange L (2005). Estimation of protein fermentation in the large intestine of pigs using a gas production technique. Anim Feed Sci Technol; 123–24:463–472.

16) Corzo N, Alonso JL, Azpiroz F, Calvo MA, Cirici M, Leis R, Lombo F, Mateos-Aparicio I, Plou FJ, Ruas-Madiedo P, Ruperez P, Redondo-Cuenca A, Sanz ML, Clemente A (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. Nutr Hosp; 31:99-118.

17) Davenport DJ, Remillard RL, Carroll M (2010). Constipation/obstipation/megacolon, En: Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P. Small animal clinical nutrition. 5a ed. USA, Topeka, KS: Mark Morris Institute, pp. 1120-1123.

18) De Godoy MRC, Kerr KR, Fahey Jr GC (2013). Alternative Dietary Fiber Sources in Companion Animal Nutrition. J Nutr; 5:3099-3117.

19) De Oliveira LD, Takakura FS, Kienzle E, Brunetto MA, Teshima E, Pereira GT, Vasconcellos RS, Carciofi AC (2012). Fibre analysis and fibre digestibility in pet foods – a comparison of total dietary fibre, neutral and acid detergent fibre and crude fibre. J Anim Phys Anim Nutr; 96:895–906.

20) Deluca C., Brambillasca S., Reyes L., Britos A., Cajarville C (2010). Caracterización de fuentes de fibra a través de la producción de gas *in vitro* usando como inóculo heces de perro. Congreso AUPA, III, Montevideo, Uruguay, p.203.

21) Deng P, Beloshapka AN, Vester Boler BM, Swanson KS (2013). Dietary fibre fermentability but not viscosity elicited the ‘second-meal effect’ in healthy adult dogs. Brit J Nutr; 110:960–968.

22) Dirección Nacional de Aduanas (2016). Partidas arancelarias. Disponible en: <https://servicios.aduanas.gub.uy/LuciapubX/hCN1Publico.aspx>. Fecha de consulta: 15/3/17.

23) Eastwood MA (1992). The physiological effect of dietary fiber: An update. Annu Rev Nutr; 12:19-35.

24) El Observador (2012). Crece la “industria” detrás del cuidado canino. Disponible en: <http://www.elobservador.com.uy/crece-la-industria-detras-del-cuidado-canino> n217967. Fecha de consulta: 26/7/16.

25) Escudero Álvarez E, González Sánchez P (2006). La fibra dietética. Nutr Hosp; 21:61-72.

26) Fahey Jr GC, Merchen NR, Corbin JE, Hamilton AK, Serbe KA, Lewis SM, Hirakawa DA (1990a). Dietary fiber for dogs: I. Effects of graded levels of dietary beet pulp on nutrient intake, digestibility, metabolizable energy and digesta mean retention time. J Anim Sci; 68:4221–4228.

- 27) Fahey Jr GC, Merchen NR, Corbin JE, Hamilton AK, Serbe KA, Hirakawa DA (1990b). Dietary fiber for dogs: II. Iso-total dietary fiber (TDF) additions of divergent fiber sources to dog diets and their effects on nutrient intake, digestibility, metabolizable energy and digesta mean retention time. *J Anim Sci*; 68:4229–4235.
- 28) Flickinger EA, Scheinjen EMWC, Patil AR, Hussein HS, Grieshop CM, Merchen NR, Fahey Jr GC (2003). Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. *J Anim Sci*; 81:2008–2018.
- 29) Flickinger EA, Wolf BW, Garleb KA, Chow J, Leyer GJ, Johns PW, Fahey Jr GC (2000). Glucose-based oligosaccharides exhibit different *in vitro* fermentation patterns and affect *in vivo* apparent nutrient digestibility and microbial population in dogs. *J Nut*; 130: 1267-1273.
- 30) German AJ, Holden SL, Bissot T, Morris PJ, Biourge V (2010). A high protein high fibre diet improves weight loss in obese dogs. *Vet J*; 183:294–297.
- 31) Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, Gareau M, Murphy EF, Saulnier D, Loh G, Macfarlane S, Delzenne N, Ringel Y, Kozianowski G, Dickmann R, Lenoir-Wijnkoop I, Walker C, Buddington R (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol*; 7:1-19.
- 32) Gibson GR, Probert HM, van Loo JAE, Rastall RA, Roberfroid MB (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nut Res Rev*; 17: 259-275
- 33) Grieshop CM, Flickinger EA, Bruce KJ, Patil AR, Czarnecki GL, Fahey Jr GC (2004). Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan-oligosaccharides. *Arch Anim Nut*; 58:483-493.
- 34) Gross KL, Yamka RM, Khoo C, Friesen KG, Jewell DE, Schoenherr WD, Debrakeleer J, Zicker SC (2010). Macronutrientes. En: Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P. *Small animal clinical nutrition*. 5ª ed., Topeka, KS: Mark Morris Institute, pp. 49-105.
- 35) Groot JCJ, Cone JW, Williams BA, Debersaques FMA, Lantinga EA (1996). Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol*; 64:77–89.
- 36) Hesta M, Roosen W, Janssens GPJ, Millet S, De Wilde R (2003). Prebiotics affect nutrient digestibility but not faecal ammonia in dogs fed increased dietary protein levels. *Brit J Nutr*; 90:1007–1014.
- 37) Lewis LD, Magerkurth JH, Roudebush P, Morris ML, Mitchell EE Jr, Teeter SM (1994). Stool characteristics, gastrointestinal transit time and nutrient digestibility in dogs fed different fiber sources. *J Nutr*; 124:2716S–2718S.
- 38) Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C (1986). Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol*; 132:1647–1656.
- 39) Marks SL (2013). Como trato... perros con enfermedad inflamatoria intestinal. Disponible en: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2013/es/lectures/45.pdf> Fecha de consulta: 2/7/16.

- 40) Martínez-Pascual J, Fernández-Carmona J (1980). Composition of citrus pulp. *Anim Feed Sci Technol*; 5:1–10.
- 41) Mauricio RM, Mould FL, Dhanoa MS, Owen E, Channa KS, Theodorou MK (1999). A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim Feed Sci Technol*; 79:321-330.
- 42) McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFK, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG (2013). *Nutrición animal*. 7^a ed. Zaragoza, Ed. Acribia, 653 p.
- 43) Middelbos IS, Godoy MR, Fastinger ND, Fahey GC Jr (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.
- 44) Muir HE, Murray SM, Fahey GC Jr, Merchen NR, Reinhart GA (1996). Nutrient digestion by ileal cannulated dogs as affected by dietary fibers with various fermentation characteristics. *J Anim Sci*; 75:1641-1648.
- 45) NRC (National Research Council) (2006). Carbohydrates and fiber. En: National Reserch Council. *Nutrient Requirements of dogs and cats*. Washington, The National Academies Press, pp. 49-80.
- 46) Packaged facts (2016). *Pet Products & Services Market Reports*. Disponible en: <http://www.packagedfacts.com/pet-products-services-c124/>. Fecha de consulta: 26/7/17.
- 47) Pet food industry (2016a). Functional dog, cat food and pet treat trends. Disponible en: <http://www.petfoodindustry.com/articles/5916-infographic-functional-dog-cat-food-and-pet-treat-trends>. Fecha de consulta: 26/7/16.
- 48) Pet food industry (2016b). Why pet food's future is so bright. Disponible en: <http://www.petfoodindustry.com/blogs/7-adventures-in-pet-food/post/5910-why-pet-foods-future-is-so-bright>. Fecha de consulta: 26/7/16.
- 49) Pinna C, Vecchiato CG, Zaghini G, Grandi M, Nannoni E, Stefanelli C, Biagi G (2016). *In vitro* influence of dietary protein and fructooligosaccharides on metabolism of canine fecal microbiota. *BMC Vet Res*; 12:1-9.
- 50) Rastall JA (2004). Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *J Nutr*; 134:2022S-2026S.
- 51) Roediger WEW (1994) Famine, fiber, fatty acids, and failed colonic absorption: does fiber fermentation ameliorate diarrhea? *J Parenteral Enteral Nut*; 18:4–8.
- 52) Roediger WEW (1982). Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology*, 83:424-429.
- 53) Schneeman BO (1987). Soluble vs insoluble fiber-Different physiological responses. *Food Technol*; 41:81-82.
- 54) Seifert S, Waltz B (2007). Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *J Nutr*; 137:2563S–2567S.

- 55) Silvio J, Harmon DL, Gross KL, McLeod KR (2000). Influence of fiber fermentability on nutrient digestion in the dog. *Nutr*; 16:289-295.
- 56) Skinkė L, Januškevičius A (2015). Prospects of use of nutrient fiber, applying different feeding manners, to reduce obesity in dogs. *Vet Med Zoot*; 71:52-60.
- 57) Strickling JA, Harmon DL, Dawson KA, Gross KL (2000). Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. *Anim Feed Sci Technol*; 85:205–219.
- 58) Sunvold GD, Fahey Jr GC, Merchen NR, Reinhart GA (1995a). *In vitro* fermentation of selected fibrous substrates by dog and cat fecal inoculum: influence of diet composition on substrate organic matter disappearance and short-chain fatty acid production. *J Anim Sci*; 73:1110–1122.
- 59) Sunvold GD, Fahey Jr GC, Merchen NR, Titgemeyer EC, Bourquin LD, Bauer LL, Reinhart GA (1995b). Dietary fiber for dogs: IV. *In vitro* fermentation of selected fiber sources by dog fecal inoculum and *in vivo* digestion and metabolism of fiber-supplemented diets. *J Anim Sci*; 73:1099–1109.
- 60) Sunvold GD, Hussein HS, Fahey Jr GC, Merchen NR, Reinhart GA (1995c) *In vitro* fermentation of cellulose, beet pulp, citrus pulp, and citrus pectin using fecal inoculum from cats, dogs, horses, humans, and pigs and ruminal fluid from cattle. *J Anim Sci*; 73:3639–3648.
- 61) Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Healy HP, Dawson KA, Merchen NR, Fahey Jr GC (2002a). Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *J Nutr*; 132:980–989.
- 62) Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Wolf BW, Chow JM, Garleb KA, Williams JA, Fahey GC Jr (2002b). Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* Modify Bowel Function and Protein Catabolites Excreted by Healthy Humans. *J Nutr*; 132: 3042–3050.
- 63) Swanson KS, Grieshop CM, Clapper GM, Shields Jr RG, Belay T, Merchen NR, Fahey Jr GC (2001). Fruit and vegetable fiber fermentation by gut microflora from canines. *J Anim Sci*; 79:919–926.
- 64) Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol*; 48:185–197.
- 65) Trowell H, Southgate DAT, Wolever TMS, Leeds AR, Gusell MA, Jenkins DJA (1976). Dietary fiber redefined. *Lancet*; 1:967.
- 66) Twomey LN, Pluske JR, Rowe JB, Choct M, Brown W, Pethick DW (2003a). The effects of added fructooligosaccharide (Raftilose®P95) and inulinase on faecal quality and digestibility in dogs. *Anim Feed Sci Tech*; 108:83-93.
- 67) Twomey LN, Pluske JR, Rowe JB, Choct M, Brown W, McConnell MF, Pethick DW (2003b). The effects of increasing levels of soluble non-starch polisaccharides

and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. *Anim Feed Sci Technol*; 108:71–82.

68) Wakshlag JJ, Simpson KW, Struble AM, Dowd SE (2011). Negative fecal characteristics are associated with pH and fecal flora alterations during dietary changes in dogs. *Intern J Appl Res Vet Med*; 9:278–283.

69) Wara A, Datz C (2014). El papel de la fibra alimentaria en el gato. *Vet Focus*; 24:26-32.

70) Williams BA, Bosch MW, Boer H, Verstegen MWA, Tamminga S (2005). An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim Feed Sci Technol*; 123–124:445–462.

71) Williams BA, Verstegen MWA, Tamminga S (2001). Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nut Res Rev*; 14:207-227.

72) Young GP, Gibson PR (1991). Contrasting effects of butyrate on proliferation and differentiation of normal and neoplastic cells. En: Rombeau JL, Cummings JH, Sakata T, Short-chain fatty acids: metabolism and clinical importance. Report of the 10th Ross Conf. on Medical Research, Columbus, Ohio: Ross Laboratories, Ed. Roche AF, pp 50-55.

73) Zentek J (1996). Cellulose, pectins and guar gum as fiber sources in canine diets. *J Anim Physiol Anim Nutr*; 75:36-45.