

FATORES QUE AFETAM A ESTABILIDADE DE AMOSTRAS DE FEZES E EXTRATOS PREPARADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO INTESTINAL

ISABELA C. BOGO¹, JOSIANE A. VOLPATO¹, LUIZ GUSTAVO S. CAMPANHA, KARLA S. MEMARE, PATRICIA D. S. DOS SANTOS², RICARDO S. VASCONCELLOS¹

¹Dep. Zootecnia, UEM; ²Dep. Química, UEM

Contato: isabelacbogo@gmail.com / Apresentador: ISABELA C. BOGO

Resumo: Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR) são metabólitos da fermentação intestinal cuja quantificação depende da estabilidade das amostras fecais. Este estudo avaliou o efeito de diferentes condições de preparo de fezes de gatos na determinação desses compostos por cromatografia gasosa. Amostras frescas foram organizadas em três pools e submetidas a variações de tempo em bancada (0, 2 e 4 h), refrigeração antes da centrifugação (24, 48, 72 e 144 h), congelamento por 30 dias (extrato ou fezes) e comparação entre matriz íntegra e extrato. Não houve diferenças significativas entre tratamentos ($p>0,05$). Os AGCC variaram de 677 a 865 mmol/kg MS e os AGCR de 138 a 193 mmol/kg MS. Os resultados indicam estabilidade dos metabólitos nas condições avaliadas, embora a variabilidade experimental ressalte a importância da padronização metodológica.

PalavrasChaves: Compostos voláteis; microbiota intestinal; metodologia

FACTORS AFFECTING THE STABILITY OF STOOL SAMPLES AND EXTRACTS PREPARED FOR THE DETERMINATION OF INTESTINAL FERMENTATION PRODUCTS

Abstract: Short-chain (SCFA) and branched-chain fatty acids (BCFA) are intestinal fermentation metabolites whose quantification depends on fecal sample stability. This study evaluated the effect of different preparation conditions of cat feces on SCFA and BCFA determination by gas chromatography. Fresh samples were pooled and subjected to bench time (0, 2, and 4 h), refrigeration before centrifugation (24, 48, 72, and 144 h), freezing for 30 days (extract or feces), and comparison between intact matrix and extract. No significant differences were observed ($p>0.05$). SCFA ranged from 677 to 865 mmol/kg DM and BCFA from 138 to 193 mmol/kg DM. The results indicate metabolite stability under the evaluated conditions, although experimental variability highlights the need for methodological standardization.

Keywords: volatile compounds; intestinal microbiota; methodology

Introdução: Os ácidos graxos voláteis (AGVs), principalmente acetato, propionato e butirato, são metabólitos produzidos pela fermentação microbiana no intestino grosso e exercem funções essenciais na fisiologia intestinal. Além de fornecerem energia aos colonócitos, estão relacionados à modulação e ao equilíbrio da microbiota intestinal (LYU, 2020). A quantificação dos AGVs é amplamente utilizada como indicador da fermentação intestinal e da resposta a diferentes ingredientes ou substratos. Contudo, a integridade dessas amostras é altamente dependente das condições de temperatura e armazenamento. Após a coleta do material fecal, a continuidade da atividade microbiana e a volatilização desses metabólitos podem provocar alterações na concentração dos AGVs (CUNNINGHAM, 2020). Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito de diferentes condições de preparo de fezes de gatos na quantificação de AGCC e AGCR.

Material e Métodos: Para entender a metodologia deste estudo, as amostras fecais são preparadas para a análise de ácidos graxos de cadeia curta, nas seguintes etapas: preparo do extrato em meio ácido, centrifugação, filtragem, extração e análise por cromatografia gasosa (CG). Foram utilizadas fezes frescas de gatos, coletadas imediatamente após a defecação, garantindo mínima interferência de fatores ambientais. As amostras foram provenientes de diferentes animais e organizadas em três pools experimentais, com o objetivo de reduzir a variabilidade individual. Os pools foram submetidos a diferentes condições de preparo das amostras, incluindo: (i) tempo de permanência em bancada dos extratos preparados (0, 2 e 4 horas), (ii) armazenamento dos extratos antes de centrifugar sob refrigeração de 4-8°C (24, 48, 72 e 144 horas), (iii) congelamento do extrato pronto por 30 dias ou das fezes sem preparo por 30 dias, sendo preparado os extratos das fezes depois do descongelamento e (iv) comparação entre matriz fecal íntegra e extrato. Cada tratamento foi conduzido com três repetições. Após o preparo, as amostras foram processadas para quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR), expressos em mmol/Kg de fezes na matéria seca, conforme descrito por (GONZÁLEZ et al., 2023). Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva e à análise de variância (ANOVA) a um fator, considerando nível de significância de 5%. Quando aplicável, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. As análises foram realizadas utilizando os softwares Jamovi (versão 2.6).

Resultado e Discussão: Os resultados preliminares indicaram o perfil fermentativo consistente em fezes de gatos. Foram observadas variações numéricas entre os tratamentos (Figura 1), com valores de AGCC variando de 677 a 865 mmol/Kg de fezes MS e AGCR de 138 a 193 mmol/Kg de fezes MS, sem diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$). A ausência de efeito significativo foi consistente entre as condições avaliadas, incluindo tempo de bancada, resfriamento e congelamento, indicando que essas variáveis não interferiram na quantificação dos metabólitos. Esses achados sugerem que AGCC e AGCR apresentam relativa estabilidade em fezes frescas de gatos, mesmo sob diferentes condições de preparo. Entretanto, os elevados desvios-padrão observados indicam variabilidade experimental considerável, possivelmente associada à heterogeneidade da matriz fecal e às diferenças entre os pools formados a partir de animais distintos. Além disso, a atividade microbiana residual pode contribuir para flutuações nos níveis dos metabólitos. Estudos prévios demonstram que o armazenamento e o preparo das amostras fecais podem influenciar a estabilidade de ácidos graxos de cadeia curta,

especialmente em função da continuidade da atividade microbiana e da volatilidade desses compostos (Liebisch et al., 2019; Hsu et al., 2019). Assim, embora os resultados indiquem robustez metodológica, reforça-se a necessidade de padronização rigorosa das condições experimentais para aumentar a precisão e reprodutibilidade das análises.

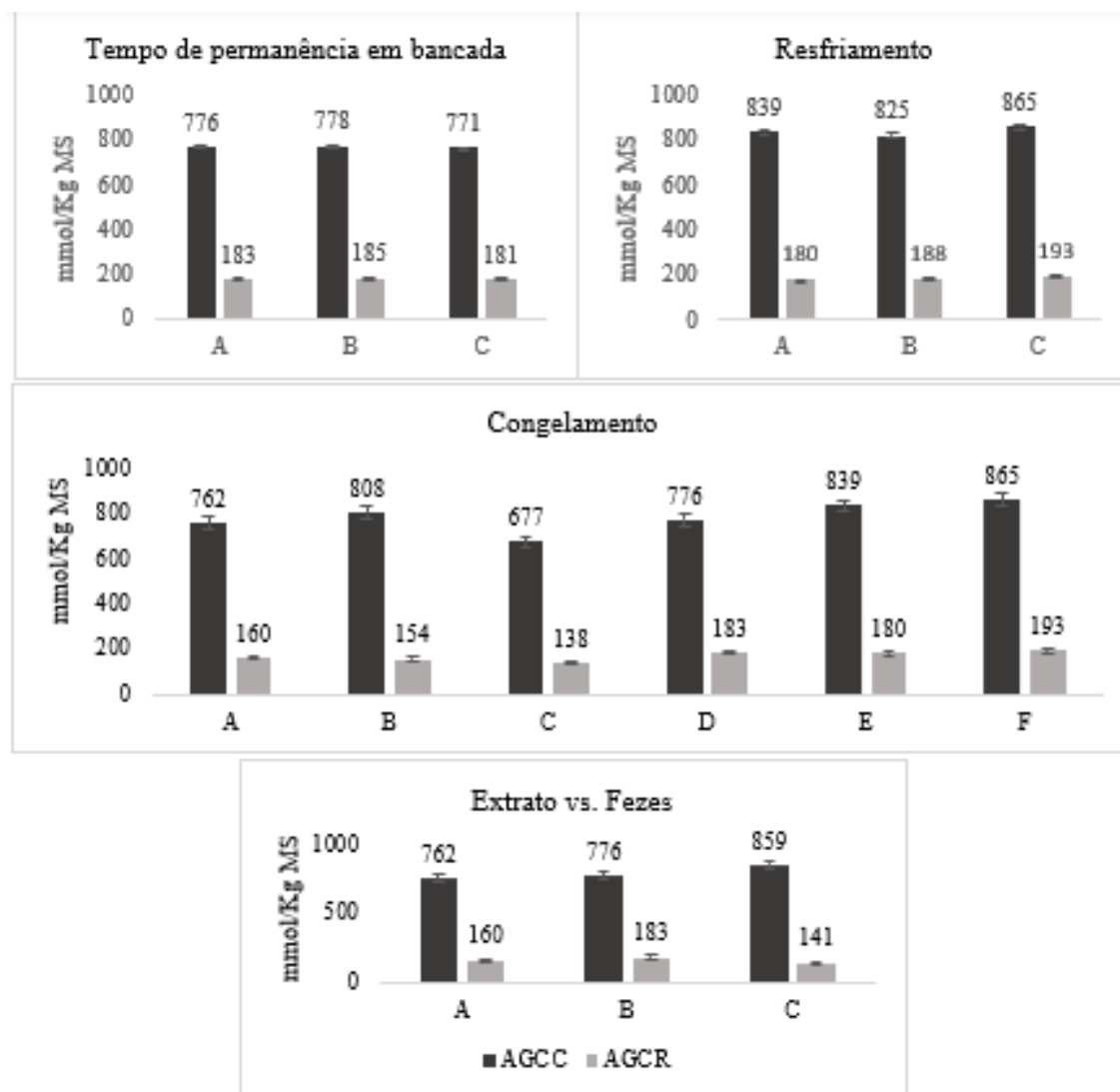


Figura 1. Concentração de AGCC e AGCR (mmol/Kg MS) sob diferentes condições de preparo. Tempo de permanência em bancada dos extratos de fezes, A:0h, B:2h e C:4h. Refrigeração dos extratos antes da centrifugação: A: 24h, B:48h e C:72h. Congelamento por 30 dias: A:extrato de fezes 0h, B:extrato de fezes 24h, C:extrato de fezes 72h, D:fezes 0h, E:fezes 24h, e F:fezes 72h. Extrato vs. Fezes: A:extrato de fezes 0h congelado por 30 dias, B:extrato 0h e C:fezes congeladas por 30 dias e preparado o extrato.

Conclusão: As condições de preparo das fezes e extratos fecais de gatos não influenciaram a quantificação de AGCC e AGCR, indicando estabilidade dos metabólitos. Contudo, a variabilidade observada destaca a necessidade de padronização metodológica. Os resultados preliminares demonstram potencial de aplicação, mas requerem validação adicional.

Agradecimentos: Ao Laboratório de Análises de Água e Alimentos pela disponibilidade das análises sem custo.

Referências Bibliográficas: CUNNINGHAM, Janet L. et al. Impacto do tempo e da temperatura na microbiota intestinal e na composição de AGCC em amostras de fezes. PLoS One, v. 15, n. 8, p. e0236944, 2020; GONZÁLEZ, Fernando José González. Efeitos de aditivos com ação prebiótica utilizados em alimentos extrusados para gatos: uma abordagem in vitro. 2023. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. HSU, Ya-Lin et al. Avaliação e otimização de métodos de manipulação de amostras para quantificação de ácidos graxos de cadeia curta em amostras fecais humanas por GC-MS. Journal of proteome research, v. 18, n. 5, p. 1948-1957, 2019; LIEBISCH, Gerhard et al. Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta fecais por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem — investigação da estabilidade pré-analítica. Biomolecules, v. 9, n. 4, p. 121, 2019; LYU, Yang et al. Passado, presente e futuro da pesquisa da microbiota gastrointestinal em gatos. Frontiers in microbiology, v. 11, p. 1661, 2020;