

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS EXTRUSADAS PARA
CÃES CONTENDO FARELO DE SOJA**

Letícia Tortola

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS EXTRUSADAS PARA
CÃES CONTENDO FARELO DE SOJA

Letícia Tortola

Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *Câmpus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Área de concentração em Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2011

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LETÍCIA TORTOLA – Nascida em 04 de janeiro de 1983, em Sorocaba, filha de Aristides Tortola e Marilza Tortola, tornou-se graduada em Medicina Veterinária, em dezembro de 2006, pela Universidade Estadual de Londrina – UEL – em Londrina, PR. Coursou o Programa de Aprimoramento em Medicina Veterinária, na área de Nutrição e Nutrição Clínica de Cães e Gatos, nos anos de 2007 a 2009, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – Unesp *Câmpus* de Jaboticabal, SP. Iniciou, em 2009, o curso de Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária sob orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi. Atualmente é analista de formulação na empresa Mogiana Alimentos LTDA.

OFERECIMENTO

Ao professor Aulus Cavalieri Carciofi por ter
aceitado ser meu orientador, e por
proporcionar meu crescimento profissional

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por permitir todas as minhas conquistas, ter colocado pessoas maravilhosas durante esse período e me guiar em todos os momentos.

Agradeço ao Padre Paulo Cesar Mazzi e às irmãs Carmelitas por me conduzirem dentro da Igreja Católica com suas doces palavras e seus ensinamentos tão preciosos.

Ao Professor Aulus, não somente como orientador, mas também como exemplo de pessoa justa e humilde. Obrigada por compartilhar sua sabedoria e me inspirar como profissional.

Agradeço aos professores João Martins Pizauro Junior e Ricardo Souza Vasconcellos por aceitarem o convite de colaborar com essa dissertação participando da banca de defesa. Também aos professores Nilva Kazue Sakomura e Márcio Antonio Brunetto, membros da banca do exame de qualificação, pelas sugestões tão essenciais para a correção dessa dissertação.

À Natalie, parceira nesse trabalho, obrigada por todo o tempo que você dedicou a essa pesquisa, noites, finais de semana e feriados. A toda troca de experiência e todo aprendizado que juntas tivemos.

À empresa Alltech do Brasil, nas pessoas de Maurício Rocha e Andrea Malaguido, pelo auxílio financeiro e pelas importantes discussões técnicas durante o desenvolvimento e execução do projeto de pesquisa.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão do auxílio através da bolsa.

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e a todo o seu corpo docente, em especial ao Professor José Jurandir Fagliari, pelo empenho em tornarem o programa cada vez mais conceituado.

À empresa Mogiana Alimentos LTDA., pela doação das matérias primas utilizadas nas rações experimentais e pela manutenção financeira do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”. Agradeço por acreditar e incentivar a pesquisa brasileira. Agradeço também à Premier pet e à SPF do Brasil pela doação de matérias primas.

A todos os meus colegas de trabalho no Laboratório de Pesquisa em Nutrição de Cães e Gatos: Ricardo, Márcio, Eliana, Márcia, Juliana, Sandra, Guilherme, Leandro, Michele, Fabiano, Raquel, Flávio, Fernanda, Mayara, Chayanne, Danilo, Ana Paula, Fernando, Íris, Bruna, Ana Carolina, Mariana, Thaila, Dóris, Manuela. Muito obrigada a todos vocês pela amizade, pelos conselhos, pela convivência e pelos ensinamentos.

Agradeço a todos os orientados de iniciação científica e estagiários por toda a ajuda nessa pesquisa e no laboratório como um todo: Laura, Mariana, Guilherme, Laís, Aline, Ana Carolina, Karine, Luana, Natasha, Patrícia, Paula, Rafael e muitos outros que passaram durante todos esses anos pelo Laboratório de Nutrição de Cães e Gatos.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição de Cães e Gatos, Elaine e Diego, que fazem seu trabalho com tanta dedicação. Obrigada por toda ajuda e convivência tão prazerosa!

Agradeço muito à Cláudia, técnica do Laboratório de Nutrição de Cães e Gatos, pelo auxílio na execução das análises laboratoriais. Você foi peça fundamental na realização deste projeto de pesquisa.

A todos os cães e gatos do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada” que me possibilitaram muito além da pesquisa, como também o orgulho de ter escolhido uma profissão que se dedica a vocês.

Aos meus pais, Marilza e Aristides, pelo amor, exemplo, base e apoio. Nada seria realizado sem o suporte de vocês. Obrigada por toda força, amo vocês.

Ao meu amor, meu companheiro, Junior, sempre do meu lado, mesmo à distância. Apoiando-me em todas as minhas decisões. Obrigada pela compreensão, pelo carinho, pela paciência, por ser fundamental para eu seguir adiante, do seu lado. Te amo muito!

À República Bigode, por ter me acolhido durante todos esses anos. Simone, Haroldo, Érika, Lonjoré, Eliana, Anelise, Raquel, Sharon e Mel. Todos os momentos que passamos, estávamos sempre unidos. Vocês não foram colegas de casa, e sim minha família em Jaboticabal.

Agradeço ao Leandro, mais que amigo, um irmão. Obrigada por toda a nossa caminhada sempre crescendo juntos no campo profissional, pessoal e espiritual. Obrigada também pelo apoio de todos os meus amigos, em especial à Edna, Denise (e Tigrão), Palumbo, Marcus, André, Letícia, Andressa, Carol, Camila, Fernanda.

Às repúblicas Pau da Goiaba e Antro do HV e a todos os seus moradores e agregados. Foram lugares em que passei ótimos momentos.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira entraram na minha vida em Jaboticabal, também as que por algum descuido não citei. Uma parte da minha história ficou nessa pequena cidade do interior de São Paulo, lugar em que passei momentos maravilhosos e que estarão sempre guardados no meu coração. Deus abençoe a todos vocês!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Farelo de soja e suas características	3
2.2. Os oligossacarídeos presentes na soja e sua influência sobre a digestibilidade e qualidade das fezes	6
2.3. Adição de enzimas nas dietas para animais	7
2.4. A microbiota intestinal de cães.....	10
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Animais e delineamento experimental.....	14
4.2 Dietas	15
4.3 Protocolo Experimental	19
4.4 Análises laboratoriais	23
4.5 Análise estatística	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Digestibilidade e Parâmetros Fecais.....	26
5.2 Composição microbiana das fezes.....	32
5.3 Resposta pós-prandial de ureia, balanço de nitrogênio e aminograma	33
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES.....	48
8. REFERÊNCIAS	50
ANEXO 1.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química das amostras de farelo de soja empregadas nos experimentos A e B ¹ . Valores expressos sobre a matéria natural.....	16
Tabela 2 - Fórmulas das dietas utilizadas nos experimentos A e B.....	17
Tabela 3 - Composição química analisada e parâmetros qualitativos das dietas empregadas nos experimentos A e B ¹	18
Tabela 4 - Métodos empregados para cultura das bactérias em estudo.	21
Tabela 5 - Características morfo-tinturiais dos gêneros de bactérias em estudo visualizados em esfregaços corados pelo método de Gram.	22
Tabela 6 - Consumo (g) e coeficientes de digestibilidade aparente (%) das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento A....	27
Tabela 7 – Consumo (g) e coeficientes de digestibilidade aparente (%) das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento B....	28
Tabela 8 - Produção, características, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácido láctico e amônia fecal de cães mediante consumo o das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento A.....	30
Tabela 9 - Produção, características, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácido láctico e amônia fecal de cães mediante consumo das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento B.....	31
Tabela 10 - Contagem de bactérias nas fezes de cães mediante consumo das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento B....	32
Tabela 11 - Área abaixo da curva, incremento de ureia sérica pós-prandial e balanço de nitrogênio de cães mediante consumo das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento A.	34
Tabela 12 - Área abaixo da curva, incremento de ureia sérica pós-prandial e balanço de nitrogênio de cães mediante consumo das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento B.	36
Tabela 13 - Aminograma das rações empregadas nos experimentos A e B ¹ . Valores sobre a matéria natural.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incremento de ureia sérica de cães (mg/dL) mediante consumo das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento A....38

Figura 2 - Incremento de ureia sérica de cães (mg/dL) mediante consumo das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento B....39

LISTA DE ABREVIATURAS

AAC	Área abaixo da curva
AAFCO	Association of American Feed Control Official
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
CDA	Coeficiente de digestibilidade aparente
CV	Coeficiente de variação
EB	Energia bruta
EEA	Extrato etéreo em hidrólise ácida
EM	Energia metabolizável
EPM	Erro padrão da media
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FDT	Fibra dietética total
P	Fósforo
MM	Matéria mineral
MN	Matéria natural
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
NRC	National Research Council
PB	Proteína bruta
Unesp	Universidade Estadual Paulista

ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS EXTRUSADAS PARA CÃES CONTENDO FARELO DE SOJA

RESUMO - Farelo de soja (FS) foi avaliado como substituto protéico da farinha de vísceras de frango (FVF) em rações extrusadas para cães, bem como a ação de enzimas exógenas sobre a digestibilidade dos nutrientes, formação de produtos de fermentação intestinal, composição da microbiota das fezes e resposta pós-prandiais de ureia. Duas formulações isonutritivas foram usadas em dois ensaios: FVF (28,9% de FVF, casca de soja como fonte de fibra) e dieta a base de FS (29,9% de FS). No experimento A, a dieta FS foi desdobrada em três dietas: FS-0, sem adição de enzimas; FS-1, 7.500U/kg de protease e 45U/kg de celulase; FS-2, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase, ambas adicionadas por cobertura após a extrusão. No experimento B, a dieta FS foi desdobrada em três dietas: FS-0, FS-1, 140U/kg de protease, 8U/kg de celulase, 800U/kg de pectinase, 60U/kg de fitase, 40U/kg de betaglucanase e 20U/kg de xilanase; FS-2, 700U/kg de protease, 40U/kg de celulase, 4000U/kg de pectinase, 300U/kg de fitase, 200U/kg de betaglucanase e 100U/kg de xilanase, ambas adicionadas por cobertura após a extrusão. Cada experimento seguiu um delineamento em blocos com dois blocos de 12 cães beagle sadios e seis cães por dieta. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por contrastes ortogonais e polinomiais ($p < 0,05$). Em ambos os experimentos, a digestibilidade dos nutrientes e a energia metabolizável não diferiram entre as dietas ($p > 0,05$). O uso de FS resultou em aumento da umidade fecal e da produção fecal ($p < 0,05$). Altas concentrações de acetato, propionato e lactato e menor quantidade de amônia foram encontrados nas fezes de cães alimentados com FS ($p < 0,05$). No experimento B, a adição de enzimas aumentou a concentração fecal de acetato, propionato e AGCC totais ($p < 0,05$). A resposta pós-prandial de ureia e a área abaixo da curva foram maiores para as dietas de cães alimentados com FS ($p < 0,05$). O farelo de soja resultou em baixas concentrações fecais de aeróbios e anaeróbios totais ($p < 0,05$). Apesar de apresentar digestibilidades semelhantes, FS mostrou uma possível pior utilização de aminoácidos absorvidos. Os oligossacarídeos da soja podem mudar benéficamente a formação de produtos finais da fermentação intestinal e a composição da microbiota fecal, aspectos que merecem consideração em relação à saúde intestinal.

PALAVRAS-CHAVE: animais de companhia, oligossacarídeos, ingrediente

EXOGENOUS ENZYMES IN EXTRUDED DIETS CONTAINING SOYBEAN MEAL FOR DOG

ABSTRACT: Soybean meal (SBM) was evaluated as a protein substitute of poultry by-product meal (PM) in extruded dog foods, as well the effects of exogenous enzymes supplementation on nutrient digestibility, fermentation end products formation, fecal microbiota composition and postprandial urea response. Two kibble isonutritive diets were used in two trials: PM based diet (28,9% of PM; soybean hulls as a fiber source); SBM based diet (29,9% of SBM). On experiment 1, the SBM diet was unfolded into three diets: SBM-0, without enzyme addition; SBM-1, covered after extrusion with 7,500Uprotease/kg and 45Ucelulase/kg; SBM-2, covered with 15,000Uprotease/kg and 90Ucelulase/kg. On experiment 2, the SBM diet was unfolded into three diets: SBM-0; SBM-1, covered with 140Uprotease/kg; 8Ucellulase/kg, 800Upectinase/kg, 60Uphytase/kg, 40Ubetaglucanase/kg and 20Uxylanase/kg; SMB-2, covered with 700Uprotease/kg, 40Ucellulase/kg, 4000Upectinase/kg, 300Uphytase/kg, 200U betaglucanase/kg and 100Uxylanase/kg. Each experiment followed a block design with two blocks of 12 health beagles, and 6 dogs per diet. Data was submitted to analysis of variance and means compared by orthogonal and polynomial contrasts ($P < 0.05$). In both experiments, digestibility of nutrients and metabolizable energy did not differ between diets ($P > 0.05$). The use of SBM resulted in increased faecal moisture and faecal production ($P < 0.05$). High concentration of propionate, acetate and lactate, and lower amounts of ammonia were found in the feces of dogs fed SBM ($P < 0.05$). In experiment 2 the addition of enzymes increased fecal concentration of propionate, acetate and total SCFA ($P < 0.05$). Postprandial urea pick response and area under the curve were higher for dogs fed SBM diets ($P < 0.05$). Soybean meal resulted in low faecal concentrations of total aerobes and total anaerobes ($P < 0.05$). In spite to present similar digestibilities, SBM showed a worse possible utilization of absorbed amino acids. Soybean oligosaccharides can beneficially change gut fermentation end product formation and faecal microbiota composition, aspects that deserve consideration in respect to gut health.

KEYWORDS: pets, oligosaccharides, ingredients

1. INTRODUÇÃO

O mercado de alimentos para animais de companhia vem se tornando cada vez mais expressivo. O potencial de desenvolvimento deste segmento faz com que a busca por ingredientes alternativos para a formulação de *pet food* seja crescente. Apesar da grande quantidade de tipos e marcas de alimentos disponíveis para cães e gatos, pesquisas nacionais visando a melhoria das dietas, estudando ingredientes e aditivos para formulação ainda são escassos (CARCIOFI et al., 2006), mesmo internacionalmente apenas nas últimas décadas o volume de informações produzido têm crescido (FAHEY, 2003).

A utilização de coprodutos da agroindústria é alternativa viável na alimentação de cães e gatos, pois diminui a dependência por ingredientes que possam servir para alimentação humana, podendo reduzir o custo das dietas. Entre os coprodutos de origem vegetal, o farelo de soja é o ingrediente mais utilizado mundialmente para a produção de alimentos para diversas espécies (BUTOLO, 2010).

Apesar das vantagens do uso do farelo de soja em dietas para animais de companhia, como baixo custo e boa disponibilidade, a presença de polissacarídeos não-amiláceos poderia causar menor digestibilidade e aumento do volume e umidade das fezes dos cães e a presença de fitato reduzir a disponibilidade dos minerais (FAHEY, 2007).

Os polissacarídeos não-amiláceos (PNA), principais constituintes da parede celular dos vegetais, são polímeros de carboidrato que não podem ser digeridos por monogástricos devido à natureza de suas ligações químicas, sendo resistentes à hidrólise no trato digestório (ROSA & UTTPATEL, 2007). No farelo de soja, cerca de 20% da matéria seca é composta por PNA (NRC, 2006). Estes podem causar efeitos antinutricionais como aumento da viscosidade da digesta e desbalanço na microbiota intestinal, gerando redução na digestão e absorção de nutrientes (CHOCT & ANNISON, 1990).

Ao contrário dos demais fatores antinutricionais presentes na soja, os PNA não são compostos termolábeis, ou seja, o aquecimento não é capaz de inativar suas propriedades (YAMKA et al., 2003). Assim, uma alternativa que tem sido investigada em várias espécies de animais monogástricos para se tentar reduzir esses efeitos antinutricionais é a adição de enzimas à ração. Dentre as enzimas utilizadas, destacam-se a protease, celulase, amilase, pentosanase, xilanase, beta-glucanase, pectinase, beta-mananase, fitase e alfa-galactosidade.

Essas enzimas, provenientes geralmente de bactérias do gênero *Bacillus* sp ou de fungos do gênero *Aspergillus* sp (FIREMAN & FIREMAN, 1998), atuam hidrolisando estes polissacarídeos, reduzindo seu peso molecular e promovendo desse modo redução na viscosidade do meio em que estes estão diluídos, melhorando a digestibilidade de nutrientes (FURLAN et al., 1997). Desta forma, na presente Dissertação, investigaram-se os efeitos da adição de concentrações crescentes de duas misturas enzimáticas sobre a digestibilidade dos nutrientes, produção de fezes, respostas pós-prandiais de ureia, formação de produtos de fermentação e microbiota das fezes de cães alimentados com rações extrusadas contendo farelo de soja em substituição da farinha de vísceras de frango como fonte protéica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Farelo de soja e suas características

Com o crescente aumento da competitividade do mercado de alimentos para cães e gatos, a utilização de alimentos alternativos e coprodutos da agroindústria vem sendo economicamente importante. Para seu correto emprego nas formulações de rações, todavia, é importante se conhecer seu valor nutritivo, que engloba não só sua composição química, mas também disponibilidade dos nutrientes, concentração e disponibilidade de energia (GENEROSO et al., 2008). Na busca de alternativas viáveis e de custo atrativo para *pet food*, tem-se recorrido a matérias-primas de origem vegetal.

O farelo de soja é o subproduto tostado, resultante do processo de extração do óleo dos grãos de soja por solvente (BUTOLO, 2010). Embora largamente empregado em alimentos para animais de produção, para cães e gatos, seu uso pode ser limitado, sendo mais empregado em formulações de custo reduzido e em quantidades inferiores a 15% da formulação total (YAMKA et al., 2003). Os principais problemas atribuídos a este ingrediente para cães e gatos são suas quantidades altas de fibras, de oligossacarídeos e de fatores anti-nutricionais, que podem reduzir a digestibilidade da dieta e causar aumento da quantidade de fezes, amolecimento das fezes e flatulência (CLAPPER et al., 2001; YAMKA et al., 2003; DERSJANT-LI & HILL, 2005).

A produção do farelo de soja se divide em quatro fases. Na primeira determina-se a umidade dos grãos procedentes da lavoura, que são classificados, limpos e

enviados para os secadores. Estes são posteriormente armazenados com controle de umidade, impurezas e temperatura. Na segunda fase ocorre a extração do óleo e a eliminação dos fatores antinutricionais, controlando-se o tempo, a temperatura e o teor do óleo residual. Na terceira fase acontece a moagem com granulometria padronizada e estocagem. Por fim, na quarta fase pode haver ensacamento do produto farelado ou a granel, ou ainda peletização com posterior estocagem dos pelets (BUTOLO, 2010).

Dentre as vantagens da inclusão da soja em alimentos para cães e gatos pode-se citar: baixo custo, o que permite elevar os teores protéicos de formulações de baixo custo; elevada disponibilidade comercial; qualidade e composição química consistentes; não interferência na palatabilidade da dieta; bom perfil de aminoácidos; melhora da textura da dieta; favorecer a extrusão; pode ser fonte de fibras (FAHEY, 2007). Em relação à sua digestibilidade, estudos têm demonstrado que a depender de seu processamento, o farelo de soja pode ser tão digestível quanto proteínas de origem animal (CLAPPER et al., 2001; DERSJANT-LI & HILL, 2005; CARCIOFI et al., 2006). Entretanto, o uso da soja em *pet food* também possui desvantagens como ter imagem negativa perante os proprietários de cães e gatos, conter fatores antinutricionais, apresentar baixas concentrações de metionina e cisteína, aumentar o volume e umidade das fezes, reduzir a disponibilidade dos minerais por causa de seus teores de fitato e apresentar importante quantidade de fibra (FAHEY, 2007).

Em relação a seus fatores antinutricionais, número considerável deles pode estar presente na soja, sendo os principais: os inibidores de tripsina que são compostos protéicos que se complexam com a tripsina prejudicando a quebra das cadeias protéicas que liberam os aminoácidos para absorção intestinal; as hemaglutininas (lectinas) que são albuminas solúveis em água que interagem com as glicoproteínas presentes nas membranas celulares dos glóbulos vermelhos, aglutinando-os; o ácido fítico, que reduz a disponibilidade de zinco, cobre, ferro, cromo e outros minerais; os oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) que não podem ser digeridos pelas enzimas do trato gastrointestinal e, em função disto, podem diminuir o tempo de passagem da

digesta, aumentando a umidade das fezes com decréscimo da digestão e absorção dos nutrientes da dieta (BUTOLO, 2010).

As rações destinadas a animais de companhia sofrem processo de extrusão, que atinge elevadas temperaturas (em média 130°C). Durante a extrusão, os ingredientes são cozidos, ocorrendo sua expansão através da gelatinização do amido. Este processamento acaba também por inativar parte dos fatores antinutricionais da soja (MENDES et al., 2004). Durante a própria produção do farelo de soja, este já é submetido à tostagem a temperatura de média de 105°C, inativando vários fatores antinutricionais termolábeis. A determinação da atividade ureática inclusive faz parte do monitoramento da qualidade do farelo de soja, sendo utilizado como indicador de qualidade da tostagem. A atividade ureática mede, de maneira eficaz, o grau de inativação dos fatores antinutricionais termolábeis. Sua aferição se faz pela variação do pH (atividade ureática). O grão cru tem atividade ureática de 2,0 a 2,5, quanto mais próximo de zero, melhor representa a inativação dos fatores antinutricionais termolábeis (BUTOLO, 2010).

Com isto tem-se que o duplo processamento térmico sofrido pelo farelo de soja na tostagem e extrusão torna pouco provável que os fatores antinutricionais termolábeis venham a ser problema para seu emprego na alimentação de cães. Já os oligossacarídeos, ácido fítico e a fibra do ingrediente, não sendo inativados pelo calor permanecem presentes no farelo de soja, representando potenciais limitantes de sua qualidade nutricional (YAMKA et al., 2003).

Entretanto, a inativação em excesso dos fatores antinutricionais termolábeis pode comprometer a disponibilidade de lisina e aminoácidos sulfurados e um método indicado para avaliar esse comprometimento é a solubilidade protéica em KOH 0,2%, em que a soja bem processada deve ter uma solubilidade protéica ideal entre 80 e 85% (BUTOLO, 2010).

2.2. Os oligossacarídeos presentes na soja e sua influência sobre a digestibilidade e qualidade das fezes

Os PNA são componentes estruturais das paredes celulares dos cereais, formados principalmente por oligossacarídeos (estaquiose e rafinose), celulose, hemicelulose e pectina. A estaquiose e a rafinose são alfa-galactosídeos mais abundantes encontrados na soja, compreendendo, respectivamente, 4,7% e 1,0% do ingrediente (NRC, 2006). Além de serem importantes para a integridade estrutural da planta, as ligações entre PNA e outros componentes provavelmente determinam o valor nutricional e digestibilidade do vegetal (FISCHER et al., 2002). A elevada capacidade de ligar-se a água, juntamente com a impossibilidade de digestão enzimática desses compostos pelos animais, resulta em aumento da viscosidade do conteúdo intestinal quando alimento contendo PNA solúvel é consumido (CHOCT & ANNISON, 1996). Um aumento demasiado da viscosidade do lúmen intestinal interfere na digestibilidade dos nutrientes, pois reduz a interação das enzimas endógenas com os substratos presentes no intestino (SMITS & ANNISON, 1996). Como consequência direta, em estudo em cães, verificaram-se que pode ocorrer redução da digestibilidade da matéria seca e proteína bruta dos alimentos no intestino delgado (YAMKA et al., 2005) o que implica em aumento do fluxo ileal de matéria orgânica e maior volume de fezes (YAMKA et al., 2003),

Estaquiose e rafinose não podem ser clivados no intestino dos monogástricos devido a ausência da enzima α -1,6-galactosidase (ZUO et al., 1996; BUTOLO, 2010), necessária para converter os oligossacarídeos em açúcares mais simples. A adsorção de aminoácidos e peptídeos por estes compostos também dificulta a atividade enzimática e a digestão e absorção dos nutrientes, aumentando a taxa de passagem intestinal (COON et al., 1990; GRIESHOP & FAHEY, 2000; ZUO et al., 1996; SILVIO et al., 2000; BUTOLO, 2010; YAMKA et al., 2003).

Além disso, os oligossacarídeos são facilmente fermentados no intestino grosso. Apesar da fermentação de matéria orgânica ser parte importante e desejável da fisiologia normal do intestino grosso, quando em excesso esta pode levar à piora da absorção de nutrientes e da qualidade das fezes (TWOMEY et al., 2003b), maior produção de gases e ácidos graxos de cadeia curta (ácido butírico, propiônico e acético) e ácido lático pela microbiota do trato digestório (GRIESHOP & FAHEY, 2000; SILVIO et al., 2000; YAMKA et al., 2005).

2.3. Adição de enzimas nas dietas para animais

Dentre as enzimas secretadas no trato gastrintestinal dos mamíferos, não se conhece nenhuma capaz de clivar os componentes fibrosos do alimento (ARGENZIO, 1996). Assim, alternativa que tem sido investigada em várias espécies de animais monogástricos para se tentar reduzir efeitos antinutricionais de ingredientes vegetais é a adição de enzimas à ração. Dentre as enzimas mais utilizadas, destacam-se a celulase, pentosanase, xilanase, beta-glucanase, pectinase, beta-mananase, fitase e alfa-galactosidade.

Enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações no organismo, sem serem, elas próprias, alteradas neste processo (CHAMPE & HARVEY, 1989). Antigamente, as enzimas usadas na indústria de rações eram subprodutos da indústria de alimentos. Os componentes das enzimas, sua estabilidade e atividade não eram adequadamente padronizados. Avanços nas áreas de biotecnologia e bioquímica permitiram melhorias significativas na estrutura e produção de enzimas. Atualmente estas são produzidas comercialmente principalmente a partir de bactérias do gênero

Bacillus sp ou de fungos do gênero *Aspergillus* sp (FIREMAN & FIREMAN, 1998), em processos industriais especializados e elevada tecnologia. Sua suplementação na dieta de cães, como na de outros monogástricos, objetiva hidrolisar ligações específicas de substâncias não digestíveis, atenuando os efeitos indesejados dos fatores antinutricionais e aumentando a acessibilidade dos nutrientes às enzimas endógenas, com melhora no aproveitamento dos ingredientes e seu valor nutricional (TWOMEY et al., 2003b; HASTINGS, 1946, FRY et al., 1957).

Exemplo neste sentido é o do ácido fítico. Admite-se que apenas 35% do fósforo total da soja seja disponível para os monogástricos, pois esse encontra-se ligado ao ácido fítico. Os fitatos (fosfoinositóis) são conhecidos como agentes complexantes de vários cátions divalentes (Fe^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , Ca^{++}). A adição de fitase melhora a absorção aparente de diversos minerais e oligoelementos, por hidrólise da molécula fosfoinositol, incluindo a do fósforo (SMET et al., 1999).

Em animais de produção (aves, suínos e peixes), a adição de enzimas visa maior ganho de peso e redução na conversão alimentar, através do uso de ingredientes menos nobres minimizando o custo da formulação. A adição de celulase e protease em dietas contendo tanto soja extrusada quanto soja tostada aumentou a digestibilidade da proteína bruta para frangos de corte (MARSMAN et al., 1997). Zanella et al. (1999), utilizando mistura enzimática 0,1% contendo 800 μg de xilanase, 6.000 μg de protease e 2.000 μg de amilase, observaram melhora no ganho de peso e conversão alimentar de frangos consumindo dietas a base de milho e de farelos de soja. Brito et al. (2006) adicionaram enzimas (celulase, amilase e protease) em dietas à base de soja extrusada para frangos de corte e verificaram melhora da digestibilidade ileal da matéria seca das rações, indicando que as enzimas foram efetivas em atenuar os efeitos negativos provocados pelos fatores antinutricionais presentes no ingrediente.

Estudo em cães avaliou a adição de alfa-galactosidase, fitase ou ambos em dietas a base de ingredientes de origem vegetal (milho, farelo de soja, ervilha e arroz) (SMET et al. 1999). Alfa-galactosidase aumentou os coeficientes de digestibilidade da

matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e extrativo não nitrogenado e reduziu a quantidade de ácido propiônico e láctico das fezes, já a dieta contendo fitase aumentou a absorção aparente do fósforo. Yamka et al. (2006), por sua vez, ao avaliarem os efeitos dos oligossacarídeos e da adição de beta-mannanase em dietas para cães a base de farelo de soja não encontraram diferenças sobre a digestibilidade dos nutrientes. Twomey et al. (2003b) avaliaram a adição de enzimas (amilase, beta-gluconase e xilanase) em dietas extrusadas para cães contendo teores crescentes de PNA solúveis. No estudo, demonstrou-se que a adição de enzimas resultou em aumento na digestibilidade da gordura, matéria seca e energia bruta e melhora significativa na qualidade das fezes dos cães. Estes efeitos foram atribuídos a quebrar as moléculas de PNA solúveis em pequenos polímeros, diminuindo assim a viscosidade do bolo alimentar. Em estudo anterior, no entanto, o mesmo grupo de pesquisa havia avaliado a adição de carboidrases em dietas para cães contendo sorgo e milho, não encontrado efeito da adição de enzimas (TWOMEY et al., 2003a). González-Sánchez et al. (2007) avaliaram a adição de diferentes concentrações de fitase (250 e 500 U/kg de MS) em dieta para gatos domésticos, verificando redução da digestibilidade aparente da matéria seca, fibra em detergente neutro e energia, um efeito negativo da enzima.

Apesar dos benefícios potenciais, vários fatores influenciam a atividade catalítica das enzimas exógenas e sua eficácia, divididos em fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos ao organismo animal incluem pH, comprimento do trato digestório, grau de hidratação, temperatura do corpo, concentração do substrato em razão da hidrólise enzimática e suscetibilidade das enzimas exógenas às enzimas endógenas (ACAMOVIC & MCCLEARY, 1996). Dentre os fatores extrínsecos, podem-se citar a exposição das enzimas ao ambiente externo e o pré-tratamento dos ingredientes, incluindo a variação de pH, calor, umidade e pressão e a presença de solventes orgânicos (PENZ, 1998).

Durante o processo de peletização, que trabalha com condições de umidade, pressão e temperatura inferiores às verificadas na extrusão, a atividade catalítica de enzimas exógenas pode ser reduzida significativamente. Segundo Spring et al. (1996),

o aumento gradual da temperatura durante a peletização resultou em inativação enzimática. Samarasinghe et al. (2000) afirmaram que a viscosidade oriunda da gelatinização do amido durante o processo de peletização foi responsável por propiciar um ambiente úmido e de calor excessivo, também resultando em desestabilização enzimática. Apesar de não terem sido localizados dados de retenção de atividade enzimática após a extrusão, admite-se que esta deva inativar completamente a ação das enzimas exógenas, pois a temperatura (acima de 120°C) e pressão (ao redor de 5 atmosferas) de processo desnaturam praticamente todas as proteínas presentes.

Frente a escassez de trabalhos e resultados controversos em cães, justifica-se a necessidade de mais pesquisas quanto ao emprego de enzimas e farelo de soja, estudando-se melhor tanto os efeitos dos oligossacarídeos sobre a digestibilidade dos nutrientes e fermentação bacteriana como a ação de enzimas exógenas na redução de efeitos antinutricionais. É esperado que a inclusão de farelo de soja na dieta reduza a digestibilidade dos nutrientes e aumente a produção de fezes e a formação de produtos finais de fermentação, sendo estes efeitos mitigados pela adição de misturas de enzimas à ração.

2.4. A microbiota intestinal de cães

A microbiota do trato gastroentérico desempenha diferentes funções nos mamíferos. Em ruminantes e herbívoros de grande porte, por exemplo, as bactérias são cruciais para extrair energia de substratos fibrosos por meio de fermentação anaeróbica. Na maioria dos monogástricos onívoros e carnívoros, a quantidade de energia obtida por fermentação microbiana é baixa, devido à baixa ingestão de fibra alimentar e/ou às diferenças da anatomia e fisiologia gastroentéricas. Apesar destas

diferenças, as populações microbianas desempenham um importante papel em diversas funções gastroentéricas, incluindo a resistência a patógenos e modulação do sistema imune (LUBS et al., 2008).

Ao contrário de outros animais monogástricos e humanos, pesquisas sobre a microbiota intestinal de cães ou gatos têm sido limitadas (HUSSEIN et al., 1999; ZENTEK et al., 2003, LUBS et al., 2008, GOMES, 2009). Recentemente, entretanto, estudos foram dedicados ao maior entendimento da microbiota do cólon de cães e gatos, sugerindo a presença de uma população diversificada, com um grande número de bactérias anaeróbias, que promovem significativa fermentação colônica (HUSSEIN et al., 1999).

As bactérias presentes no cólon fermentam os nutrientes dietéticos e secreções endógenas que escapam à digestão e absorção no intestino delgado, como amido resistente, polissacarídeos não amiláceos, açúcares não absorvidos, oligossacárides, proteína dietética, enzimas endógenas e muco (NRC, 2006). A densidade das bactérias pode alcançar 10^{10} por grama de fezes, sendo composta principalmente por estreptococos, bifidobacterias, lactobacilos, *Bacterioides* e *Clostridium* (VANHOUTTE et al. 2005). Segundo Silva & Nörnberg (2003), a microbiota benéfica (como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) pode auxiliar na digestão e absorção de nutrientes, produzir vitaminas que serão utilizadas pelo hospedeiro e diminuir, por exclusão competitiva, a proliferação de bactérias nocivas (como *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Salmonella*), as quais podem causar inflamações na mucosa intestinal, gerar metabólitos tóxicos e propiciar o aparecimento de enfermidades. Em condições normais, estas populações encontram-se em equilíbrio. No entanto, em condições de estresse (mudança da dieta, alterações climáticas, qualquer outra situação desfavorável) as populações benéficas diminuem e as nocivas se proliferam, o que se reflete negativamente sobre a saúde do animal (SILVA & NÖRNBERG, 2003).

Os principais produtos finais da fermentação e metabolismo bacteriano são os ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato, butirato), lactato, dióxido de

carbono e gás hidrogênio. Os ácidos graxos de cadeia curta diminuem o pH fecal, favorecendo a inibição das bactérias patogênicas e estimulando a proliferação de enterócitos. Com isto pode ocorrer melhoria da estrutura e integridade da parede celular, favorecendo a capacidade de absorção intestinal de nutrientes (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991).

Há evidências de que a composição da microbiota intestinal pode ser alterada por ingredientes da dieta. HUSSEIN et al. (1999) descreveram que a fonte e a quantidade de proteína dietética influenciam a maior ocorrência de patógenos, como *Clostridium* os quais tendem a ocasionar diminuição da concentração fecal de bifidobactérias. Durante a fermentação colônica de aminoácidos endógenos e não digeridos, são produzidos vários compostos putrefativos os quais são responsáveis pelo mau cheiro das fezes. Estes compostos incluem amônia, aminas alifáticas (agmatina, cadaverina, putrescina feniletilamina, e tiramina), ácidos graxos de cadeia ramificada (isobutirato e isovalerato), indóis, fenóis e compostos voláteis contendo enxofre (HUSSEIN et al., 1999). Muitos destes compostos podem ter efeitos adversos sobre a saúde do cólon, sendo altamente prejudiciais à integridade da mucosa.

Como a microbiota do intestino pode desempenhar papel importante na saúde intestinal, a modulação da microbiota do cólon com a proliferação de bactérias benéficas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) em detrimento às bactérias prejudiciais (*Escherichia coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Salmonella*), pode ser realizada a partir da manipulação da dieta, principalmente da fonte de proteína e carboidratos (fibra) ingeridos pelos cães e gatos.

3. OBJETIVOS

Avaliar o uso do farelo de soja como substituto protéico da farinha de vísceras de frango em rações extrusadas para cães, bem como a ação de enzimas exógenas sobre a digestibilidade dos nutrientes, concentrações fecais de produtos de fermentação intestinal, microbiota das fezes e respostas pós-prandiais de ureia dos cães.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais desta dissertação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual de Paulista- FCAV/Unesp, *Câmpus* de Jaboticabal (Anexo 1).

Foram realizados dois experimentos, denominados experimento A e experimento B. Em cada um foram avaliadas diferentes enzimas, adicionadas em ração com 30% de farelo de soja. Ração sem farelo de soja foi empregada como controle negativo e ração com farelo de soja, mas sem adição de enzimas como controle positivo em cada experimento.

Os experimentos foram conduzidos na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, *Câmpus* de Jaboticabal, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”.

4.1 Animais e delineamento experimental

O experimento A incluiu cinco rações e 30 cães da raça Beagle (machos e fêmeas), com peso corporal $10,6 \pm 0,5$ kg e idade de $7,3 \pm 0,9$ anos. Foi empregado delineamento em blocos, com dois blocos de 15 cães e três repetições de cada tratamento por bloco, totalizando seis cães por tratamento (ração). O experimento B incluiu quatro rações e 24 cães da raça Beagle (machos e fêmeas), com peso corporal $11,8 \pm 0,52$ kg e idade de $8,2 \pm 0,8$ anos. Foi empregado delineamento em blocos, com dois blocos de 12 cães e três repetições de cada tratamento por bloco, totalizando seis cães por tratamento (ração). A saúde dos cães foi verificada previamente a cada experimento, por exame físico e laboratorial.

4.2 Dietas

Quatro amostras de farelo de soja foram adquiridas e analisadas. Estas apresentaram $1,14 \pm 0,13\%$ de estaquiose e $1,07 \pm 0,28\%$ de rafinose. Foi selecionada para cada experimento a amostra que apresentou maiores concentrações destes oligossacarídeos (Tabela 1). Duas dietas isonutritivas foram formuladas, respeitando-se as recomendações nutricionais da AFFCO (2004) para cães adultos. Uma teve como fonte protéica principal a farinha de vísceras de frango (28,9%) e a outra o farelo de soja (29,9%). A dieta com farelo de soja foi desdobrada em diferentes tratamentos, representados cada um por diferentes adições de enzimas. Na ração com farinha de vísceras de frango, casca de soja foi incluída de forma a tornar isonutritivas as duas formulações. A fórmula das dietas experimentais encontra-se na Tabela 2 e sua composição química na Tabela 3.

No experimento A, foram empregadas: ração controle negativo, com farinha de vísceras de frango (FVFA); ração controle positivo, com farelo de soja sem enzimas (FSA-0); ração com farelo de soja, 7.500U/kg de protease e 45U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão (FSA-1); ração com farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão (FSA-2); ração com farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas na mistura antes da extrusão (FSA-2-ext).

No experimento B foram empregadas: ração controle negativo, com farinha de vísceras de frango (FVFB); ração controle positivo, com farelo de soja sem enzimas (FSB-0); ração com farelo de soja, 140U/kg de protease, 8U/kg de celulase, 800U/kg de pectinase, 60U/kg de fitase, 40U/kg de betaglucanase e 20U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão (FSB-1); ração com farelo de soja, 700U/kg de protease, 40U/kg de celulase, 4000U/kg de pectinase, 300U/kg de fitase, 200U/kg de betaglucanase e 100U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão (FSB-2).

Tabela 1 - Composição química das amostras de farelo de soja empregadas nos experimentos A e B¹. Valores expressos sobre a matéria natural.

Item	Farelo de soja experimento A	Farelo de soja experimento B
Matéria seca (%)	89,2	89,2
Proteína bruta (%)	45,9	46,2
Extrato etéreo ácido (%)	3,0	3,4
Matéria mineral (%)	6,8	6,3
Amido (%)	3,4	3,4
Fibra dietética total (%)	26,4	26,1
Fibra insolúvel (%)	25,1	24,9
Fibra solúvel (%)	1,2	1,1
Estaquiose (%)	1,1	1,6
Rafinose (%)	1,2	1,2
Sacarose	0,5	0,6
Atividade Ureática (pH)	0,023	0,03

¹ - analisadas em duplicada (CV<5%)

Tabela 2 - Fórmulas das dietas utilizadas nos experimentos A e B

Ingrediente	Dieta com farinha de vísceras de frango	Dieta com farelo de soja
Farelo de Soja	0,0	29,9
Farinha de Vísceras de Frango	28,9	10,0
Quirera de Arroz	26,9	16,4
Gordura de Aves	5,4	7,8
Milho Grão	30,0	30,0
Fosfato Bicálcico	0,7	1,5
Mistura mineral e vitamínica ¹	1,0	1,0
Casca de Soja	3,7	0,0
Palatabilizante	2,0	2,0
Cloreto de Sódio	0,5	0,5
Cloreto de Colina 60%	0,2	0,2
Antifúngico ²	0,1	0,1
DL-Metionina	0,0	0,1
Lisina HCL	0,0	0,2
Antioxidante ³	0,05	0,05
Calcário	0,0	0,3
Cloreto de Potássio	0,6	0,0

¹ - Adição por quilograma de produto: Ferro 100 mg, Cobre 10 mg, Manganês 10 mg, Zinco 150 mg, Iodo 2 mg, Selênio 0,3 mg, Vitamina A 18000 UI, Vit. D 1200 UI, Vit. E 200 UI, Tiamina 6 mg, Riboflavina 10 mg, Ácido pantotênico 40 mg, Niacina 60 mg, Piroxidina 6 mg, Ácido fólico 0,30 mg e Vit. B12 0,1 mg.

²- Moldzap. Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda, Curitiba-PR, Brasil. (propionato de amônio, propanodiol, ácido propiônico, ácido acético, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido sórbico, ácido fórmico, sorbato de potássio, veículo q.s.p.).

³- Banox. Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda, Curitiba-PR, Brasil. (BHA, BHT, galato de propila e carbonato de cálcio).

Tabela 3 - Composição química analisada e parâmetros qualitativos das dietas empregadas nos experimentos A e B¹.

Item	Diets experimento A ²					Diets experimento B ³				
	FVFA	FSA-0	FSA-1	FSA-2	FSA-2ext	FVFB	FSB-0	FSB-1	FSB-2	
Matéria seca (%)	92,61	93,4	92,0	92,0	90,4	92,6	93,4	92,0	92,1	
Valores sobre a matéria seca										
Matéria mineral (%)	6,2	5,8	6,06	6,3	6,2	9,0	7,3	7,8	7,7	
Matéria orgânica (%)	93,7	94,2	93,9	93,7	93,8	91,0	92,7	92,2	92,3	
Proteína bruta (%)	27,2	28,1	28,2	29,2	29,6	26,5	27,1	27,3	27,2	
Extrato etéreo ácido (%)	12,0	12,1	13,0	13,3	12,8	9,4	8,5	9,1	9,0	
Amido (%)	40,9	38,5	37,3	35,8	35,6	45,5	39,3	37,9	38,9	
Fibra Dietética Total (%)	14,9	15,9	16,4	15,1	16,5	15,9	15,8	14,9	14,5	
Fibra Solúvel (%)	0,3	0,6	0,7	1,0	0,7	0,4	0,6	0,5	0,6	
Fibra Insolúvel (%)	14,6	15,3	15,4	14,2	15,9	15,6	15,2	14,4	15,0	
Energia Bruta (kcal/kg)	4895	4835	4915	4905	4932	4683	4596	4656	4678	
<i>Parâmetros de processo</i>										
Densidade (g/L)	424	433,9	493,2	465,9	490,5	392		378 ⁴		
Índice de gelatinização do amido (%)	94,3	93,4	87,3	90,3	88,9	91,6		87,8 ⁴		
Atividade Ureática (pH)	0,05	0,08	0,08	0,06	0,05	0,02		0,03 ⁴		

¹ - analisadas em duplicada (CV<5%)

² - FVFA - ração controle negativo, com amostra A de farinha de vísceras de frango; FSA-0 - ração controle positivo, com amostra A de farelo de soja sem enzimas; FSA-1 - ração com amostra A de farelo de soja, 7.500U/kg de protease e 45U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSA-2 - ração com amostra A de farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSA-2-ext - ração com amostra A de farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas na mistura antes da extrusão.

³ - FVFB - ração controle negativo, com amostra B de farinha de vísceras de frango; FSB-0 - ração controle positivo, com amostra B de farelo de soja sem enzimas; FSB-1 - ração com amostra B de farelo de soja, 140U/kg de protease, 8U/kg de celulase, 800U/kg de pectinase, 60U/kg de fitase, 40U/kg de betaglucanase e 20U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSB-2 - ração com amostra B de farelo de soja, 700U/kg de protease, 40U/kg de celulase, 4000U/kg de pectinase, 300U/kg de fitase, 200U/kg de betaglucanase e 100U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão.

⁴ - Resultado referente a um único lote de produção, desdobrado nos tratamentos com adição de enzimas.

Para fabricação das rações os ingredientes foram moídos em moinho com peneira de 0,8 mm no experimento A e de 1mm no experimento B e as rações extrusadas em extrusora Tipo MAB 400S, na Fábrica de Rações do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *Câmpus* de Jaboticabal. O processo de produção foi controlado com ajustes na densidade dos *kibbles* (g/L) a cada 20 minutos. O pré-condicionador foi mantido à temperatura de 90°C. Água, vapor, velocidade da rosca e o fluxo de ração foram ajustados de acordo com a dieta. A temperatura no interior do canhão da extrusora foi mantida entre 120°C e 135°C. Todos os ingredientes empregados na produção das dietas experimentais foram obtidos a partir de um único lote, de modo a não permitir variabilidade nas rações.

4.3 Protocolo Experimental

O ensaio de digestibilidade foi realizado pelo método de coleta total de urina e fezes, segundo protocolo e procedimentos de calculo preconizados pela AAFCO (2004). Este incluiu período de adaptação de cinco dias, seguidos de cinco dias de coleta total de fezes e urina. Água foi fornecida *ad libitum*. Durante o período experimental, os cães foram alojados em gaiolas metabólicas individuais (90x80x90cm) com aparato especial para coleta de fezes e urina separadamente. As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia, em quantidade suficiente para atender a necessidade energética dos animais (NRC, 2006).

Durante o período de coleta, as fezes foram recolhidas duas vezes ao dia, identificadas por animal e período, pesadas e congeladas (-15°C). Urina foi coletada duas vezes ao dia, em recipientes plásticos contendo 1mL de H₂SO₄ (1N). Assim que recolhida, determinava-se o volume de urina e esta era congelada para análises posteriores. O escore fecal foi avaliado segundo CARCIOFI et al. (2008) atribuindo notas: 0= fezes líquidas, 1= fezes pastosas sem forma; 2= fezes macias, mal formadas e que assumem o formato do recipiente de coleta; 3= fezes formadas, macias e úmidas, que marcam o piso; 4= fezes bem formadas, consistentes e que não aderem ao piso; 5= fezes bem formadas, duras e secas. Logos após o ensaio de digestibilidade, nos

dias 11, 12 e 13 foram coletadas amostras de fezes frescas, após no máximo 15 minutos de eliminação. Nestas determinaram-se o pH, amônia, ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta. O pH fecal foi avaliado usando-se 2,0g de fezes frescas, diluídas (1:10 w/w) em água mili-Q e o pH medido com pH-metro de precisão 0,01 pH (Digicrom Analítica Ltda, modelo DM20). Para a análise dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e amônia utilizou-se 10g de fezes frescas foram homogeneizadas e misturadas com 30mL de ácido fórmico a 4,2 N (proporção volumétrica de 1:3). Para a determinação de ácido láctico foram empregados cerca de três gramas de fezes colhidas como descrito para AGCC, estas foram rapidamente homogeneizadas e misturadas à 9 mL de água destilada. Esta mistura foi mantida sob refrigeração por um dia. Posteriormente as misturas foram centrifugadas a 4.500 G durante 15 minutos a 15°C por três vezes, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento. Após a extração, as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C).

A avaliação da resposta pós-prandial da ureia foi conduzida segundo Carciofi et al. (2009), ao final do ensaio de digestibilidade. Os animais foram alimentados para atender às necessidades nutricionais de manutenção ($130\text{kcal/kg}^{0,75}$; NRC 2006), e condicionados a ingerir todo o alimento durante 15 minutos durante todo o período experimental. No dia 11, os animais foram privados de alimento durante o período de 24h antes do teste de ureia. Neste mesmo dia, cada cão foi assepticamente cateterizado com cateter periférico intravenoso introduzido na veia cefálica (Angiocath 20 GA x 1,16 cm, Becton, Dickinson, EUA). No dia 12, amostras de sangue foram coletadas pré-alimentação (amostra de referência, tempo 0) e 1, 2, 3, 4, 4h30min, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 h após a alimentação (os tempos foram contados a partir do final do refeição). A coleta de sangue foi realizada sempre iniciando às 8:00h. Cada amostra de sangue foi coletada com uma seringa, transferida para um tubo de vidro e centrifugada durante 15 minutos para obtenção do soro e armazenada a -15°C. Todas as alíquotas foram analisadas num período de até 24h pós-coleta usando um analisador semi-automático (LabQuest modelo BIO-2000, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, Brasil). As concentrações de ureia foram determinadas pelo ensaio cinético ultravioleta (UV Liquiform ureia, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, Brasil). O incremento de ureia

pós-prandial foi calculado, para cada animal, subtraindo-se a concentração de ureia no tempo 0 (jejum) das concentrações obtidas nos outros tempos de colheita.

No experimento B foi verificada, adicionalmente, a influência da adição de farelo de soja e enzimas dietéticas na microbiota das fezes dos cães. Foram empregadas nesta avaliação apenas as rações FVFB, FSB-0 e FSB-2. Amostras de fezes foram colhidas de forma asséptica imediatamente após a eliminação e levadas para análise no Laboratório de Microbiologia Aplicada à Zootecnia em no máximo 30 minutos após sua coleta. Foram pesadas 25 gramas de cada amostra fecal, homogeneizada, diluídas em série com água salina estéril até 10^{-6} e semeadas para contagem dos microrganismos utilizando-se de meios e condições apropriadas para cada tipo de bactéria, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Métodos empregados para cultura das bactérias em estudo.

Bactéria	Meio de cultura	Fabricante	Condições de incubação*
Aeróbios totais	Plate Count Agar (PCA)	Acumedia ¹	A, 37°C, 24h
Anaeróbios totais	Plate Count Agar (PCA)	Acumedia ¹	AN, 37°C, 24h
<i>Escherichia coli</i>	Agar MacConkey	Acumedia ¹	A, 37°C, 24h
<i>Clostridium</i>	Reinforced Clostridium Agar (RCA)	Oxoid ²	AN, 37°C, 48h
<i>Lactobacillus</i>	Man Rogosa Sharpe (MRS)	Acumedia ¹	AN, 37°C, 72h

* Necessidade de oxigênio, temperatura e tempo de incubação. Legenda: A = aerobiose, AN = anaerobiose

¹ Acumedia Manufacturers Inc., Miami, EUA

² Oxoid Ltd, Cambridge, Reino Unido

A contagem de bactérias, em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/g de fezes na matéria seca) foi realizada pela técnica de contagem padrão em placas. As diluições foram semeadas em duplicatas em placas de petri descartáveis pela técnica de *pour plate* e incubadas conforme a sua necessidade de oxigênio. As bactérias aeróbias (*Escherichia coli* e aeróbios totais), após semeadura foram incubadas a 37°C, em aerobiose, por 24 a 48 horas. As bactérias anaeróbias (*Lactobacillus* e anaeróbios totais) foram incubadas em jarras de anaerobiose com o sistema gás-pack a 37°C por 24 a 72 horas. Para o gênero *Clostridium*, as amostras nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} foram submetidas a choque térmico prévio à semeadura, para ativar a germinação dos esporos e destruir contaminantes não esporulados, que consistiu em mantê-las em banho-maria a 80°C por 10 minutos, seguido por resfriamento em água com gelo por mais 10 minutos. Após este procedimento as amostras foram semeadas em placas e incubadas como descrito anteriormente. Após incubação procedeu-se a contagem das placas e cinco colônias típicas foram submetidas a esfregaços corados pelo método de Gram para confirmação das características morfológicas de cada gênero, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Características morfo-tinturiais dos gêneros de bactérias em estudo visualizados em esfregaços corados pelo método de Gram.

Gênero	Morfologia e coloração de Gram
<i>Escherichia coli</i>	Bastonetes retos pequenos, Gram negativos
<i>Clostridium</i>	Bastonetes curtos com extremidades arredondadas, Gram positivos, formadores de esporo
<i>Lactobacillus</i>	Bastonetes finos e longos, Gram positivos

Fonte: HOLT et al. (1994).

4.4 Análises laboratoriais

Nas amostras de farelo de soja e dietas extrusadas foram avaliadas as concentrações de rafinose e estaquiase. Estas foram analisadas segundo (Guimarães et al., 2001) por HPLC (Shimadzu, modelo RID-10a, Shimadzu Corp., Japão) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da FCAV/Unesp. Ao final do período de coleta, fezes e urina foram descongeladas e homogeneizadas compondo-se uma amostra única por animal e bloco. Posteriormente, cada amostra de fezes (total produzido) e de urina (cerca de 100mL) foi colocada em estufa de ventilação forçada (320-SE, FANEM, São Paulo) à 55°C, por 72 horas, a fim de promover sua pré-secagem. Fezes, rações e ingredientes foram moídas em moinho tipo faca (MOD 340, ART LAB, São Paulo) com peneira de 1,0mm, para proceder-se às análises laboratoriais.

Nas fezes e rações foram determinados os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), matéria mineral (MM) e fósforo (apenas no experimento B) segundo a AOAC (1995). Fibra dietética total (FDT), fibra solúvel e fibra insolúvel foram determinadas segundo PROSKY et al. (1992). Os teores de amido também foram analisados nas rações e fezes (ICC, 1995; HOLM et al., 1986; KARKALAS, 1985). A EB das rações, fezes e urina foi determinada em bomba calorimétrica adiabática (1281, PARR Instruments, EUA). Nas amostras de urina foram determinados, adicionalmente, os teores de nitrogênio, a fim de se calcular o balanço nitrogenado. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – *Câmpus* de Jaboticabal.

O índice de gelatinização do amido das rações e a atividade ureática dos farelos de soja e das rações foram determinados no Labtec Análises (Mogiana Alimentos LTDA Campinas/SP). Todas as análises foram realizadas em duplicata e repetidas quando variavam mais de 5%. O aminograma das rações foi determinado segundo Hagen et al. (1989), por HPLC (Shimadzu, modelo 20-A, Shimadzu Corp., Japão) no Labtec Análises (Mogiana Alimentos LTDA Campinas/SP).

O balanço nitrogenado (BN) foi calculado pela diferença entre o nitrogênio total ingerido (Ningerido) e o excretado nas fezes (Nfecal) e na urina (Nurinário), pela seguinte fórmula:

$$\text{BN (mg/kgPC/dia)} = \text{Ningerido (mg/kgPC/dia)} - (\text{Nfecal (mg/kgPC/dia)} + \text{Nurinário (mg/kgPC/dia)})$$

A concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi determinada por cromatografia gasosa (Finnigan 9001) de acordo com ERWIN et al. (1961), sendo a coluna de vidro de 2 metros de comprimento, diâmetro de 1/8", empacotada com 80/120 Carbowax 20M. O cromatógrafo foi calibrado por meio da injeção de 1µL de solução padrão misto e a curva pré-estabelecida no software BORWIN versão 1.21.60. Foi utilizado nitrogênio como gás de arraste (vazão de 25 mL/min.), oxigênio como gás comburente (vazão de 175mL/min.) e hidrogênio como gás combustível (vazão de 15mL/min.), com temperaturas de operação de 220°C no injetor, 210°C na coluna e 250°C no detector de ionização de chama. Para a determinação de ácido láctico, utilizou-se o método espectrofotométrico com leitura a 565nm (500 a 570nm), de acordo com PRYCE (1969). Foi utilizado branco reagente para calibrar o espectrofotômetro (QUICK - Lab marca DRAKE). As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0,08%. AGCC e ácido láctico foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – Pirassununga. A concentração de amônia das fezes foi analisada segundo VIEIRA (1980) com modificações, utilizando os extratos preparados para dosagem de AGCC. Os extratos foram descongelados à temperatura ambiente e em seguida tomou-se alíquotas de 2mL que foram diluídas em 13mL de água destilada (2:13 v/v) e submetidas à destilação em um destilador de nitrogênio (Tecnal TE - 036/1, Piracicaba, Brasil). A destilação foi realizada com 5mL de solução 0,2N de hidróxido de potássio e o nitrogênio recebido em um erlenmeyer que continha 10 mL de solução receptora (ácido bórico a 0,97N). Ao atingir-se 50mL de solução receptora mais material destilado interrompeu-se a destilação. Em seguida foi realizada a titulação com ácido clorídrico 0,005N.

4.5 Análise estatística

Os dois experimentos seguiram delineamento em blocos casualizados. Os dados obtidos foram avaliados pela função GLM do SAS (Version 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2001) procedendo-se previamente a análise de normalidade dos erros. O modelo empregado considerou os efeitos de bloco, tratamento e animal. Para interpretação da resposta pós-prandial de ureia, foram calculadas para cada animal as áreas abaixo da curva (AAC) dos valores absolutos e do incremento de ureia sérica. O incremento de ureia foi calculado subtraindo-se do valor observado em cada tempo o valor obtido no tempo zero (jejum). As AAC foram computadas por integrações numéricas pelo método trapezoidal, utilizando o programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad, La Jolla, USA). Para o consumo de nutrientes, quando diferenças estatísticas foram obtidas na análise de variância ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para os coeficientes de digestibilidade, características das fezes e respostas pós-prandiais de ureia, quando diferenças estatísticas foram obtidas na análise de variância ($p < 0,05$), foram realizados contrastes ortogonais ($p < 0,05$) predeterminados, sendo em cada experimento um entre os tratamentos com farelo de soja *versus* sem farelo de soja e outro entre a ração com farelo de soja sem enzimas *versus* as rações com farelo de soja e enzimas. Como cada experimento incluiu três doses de enzimas, contrastes polinomiais também foram realizados ($p < 0,05$) para avaliar o efeito de teor de adição. Quanto necessário, utilizou-se a transformação logarítmica das variáveis ($\log x + 1$). No experimento A foi verificado, adicionalmente, o efeito da extrusão na ação das enzimas comparando-se pelo teste F as rações FSA-2 *versus* FSA-2ext ($p < 0,05$). No experimento B as contagens de bactérias nas fezes foram submetidas a análise de variância e quando diferenças estatísticas foram obtidas ($p < 0,05$) as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Digestibilidade e Parâmetros Fecais

As dietas foram adequadamente consumidas pelos cães sem episódios de rejeição alimentar, vômitos ou diarreia. Informações referentes à ingestão de nutrientes e efeitos da inclusão das enzimas sobre os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e energia metabolizável das dietas estão apresentadas na Tabela 6, para o experimento A e Tabela 7 para o experimento B. Houve diferenças no consumo de alguns nutrientes entre as dietas, mas estas foram pequenas e provavelmente não interferiram nos resultados de digestibilidade aparente. Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e a energia metabolizável das rações não diferiram entre as dietas em nenhum dos experimentos ($p>0,05$).

Tabela 6 - Consumo (g) e coeficientes de digestibilidade aparente (%) das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento A.

Item	Dietas ¹					EPM ²	CV (%)	P
	FVFA	FSA-0	FSA-1	FSA-2	FSA-2ext			
Peso corporal (kg)	10,8	10,1	11,5	10,0	10,7	0,21	10,8	0,23
Ingestão (gramas por kg por dia)								
Matéria seca	13,5	14,3	13,2	13,6	13,1	0,15	5,88	0,11
Matéria orgânica	12,6	13,5	12,4	12,8	12,3	0,14	5,89	0,09
Proteína bruta	3,7	4,0	3,9	3,9	3,9	0,04	5,81	0,27
Extrato etéreo ácido	1,6 ^a	1,7 ^{ab}	1,7 ^{ab}	1,8 ^a	1,7 ^{ab}	0,02	5,62	0,03
Amido	5,8 ^a	5,3 ^{ab}	4,9 ^b	5,0 ^b	4,8 ^b	0,05	5,75	<0,001
Fibra dietética total	2,2	2,3	2,2	2,1	2,2	0,02	5,80	0,07
Coeficientes de digestibilidade aparente (%)								
Matéria seca	85,6	84,5	83,6	83,7	82,8	0,31	2,00	0,09
Matéria orgânica	87,6	86,9	85,8	86,4	85,5	0,27	1,74	0,13
Proteína bruta	85,9	87,0	86,4	85,8	85,7	0,29	1,91	0,61
Extrato etéreo ácido	91,7	91,3	91,8	91,9	91,8	0,22	1,33	0,91
Amido	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	0,01	0,04	0,22
Fibra dietética total	63,0	59,5	57,2	60,8	59,8	0,91	8,32	0,40
Energia bruta	88,1	87,7	86,9	87,1	86,6	0,27	1,68	0,41
Energia metabolizável (kcal/kg MS)	4153	4055	4097	4088	4111	19,7	2,64	0,63

¹ - FVFA - ração controle negativo, com amostra A de farinha de vísceras de frango; FSA-0 - ração controle positivo, com amostra A de farelo de soja sem enzimas; FSA-1 - ração com amostra A de farelo de soja, 7.500U/kg de protease e 45U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSA-2 - ração com amostra A de farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSA-2-ext - ração com amostra A de farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas na mistura antes da extrusão.

² - erro padrão da média, n=6 cães por ração.

³ - comparação entre ração FVFA versus rações com farelo de soja (FSA-0, FSA-1, FSA-2, FSA-2ext)

⁴ - comparação entre FSA-0 (soja sem enzimas) versus FSA-1, FSA-2, FSA-2ext (soja com enzimas)

Tabela 7 – Consumo (g) e coeficientes de digestibilidade aparente (%) das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento B.

Item	Dietas ¹				EPM ²	CV (%)	P
	FVFB	FSB-0	FSB-1	FSB-2			
Peso corporal (kg)	11,6	11,6	12,5	11,2	0,25	11,47	0,46
Ingestão (gramas por kg por dia)							
Matéria seca	13,2	13,3	12,9	13,3	0,08	2,84	0,30
Matéria orgânica	12,0	12,3	11,9	12,2	0,07	2,85	0,18
Proteína bruta	3,5 ^b	3,8 ^a	3,9 ^a	3,5 ^b	0,02	2,89	<0,001
Extrato etéreo ácido	1,3	1,2	1,3	1,3	0,01	2,79	0,06
Amido	5,5 ^a	4,8 ^b	4,8 ^b	4,8 ^b	0,03	2,78	<0,001
Fibra dietética total	2,1 ^a	2,1 ^a	1,9 ^b	1,9 ^b	0,01	2,79	<0,001
Fósforo	1,5 ^a	1,3 ^b	1,3 ^b	1,3 ^b	0,18	2,85	<0,001
Coeficientes de digestibilidade aparente (%)							
Matéria seca	79,1	79,8	80,9	80,0	0,51	3,14	0,65
Matéria orgânica	84,8	83,9	84,5	84,1	0,43	2,49	0,89
Proteína bruta	79,8	80,5	81,4	81,6	0,55	3,34	0,66
Extrato etéreo ácido	92,8	91,6	93,6	93,2	0,22	2,23	0,38
Amido	99,8	99,9	99,8	99,8	0,01	0,04	0,73
Fibra dietética total	55,2	49,6	49,9	47,3	10,50	10,72	0,11
Energia bruta	84,0	83,4	84,1	83,6	0,47	2,77	0,95
Fósforo	28,0	22,5	27,3	27,4	0,91	16,92	0,15
Energia metabolizável (kcal/kg MS)	3911	3815	3891	3895	21,49	2,71	0,41

¹ - FVFB - ração controle negativo, com amostra B farinha de vísceras de frango; FSB-0 - ração controle positivo, com amostra B de farelo de soja sem enzimas; FSB-1 - ração com amostra B de farelo de soja, 140U/kg de protease, 8U/kg de celulase, 800U/kg de pectinase, 60U/kg de fitase, 40U/kg de betaglucanase e 20U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSB-2 - ração com amostra B de farelo de soja, 700U/kg de protease, 40U/kg de celulase, 4000U/kg de pectinase, 300U/kg de fitase, 200U/kg de betaglucanase e 100U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão.

² - erro padrão da média, n=6 cães por ração.

³ - comparação entre ração FVFB versus rações com farelo de soja (FSB-0, FSB-1, FSB-2)

⁴ - comparação entre FSB-0 (soja sem enzimas) versus FSB-1, FSB-2 (soja com enzimas)

A produção e características das fezes encontram-se na Tabela 8 (experimento A) e na Tabela 9 (experimento B). Tanto no experimento A como no experimento B, a inclusão de farelo de soja nas rações levou ao aumento do teor de água das fezes e da produção de fezes pelos cães ($p < 0,05$), sem efeito das enzimas sobre estes parâmetros ($p > 0,05$). O escore fecal, no entanto, não variou entre as dietas ($p > 0,05$). Aumento na concentração de AGCC totais, proprionato, acetato e lactato nas fezes dos cães foi verificado com a inclusão de farelo de soja, sendo estes significativos para os experimentos A e B ($p < 0,05$). Este aumento na atividade fermentativa microbiana de carboidratos resultou em redução do pH das fezes no experimento B ($p < 0,05$) e tendência de redução no experimento A ($p = 0,07$). A inclusão de farelo de soja ainda ocasionou redução da concentração de amônia nas fezes, com menores valores que os verificados nas fezes dos cães alimentados com farinha de vísceras de frango ($p < 0,05$). Para nenhum dos parâmetros avaliados se verificou efeito da adição de enzimas ($p > 0,05$).

Tabela 8 - Produção, características, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácido láctico e amônia fecal de cães mediante consumo o das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento A.

Item	Dietas ¹					EPM ²	CV (%)	P	Contrastes			
	FVFA	FSA-0	FSA-1	FSA-2	FSA-2ext				FVF x soja ³	soja x enz ⁴	linear	quad.
g fezes MN cão/dia	56,5	76,6	78,8	77,5	80,8	2,06	15,41	<0,01	0,05	0,19	0,54	0,58
MS fecal (%)	37,0	30,7	32,1	28,5	30,1	0,43	7,50	<0,01	0,04	0,83	0,14	0,06
g fezes MS cão/dia	20,8	22,0	25,2	22,0	24,2	0,53	12,75	0,09	-	-	-	-
Escore fecal	4,1	3,8	3,9	3,6	3,8	0,05	7,70	0,18	-	-	-	-
pH fecal	6,45	6,24	6,33	6,08	6,07	0,04	3,81	0,07	-	-	-	-
Amônia (mg/g MS Fecal)	2,1	1,3	1,2	1,5	1,1	0,06	24,81	<0,01	0,04	0,59	0,59	0,20
	mMol/kg MS Fecal											
Ácido acético	180	272	246	246	237	8,49	19,64	0,03	0,04	0,26	0,42	0,65
Ácido propiônico	116	244	208	196	208	9,54	26,81	<0,01	0,02	0,18	0,23	0,71
Ácido butírico	29,6	22,7	33,7	27,4	19,2	1,85	38,40	0,15	-	-	-	-
AGCC totais	326	539	488	470	464	16,24	19,42	<0,01	0,02	0,11	0,29	0,76
Ácido láctico	6,1	16,7	17,0	18,8	14,9	1,16	43,2	0,01	0,05	0,22	0,83	0,87

¹ - FVFA - ração controle negativo, com amostra A de farinha de vísceras de frango; FSA-0 - ração controle positivo, com amostra A de farelo de soja sem enzimas; FSA-1 - ração com amostra A de farelo de soja, 7.500U/kg de protease e 45U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSA-2 - ração com amostra A de farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSA-2-ext - ração com amostra A de farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas na mistura antes da extrusão.

² - erro padrão da média, n=6 cães por ração.

³ - comparação entre ração FVFA versus rações com farelo de soja (FSA-0, FSA-1, FSA-2, FSA-2ext)

⁴ - comparação entre FSA-0 (soja sem enzimas) versus FSA-1, FSA-2, FSA-2ext (soja com enzimas)

Tabela 9 - Produção, características, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácido láctico e amônia fecal de cães mediante consumo das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento B.

Item	Dietas ¹				EPM ²	CV (%)	P	Contrastes			
	FVFB	FSB-0	FSB-1	FSB-2				FVF x soja ³	soja x enz ⁴	linear	quadr.
	mMol/kg MS Fecal										
g fezes MN cão/dia	77,1	103,1	107,8	96,2	4,33	21,27	0,08	-	-	-	-
MS fecal (%)	41,7	30,6	29,2	31,6	0,54	7,91	<0,01	0,01	0,54	0,44	0,11
g fezes MS cão/dia	31,9	31,3	31,1	28,3	1,04	15,97	0,61	-	-	-	-
Escore fecal	4,1	3,8	3,6	3,7	0,07	8,43	0,21	-	-	-	-
pH fecal	6,40	5,88	5,87	5,96	0,02	1,98	<0,01	<0,01	0,67	0,30	0,45
Amônia (mg/g MS fecal)	2,2	1,2	1,2	1,3	0,07	21,40	<0,01	<0,01	0,45	0,29	0,95
Ácido acético ⁵	259	344	356	370	0,02	2,26	<0,001	0,05	0,04	0,31	0,97
Ácido propiónico ⁵	189	245	313	306	0,03	3,21	<0,001	0,05	<0,001	0,12	0,11
Ácido butírico	40,1	56,8	41,9	43,1	3,11	37,37	0,33	-	-	-	-
AGCC totais ⁵	488	646	711	720	0,02	2,09	<0,001	0,05	0,01	0,15	0,51
Ácido láctico ⁵	7,1	20,1	29,2	16,8	0,08	15,71	<0,001	0,05	<0,001	0,32	0,03

¹ - FVFB - ração controle negativo, com amostra B farinha de vísceras de frango; FSB-0 - ração controle positivo, com amostra B de farelo de soja sem enzimas; FSB-1 - ração com amostra B de farelo de soja, 140U/kg de protease, 8U/kg de celulase, 800U/kg de pectinase, 60U/kg de fitase, 40U/kg de betaglucanase e 20U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSB-2 - ração com amostra B de farelo de soja, 700U/kg de protease, 40U/kg de celulase, 4000U/kg de pectinase, 300U/kg de fitase, 200U/kg de betaglucanase e 100U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão.

² - erro padrão da média, n=6 cães por ração.

³ - comparação entre ração FVFB versus rações com farelo de soja (FSB-0, FSB-1, FSB-2)

⁴ - comparação entre FSB-0 (soja sem enzimas) versus FSB-1, FSB-2 (soja com enzimas)

⁵ - resultados estatísticos obtidos mediante transformação logarítmica das variáveis - log (x + 1).

5.2 Composição microbiana das fezes

As contagens de bactérias das fezes dos cães encontram-se na Tabela 10. O consumo de ração com farelo de soja sem adição de enzimas resultou em redução das concentrações de aeróbios totais, anaeróbios totais das fezes dos cães ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Contagem de bactérias nas fezes de cães mediante consumo das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento B

Item	Dietas ¹			EPM ²	CV (%)	P
	FVFB	FSB-0	FSB-2			
(Log UFC/g fezes na matéria seca)						
Aeróbios totais	7,05 ^a	5,96 ^b	6,84 ^{ab}	0,18	13,39	0,03
Anaeróbios totais	7,02 ^a	5,84 ^b	7,01 ^{ab}	0,17	12,58	0,02
<i>Escherichia coli</i>	5,45	4,80	5,35	0,22	20,61	0,53
<i>Clostridium spp</i>	3,73	3,65	3,47	0,11	14,65	0,68
<i>Lactobacillus spp</i>	5,69	6,31	6,41	0,20	15,85	0,40

¹ - FVFB - ração controle negativo, com amostra B farinha de vísceras de frango; FSB-0 - ração controle positivo, com amostra B de farelo de soja sem enzimas; FSB-2 - ração com amostra B de farelo de soja, 700U/kg de protease, 40U/kg de celulase, 4000U/kg de pectinase, 300U/kg de fitase, 200U/kg de betaglucanase e 100U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão.

² - erro padrão da média, n=6 cães por ração.

^{a, b} – médias sem uma letra em comum são diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

5.3 Resposta pós-prandial de ureia, balanço de nitrogênio e aminograma

As tabelas 11 e 12 apresentam o incremento de ureia sérica pós-prandial e o balanço de nitrogênio dos cães, respectivamente nos experimentos A e B. Estes resultados estão ilustrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Nos dois experimentos nota-se aumento pós-prandial da concentração de ureia, que atingiu pico aproximadamente seis horas após a refeição. Tanto no experimento A como no B verificou-se maior pico de ureia nos cães alimentados com ração contendo farelo de soja ($p < 0,05$). No experimento A, verificou-se que o farelo de soja resultou em maior incremento de ureia às 4h30min e de 6 a 8 horas pós-prandiais, já no experimento B o farelo de soja resultou em maior incremento de ureia às 7 horas pós-prandiais. Em ambos os experimentos, os cães que receberam ração com farelo de soja apresentaram maior AAC de ureia que a ($P < 0,05$) que as dietas contendo farinha de vísceras de frango. O balanço de nitrogênio dos animais do experimento A diferiu entre as dietas ($p < 0,05$), verificando-se menores valores para os cães que consumiram a dieta FVFA.

Tabela 11 - Área abaixo da curva, incremento de ureia sérica pós-prandial e balanço de nitrogênio de cães mediante consumo das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento A.

Item	Dietas ¹										Contrastes			
	FVFA	FSA-0	FSA-1	FSA-2	FSA-2ext	EPM ²	CV (%)	P	FVF x soja ³	soja x enz ⁴	linear	quadr.		
Ingestão de proteína g/kg PC	3,7	4,0	3,9	3,9	3,9	0,04	5,68	0,20	-	-	-	-		
Incremento de ureia sérica (mg/dL)														
0 hora (jejum)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-		
1 hora	2,6	3,8	4,5	0,8	3,3	0,46	84,46	0,14	-	-	-	-		
2 horas	7,8	9,5	10,5	8,0	11,3	0,91	53,01	0,31	-	-	-	-		
3 horas	9,4	18,3	13,1	13,8	16,3	1,03	39,83	0,11	-	-	-	-		
4 horas	12,5	19,1	18,5	16,8	21,4	1,11	34,38	0,16	-	-	-	-		
4 horas e 30 min.	11,6	21,6	20,0	16,7	20,5	1,09	32,25	0,03	0,05	0,29	0,20	0,79		
5 horas	13,7	22,5	19,5	18,3	22,3	1,22	34,62	0,07	-	-	-	-		
6 horas ⁵	13,8	23,6	20,6	18,2	22,0	1,15	31,94	0,02	0,05	0,55	0,10	0,95		
7 horas ⁵	12,5	24,0	19,1	20,1	22,7	1,33	36,99	0,02	0,04	0,88	0,29	0,35		
8 horas ⁵	10,0	20,3	17,8	17,9	20,8	1,24	39,25	0,03	0,05	0,67	0,32	0,81		
9 horas	9,5	18,0	15,8	12,9	17,4	1,17	43,45	0,11	-	-	-	-		
10 horas	8,3	14,3	13,1	11,3	15,1	1,10	48,68	0,16	-	-	-	-		
Área abaixo da curva (AAC) do incremento de uréia sérica, mg/dL/hora														
AAC total	83,3	146,4	116,9	115,8	165,8	8,07	34,52	0,03	0,05	0,73	0,25	0,92		
Pico do incremento de ureia (mg/dL)	15,6	25,3	22,7	21,0	27,1	1,20	9,39	0,05	0,05	0,65	0,31	0,90		
Pico ureia	6h18min	6h	5h55min	6h35min	6h	0,22	19,84	0,86	-	-	-	-		
Balanço nitrogênio (mg/kgPC/dia)	83,4	90,2	92	91,5	89,0	0,76	4,69	0,01	0,05	0,54	0,58	0,59		

continua...

- ¹ - FVFA - ração controle negativo, com amostra A de farinha de vísceras de frango; FSA-0 - ração controle positivo, com amostra A de farelo de soja sem enzimas; FSA-1 - ração com amostra A de farelo de soja, 7.500U/kg de protease e 45U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSA-2 - ração com amostra A de farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSA-2-ext - ração com amostra A de farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas na mistura antes da extrusão.
- ² - erro padrão da média, n=6 cães por ração.
- ³ - comparação entre ração FVFA versus rações com farelo de soja (FSA-0, FSA-1, FSA-2, FSA-2ext)
- ⁴ - comparação entre FSA-0 (soja sem enzimas) versus FSA-1, FSA-2, FSA-2ext (soja com enzimas)
- ⁵ - resultados estatísticos obtidos mediante transformação logarítmica das variáveis - $\log(x + 1)$.

Tabela 12 - Área abaixo da curva, incremento de ureia sérica pós-prandial e balanço de nitrogênio de cães mediante consumo das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento B.

Item	Dietas ¹					Contrastes					
	FVFB	FSB-0	FSB-1	FSB-2	EPM ²	CV (%)	P	FVF x soja ³	soja x enz ⁴	linear	quadr
Ingestão de Proteína											
g/kg PC	3,5	3,6	3,5	3,6	0,02	2,81	0,23	-	-	-	-
Incremento de ureia sérica (mg/dL)											
0 hora (jejum)	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-
1 hora	3,1	2,7	3,5	2,6	0,42	69,22	0,90	-	-	-	-
2 horas	7,1	11,7	11,6	8,9	0,91	45,38	0,29	-	-	-	-
3 horas ⁵	10,9	19,6	15,4	14,9	1,36	43,72	0,07	-	-	-	-
4 horas ⁵	12,8	19,5	14,5	19,1	1,21	36,04	0,07	-	-	-	-
4 horas e 30 min.	13,6	20,2	15,2	19,3	1,27	36,51	0,12	-	-	-	-
5 horas ⁵	13,5	21,1	12,7	19,4	1,39	40,69	0,07	-	-	-	-
6 horas	14,0	20,9	15,9	18,2	1,14	32,42	0,13	-	-	-	-
7 horas ⁵	13,5	19,7	13,9	18,2	0,93	28,00	0,01	0,02	0,31	0,50	0,02
8 horas	12,6	17,8	12,4	14,6	1,02	34,89	0,15	-	-	-	-
9 horas	11,9	18,3	9,6	12,0	1,30	49,26	0,14	-	-	-	-
10 horas	11,0	10,8	8,3	10,4	1,04	50,24	0,74	-	-	-	-
Área abaixo da curva (AAC) do incremento de ureia sérica, mg/dL/hora											
AAC total	105,1	156,9	112,1	133,1	6,29	24,31	0,04	0,01	0,65	0,23	0,06
Pico do incremento de ureia (mg/dL)	15,3	24,9	19,8	21,4	1,14	27,35	0,03	0,02	0,58	0,32	0,29
Pico ureia	6h12min	6h	5h12min	4h55min	0,30	26,09	0,37	-	-	-	-
Balanço nitrogênio (mg/kgPC/dia)	78,1	81,3	82,2	81,2	0,59	3,61	0,11	-	-	-	-

continua...

- ¹ - FVFB - ração controle negativo, com amostra B farinha de vísceras de frango; FSB-0 - ração controle positivo, com amostra B de farelo de soja sem enzimas; FSB-1 - ração com amostra B de farelo de soja, 140U/kg de protease, 8U/kg de celulase, 800U/kg de pectinase, 60U/kg de fitase, 40U/kg de betaglucanase e 20U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSB-2 - ração com amostra B de farelo de soja, 700U/kg de protease, 40U/kg de celulase, 4000U/kg de pectinase, 300U/kg de fitase, 200U/kg de betaglucanase e 100U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão.
- ²- erro padrão da média, n=6 cães por ração.
- ³- comparação entre ração FVFB versus rações com farelo de soja (FSB-0, FSB-1, FSB-2)
- ⁴ – comparação entre FSB-0 (soja sem enzimas) versus FSB-1, FSB-2 (soja com enzimas)
- ⁵- resultados estatísticos obtidos mediante transformação logarítmica das variáveis - $\log(x + 1)$.

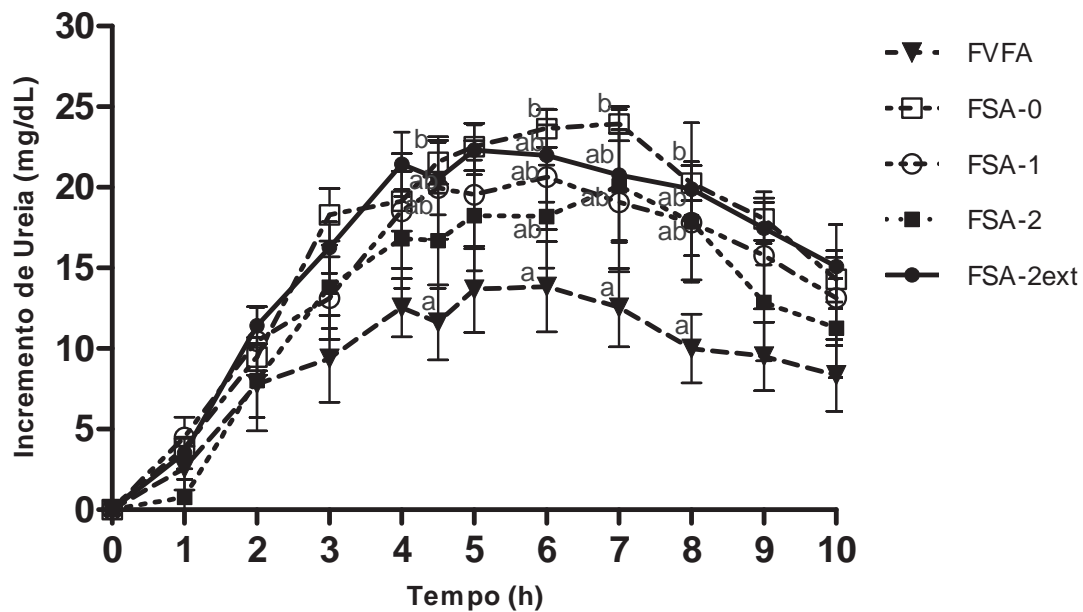


Figura 1 - Incremento de ureia sérica de cães (mg/dL) mediante consumo das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento A.

FVFA - ração controle negativo, com amostra A de farinha de vísceras de frango; FSA-0 - ração controle positivo, com amostra A de farelo de soja sem enzimas; FSA-1 - ração com amostra A de farelo de soja, 7.500U/kg de protease e 45U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSA-2 - ração com amostra A de farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSA-2-ext - ração com amostra A de farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas na mistura antes da extrusão.

a, b – em cada tempo médias sem uma letra em comum são diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

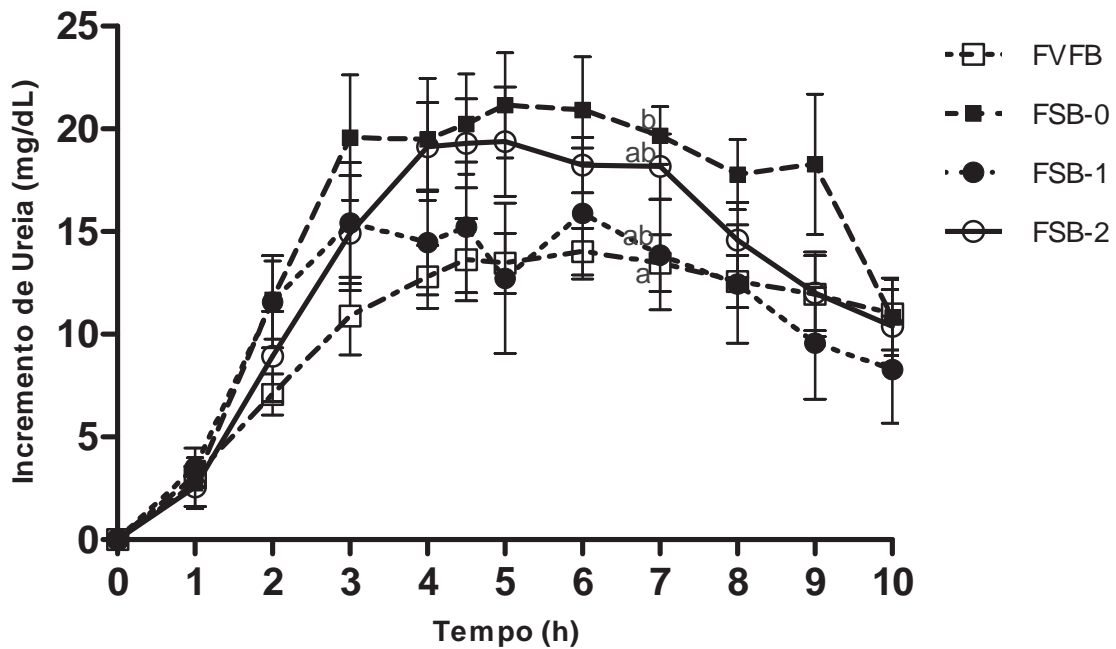


Figura 2 - Incremento de ureia sérica de cães (mg/dL) mediante consumo das dietas experimentais com diferentes inclusões de enzimas empregadas no experimento B.

FVFB - ração controle negativo, com amostra B farinha de vísceras de frango; FSB-0 - ração controle positivo, com amostra B de farelo de soja sem enzimas; FSB-1 - ração com amostra B de farelo de soja, 140U/kg de protease, 8U/kg de celulase, 800U/kg de pectinase, 60U/kg de fitase, 40U/kg de betaglucanase e 20U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSB-2 - ração com amostra B de farelo de soja, 700U/kg de protease, 40U/kg de celulase, 4000U/kg de pectinase, 300U/kg de fitase, 200U/kg de betaglucanase e 100U/kg de xilanase adicionadas por cobertura após a extrusão.

a, b – em cada tempo médias sem uma letra em comum são diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Na tabela 13, são apresentados as concentrações de aminoácidos das rações experimentais. Verifica-se que as formulações com farinha de vísceras de frango ou farelo de soja não diferiram em relação à composição de aminoácidos essenciais, tendo apresentado as rações com farelo de soja, via de regra, maior concentração de aminoácidos essenciais do que as rações com vísceras de frango.

Tabela 13 - Aminograma das rações empregadas nos experimentos A e B¹.
Valores sobre a matéria natural.

Aminoácido (%)	Dietas experimento A ²					Dietas experimento B ³	
	FVFA	FSA-0	FSA-1	FSA-2	FSA-2ext	FVFB	FSB
Essenciais							
Arginina	1,68	1,96	1,95	1,93	1,87	1,63	1,72
Fenilalanina	0,81	1,04	1,08	1,08	1,07	0,82	0,91
Histidina	0,65	0,82	0,82	0,81	0,77	0,58	0,74
Isoleucina	0,68	0,87	0,88	0,87	0,8	0,65	0,59
Leucina	1,57	1,78	1,90	1,92	1,85	1,64	1,71
Lisina	1,78	1,81	1,84	1,9	1,82	1,35	1,74
Metionina	0,97	0,84	1,01	0,9	0,89	0,81	0,91
Treonina	0,91	0,97	0,96	0,95	0,94	0,76	0,81
Triptofano	0,16	0,16	0,17	0,17	0,19	0,18	0,19
Valina	0,82	0,96	0,97	0,94	0,85	0,85	0,69
Total	10,03	11,21	11,58	11,47	11,05	9,27	10,01
Não essenciais							
Ácido aspártico	1,92	2,57	2,55	2,54	2,5	3,36	4,57
Acido glutâmico	3,06	4,12	4,10	4,06	3,96	3,72	4,86
Alanina	1,29	1,23	1,25	1,26	1,22	1,39	1,24
Cisteína	0,28	0,45	0,43	0,34	0,3	0,31	0,3
Glicina	1,66	1,34	1,40	1,37	1,33	1,98	1,45
Prolina	1,36	1,4	1,44	1,43	1,4	1,55	1,4
Serina	1,03	1,24	1,23	1,23	1,23	1,41	1,52
Tirosina	0,61	0,73	0,73	0,72	0,69	0,54	0,6
Total	11,21	13,08	13,13	12,95	12,63	14,26	15,94

¹ - analisadas em duplicada (CV<5%)

² - FVFA - ração controle negativo, com amostra A de farinha de vísceras de frango; FSA-0 - ração controle positivo, com amostra A de farelo de soja sem enzimas; FSA-1 - ração com amostra A de farelo de soja, 7.500U/kg de protease e 45U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSA-2 - ração com amostra A de farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas por cobertura após a extrusão; FSA-2-ext - ração com amostra A de farelo de soja, 15.000U/kg de protease e 90U/kg de celulase adicionadas na mistura antes da extrusão.

³ - FVFB - ração controle negativo, com amostra B de farinha de vísceras de frango e FSB - único lote de produção, desdobrado nos demais tratamentos (FSB-0, FSB-1, FSB-2).

6. DISCUSSÃO

Durante os 16 dias de cada ensaio, não houve episódios de rejeição alimentar, vômitos ou diarreia nos animais, o que demonstra tolerância à soja e às enzimas nas inclusões avaliadas. Foram utilizados cães com peso médio semelhante ($p > 0,05$) entre tratamentos (Tabelas 6 e 7), havendo uniformidade e ausência de efeito desta variável sobre os resultados obtidos.

O uso do farelo de soja em dietas para cães tem sido alvo de diversas pesquisas (ZUO et al., 1996; CLAPPER et al., 2001; YAMKA et al., 2003; YAMKA et al., 2005; CARCIOFI et al., 2006), bem como o uso de misturas enzimáticas em dietas para cães que apresentam PNA (SMET et al. 1999; TWOMEY et al., 2003a; TWOMEY et al., 2003b; YAMKA et al., 2006). No presente estudo foi possível constatar que a utilização de 30% de farelo de soja, com ou sem enzimas exógenas, apresentou coeficiente de digestibilidade aparente similar à dieta que possuía somente farinha de vísceras de frango como fonte protéica (Tabelas 6 e 7). Estudos que compararam dietas à base de farelo de soja com dietas à base de farinha de vísceras de frango demonstraram coeficientes de digestibilidade aparente próximos (CLAPPER et al., 2001), corroborando com a digestibilidade dos nutrientes verificada no presente estudo. Zuo et al. (1996) e Carciofi et al. (2006), por outro lado, verificaram maiores coeficientes de digestibilidade da proteína bruta para as dietas à base de farelo de soja, em relação a dieta formulada com farinha de vísceras de frango. Considerando a uniformidade e padronização do farelo de soja, estas diferenças provavelmente referem-se mais às variações na composição e digestibilidade da farinha de vísceras de frango, que pode variar entre fornecedores e entre partidas de um mesmo fornecedor.

Os únicos autores que reportaram menor digestibilidade da proteína para rações com farelo de soja em relação a vísceras de frango foram Yamka et al (2003), contrastando com a presente pesquisa e as demais publicações (ZUO et al., 1996; CLAPPER et al., 2001; CARCIOFI et al., 2006). Estes autores avaliaram adições graduais de farelo de soja (15 a 46%) em alimentos extrusados para cães, verificando que adições superiores a 25% tiveram efeito negativo sobre a digestibilidade dos

nutrientes e formação de fezes de cães. No presente estudo teve-se a proposta de se comparar dietas isonutritivas, para isto 3,7% de casca de soja foi adicionada às dietas a base de farinha de vísceras de frango obtendo-se alimentos com a mesma concentração de fibra dietética total. É possível que esta diferença de delineamento explique boa parte das diferenças de resultados, em função da redução linear da digestibilidade dos alimentos verificada com o aumento da fibra da dieta (CASTRILLO et al., 2001) e em função da variação da qualidade das farinhas de vísceras de frango.

Os farelos de soja utilizados em ambos os experimentos apresentaram baixa atividade ureática, em torno de 0,25 unidade de pH (Tabela 1), indicando que houve inativação dos fatores antinutricionais termolábeis durante o processamento do farelo de soja (BUTOLO, 2010).

A concentração média de estaquiose (1,35%) e rafinose (1,2%) dos farelos de soja empregados podem ser consideradas elevadas e intermediárias, respectivamente, quando comparados às encontradas por Parsons et al. (2000), que reportaram concentrações de estaquiose de 0,58% e de rafinose de 3,2% nos farelos de soja convencionais e concentração média (intervalo) de 0,08% (0,03% a 0,17%) e 0,42% (0,04% a 1,08%), respectivamente, nos farelos de soja com baixo conteúdo de oligossacarídeos, tanto os obtidos por extração com solvente como os provenientes de linhagens de soja geneticamente modificadas. Esses pesquisadores, ao avaliarem a digestibilidade em galos cecectomizados, encontraram maior digestibilidade da proteína bruta para as dietas contendo os farelos de soja com baixo conteúdo de oligossacarídeos. Em estudo semelhante com cães, ao contrario, Zuo et al. (1996) não encontraram diferenças de digestibilidade entre as dietas com os diferentes farelos de soja. Pode-se, assim, considerar que a influência destes oligossacárides em cães sobre a digestibilidade dos nutrientes não seja assim tão elevada, sendo estes tolerados mesmo em elevada inclusão, como no presente estudo.

Existem três formas de reduzir os efeitos negativos dos oligossacarídeos presentes no farelo de soja. Através da extração com etanol da estaquiose e rafinose, pela seleção de linhagens de soja com reduzido conteúdo desses oligossacarídeos ou

com a utilização de enzimas exógenas com a função de clivar esses compostos. (PARSONS et al., 2000). No presente estudo o principal efeito adverso da presença destes oligossacarídeos no alimento foram o aumento do teor de água das fezes e da produção de fezes pelos cães. Estes efeitos foram relatados anteriormente em vários estudos (ZUO et al., 1996; YAMKA et al., 2003; CARCIOFI et al., 2006). Do ponto de vista comercial, o volume e a consistência das fezes produzidas pelos cães são características relevantes. Mesmo que não haja alterações da digestibilidade com a inclusão do ingrediente, fezes amolecidas ou em excesso são características indesejadas pelos proprietários. Entretanto, o escore fecal não diferiu entre as dietas, portanto, as fezes dos animais que consumiram farelo de soja não ficaram visivelmente mais amolecidas. O efeito dos oligossacarídeos do farelo de soja foi avaliado por Zuo et al (1996) que compararam o farelo de soja convencional e o farelo de soja com baixo conteúdo de oligossacarídeos. A remoção dos oligossacárides não resultou em melhora da digestibilidade ou das características fecais.

A adição das duas misturas de enzimas não resultou em melhora na digestibilidade aparente das dietas (Tabelas 6 e 7), bem como em alterações nos parâmetros fecais estudados (Tabelas 8 e 9). Resultados controversos têm sido encontrados na literatura sob os efeitos de misturas de enzimas em alimentos extrusados para cães, enquanto alguns estudos verificaram resultados positivos (SMET et al. 1999; TWOMEY et al., 2003b) outros não constataram efeito destas suplementações (TWOMEY et al., 2003a). A hipótese da presente pesquisa era de que a dieta controle negativo, a base de farinha de vísceras de frango, apresentasse melhor digestibilidade do que as formulações com farelo de soja, tornando possível a verificação do efeito da adição de enzimas na melhora relativa da digestibilidade destes alimentos. A falta de efeito da adição de farelo de soja, no entanto, torna difícil a interpretação dos resultados, pois em alimentos com concentrações mais elevadas de oligossacárides é possível que um efeito das enzimas exógenas possa vir a ser evidenciado, hipótese que dependeria, no entanto, de mais estudos.

Os estudos publicados com enzimas exógenas divergem bastante quanto à composição do alimento estudado. Principalmente, devido a diferenças tanto na

quantidade e composição de PNA presentes e quanto os tipos e concentrações de enzimas adicionadas, dificultando a comparação dos resultados.

Twomey et al. (2003a) avaliaram a adição de uma solução de enzimas (contendo 225U de xilanase, 18,75U de amilase, 82,5U de betaglucanase, 60.000U de hemicelulase, 4000U de pectinase e 150U endoglucanase por quilograma de ração) sobre dietas contendo elevadas quantidades de pentosanas (sorgo), observando que não houve melhora da digestibilidade. No presente estudo, também não foi observada melhora na digestibilidade aparente sobre as dietas contendo estaquiiose e rafinose, apesar de maiores quantidades utilizadas das mesmas enzimas (FSB-1 800U/kg de pectinase, 60U, 40U/kg de betaglucanase e 20U/kg de xilanase E FSB-2 4000U/kg de pectinase, 200U/kg de betaglucanase e 100U/kg de xilanase)

Em estudo posterior, o mesmo grupo de pesquisa avaliou dietas extrusadas para cães com diferentes níveis de polissacarídeos não amiláceos (11, 16 e 20g/kg) e enzimas (340U de xilanase, 30U de betaglucanase e 0,9U de amilase por quilograma de ração) sobre os beta-glucanos (cevada) e arabinoxilanos (trigo). Os autores demonstraram que, com a adição de enzimas, houve um aumento na digestibilidade da matéria seca, atribuindo este efeito à quebra das moléculas de PNA solúveis em pequenos polímeros, diminuindo assim a viscosidade do bolo alimentar (TWOMEY et al., 2003b).

O farelo de soja contém cerca de 35% do fósforo total disponível para os monogástricos, pois a maior parte desse fósforo encontra-se ligado ao ácido fítico e a sua quebra só pode ser realizada através da enzima fitase, produzida apenas pelos microorganismos (ROSTAGNO et al., 2005). O uso de fitases em dietas foram avaliadas por Smet et al. (1999), utilizando 800U de fitase por kg de ração para cães contendo elevada quantidade de fitato, verificando aumento da absorção aparente do fósforo. O presente estudo utilizou menores quantidades de fitase (FSB-1 60U/kg e FSB-2 300U/kg) os quais, apesar apresentarem de menor valor numérico para FSB-0 (22,5) que os demais tratamentos (média de 27,6), não resultaram em diferenças estatísticas na absorção aparente do fósforo ($p > 0,05$), possivelmente devido ao alto coeficiente de variação (16,9%).

A ingestão das rações com farelo soja resultou em aumento da concentração de AGCC totais, propionato, acetato e lactato, bem como em redução da amônia e pH das fezes dos cães (Tabelas 8 e 9), o que se justifica pela fermentação intestinal de seus oligossacarídeos (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991). Também não se verificou efeito de enzimas nestes parâmetros, diferindo do verificado por Smet et al. (1999) e Twomey et al., (2003b), que encontraram redução dos produtos de fermentação com suplementação de enzimas. A formação de produtos de fermentação depende largamente da dieta e materiais não digeridos que chegam ao cólon. A fermentação de proteínas resulta na produção de compostos putrefativos como aminas biogênicas, amônia, indol e fenol, sendo indesejável (SWANSON et al., 2002; ZENTEK et al., 2003), enquanto a fermentação de carboidratos pela microbiota nativa do cólon produz ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) e ácido lático. Esses ácidos orgânicos diminuem o pH fecal, favorecendo a inibição das bactérias patogênicas e estimulam a proliferação de colonócitos. Os AGCC, especialmente o butirato, são importante fonte de energia para os colonócitos, favorecendo a absorção de íons, fluxo sanguíneo intestinal e o peristaltismo, promovendo saúde no animal por aumentarem os nutrientes disponíveis para as células gastrointestinais (ROEDIGER, 1982). Desta forma, a redução do pH e dos teores de amônia e o aumento das concentrações de AGCC promovidos pelos oligossacárides da soja podem ser considerados efeitos benéficos deste ingrediente sobre o metabolismo intestinal dos cães, merecendo futuros estudos sobre suas implicações à saúde destes animais. Estas alterações nos produtos de fermentação são, na realidade, reflexo de mudanças na composição e atividade metabólica da microbiota intestinal induzidas pelo alimento (STRICKLING et al., 2000). No experimento B, o consumo de farelo de soja sem adição de enzimas reduziu as populações de aeróbios totais e anaeróbios totais das fezes dos cães (Tabela 10).

ZENTEK et al. (2003), demonstraram que o consumo de proteínas de origem animal favorece o crescimento de bactérias indesejáveis, como o *Clostridium perfringens* e reduz as contagens fecais de bifidobactérias. Na presente pesquisa, no entanto, apesar de a diminuição de aeróbios e anaeróbios totais ser um resultado

relativamente inespecífico em relação ao equilíbrio da microbiota entérica, o aumento de AGCC e ácido lático e redução de amônia e pH fecais nos tratamentos com farelo de soja, sugerem que estas alterações podem estar relacionadas com melhora da saúde intestinal destes animais. A dieta e o fator mais importante para o controle da atividade microbiana no trato gastrintestinal de não ruminantes. A digesta que chega ao intestino grosso vai definir a população microbiana pela quantidade e tipo de substrato que fornece (STRICKLING et al.,2000).

A adição de enzimas, no entanto, resultou em aumento da contagem de bactérias da microbiota fecal, não diferindo entre os demais tratamentos avaliados. Apesar desse resultado, nota-se que a adição de enzimas gerou diferenças nos produtos finais de fermentação, com aumento de AGCC e ácido lático e sem alteração em pH e amônia fecais quando comparados ao tratamento sem adição de enzimas (Tabela 9). Esses dados sugerem que houve maior liberação de substrato pelas enzimas exógenas das quais podem não ter sido absorvidos no intestino delgado gerando mais substrato para a microbiota fecal, portanto, as bactérias que aumentaram no tratamento FVF-B podem ter sido diferentes das bactérias intestinais que se formaram no tratamento FSB-2.

Ao se avaliar o incremento de ureia em ambos os experimentos (Tabelas 11 e 12), nota-se que o aumento deste metabólito ocorreu a partir de uma hora após a alimentação dos animais e que mesmo após 10 horas, não houve retorno aos valores basais. A produção hepática de ureia pós-prandial retrata, em situações de ingestão semelhante de proteína, a eficiência da síntese protéica a partir dos aminoácidos absorvidos do alimento. A maior AAC de ureia mediante consumo das rações com farelo de soja sugere que maior proporção dos aminoácidos absorvidos esteve indisponibilizada para a síntese protéica, tendo sido deaminada e transformada em ureia para ser eliminada via urina (FORD & SHORROCK, 1971). Os maiores valores encontrados no balanço de nitrogênio dos cães mediante o consumo das dietas com farelo de soja pode ser decorrente, juntamente com a maior AAC de uréia, do pior aproveitamento de aminoácidos absorvidos e conseqüente pior valor biológico da proteína do alimento (CARCIOFI et al., 2009). A avaliação da composição de

aminoácidos dos alimentos mostra bastante semelhança entre as formulações com farinha de vísceras de frango e farelo de soja, com teores de aminoácidos essenciais até um pouco mais elevados nas rações com farelo de soja (Tabela 13). Desta forma, a composição de aminoácidos totais não explica as diferenças de utilização pós-prandial da proteína das rações. É possível que diferenças na digestibilidade dos aminoácidos e/ou na simultaneidade de suas absorções intestinais venham a explicar esta menor eficiência de síntese protéica do farelo de soja. Tanto fatores relativos ao próprio ingrediente como ao seu comportamento no processo de extrusão podem colaborar para estas questões, por exemplo a sacarose, estaquiose e rafinose do farelo de soja podem ter favorecido a formação de complexos amino-carboidratos em reações de Maillard, diminuindo a biodisponibilidade de aminoácidos específicos mas não da proteína como um todo, que apresentou digestibilidade aparente semelhante. Estas especulações, no entanto, necessitam ser adequadamente estudadas, pois os estudos que compararam a digestibilidade ileal de aminoácidos de rações à base de farelo de soja e farinha de vísceras de frango demonstraram, na realidade, maior digestibilidade de todos os aminoácidos essenciais para a dieta com farelo de soja (ZUO et al., 1996; CLAPPER et al., 2001).

7. CONCLUSÕES

Nas condições de realização deste trabalho, pode-se concluir que:

- As dietas que continham proteína de origem vegetal (farelo de soja), comparativamente as que continham proteína de origem animal (farinha de vísceras de frango) não apresentaram alterações na digestibilidade, mas expressaram aumento da umidade fecal, produção de fezes e concentração dos produtos finais do processo fermentativo.

- A adição das enzimas nas quantidades utilizadas em ambos os experimentos nas dietas com 30% de farelo de soja não foram suficientes para a melhora dos

coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes analisados, assim como da qualidade fecal.

- A utilização de farelo de soja reduziu significativamente as contagens de aeróbios e anaeróbios totais, amônia e pH das fezes dos cães, quando comparado às dietas contendo farinha de vísceras de frango, sem alterações com o uso de enzimas. Estas alterações sinalizam melhora do ambiente intestinal, merecendo futuras investigações com relação à saúde intestinal dos cães.

- O aproveitamento pós-absortivo dos aminoácidos do alimento foi pior para as dietas com farelo de soja. Este não pôde ser explicado pela composição bruta de aminoácidos, que foi semelhante e deve ter decorrido de diferenças na digestibilidade e absorção dos mesmos ou devido a reações de Maillard ocorridas nos farelos de soja.

- São necessários novos estudos relacionando diferentes concentrações de enzimas exógenas e de farelo de soja em dietas extrusadas para cães a fim de melhor avaliar seus efeitos sobre a digestibilidade em cães.

8. REFERÊNCIAS

AAFCO. 2004. Association of American Feed Control Officials: Official Publication. The Association, Atlanta, GA.

ACAMOVIC, T.; MCCLEARY, B.V. Optimising the response. **Feed Mix**, v.4, n.4, p.14-19, 1996.

ANTONIOU, T.C.; MARQUARDT. R.R. The utilization of rye by growing chicks as influenced by autoclave treatment, water extraction, and water soaking. **Poultry Science**. v. 62, p.91-102, 1983.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, **Official Methods of Analysis**, 16th ed. AOAC, Washington DC, USA, chap. 4, p.1-45, 1995.

ARGENZIO, R.A. Funções secretórias do Trato Gastrointestinal. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996, p.319-329.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS (AAFCO). **Official Publication 2004**. Association of American Feed Control Officials, 2004.

BRITO, C.O.; ALBINO, L.F.T; ROSTAGNO, H.S; GOMES, P.C; CARVALHO, D.C.O.; CORASSA, A. Adição de complexo multienzimático em dietas à base de soja extrusada e desempenho de pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.2, p.457-461, 2006.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Campinas: CBNA, 2010. 2.ed. 430p.

CASTRILLO C.; VICENTE, F.; GUADA, J.A. The effect of crude fibre on apparent digestibility and digestible energy content of extruded dog foods. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v. 85, n. 7-8, p. 231-6, 2001.

CARCIOFI, A.C.; PONTIERI, R.; FERREIRA, C.F., PRADA, F. Avaliação de fontes protéicas para a alimentação de cães. **Brazilian Journal of Animal Science**. v.35, p.754-760, 2006.

CARCIOFI, A.C.; TAKAKURA, F. S.; DE-OLIVEIRA, L. D.; TESHIMA, E.; JEREMIAS, J. T.; BRUNETTO, M. A.; PRADA, F. Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post-prandial glucose and insulin response. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.92, n., p.326-336, 2008.

CARCIOFI, A.C.; de-OLIVEIRA, L.D.; VALERIO, A.G.; BORGES, L.L., CARVALHO, F.M.; BRUNETTO, M.A.; VASCONCELLOS, R.S. Comparison of micronized whole soybeans to common protein sources in dry dog and cat diets. **Animal Feed Science and Technology**. v. 151, p. 251-260, 2009.

CHAMPE, P. C., HARVEY, R. A. Enzimas. In: _____. **Bioquímica Ilustrada**. 2.ed. São Paulo: Artes médicas, 1989. p.53-66.

CHOCT, M.; ANNISON, G. Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets. **British Poultry Science**. v.31, p.811-821, 1996.

CLAPPER, G.M. ; GRIESHOP, C.M ; MERCHEN, N.R. ; RUSSET, J.C. ; BRENT Jr, J.L. ; FAHEY Jr, G.C. Ileal and total tract nutrient digestibilities and fecal characteristics of dogs as affect by soybean protein inclusion in dry, extruded diets. **Journal of Animal Science**, v.79, p.1523-1532, 2001.

COON, C.N.; LESKE, K.L.; AKAVANICHAN, O.; CHENG, T.K. Effect of oligosaccharide-free soyabean meal on true metabolizable energy and fiber digestion in adult roosters. **Poultry Science**, v.69, p.787-793, 1990.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon: A review. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, p.443-459, 1991.

DERSJANT-LI Y.; HILL, D.A. Why soy? The use of soy protein concentrate in pet foods. **Petfood Industry**, v.47, n.1, p.16-18, 2005.

ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, p.1768-1771, 1961.

FAHEY Jr., G.C. Research needs in companion animal nutrition. In: KVAMME, J.L.; PHILLIPS, T.D. (Eds). **Petfood Technology**. Illinois Mt Morris, 2003, p. 57-61.

FAHEY Jr., G.C. Soybean use – Companions Animals. **Soybean Meal Information Center**. Illinois Urbana Champaign, 2007, p.2 - 4.

FIREMAN, F.A.T.; FIREMAN, A.K.B.A.T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.28, n.1, p.173-178, 1998.

FISCHER, G.; MAIER, J.C.; RUTZ, F.; BERMUDEZ, V.L. Desempenho de Frangos de Corte Alimentados com Dietas à Base de Milho e Farelo de Soja, com ou sem Adição de Enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.402-410, 2002.

FORD, J.E.; SHORROCK, C. Metabolism of heat damaged proteins in rat. **British journal nutrition**, v.26, p.311-322, 1971.

FRY, R.E.; ALLRED, J.B.; JENSEN, L.S.; MCGINNIS, J. Influence of cereal grain components of the diet on the response of chicks and poults to dietary enzyme supplements **Poultry Science**. v.36, p.1120-1120, 1957.

FURLAN, A.C.; FRAIHA, M.; MURAKAMI, A.E.; MARTINS, E.N.; SCAPINELLO, C.; MOREIRA, I. Utilização de complexo multienzimático em dietas de frangos de corte contendo triticales. 1. Ensaio de digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.26, n.4, p.765-772,1997.

- GARCÍA, L.J. Phytase effect on feed digestibility in the domestic cat (*Felis silvestris catus*) **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v.6, n.2, p.301-303, 2007.
- GENEROSO, R.A.R.; GOMES, P.C.; ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; BARRETO, S.L.T.; BRUMANO, G. Composição química e energética de alguns alimentos para frangos de corte em duas idades. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, n.7, p.1251-1256, 2008.
- GOMES, M.O.S. **Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e amins fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães**. 2009. 96f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, R.; MORA-ANAYA, L.; OROZCO HERNÁNDEZ, J.R.; RUIZ-GARCÍA, L.J. Phytase effect on feed digestibility in the domestic cat (*Felis silvestris catus*) **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v.6, n.2, p.301-303, 2007.
- GRIESHOP, C.M.; FAHEY Jr, G.C., The role of soy in companion animal nutrition. In: SOY IN ANIMAL NUTRITION. **Federation of Animal Sciences**, Savoy, Il, p.171-181. 2000.
- GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G.; FELIX, C.R. Characterization of α -galactosidase from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, p. 67-73, 2001.
- HAGEN, S.R.; FROST, B.; AGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. v.72, n.6, p. 912-6, 1989.
- HASTINGS, W.H. Enzyme supplements for poultry feeds. **Poultry Science**. v.25, p.584-586, 1946.

HOLM, J.I.; BJORCK, A.; DREWS, N.G. ASP. A rapid method for the analysis of starch. **Starch/Stärke**, v.38, p.224-226, 1986.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p
HUSSEIN, H.S.; FLICKINGER, E.A.; FAHEY, G.C.Jr. Petfood Applications of Inulin and Oligofructose. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1454-1456, 1999.

ICC – International Association for Cereal Science and Technology. **Standard Methods**. Determination of starch content by calcium chloride dissolution. n.122/1, 1995, Vienna.

KARKALAS, J.J. An improved enzymatic methods for determination of native and modified starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.36, p.1019-1027, 1985.

MARSMAN, G.J.P.; GRUPEN, H.; VAN DER POEL, A.F.B.; KWAKKEL, R.P.; VERSTEGEN, M.W.A.; VORAGEN, A.G.J. The Effect of Thermal Processing and Enzyme Treatments of Soybean Meal on Growth Performance, Ileal Nutrient Digestibilities, and Chyme Characteristics in Broiler Chicks. **Poultry Science**. v.76, n.6, p.864-72, 1997.

MENDES, W.S. ; SILVA, I.J.; FONTES, D.O.; RODRIGUEZ, N.M.; MARINHO, P.C.; SILVA, F.O.; AROUCA, C.L.C.; SILVA F.C.O. Composição química e valor nutritivo da soja crua e submetida a diferentes processamentos térmicos para suínos em crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.56, n.2, p.207-213, 2004

NRC - Nutrient Requirements of Dogs and Cats. **National Research Council**. The National Academy Press: Washington, D.C. 2006. 398p.

PARSONS, C.M.; ZHANG, Y.; ARABA, M. Nutritional Evaluation of Soybean Meals Varying in Oligosaccharide Content. **Poultry Science**. v.79, p.1127–1131, 2000.

PENZ, A.M. Enzimas em rações de aves e suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, v.35. Botucatu-SP. Anais, p.165-178, 1998.

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

PROSKY, L.; ASP, N.G.; SCHWEIZER, T.F.; DEVRIES, J.W.; FURDA, I.; LEE, S.C. Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products: Collaborative study. **Journal AOAC**, v.75, p.360-367, 1992.

ROEDIGER, W.E.W. Utilization of nutrients by isolated of epithelial cells of the rat colon. **Gastroenterology**, v. 83, n. 2, p. 424, 1998.

ROSA, A.P; UTTPATEL, R. Uso de enzimas nas dietas para frangos de corte. IN: VIII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 2007, CHAPECÓ. **Anais...**, 2007, p.102-115.

ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T., DONZELE, J.L., GOMES, P.C., OLIVEIRA, R.F., LOPES, D.C., FERREIRA, A.S., BARRETO, S.L.T. Composição de alimentos e exigências nutricionais. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. 2.ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. 186p.

SAMARASINGHE, K.; MESSIKOMMER; R. WENK, C. Activity of supplemental enzymes and their effect on nutrient utilization and growth performance of growing chickens as affected by pelleting temperature. **Archiv Für Tierernährung**. v.53, p.45-58, 2000.

SAS INSTITUTE, 1996. SAS/STAT[®] USER'S GUIDE. SAS INSTITUTE INC., CARY, NC.

SILVA, L.P.; NÖRNBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.983-990, 2003.

SILVIO, J; HARMON, D.L; GROSS, K, L.; McLEOD, K.R, Influence of fiber fermentability on nutrient digestion in dogs. **Journal of Nutrition**. v.16, p 289-295, 2000.

SMET, B.; HESTA, M.; SEYNAEVE, M.; JANSSENS, G.; VANROLLEGHEM, P.; WILDE, R. The influence of supplemental alpha-galactosidase and phytase in a vegetable ration for dogs on the digestibility of organic components and phytate phosphorus. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.81, p.1–8, 1999.

SMITS, C.H.M.; ANNISON, G. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition – towards a physiologically valid approach to their determination. **World's Poultry Science Journal**. v.52, p.203-221, 1996.

SPRING, P.; NEWMAN, K.E.; WENK, C.; VUKIC VRANJES, M. Effect of pelleting temperature on the activity of different enzymes. **Poultry Science**. In press. v.75, n.3, p. 357-361, 1996.

STRICKLING, J.A.; HARMON, D.L.; DAWSON, K.A.; GROSS, K.L. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influence on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v.86, p.205-219, 2000.

SWANSON, K.S.; GRIESHOP, C.M.; FLICKINGER, E.A.; BAUER, L.L.; HEALY, H.P.; DAWSON, K.A.; MERCHEN, N.R.; FAHEY JR, G.C. Supplemental Fructooligosaccharides and Mannanooligosaccharides Influence Immune Function, Ileal and Total Tract Nutrient Digestibilities, Microbial Populations and Concentrations of Protein Catabolites in the Large Bowel of Dogs. **Journal of Nutrition**. v.132, p 980-989, 2002.

TWOMEY, L.N.; PLUSKE, J.R.; ROWE, J.B.; CHOCT, M.; BROWN, W.; McCONNELL, M.F.; PETHICK, D.W. The replacement value of sorghum and maize with or without supplemental enzymes for rice in extruded dog foods. **Animal Feed Science and Technology**. v.108, p.61-69, 2003a.

TWOMEY, L.N.; PLUSKE, J.R.; ROWE, J.B.; CHOCT, M.; BROWN, W.; McCONNELL, M.F.; PETHICK, D.W. The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on fecal quality and digestibility. **Animal Feed Science and Technology**. v.108, p.71-82, 2003b.

VANHOUTTE, T.; HUYS, G.; BRANDT, E.; FAHEY, G.C.Jr.; SWINGS, J. Molecular monitoring and characterization of the fecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. **FEMS Microbiology Letters**, v.249, p.65-71, 2005.

VIEIRA, P.F. Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminantes. Viçosa, MG, 1980. 98p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1980.

WATSON, A.D.J.; CHURCH, D.B.; FAIRBURN, A.J. Postprandial changes in serum urea and creatinine in dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v. 42, p. 1878-1880, 1981.

YAMKA, R.M.; JAMIKORN, U.; TRUE, A.D.; HARMON, D.L. Evaluation of soybean meal as a protein source in canine foods. **Animal Feed Science and Technology**, v.109, p.121-132, 2003.

YAMKA R.M.; HETZLER B.M.; HARMON D.L. Evaluation of low-oligosaccharide, low-phytate whole soybeans and soybean meal in canine foods. **Journal of Animal Science**, v. 83, p.393-399, 2005.

YAMKA, R.M.; HARMON, D.L.; SCHOENHERR, W.D.; KHOO, C.; GROSS, K.L.; DAVIDSON, S.J.; JOSHI, D.K. In vivo measurement of flatulence and nutrient digestibility in dogs fed poultry by-product meal, conventional soybean meal, and low-oligosaccharide low-phytate soybean meal. **American Journal of Veterinary Research**. v.67, n. 1, p.88-94, 2006.

ZANELLA, I.; SAKOMURA, N.K.; SILVERSIDES, F.G.; FIGUEREDO, A.; PACK, M. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. **Poultry Science**, Champaign, v.78, p.561-568, 1999.

ZENTEK, J.; MARQUART, B.; PIETRZAK, T.; BALLÈVRE, B.; ROCHAT, F. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.87, p.397–407, 2003.

ZUO, Y.; FAHEY, G.C.; MERCHEN, N.R.; BAJJALIEH, N.L. Digestion responses to low oligosaccharide soybean meal by ileally-cannulated dogs. **Journal of Animal Science** v.74, p.2441–2449, 1996.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 005908-09 do trabalho de pesquisa intitulado **"Efeito da suplementação de enzimas em dietas extrusadas para cães contendo farelo de soja"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA), em reunião ordinária de 22 de abril 2009.

Jaboticabal, 23 de abril de 2009.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEBEA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária -CEBEA