

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

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ENZIMAS SOBRE O  
PROCESSAMENTO E DIGESTIBILIDADE DE DIETAS  
EXTRUSADAS PARA CÃES CONTENDO FARELO DE  
TRIGO**

D  
I  
S  
S.  
/  
S  
Á  
  
F.  
C.  
  
2  
0  
1  
1

**Fabiano Cesar Sá**  
Médico Veterinário

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL  
Fevereiro de 2011

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

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ENZIMAS SOBRE O  
PROCESSAMENTO E DIGESTIBILIDADE DE DIETAS  
EXTRUSADAS PARA CÃES CONTENDO FARELO DE  
TRIGO**

**Fabiano Cesar Sá**

**Orientador:** Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

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

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL  
Fevereiro de 2011

S11e Sá, Fabiano Cesar  
Efeito da suplementação de enzimas sobre o processamento e digestibilidade de dietas extrusadas para cães contendo farelo de trigo / Fabiano Cesar Sá. - - Jaboticabal, 2011  
xii, 45 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011  
Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi  
Banca Examinadora: João Martins Pizauro Junior, José Roberto Sartori  
Bibliografia

1. Amido. 2. Carboidrases. 3. Extrusão. 4. Fitase. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.39:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Fabiano Cesar Sá** – filho de Joatan Furtado Sá e Vera Aparecida Cesar Sá nasceu em 24 de janeiro de 1982, na cidade de Lages, SC. Em dezembro de 2008 graduou-se no curso de Medicina Veterinária pela Universidade do Estado de Santa Catarina no Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC/CAV), na cidade de Lages-SC, durante o qual foi bolsista de Iniciação Científica na área de nutrição de monogástricos, sob orientação do Prof. Dr. Clóvis Eliseu Gewehr. Em março de 2009 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV), na cidade de Jaboticabal-SP, sob orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi.

*“O único lugar onde sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”*

*“Quem nunca errou nunca experimentou nada novo”*

***Albert Einstein***

## *Dedico*

### **A meus pais**

Quando pequeno e indefeso, era protegido pelo amor de meu grande pai e corajosa mãe. Agora crescido e vivido honro-os pelos ensinamentos e exemplos repassados, virtudes essas que hoje deixaram a maior marca em minha vida, a própria vida a ser vivida, às vezes em desamparo na ausência, mais muito amparado na certeza do amor por vocês repassado.

De seu filho que tanto os ama.

## *Ofereço*

### **A meus irmãos**

Exemplos de família e respeito  
Família essa que se concretiza de geração a geração  
E que demonstra através da educação  
o que um dia foi ensinado

Do irmão caçula, todo amor desse mundo.

## AGRADECIMENTOS

Ao Poder Superior que me concede a oportunidade de caminhar e alcançar meus sonhos mais uma vez, e pela vida por vivenciá-la só por hoje.

Aos meus guias terrenos Joatan e Vera, pais queridos que me ensinaram o respeito, o amor, a dedicação, a honestidade e que hoje me proporcionam essa vitória e sempre me incentivam a criar meus sonhos e vê-los crescer, amo muito vocês.

A Maria Florência dos Santos "DIDI" (*in Memorium*), por onde deva estar, possa ela saber da minha alegria em querer saudá-la com essa conquista e com esplendor amar-te como o filho que não teve, mas o sentimento verdadeiro de como se o fosse.

Aos meus irmãos Juliano e Luciano pelo seu companheirismo, amor e união de uma verdadeira família que se ajuda e se ama, cada lado do coração é de cada um de vocês.

A minhas cunhadas Geovana e Tatiana por continuar esse elo de família, contribuindo para que fique maior e mais forte.

A minha noiva e futura esposa Juliana, por ser minha confidente, mulher, colega, e acima de tudo a pessoa que escolho só por hoje ser minha companheira amada.

Aos meus amigos do coração de meu Grupo de escolha, a quem amo tanto e que me ensinam lições de vida a todo momento.

A meu padrinho tio lu que me ensinou a ver a vida da maneira que deve ser vivida.

A meus tios e tias pelo apoio familiar e calor humano de nossa família.

A meus primos, em especial o primo Alex que compartilhou um ano de sofrimento, mais muito aprendizado juntos, te amo primo veio, e felicidades em seu casamento.

A nova família (Oliveira & Paloschi) por ter me acolhido tão bem e respeitosamente, como grandes amigos do coração.

Aos colegas veterinários que todos sejam abençoados e tenham muito sucesso em suas carreiras, e que vivam chega só de pensar em veterinária, afinal trabalhamos com bichos e como bichos, mais somos humanos (risos).

Aos professores Sérgio Dalagnol que me ensinou o valor e a seriedade do trabalho, ao Clóvis Eliseu Gewehr pelo despertar do desejo da pesquisa, ao Nilson Oleskovicz pela ajuda e incentivo em correr atrás do que quero.

Aos locais e pessoas de Jaboticabal, por me ajudarem ao aprendizado de conviver em sociedade.

Ao setor de nutrição de cães e gatos da Unesp- Jaboticabal, pela amizade e imensa ajuda em especial aos doutorandos Márcia, Leandro, Iris, Juliana, aos residentes Flávio e Fernanda, aos mestrados Micheli, Raquel, Chayanne, aos estagiários Fernando, Danilo e Ana Paula.

A tudo que me ajudaram e ajudam essas três pessoas a que tanto estimo Márcio Antonio Brunetto, Ricardo Souza Vasconcellos e Sandra Prudente Nogueira.

Ao meu orientador, amigo e mestre, Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, que me possibilitou a felicidade de ser orientado frente a pessoas maravilhosas, de admirá-lo pelo ser humano que é e por seu trabalho dedicado, o que o torna um profissional de respeito e aclamado no meio científico.

A universidade e seus funcionários como um todo que me proporcionaram, 2 anos de muito trabalho mais de muita felicidade também.

A meus animais de estimação Alf (*in Memorium*), Maradona (*in Memorium*), Max (*in Memorium*), Akelsin, Plymouth, Nina e Marrie que me proporcionam tanta felicidade e prazer em ser Médico Veterinário.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xi</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVO .....</b>	<b>13</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
4.1. Local .....	14
4.2. Animais e delineamento experimental .....	14
4.3. Tratamentos experimentais, formulação e fabricação das dietas. ....	15
4.4. Atividade enzimática e análises de açúcares redutores nas dietas. ....	19
4.5. Digestibilidade aparente dos nutrientes, produção e qualidade das fezes.	20
4.6. Avaliação do pH e concentração de ácidos graxos de cadeia curta, ácido lático e amônia das fezes .....	22
4.7. Análise Estatística .....	24
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
5.1. Fabricação das dietas experimentais .....	25
5.2. Atividade enzimática e açúcares redutores nas dietas .....	28
5.3. Digestibilidade aparente dos nutrientes .....	29
5.4. Avaliação do pH e concentração de ácidos graxos de cadeia curta, ácido lático e amônia das fezes. ....	32
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Enzimas utilizadas na alimentação animais monogástricos.....	5
<b>Tabela 2.</b>	Composição química do farelo de trigo empregado no experimento. Valores sobre a matéria original. ....	17
<b>Tabela 3.</b>	Formulação das rações utilizadas no experimento. ....	18
<b>Tabela 4.</b>	Composição química analisada das dietas experimentais. Valores sobre a matéria seca. ....	19
<b>Tabela 5.</b>	Parâmetros do processo de extrusão das dietas experimentais com adição de diferentes misturas de enzimas. ....	26
<b>Tabela 6.</b>	Atividade enzimática e teores de açúcares redutores das dietas experimentais, em diferentes etapas do processo produtivo. ....	28
<b>Tabela 7.</b>	Ingestão de nutrientes e coeficientes de digestibilidade aparente das dietas experimentais com adição de diferentes misturas de enzimas. ....	30
<b>Tabela 8.</b>	Produção, características, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e amônia fecal de cães mediante consumo das dietas experimentais com adição de diferentes misturas de enzimas. ....	33

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Classificação das enzimas amilases. ....	7
<b>Figura 2.</b>	Gaiola metabólica para cães, (seta branca) aparato de coleta de fezes, (seta preta) aparato de coleta de urina. ....	15
<b>Figura 3.</b>	Gaiolas metabólicas, para cães. ....	15
<b>Figura 4.</b>	Extrusora tipo MAB 400s. ....	17
<b>Figura 5.</b>	Ilustração de Escore Fecal. ....	22
<b>Figura 6.</b>	CN – controle negativo; CP – controle positivo; ENZ1 – mistura de enzimas 1, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase); ENZ 2 – mistura de enzimas 2, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase; 9000 U/kg $\alpha$ -amilase); ENZ2Pex – mistura de enzimas 2 adicionado por cobertura, após a extrusão, por Kg de ração. ....	25

## **EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ENZIMAS SOBRE O PROCESSAMENTO E DIGESTIBILIDADE DE DIETAS EXTRUSADAS PARA CÃES CONTENDO FARELO DE TRIGO.**

**RESUMO** - O farelo de trigo é um coproduto da indústria alimentícia com custo acessível e importante fonte de fibra e amido que vem sendo empregado para cães. Contudo, este ingrediente apresenta Polissacarídeos Não Amiláceos (PNA's), que não são digeridos pelos cães e podem causar distúrbios gastrintestinais, que interferem na absorção dos nutrientes. Com o intuito de aumentar a biodisponibilidade dos nutrientes do farelo de trigo em dietas extrusadas para cães, avaliou-se a suplementação com uma mistura de enzimas sobre o coeficiente de digestibilidade dos nutrientes, qualidade e produção de fezes e parâmetros fermentativos intestinais. Foram formuladas duas dietas experimentais isonutritivas. A primeira possuía apenas milho e quireira de arroz como fonte de amido e fibra de cana de açúcar como fonte de fibra, que foi denominada ração controle negativo (CN). A segunda formulação apresentava 25% de farelo de trigo e foi desdobrada em quatro tratamentos: CP - dieta controle positivo, com farelo de trigo e sem adição de enzimas; ENZ1 – com enzimas na mistura antes da extrusão; ENZ2 - com as enzimas do ENZ1 mais  $\alpha$ -amilase, na mistura antes da extrusão; ENZ2Pex - com as enzimas do ENZ2 após extrusão, como cobertura. O experimento seguiu delineamento em blocos casualizados no tempo, com dois blocos de 15 animais, três animais por tratamento em cada bloco e seis cães por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos cinco tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados foram, também, avaliados por meio de contrastes ortogonais pré-estabelecidos, a 5% de probabilidade. A adição de farelo de trigo levou à redução da digestibilidade dos nutrientes ( $p < 0,05$ ). A mistura de enzimas não resultou em diferenças na digestibilidade, qualidade das fezes e produtos de fermentação microbiana fecal ( $p > 0,05$ ). A produtividade de ração aumentou com a inclusão da mistura de enzimas ENZ2, reduzindo-se o custo de energia elétrica na produção da ração.

**Palavras-chave:** amido, carboidrases, extrusão, fitase.

## **EFFECT OF ENZYME SUPPLEMENTATION ON THE PROCESSING AND DIGESTIBILITY OF EXTRUDED DIETS FOR DOGS CONTAINING WHEAT BRAN.**

**SUMMARY** - The wheat bran is a byproduct of the food industry with affordable and important source of fiber and starch that has been used for dogs. However, this ingredient has no-starch polysaccharides (NSP), which are not digested by dogs and can cause gastrointestinal disturbances, which interfere with absorption of nutrients. In order to increase the bioavailability of nutrients in wheat bran extruded diets for dogs, we assessed whether supplementation with a mixture of enzymes on the digestibility of nutrients, quality and production of feces and intestinal fermentation parameters. Two experimental diets were formulated isonutrients. The first had only corn and broken rice as a source of starch and sugar cane fiber as a fiber source, which was designated negative control diet (NC). The second formulation showed a 25% wheat bran and was split into four treatments: CP - positive control diet with wheat bran and without enzymes; ENZ1 - with enzymes in the mixture before extrusion; ENZ2 - with enzymes ENZ1 more  $\alpha$ -amylase in the mixture before extrusion; ENZ2Pex - with enzymes ENZ2 after extrusion, as cover. The experiment followed a randomized block design in time, with two blocks of 15 animals, three animals per treatment in each block and six dogs per treatment. The data were subjected to analysis of variance and the mean of five treatment groups were compared by Tukey test at 5% probability. The results were also evaluated using orthogonal contrasts pre-set at 5% probability. The addition of wheat bran led to reduced digestibility of nutrients ( $p < 0.05$ ). The mixture of enzymes resulted in no differences in digestibility, stool quality and fecal microbial fermentation products ( $p > 0.05$ ). The productivity of feed increased with the addition of the mixture of enzymes ENZ2, reducing the cost of electricity production in the diet.

**Keywords:** starch, carbohydrases, extrusion, phytase.

## 1. INTRODUÇÃO

O mercado *petfood* está em ascensão no Brasil e no mundo. A crescente demanda por melhor utilização dos recursos alimentícios tem evidenciado a necessidade da utilização de fontes não competitivas com a alimentação humana. Na tentativa de encontrar novas alternativas viáveis e de baixo custo como ingredientes para *petfood*, tem-se recorrido a matérias-primas de origem vegetal e animal. Apesar do interesse no emprego de coprodutos, sua correta utilização nas formulações depende do seu valor nutricional, tornando-se necessário determinar não somente sua composição química, mas a disponibilidade de seus nutrientes e energia biodisponível (GENEROSO et al., 2008). No Brasil há grande oferta de coprodutos, como o farelo de trigo que é o principal e mais abundante coproduto da moagem de grãos. Segundo a ABIMA, em 2009 no Brasil foi consumido 10,1 milhões de toneladas de trigo. A produção de farinha de trigo gera obrigatoriamente o farelo de trigo, coproduto esse que apresenta custo acessível e importante fonte de fibra e amido. O farelo de trigo possui alguns fatores antinutricionais, como os Polissacarídeos Não Amiláceos (PNA's) e o fitato. Os PNA's são polímeros de açúcar da parede celular de vegetais, são componentes de alto peso molecular e podem compreender mais de 90% da parede celular das plantas (SELVENDRAN; ROBERTSON, 1990).

As ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 do amido,  $\alpha$ -1,2 entre frutose e glicose da sacarose,  $\beta$ -1,4 da glicose e galactose da lactose e  $\alpha$ -1,1 entre as unidades de glicose da trealose podem ser hidrolisadas por enzimas endógenas de mamíferos monogástricos. Todas as outras ligações glicosídicas são resistentes às enzimas digestivas, mas podem ser clivadas por enzimas produzidas por microrganismos da microbiota gastrintestinal (SMITIS; ANNISON, 1996). Assim, esses compostos que não são hidrolisados pelas enzimas do sistema digestório dos cães, podem causar distúrbios gastrintestinais, o que interfere na absorção de nutrientes.

Entre outros fatores, a disponibilidade de nutrientes pode ser influenciada pela formação de complexos naturais. Dentre esses, em particular o ácido fítico, conhecido

também como fitato, que é um complexo orgânico de armazenagem de fósforo presente nos cereais, sementes de oleaginosas e legumes. O ácido fítico está presente em grande concentração no farelo de trigo, constituindo um fator anti-nutricional que interfere na biodisponibilidade de minerais como zinco, cálcio, magnésio, ferro e prejudica a digestibilidade e absorção de proteínas e aminoácidos.

Baseado na importância da inativação desses efeitos anti-nutricionais, aditivos enzimáticos podem ser usados, para atuar na quebra desses compostos e com isso melhorar o valor nutritivo de ingredientes. De acordo com CHAMPE; HARVERY (1989), enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária e quaternária, que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações químicas no organismo. São altamente específicas para os substratos e dirigem todos os eventos metabólicos. As enzimas digestivas têm um sítio ativo que permite que elas atuem na ruptura de determinada ligação química (PENZ Jr., 1998), sob condições favoráveis de temperatura, pH e umidade.

O decreto lei nº. 76.896 de 06 de janeiro de 1976, atualmente em vigor, define como aditivo alimentar toda a substância intencionalmente adicionada ao alimento com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique o seu valor nutricional. Os aditivos enzimáticos não possuem função nutricional direta, mas podem auxiliar no processo digestivo e melhorar a digestibilidade dos nutrientes da dieta (CAMPESTRINI et al., 2005). As enzimas podem ser usadas em rações de cães de duas formas básicas: como aditivo de processo, melhorando a eficiência do processo de extrusão; e como suplemento enzimático ao processo digestivo, para complementar quantitativamente as enzimas do sistema endógeno (amilase e lipase) ou suplementar enzimas que não são produzidas pelos monogástricos (fitase, xilanase, glucanase, celulase).

Considerando que a adição de elevada quantidade de farelo de trigo em rações para cães dificulta o processamento das rações, digestibilidade dos nutrientes e qualidade das fezes, é possível que a adição de uma mistura de enzimas possa atenuar estes efeitos negativos, promovendo maior produtividade, digestibilidade e melhor qualidade das fezes dos cães.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O farelo de trigo (FT) é largamente empregado na alimentação de ruminantes e monogástricos. Este ingrediente contém, na matéria natural, 31,35% de amido, 9,66% de fibra bruta, 40,59% de FDN, 10% de lignina e 15,52% de proteína bruta (MAES et al., 2004; ROSTAGNO et al., 2005). De acordo com EVERS; MILLAR (2002) o FT é formado por tecidos botânicos distintos, exteriores ao núcleo do trigo, como o pericarpo (película que recobre o grão), a testa (película que recobre a semente), a camada hialina e a aleurona, partes externas do endosperma. O endosperma é composto de diferentes tipos de células, em sua maioria de paredes celulares grossas e difíceis de quebrar. Entretanto, o processo de moagem permite o rompimento dessas paredes, que libera micronutrientes considerados anticancerígenos (como o selênio e o ácido fólico ou fitoquímicos), flavonóides e ácido fítico (HELSEBY et al., 2000). Contudo, há fatores antinutricionais que prejudicam seu melhor aproveitamento por animais monogástricos, como os Polissacarídeos Não Amiláceos. Os principais PNA's do farelo de trigo são arabinoxilanos (36,5%), celulose (11%) e ácidos urônicos (3 a 6%), que interferem negativamente na digestão dos demais nutrientes (MAES et al., 2004). Sua elevada proporção de PNA's constitui um problema para digestão (SILVA; SMITHARD, 2002), o que compromete a digestibilidade da dieta e a eficiência de utilização e disponibilidade de alguns aminoácidos (SILVA et al., 2000), reduzindo a energia metabolizável e o desempenho dos animais (ARAUJO et al., 2008).

Segundo ARAUJO et al., (2008), o trigo é considerado um ingrediente promotor do aumento da viscosidade intestinal pelo seu alto percentual de PNA's solúveis, como os arabinoxilanos. Esses PNA's causam inibição geral da digestão dos nutrientes, o que afeta a digestibilidade de carboidratos, gorduras e proteínas. A interferência na biodisponibilidade dos aminoácidos pode ser causada pela redução em sua digestão e absorção, aumento da secreção de proteínas endógenas derivadas do intestino e pela perda de células intestinais (BEDFORD; PARTRIDGE, 2001). A alta concentração de PNA's no farelo de trigo é decorrente do processamento industrial para obtenção da



farinha de trigo, no qual as estruturas da planta mais ricas em PNA's (pericarpo, testa, camada hialina e aleurona) concentram-se neste coproduto. O farelo de trigo pode ser, também, importante fonte de fósforo, porém a elevada concentração de ácido fítico nesta matéria prima propicia absorção intestinal do fósforo inferior a 30% em aves (BEDFORD; PARTRIDGE, 2001).

Os monogástricos, como os cães, não possuem a  $\alpha$  - 1,6 galactosidase na mucosa intestinal (ZUO et al., 1996), enzima essa que catalisa a hidrólise da ligação  $\alpha$ -1,6 de PNA's (GOES; RIBEIRO, 2002). Portanto, a ingestão destes polissacarídeos pelos cães pode resultar em aumento da viscosidade do conteúdo luminal, interferência na digestibilidade dos alimentos e redução da interação das enzimas endógenas com os substratos presentes no intestino (ANTONIOU; MARQUATT, 1983; SMITIS; ANNISON, 1996). Como consequência direta verifica-se redução da digestibilidade da matéria seca e proteína bruta dos alimentos no intestino delgado (YAMKA et al., 2005), que resulta em aumento do fluxo ileal da matéria orgânica, maior volume de fezes (YAMKA et al., 2003), produção de gases como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>, ácidos graxos de cadeia curta (ácido butírico, propiônico, acético) e ácido láctico pela microbiota do cólon, favorecendo a geração de flatos (GRIESHOP; FAHEY, 2000; SILVIO et al., 2000; YAMKA et al., 2006).

Atualmente, estudos e aplicações a campo de complexos multienzimáticos para diminuição e controle de fatores antinutricionais de ingredientes, são realizados na avicultura e suinocultura industrial com resultados interessantes. No entanto, para cães, a suplementação com enzimas ainda está em fase inicial de estudos e distante de uma aplicação em larga escala industrial. TWOMEY et al. (2003a) avaliaram a adição de um complexo multienzimático composto por amilase,  $\beta$ -glucanase e xilanase em dietas extrusadas para cães com teores crescentes de PNA's solúveis. A suplementação resultou em aumento nas digestibilidades da gordura, matéria seca e energia bruta e melhora na qualidade das fezes, sem efeitos negativos aos animais.

As suplementações enzimáticas têm por objetivo provocar hidrólise das ligações específicas de substâncias não digestíveis aos monogástricos, atenuar os efeitos indesejados dos fatores antinutricionais, em especial dos PNA's, aumentar a

acessibilidade dos nutrientes às enzimas endógenas e melhorar o aproveitamento protéico-energético dos ingredientes, aumentando seu valor nutricional (BRITO et al., 2006). Desta forma, quando apropriadas e efetivas, as enzimas parecem ser capazes de reduzir algumas das propriedades antinutricionais desses PNA's da parede celular (YIN et al., 2000), ocorrendo também diminuição da variação da qualidade nutricional das dietas, permitindo digestão mais rápida e completa com diminuição da excreção fecal de nutrientes (BEDFORD, 2000).

Existem três grupos de enzimas disponíveis no mercado: a) Enzimas para alimentos com baixa viscosidade (milho, sorgo e soja) como amilase, protease, lípase e xilanase; b) Enzimas para alimentos de alta viscosidade (trigo, centeio, cevada, aveia, triticales e farelo de arroz) como glucanases, amilases, xilanases e celulases; c) Enzimas para degradar o ácido fítico (fitase) (SOTO-SALANOVA, 1996; ZANELLA, 2001). A tabela 1 contém uma lista das principais enzimas utilizadas em substratos de origem vegetal.

**Tabela 1.** Enzimas utilizadas na alimentação animais monogástricos.

SUBSTRATO	ENZIMA	EFEITOS
Arabinoxilanos	Xilanase	Redução da viscosidade da dieta.
$\beta$ -glucanos	Glucanases	Redução da viscosidade da dieta, menor umidade fecal.
Celulose	Celulases	Degradação da celulose e liberação de nutrientes.
Amido	Amilases	Suplementação das enzimas endógenas. Degradação mais eficiente do amido.
Ácido Fítico	Fitases	Melhora a utilização do fósforo dos vegetais. Remoção do ácido fítico.

Fonte: adaptado de CHOCT; KOCHER, 1997.

Técnicas de biotecnologia moderna possibilitam hoje em dia a produção de enzimas específicas para certas áreas da nutrição animal. No final da década de 1980 a produção de enzimas atingiu escala comercial. Uma grande variedade de fungos,

bactérias e leveduras podem produzir enzimas, por meio de técnicas de recombinação gênica e mutações (CAMPESTRINI et al., 2005).

Xilanases são glicosidases responsáveis principalmente pela hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 presentes na xilana vegetal (componentes da hemicelulose). Tendo em vista que as hemiceluloses são constituídas de vários polímeros (principalmente xilana), formados por diferentes resíduos de açúcares, a sua degradação completa necessita da ação cooperativa de um complexo de enzimas microbiais específicas. A enzima principal na despolimerização da xilana é a endo  $\beta$ -1,4 xilanase (COUGHLAN; HAZLEWOOD, 1993). A produção comercial das xilanases se concentra principalmente nos fungos *Trichoderma sp.* e *Aspergillus sp.* Existem novas cepas produtoras de xilanases com maior rendimento e elevada estabilidade em condições extremas de temperatura e pH (KULKARNI et al., 1999).

Glucanases são enzimas que hidrolisam os PNA's em polímeros menores, o que aumenta a digestibilidade e remove a propriedade de tornar a dieta viscosa (CHOCT; KOCHER, 1997). Elas atuam hidrolisando as  $\beta$ -glucanas, permitindo a ação das enzimas endógenas e a fermentação dos carboidratos pela microbiota (COSSON et al., 1999). Segundo YIN et al., (2001), comercialmente as preparações de glucanases são obtidas de culturas de microrganismos geneticamente modificados, incluindo *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.* e *Trichoderma sp.*

As celulasas são enzimas que possuem capacidade de hidrolisar as ligações glicosídicas de microfibrilas da celulose, resultando na liberação de dissacarídeos, celobiose e glicose (DILLON, 2004; CAMPESTRINI et al., 2005).

Amilases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1-4 glicosídicas de polissacarídeos, como glicogênio, amido ou seus produtos de degradação. Atuam liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. GUPTA et al. (2003) conceituaram que as amilases são divididas em duas categorias: endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido. Esta ação causa formação de ramos lineares de oligossacarídeos com cadeias de vários comprimentos. As exoamilases hidrolisam a partir das extremidades não-

reduzidas da cadeia resultando em produtos finais pequenos. Comercialmente a produção de amilases é feita por diversos fungos e bactérias. Recentemente amilases bacterianas têm sido produzidas por microrganismos geneticamente modificados (vários tipos de *Bacillus*). Na produção de amilases fúngicas, as culturas mais utilizadas são fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus awamori* (BURHAN et al., 2003). Como regra geral, amilases bacterianas são mais estáveis em relação à temperatura do que amilases provenientes de culturas de fungos. NIGAM; SINGH (1995) apresentam um esquema para identificar e classificar as amilases (Figura 1).



**Figura 1.** Classificação das enzimas amilases. Fonte: NIGAM; SINGH (1995)

Fitases são enzimas que catalizam reações de hidrólise que prendem o fosfato à molécula de mio-inositol, resultando na hidrólise da molécula de ácido fítico aumentando a disponibilidade do fósforo (SELLE; RAVINDRAN, 2007). O Fitato é a forma de fósforo predominante em grãos cereais, legumes e sementes oleaginosas (PANDEY et al., 2001). As fitases produzidas para uso como aditivos na alimentação animal são oriundas de culturas de diversas espécies de fungos (*Aspergillus*), bactérias (*Mucor*) e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). A maioria das fitases de origem bacteriana apresentam hidrólise na posição do carbono 6 da molécula de fitato (hexafosfato de mio-inositol), daí serem denominadas de 6-fitase. Algumas fitases

fúngicas são denominadas 3-fitases pela especificidade em iniciar a hidrólise na posição 3 (KONIETZNY; GREINER, 2002).

As enzimas que têm mostrado melhores benefícios para animais não-ruminantes são as xilanases, para dietas à base de trigo, triticale e arroz e as  $\beta$ -glucanases ou celulases para dietas à base de cevada e aveia (MARQUARDT et al., 1996; SILVA; SMITHARD, 2002). É interessante que xilanases e  $\beta$ -glucanases têm se mostrado eficientes em melhorar o desempenho de aves alimentadas com dietas contendo trigo e cevada, que promovem o aumento da viscosidade, ou mesmo milho e farelo de soja, considerados grãos que não promovem aumento de viscosidade (MATHLOUTHI et al., 2003ab).

RAVINDRAN et al. (1999) relatam que os efeitos benéficos das xilanases na utilização de nutrientes estão relacionados à dois fatores: redução da viscosidade da digesta, resultando em aumento da despolarização de arabinoxalanos em componentes de menor peso molecular; liberação dos nutrientes encapsulados nas estruturas da parede celular, favorecendo o contato dos nutrientes com as enzimas endógenas. MATHLOUTHI et al. (2002) avaliaram o efeito da adição de xilanase e  $\beta$ -glucanase na digestibilidade dos nutrientes, desempenho e condições físico químicas do intestino e microbiota cecal de frangos de corte alimentados com dietas a base de trigo e cevada. Verificaram aumento da digestibilidade dos nutrientes e da energia metabolizável aparente da ração. Trabalhando com dietas à base de farinha de trigo e trigo integral, WU; RAVINDRAN (2004) encontraram benefícios da suplementação com xilanase na conversão alimentar dos frangos, sendo esta melhorada em 2,5% em relação à dieta sem suplementação. .

CHOCT et al. (2004) reportaram diferenças na capacidade de redução da umidade da excreta entre diferentes tipos de xilanases adicionadas em dietas de frangos à base de trigo, sendo denominadas xilanases A, B e C, com afinidade por PNAs solúveis e insolúveis. A xilanase A foi melhor, reduzindo de 77% para 73% a umidade das excretas. No entanto, COWIESON (2005) cita que o uso de xilanase, isoladamente, sem emprego de outras enzimas exógenas como proteases, amilases e fitases não produz resposta semelhante às obtidas com a combinação das enzimas.

Têm se verificado que a combinação de mais de uma enzima tem potencializado os efeitos benéficos sobre a digestibilidade das dietas (ARAUJO et al., 2008). Estudos sobre complexos multienzimáticos em alimentos com farelo de soja demonstraram melhor coeficiente de digestibilidade da proteína bruta, energia bruta e matéria orgânica em suínos (PLUSKE; LIDERMAN, 1998; NERY et al., 2000). Em dietas para suínos aumentos de até 7% na digestibilidade de aminoácidos foram verificados com o uso de suplementação de mais de um tipo de enzimas (COSTA et al., 2010f). Independentemente de como e quais foram os processamentos do farelo de soja anterior à formulação, estudos demonstraram resultados zootécnicos positivos e melhor digestibilidade da PB, aminoácidos e energia metabolizável (EM) em dietas para pintos de corte suplementadas com complexo multienzimático (GARCIA et al., 2000; BRITO et al., 2006).

Hemicelulose é um polissacarídeo, que junto com a celulose, pectina e glicoproteínas, formam a parede das células vegetais. A hemicelulose refere-se a uma mistura de polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urônicos, que podem ser lineares ou ramificados (ASPINALL, 1988). As hemiceluloses são divididas em pentosanas e hexosanas. As pentosanas por hidrólise produzem pentoses (xilose e arabinose). Alimentos como casca do grão de soja e farelo de trigo possuem teores de hemicelulose de 26,18% e 34,47%, respectivamente (ZAMBOM, 2002).

As pentosanas presentes no trigo, representadas principalmente pelas arabinoxilanas, polímeros lineares, são constituídas de moléculas de D-xilose em ligações  $\beta$ -1,4, com substituição da arabinose ao longo da cadeia. Com a arabinose ausente, o polímero de xilose reage com outras moléculas e precipita. A presença da arabinose torna esse polímero solúvel, entretanto permite a produção de polímeros longos, que quando em solução se entrelaçam trazendo aos não ruminantes um aumento da viscosidade da dieta (BEDFORD, 1995). Os principais monossacarídeos encontrados em polissacarídeos não amiláceos do trigo, como xilose e arabinose, não são hidrolisados e absorvidos, causando um efeito negativo (laxativo) quando em excesso (CLASSEN, 1996).

Especula-se que a xilose e a arabinose possa ter ação prebiótica (CUMMINGS, et al., 2004). Segundo GIBSON; ROBERTFROID (1995) prebióticos são compostos capazes de resistir aos processos de digestão e absorção, ser fermentadas pelas bactérias colônicas e estimular o crescimento e a atividade de bactérias benéficas do trato gastrointestinal. Os prebióticos mais importantes são polímeros de hexoses como glicose, frutose, galactose e manose e os polímeros de pentoses como ribose, xylose e arabinose (IMMERSEEL et al., 2002), sendo que frutose e manose são componentes dos dois mais importantes grupos de prebióticos utilizados atualmente: frutoligossacarídeos (FOS) e mananoligossacarídeos (MOS), respectivamente.

A principal forma de ação dos prebióticos é sobre a modulação benéfica da microbiota nativa presente no hospedeiro. Os efeitos resultantes do uso de prebióticos são evidenciados pelo crescimento das populações microbianas benéficas, pela melhora nas condições luminais, aumentando seu valor osmótico, nas características anatômicas do trato gastrintestinal, promovendo o aumento da superfície de absorção da mucosa intestinal e no sistema imune (IMMERSEEL et al., 2002; SILVA ; NÖRNBERG, 2003).

O fósforo dos vegetais não pode ser aproveitado eficientemente pelos animais monogástricos, pois eles não sintetizam a enzima fitase, enzima capaz de catabolizar o fitato disponibilizando o fósforo e outros minerais para o metabolismo. Na meta-análise publicada por LEHNEN et al., (2007) verificou-se que 60% das dietas com trigo que continham fitase para suínos apresentaram melhor digestibilidade ileal aparente do que as outras dietas com trigo e sem fitase.

Outro aspecto interessante na disponibilidade de fósforo dos vegetais é que o processo de extrusão contribui para liberação do fósforo preso na molécula de fitato, ANDERSSON et al., (1981) encontraram redução de 13-35% no conteúdo de fitato, após a extrusão de uma mistura de glúten, amido e farelo de trigo. No entanto, quando um alimento é submetido ao processo de extrusão, a degradação do fitato não é alta ( $\leq 35\%$ ), pois o alimento é submetido a altas temperaturas e umidade por curto espaço de tempo. Em muitos casos a redução do fitato não é completa (SATHE; REDDY, 2002), sendo necessária a suplementação enzimática com fitase.

Enzimas são moléculas protéicas ativas que atuam em sistemas biológicos por meio de duas características marcantes: atividade catalítica e especificidade. Elas interagem com um ou poucos sítios de ligação, que correspondem aos substratos específicos (XAVIER et al., 2005). Todas as enzimas, tanto as endógenas (animal) como as exógenas (suplementação), sendo proteínas estão sujeitas a dois tipos de fatores que influenciam sua atividade catalítica. Primeiro são fatores intrínsecos ao organismo animal como pH e tempo de trânsito no sistema digestório, grau de hidratação e temperatura do corpo do animal, concentração do substrato em razão da velocidade de hidrólise enzimática, susceptibilidade das enzimas exógenas às enzimas endógenas e atividade/concentração de enzimas endógenas (ACAMOVIC; MCCLEARY, 1996). Por segundo são fatores do ambiente externo e ao pré-tratamento ou processamento dos ingredientes como variação de pH, calor, umidade, pressão e solventes orgânicos (PENZ Jr., 1998). É, assim, importante certificar-se das condições de suplementação e aplicação dos complexos multienzimáticos nos alimentos, em especial para cães, cujas dietas sofrem processamento bastante intenso durante a extrusão e a secagem das mesmas.

Mesmo o processo de peletização, que trabalha em condições de umidade e temperatura muito inferiores aos verificados durante a extrusão, pode reduzir significativamente a atividade catalítica de enzimas exógenas. 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, que resultou em desestabilização das enzimas.

Na extrusão, processo envolvido na fabricação de alimentos para cães, os materiais úmidos, amiláceos e protéicos são cozidos, expandidos pela gelatinização do amido e plasticizados por calor, pressão e cisalhamento mecânico em um curto espaço de tempo (HAUCK et al., 1994). Este processamento pode ser bastante agressivo para as enzimas, devendo-se avaliar seu impacto sobre a retenção da atividade destas proteínas.



A utilização de enzimas em alimentos para cães, se positiva possibilitará maior emprego de ingredientes que não competem com a alimentação do homem. O farelo de trigo já é largamente empregado em rações para cães, mas sua inclusão não pode ser elevada pelos riscos de redução da digestibilidade e piora da qualidade das fezes dos animais. Desta forma, a associação de misturas multienzimáticas ao farelo de trigo tem o potencial de propiciar maiores inclusões do ingrediente, reduzindo o custo de formulação sem prejuízo à digestibilidade dos nutrientes e qualidade das fezes.

### 3. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da adição de diferentes misturas de enzimas, incluindo glucanase, xilanase, celulase, glicoamilase, fitase e  $\alpha$ -amilase em dietas extrusadas para cães contendo farelo de trigo, sobre o processamento das rações, digestibilidade dos nutrientes e concentração de produtos finais de fermentação nas fezes dos animais.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local

O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, *campus* de Jaboticabal no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária no Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, câmpus de Jaboticabal, em comum acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), conforme demonstrado no Apêndice I.

### 4.2. Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 30 cães Beagle adultos, machos e fêmeas, não castrados, com idade média de  $7 \pm 1,21$  anos e peso corporal médio de  $10,97 \pm 2,17$  kg, considerados hígidos após avaliação clínica, hematológica e coproparasitológica. O experimento seguiu delineamento em blocos casualizados, com cinco tratamentos (rações), dois blocos de 15 animais e três repetições por tratamento em cada bloco, totalizando seis repetições por tratamento.

Durante todo o período, os animais permaneceram em gaiolas metabólicas individuais em inox, com dimensões de 90 x 90 x 100 cm, com aparato para coleta separada de fezes e urina (Figuras 2 e 3). A quantidade de ração administrada foi calculada de acordo com o valor energético da ração e a necessidade energética do animal (NRC, 2006). A quantidade total diária foi dividida em duas refeições iguais, oferecidas às 8h 30min e 17h 30min. Água foi oferecida à vontade. O consumo de alimento foi mensurado e registrado durante todo o período experimental.

Foram avaliados a digestibilidade aparente dos nutrientes, escore fecal, produção de fezes, pH fecal, ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico), ácido lático e amônia nas fezes. Para tanto, foi realizada uma adaptação à

dieta do 1º ao 5º dia; coleta total de fezes e urina nas gaiolas metabólicas para o ensaio de digestibilidade do 6º ao 10º dia; coleta de fezes frescas para análise de pH e concentração de ácidos graxos de cadeia curta, ácido lático e amônia do 11º ao 13º dia.



**Figura 2.** Gaiola metabólica para cães, (seta branca) aparato de coleta de fezes, (seta preta) aparato de coleta de urina.



**Figura 3.** Gaiolas metabólicas, para cães.

#### **4.3. Tratamentos experimentais, formulação e fabricação das dietas**

Foram formuladas duas dietas experimentais isonutrientes, de modo que suas composições nutricionais atendessem as recomendações nutricionais para manutenção de cães adultos da AAFCO (2009). A primeira, restrita em PNA's, continha apenas milho e quirera de arroz como fonte de amido e fibra de cana-de-açúcar como fonte de fibra, sem farelo de trigo nem adição de enzimas, sendo denominada ração controle negativo (CN). A dieta teste foi formulada com uma mescla de milho, quirera de arroz e 25% de farelo de trigo. Esta segunda formulação foi desdobrada em quatro tratamentos:

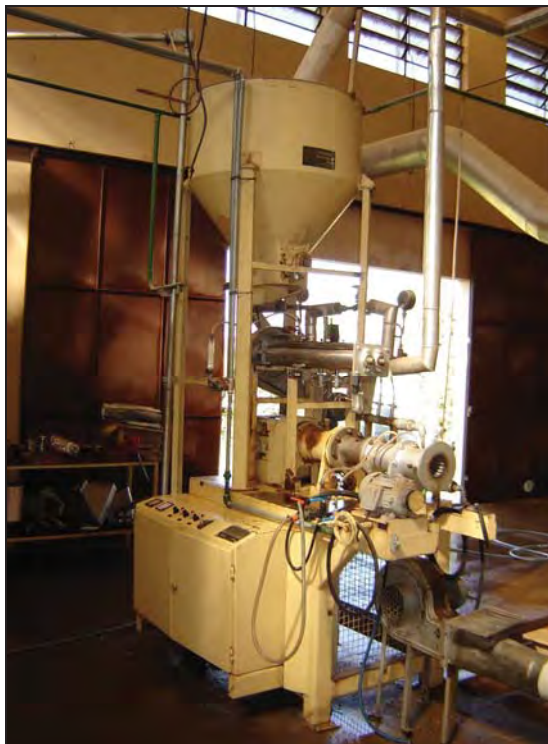
- controle positivo (CP): sem adição de enzimas;
- enzima 1 (ENZ1): adição antes da extrusão por kilograma de ração de 4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase;

- enzima 2 (ENZ2): adição antes da extrusão por kilograma de ração de 4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase; 9.000 U  $\alpha$ -amilase);

- enzima 2 pós extrusão (ENZ2Pex): adição por cobertura após a extrusão por kilograma de ração de 4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase; 9.000 U  $\alpha$ -amilase.

Os tratamentos ENZ1 e ENZ2 foram planejados para testar a hipótese de que a umidade e temperatura do pré condicionador da extrusora propiciassem ambiente à atividade das enzimas, resultando sua atividade catalítica na degradação dos PNA's, liberação de açúcares redutores e redução destes fatores antinutricionais do farelo de trigo, sendo estas posteriormente inativadas em sua passagem pela extrusora. O tratamento ENZ2Pex foi planejado para avaliar o efeito da ingestão destas enzimas e seu efeito catalítico no tubo digestivo dos cães.

A composição química do farelo de trigo empregado no estudo encontra-se na Tabela 2. A fórmula das dietas experimentais encontra-se na Tabela 3 e composição química analisada das dietas na Tabela 4. Para fabricação das rações os ingredientes foram moídos em moinho com peneira de 1 mm e as rações extrusadas em extrusora Tipo MAB 400S (Figura 4), na Fábrica de Rações do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *campus* de Jaboticabal. O processo de produção foi controlado com ajustes na densidade dos *kibbles* 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.



**Figura 4.** Extrusora Tipo MAB 400S.

**Tabela 2.** Composição química do farelo de trigo empregado no experimento. Valores sobre a matéria original.

ITEM	FARELO DE TRIGO (FT)
Matéria seca (%)	88,46
Matéria orgânica (%)	84,1
Proteína bruta (%)	18,66
Extrato etéreo hidrólise ácida (%)	3,58
Matéria mineral (%)	4,35
Fibra Bruta (%)	8,19
Fibra dietética total (%)	33,16
Fibra insolúvel (%)	31,98
Fibra solúvel (%)	1,19

**Tabela 3.** Formulação das rações utilizadas no experimento.

INGREDIENTES (%)	DIETAS				
	CN	CP	ENZ1	ENZ2	ENZ2Pex
Milho grão	37,64	20,39	20,39	20,39	20,39
Farinha de Vísceras de frango	28,39	23,66	23,66	23,66	23,66
Quirera de arroz	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Farelo de trigo	-	25,00	25,00	25,00	25,00
Fibra de cana de açúcar	3,94	-	-	-	-
Gordura de aves	5,38	5,78	5,78	5,78	5,78
Palatabilizante líquido	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Cloreto potássio	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Sal comum	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Suplemento min/vit <sup>1</sup>	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Cloreto colina 60%	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Antifúngico <sup>2</sup>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Antioxidante <sup>3</sup>	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Lisina	0,04	0,09	0,09	0,09	0,09
Calcário	0,07	0,54	0,54	0,54	0,54
Amido	1,00	1,00	-	-	-
Mistura enzimática	-	-	1,00	1,00	1,00
TOTAL %	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

CN – controle negativo; CP – controle positivo; ENZ1 – mistura de enzimas 1, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase); ENZ 2 – mistura de enzimas 2, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase; 9000 U/kg  $\alpha$ -amilase); ENZ2Pex – mistura de enzimas 2 adicionado por cobertura, após a extrusão, por Kg de ração.

<sup>1</sup> - Adição por quilograma de produto: Ferro 100 mg, Cobre 9,25 mg, Manganês 6,25 mg, Zinco 150 mg, Iodo 1,87 mg, Selênio 0,13 mg, Vit. A 18750 UI, Vit. D 1500 UI, Vit. C 125 mg, Vit. K 0,15 mg, Tiamina 5 mg, Riboflavina 16 mg, Ácido pantotênico 35,75 mg, Niacina 62,5 mg, Piroxidina 7,5 mg, Cobalamina 45 mcg, Ácido fólico 0,75 mg.

<sup>2</sup>- Mold Zap Aquativa, Alltech Brasil Agroindustrial Ltda: propionato de amônio, propanodiol, ácido propiônico, ácido acético, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido fórmico, sorbato de potássio, veículo q.s.p.

<sup>3</sup>- Banox, Alltech Brasil Agroindustrial Ltda: BHA, BHT, galato de propila e carbonato de cálcio

**Tabela 4.** Composição química analisada<sup>1</sup> das dietas experimentais. Valores sobre a matéria seca.

ITEM	DIETAS				
	CN	CP	ENZ1	ENZ2	ENZ2Pex
Matéria Seca (%)	93,16	93,17	93,74	93,92	93,14
Matéria Mineral (%)	8,05	8,65	8,28	8,34	8,42
Matéria Orgânica (%)	91,95	91,35	91,72	91,66	91,58
Proteína Bruta (%)	26,51	26,06	26,08	26,09	26,26
Extrato Etéreo Hidrólise Ácida (%)	11,58	11,29	11,18	11,11	11,10
Fibra dietética total (%)	11,31	14,72	14,11	14,36	14,79
Fibra bruta	3,59	3,56	3,59	3,99	3,61
Amido (%)	41,13	39,31	40,93	40,60	39,00
Energia bruta (kcal/g)	4,75	4,72	4,65	4,77	4,72
Densidade (g/L)	340	330	350	340	340
Índice de gelatinização do amido (%)	97,56	96,13	92,83	99,57	89,75

CN – controle negativo; CP – controle positivo; ENZ1 – mistura de enzimas 1, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase); ENZ 2 – mistura de enzimas 2, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase; 9000 U/kg  $\alpha$ -amilase); ENZ2Pex – mistura de enzimas 2 adicionado por cobertura, após a extrusão, por Kg de ração.

<sup>1</sup> - analisadas em duplicada (CV<5%)

#### 4.4. Atividade enzimática e análises de açúcares redutores nas dietas

Foram analisados os teores de açúcares redutores das rações, a fim de se verificar a presença e intensidade da atividade enzimática da mistura de enzimas adicionada. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de SOMOGY-NELSON (NELSON, 1944), em diferentes momentos durante a produção das rações: na mistura farelada; logo após o pré condicionamento da extrusora; na saída da



extrusora; logo após a passagem pelo secador. Nos tratamentos CP, ENZ2 e ENZ2Pex foram determinados também a presença e atividade das enzimas xilanase e celulase pelo método de BAILEY et al. (1992) e a atividade da fitase pelo método de STOCKMANN et al. (2003). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP – Campinas.

#### **4.5. Digestibilidade aparente dos nutrientes, produção e qualidade das fezes**

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes foram determinados pelo método de coleta total de fezes e urina, segundo recomendações da AAFCO (2009). O consumo alimentar foi registrado diariamente, pesando-se as quantidades oferecidas de alimento a cada refeição. Após período de adaptação de cinco dias, fezes e urina foram recolhidas integralmente por cinco dias consecutivos. As fezes eram recolhidas sempre que presentes ou no mínimo duas vezes ao dia, entre 8h00 as 20h00, pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer (-15°C). A urina foi recolhida duas vezes por dia em recipientes plásticos contendo 1 mL de ácido sulfúrico 1 Eq/L, para evitar perdas de nitrogênio e proliferação de bactérias. Assim que recolhida mensurava-se seu volume em proveta e a urina era armazenada em freezer (-15°C).

Ao final do período de coleta, fezes e urina foram descongeladas e homogeneizadas compondo-se uma amostra única por animal e período. Posteriormente, cada amostra de fezes (total produzido) e de urina (cerca de 100mL) foram colocadas 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 então moídos em moinho tipo faca (MOD 340, ART LAB, São Paulo), com peneira de 1mm, para proceder-se às análises laboratoriais.

Nas rações e fezes foram determinados, segundo a metodologia descrita pela AOAC (1995), os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), energia bruta (EB), extrato etéreo hidrólise ácida (EEHA). Fibra dietética total (FDT) foi determinada

segundo PROSKY et al. (1992) e o teor de amido total segundo HENDRIX (1993). A EB das rações, fezes e urina foi determinada em bomba calorimétrica adiabática (1281, PARR *Instruments*, EUA). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP - Jaboticabal, em duplicata e repetidas quando variavam mais de 5%.

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, matéria mineral, proteína bruta, extrato etéreo hidrólise ácida, fibra dietética total, amido e energia bruta. Estes cálculos foram realizados com a seguinte fórmula (POND et al., 1995):

$$\text{Coeficiente de digestibilidade (\%)} = \frac{\text{nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente excretado (g)}}{\text{nutriente ingerido (g)}} \times 100$$

A matéria seca das fezes foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\text{MS fecal} = \frac{1^{\text{a}} \text{ MS} \times 2^{\text{a}} \text{ MS}}{100}, \text{ sendo:}$$

1<sup>a</sup> MS = matéria seca a 55°C das fezes *in natura*

2<sup>a</sup> MS = matéria seca a 105°C das fezes secas a 55°C.

A qualidade das fezes foi determinada por meio do escore fecal (Figura 5), atribuindo-se notas de 0 a 5, sendo: 0 = fezes líquidas; 1 = fezes pastosas e sem forma; 2 = fezes macias, mal formadas e que assumem o formato do recipiente de colheita; 3 = fezes macias, formadas e úmidas, que marcam o piso; 4 = fezes bem formadas e consistentes que não marcam o piso; 5 = fezes bem formadas, duras e secas. Fezes adequadas estão entre os valores 3 e 4.



**Figura 5.** Ilustração de Escore fecal.

#### **4.6. Avaliação do pH e concentração de ácidos graxos de cadeia curta, ácido lático e amônia das fezes**

O pH das fezes dos cães foi determinado nos dias 11, 12 e 13. Para isto dois gramas das fezes frescas foram diluídas (1:10 w/w) em água miliq e o pH medido com pH-metro de precisão 0,01 pH (Digicrom Analítica Ltda, modelo DM20).

Para análise dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), foram coletadas nos dias da avaliação de pH, 10 gramas de fezes frescas para cada defecação (coletadas no máximo 10 minutos após a evacuação). As fezes foram homogeneizadas e misturadas a cada coleta com 30 mililitros de ácido fórmico 4,2 N (1:3 w/v). Após 48 horas, as amostras foram homogeneizadas e posteriormente 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 concentração de ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) 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 B-DA/4% Carbowax 20M. O cromatógrafo foi calibrado por meio da injeção de 1 µL 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 175 mL/min.) e hidrogênio como gás combustível (vazão de 15 mL/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 foram empregos 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, sendo, então, centrifugada por três vezes a 4.500 G à 15°C, por 15 minutos. Aproveitou-se o sobrenadante e foi desprezado o sedimento. A análise foi realizada no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – Pirassununga, de acordo com PRYCE (1969) pelo método espectrofotométrico com leitura a 565 nm (500 a 570nm). 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%.

Para medir a concentração de NH<sub>3</sub> fecal foi adaptada da metodologia de VIEIRA (1980). Foram utilizados 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 0,97 N). Ao atingir-se 50 mL de solução receptora mais material destilado interrompeu-se a destilação. Em seguida foi realizada a titulação com ácido clorídrico 0,005N.

#### **4.7. Análise Estatística**

O experimento seguiu delineamento em blocos casualizados. Os dados obtidos foram avaliados pela função GLM do programa estatístico SAS (2004). Procedendo-se previamente a análise de homoscedasticidade das variâncias. O modelo empregado considerou os efeitos de bloco, tratamento e animal. Quando diferenças estatísticas foram obtidas na análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Foram realizados, adicionalmente, contrastes ortogonais predeterminados, sendo um entre os tratamentos com farelo de trigo (CP, ENZ1, ENZ2 e ENZ2Pex) versus sem farelo de trigo (CN) e outro entre a ração com farelo de trigo sem enzimas (CP) versus as rações com farelo de trigo e enzimas (ENZ1, ENZ2 e ENZ2Pex). Considerou-se significativo valor de  $p < 0,05\%$ . Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Fabricação das dietas experimentais

Seguiu-se uma sequência previamente estabelecida na fabricação das rações para se evitar contaminações de enzimas entre tratamentos. No primeiro dia extrusou-se as rações CN, CP e ENZ1. No segundo dia as rações ENZ2Pex e ENZ2. Na Tabela 5 estão descritos os parâmetros do processo de extrusão das dietas experimentais. Fotos das rações encontram-se na Figura 6.



**Figura 6:** CN – controle negativo; CP – controle positivo; ENZ1 – mistura de enzimas 1, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase); ENZ 2 – mistura de enzimas 2, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase; 9000 U/kg  $\alpha$ -amilase); ENZ2Pex – mistura de enzimas 2 adicionado por cobertura, após a extrusão, por Kg de ração.

**Tabela 5.** Parâmetros do processo de extrusão das dietas experimentais com adição de diferentes misturas de enzimas.

PARÂMETROS DE PRODUÇÃO	DIETAS				
	CN	CP	ENZ1	ENZ2	ENZ2Pex
Velocidade da faca de corte (Hz)	64,9	68,7	62,13	115	102
Alimentação (Hz)	22,3	24,6	25,26	51,8	48,4
Velocidade da rosca (Hz)	51,7	51,8	52,89	57,14	57
Tempo retenção condicionador (seg)	30	27	21,3	17,5	18,33
Amperagem (A)	14	16	16	20	19
Temperatura condicionador (°C)	79	79,6	80	77	76
Umidade saída condicionador (%)	36,32	35,37	37,21	35,73	28,72
Tempo retenção total (s)	49,26	46,83	49,8	40,1	30,33
Densidade (g/L)	340	330	350	340	340
Índice de gelatinização do amido (%)	97,56	96,13	92,83	99,57	89,75
Produção (kg/h)	93	99	95	188	139
Produção matéria seca (kg MS/h)	67,51	72,04	71,82	139,95	97,48
Relação produção MS/amperagem	4,82	4,50	4,48	6,99	5,13
Consumo de energia (kW/h)	4,054	4,633	4,633	5,791	5,502
Produtividade (kg MS/kW/h)	67,51	72,04	71,82	139,95	97,48
Custo de energia elétrica da extrusora (R\$ por 100 kg MS produzida) <sup>1</sup>	1,12	1,21	1,21	0,78	1,06
Temperatura na extrusão (°C)	>120	>120	>120	>120	>120
Umidade na saída da extrusora (%)	27,41	26,78	31,69	25,62	29,53

CN – controle negativo; CP – controle positivo; ENZ1 – mistura de enzimas 1, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase); ENZ 2 – mistura de enzimas 2, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase; 9000 U/kg  $\alpha$ -amilase); ENZ2Pex – mistura de enzimas 2 adicionado por cobertura, após a extrusão, por Kg de ração.

<sup>1</sup> - calculado considerando R\$0,188 por KW/h

Durante a produção dos tratamentos CN, CP e ENZ1 a alimentação da extrusora foi mantida baixa (inferior a 25 Hz), inferior à capacidade do equipamento resultando em baixa produtividade (menos de 100 kg/h). Durante a produção dos tratamentos ENZ2 e ENZ2Pex trabalhou-se no limite do equipamento, com alimentação superior a 48 Hz. Isto reduziu o período de retenção do produto no pré-condicionador e o período de retenção total, mas não elevou a densidade dos produtos, que permaneceu a mesma, nem o grau de cozimento, que foi bastante elevado em todos os tratamentos (Tabela 4). Nesta condição de trabalho do equipamento, verificou-se que a adição das enzimas no tratamento ENZ2 levou a aumento médio de 43% na produtividade de ração, sobre a matéria seca, quando comparado ao tratamento ENZ2Pex. O custo de energia elétrica por 100 kg de MS de ração também caiu no tratamento ENZ2, sendo 36% menor do que o do tratamento ENZ2Pex. Esta melhora de produtividade pode ser atribuída a adição de amilases ao tratamento ENZ2. FROETSCHNER et al. (2006) também demonstraram em ração extrusada para cães que o uso de  $\alpha$ -amilase reduziu o consumo de energia entre 17,95% e 25,8%, dependendo do tipo de enzima. No trabalho destes autores a produtividade de ração, no entanto, apresentou apenas pequena melhora, entre 1,28% e 0,72%, bem inferior ao verificado no presente estudo. A comparação direta entre os parâmetros produtivos obtidos no processamento dos tratamentos CP, ENZ1 e ENZ2 deve ser feita com cautela, devido carga de alimentação bastante diferente. No entanto, pode-se supor que a ausência de efeito do tratamento ENZ1 se deva ao fato deste não conter  $\alpha$ -amilase.

Segundo GUPTA et al. (2003), a  $\alpha$ -amilase é uma endoamilase que hidrolisa de forma aleatória no interior da molécula de amido. Esta ação causa formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. As exoamilases (glicoamilase) hidrolisam a molécula a partir das extremidades não-redutoras da cadeia resultando em produtos finais pequenos. A adição de  $\alpha$ -amilase e a presença da glicoamilase no tratamento ENZ2 provavelmente promoveu hidrólise e quebra das cadeias polissacarídicas da amilose e amilopectina, o que reduziu a viscosidade e aumentou a fluidez da massa no canhão da extrusora, explicando o aumento de produtividade e a economia de energia elétrica. A economia de energia elétrica se fez,



provavelmente, não só pelo maior fluxo de matéria seca por unidade de tempo na extrusora, mas pela diminuição da força mecânica necessária à propulsão da massa de menor viscosidade.

## 5.2. Atividade enzimática e açúcares redutores nas dietas

Na tabela 6 estão apresentados os resultados da atividade enzimática e açúcares redutores nas rações, nos diferentes momentos de amostragem durante o processamento.

**Tabela 6.** Atividade enzimática e teores de açúcares redutores das dietas experimentais, em diferentes etapas do processo produtivo.

Pontos de amostragem	DIETAS				
	CN	CP	ENZ1	ENZ2	ENZ2Pex
<b>Xilanase (U/kg)</b>					
Mistura	na <sup>1</sup>	2.120	na	2.710	na
Pré-condicionador	na	53	na	230	na
Extrusora	na	1.020	na	760	na
Secador	na	250	na	770	8.170
<b>Celulase (U/kg)</b>					
Mistura	na	1.450	na	1.360	na
Pré-condicionador	na	505	na	470	na
Extrusora	na	800	na	370	na
Secador	na	200	na	100	7.570
<b>Fitase (U/kg)</b>					
Mistura	Na	74.240	na	101.140	na
Pré-condicionador	Na	1.460	na	570	na
Extrusora	Na	340	na	280	na
Secador	Na	1.290	na	930	2.060
<b>Açúcares redutores (g glicose/100 g amostra)</b>					
Mistura	0,070	0,260	0,201	0,447	na
Pré-condicionador	0,072	0,121	0,126	0,093	na
Extrusora	0,039	0,047	0,043	0,054	na
Secador	0,052	0,068	0,062	0,078	2,36

CN – controle negativo; CP – controle positivo; ENZ1 – mistura de enzimas 1, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase); ENZ 2 – mistura de enzimas 2, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U  $\beta$ -glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198.4 U glicoamilase; 1.910 U fitase; 9000 U/kg  $\alpha$ -amilase); ENZ2Pex – mistura de enzimas 2 adicionado por cobertura, após a extrusão, por Kg de ração.<sup>1</sup>- amostra não analisada.

O resultado de atividade residual demonstrou baixa atividade enzimática, com valores semelhantes em ENZ2 ao controle positivo. Duas explicações podem ser dadas, ou as enzimas não estavam no preparado adicionado nas concentrações pretendidas ou houve erro laboratorial em sua quantificação. Fitase foi a única presente em quantidades expressivas nos tratamentos onde foi dosada, o CP e o ENZ2, com valores 27% maiores para o tratamento ENZ2. Esta enzima foi em grande parte inativada no pré-condicionador, com atividade residual inferior a 2% da inicial. Desta forma, a combinação de umidade (ao redor de 35%) e temperatura (acima de 77°C) a que foi submetido o alimento durante os 17 a 27 segundos que permaneceu no condicionador praticamente inativaram toda a atividade da fitase.

Os valores de açúcares redutores foram muito baixos, não indicando a presença nem mesmo a liberação destes pelas enzimas. Ao contrário, os açúcares redutores diminuíram após o pré-condicionador e principalmente após a extrusão. Segundo HUBER (1991) explicações para este fato se apóiam na possibilidade de ter ocorrido reações de complexação entre os açúcares redutores e aminoácidos, proteínas e lípides do alimento. Estas reações são aceleradas pela temperatura e pressão durante a extrusão, formando complexos que não são detectados pelo método de açúcares redutores. Estes complexos lipo-carboidrato e amino-carboidratos representam as reações de caramelização. Elas reduzem a digestibilidade dos nutrientes, mas podem ocasionar aumento de sabor e odor. De qualquer modo, as possibilidades destas complexações tornam a dosagem de açúcares redutores um método inadequado para se estudar o efeito hidrolítico das enzimas exógenas sobre seus substratos durante o processo de extrusão. Sugere-se, com isto, que outros métodos devam ser explorados para se verificar a ação das enzimas, talvez a própria dosagem dos complexos lipo-carboidrato e amino-carboidratos.

### **5.3. Digestibilidade aparente dos nutrientes**

Os resultados de ingestão de nutrientes e coeficientes de digestibilidade aparente estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Ingestão de nutrientes e coeficientes de digestibilidade aparente das dietas experimentais com adição de diferentes misturas de enzimas.

ITEM	DIETAS				EPM <sup>1</sup>	Valor de p	CONTRASTES	
	CN	CP	ENZ1	ENZ2			ENZ2Pex	CN versus FT <sup>2</sup>
Peso corporal médio (kg)	11,32 <sup>a</sup>	10,98 <sup>a</sup>	11,02 <sup>a</sup>	10,51 <sup>a</sup>	11,00 <sup>a</sup>	0,97	0,9627	
<b>Ingestão (gramas por cão por dia)</b>								
Matéria seca	146,03	159,21	160,25	161,08	159,01	10,72	0,8580	-
Matéria orgânica	144,14	156,10	156,80	157,20	155,19	10,50	0,8927	-
Proteína bruta	41,55	44,53	44,58	44,74	44,17	2,99	0,9286	-
Extrato etéreo ácido	18,15	19,29	19,11	19,05	18,81	1,29	0,9600	-
Fibra dietética total	24,31	24,76	24,77	24,85	24,53	1,60	0,1116	-
Amido	64,47	62,78	69,97	69,63	68,74	4,60	0,3452	-
<b>Coefficientes de digestibilidade aparente (%)</b>								
Matéria seca	81,46 <sup>a</sup>	76,19 <sup>b</sup>	76,16 <sup>b</sup>	76,08 <sup>b</sup>	76,81 <sup>b</sup>	0,99	0,0023	<0,0001
Matéria orgânica	86,30 <sup>a</sup>	81,37 <sup>b</sup>	80,78 <sup>b</sup>	81,79 <sup>b</sup>	81,53 <sup>b</sup>	0,74	<,0001	<0,0001
Matéria Mineral	26,17	21,42	25,03	24,37	25,43	3,86	0,8382	-
Proteína bruta	87,30 <sup>a</sup>	83,44 <sup>b</sup>	83,14 <sup>b</sup>	83,15 <sup>b</sup>	83,07 <sup>b</sup>	0,85	0,0105	0,0002
Extrato etéreo ácido	91,72 <sup>a</sup>	86,90 <sup>b</sup>	86,68 <sup>b</sup>	86,14 <sup>b</sup>	86,72 <sup>b</sup>	0,46	<,0001	<0,0001
Fibra dietética total	35,36	32,90	28,93	28,04	38,94	3,17	0,1750	-
Amido	99,07	99,19	99,60	99,39	99,51	0,22	0,1048	-
Energia bruta	86,57 <sup>a</sup>	81,88 <sup>b</sup>	81,13 <sup>b</sup>	81,15 <sup>b</sup>	81,88 <sup>b</sup>	0,77	0,0001	<0,0001
Energia metabolizável aparente (kcal/kg MS)	4117 <sup>a</sup>	3860 <sup>b</sup>	3780 <sup>b</sup>	3871 <sup>b</sup>	3865 <sup>b</sup>	36,52	<,0001	<0,0001

CN – controle negativo; CP – controle positivo; ENZ1 – mistura de enzimas 1, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U β-glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198,4 U glicoamilase; 1,910 U fitase); ENZ 2 – mistura de enzimas 2, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U β-glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198,4 U glicoamilase; 1,910 U fitase; 9000 U/kg α-amilase); ENZ2Pex – mistura de enzimas 2 adicionado por cobertura, após a extrusão, por Kg de ração.

<sup>1</sup> - Erro padrão da média, n=6 animais por dieta.

<sup>2</sup> – CN versus FT (CP + ENZ1+ ENZ2 + ENZ2Pex).

<sup>3</sup> – CP versus ENZ (ENZ1+ENZ2+ ENZ2Pex).

<sup>a, b</sup> - Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Todas as dietas foram adequadamente consumidas pelos cães, não ocorreu episódios de recusa alimentar ou diarreia nos animais, o que sugere tolerância a mistura de enzimas na inclusão estudada. Não foram verificadas diferenças no consumo de nutrientes entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo ácido e energia bruta foram menores nas dietas com farelo de trigo, em relação ao CN. Menor digestibilidade dos nutrientes pela adição de farelo de trigo era esperada, em função da elevada quantidade de fibra alimentar deste ingrediente (33%) e da influência negativa da fibra na digestibilidade de alimentos para cães (FAHEY et al., 1990b; MIDDELBOS et al., 2007).  $\beta$ -glucanos e pentosanas (arabinoxalanos) se tornam solúveis no trato digestório. A solubilização parcial dos arabinoxalanos contidos no trigo produz aumento da viscosidade do conteúdo intestinal, alterando a ação das enzimas digestivas, reduzindo o fluxo da digesta e a absorção de nutrientes (NAGASHIRO, 2007). Em um ambiente viscoso, nutrientes como gordura, amido e proteínas se tornam menos acessíveis e disponíveis as enzimas endógenas, resultando em menor digestibilidade desses nutrientes. Além disso, a elevada viscosidade deste bolo alimentar pode contribuir para formação de quadros de diarreia.

Em relação à mistura de enzimas, não se verificou diferenças nos CDA dos nutrientes com sua adição às dietas ( $p>0,05$ ). A digestibilidade da fibra dietética foi semelhante entre tratamentos ( $p=0,1750$ ), também sem ação da mistura de enzimas sobre a digestibilidade deste nutriente. Desta forma, a adição da mistura de enzimas nos tratamentos ENZ1, ENZ2 e ENZ2Pex não resultou em mudanças nas propriedades antinutricionais dos PNA's. TWOMEY et al. (2003b) verificaram efeitos positivos da adição de enzimas à dietas de cães que continham PNA's, com melhora nos CDA da matéria seca, extrato etéreo e na qualidade nas fezes. No entanto, estes autores empregaram suplementações maiores de xilanase (340 U/kg) e  $\beta$ -glucanase (30U/kg) que as adicionadas no presente estudo. É interessante, todavia, que os mesmos autores, em estudo anterior, não observaram efeito da adição de 82 U/kg de  $\beta$ -glucanase, 60.000 U/kg de hemicelulase e 225 U/kg de xilanase em dietas para cães contendo sorgo e milho (TWOMEY et al., 2003a). A diferença de resultados pode ser

explicada, possivelmente, pelas concentrações de PNA das rações experimentais, que foram baixas nas dietas com arroz, milho ou sorgo (entre 3% e 5%; TWOMEY et al., 2003a) e mais elevadas nas dietas com cevada e mistura de farelo de trigo com rolão de trigo entre 9,6% e 11%; (TWOMEY et al., 2003b). Mesmo se considerando as diferenças de método de análise de PNA entre TWOMEY et al. (2003a), TWOMEY et al. (2003b) e a do presente estudo, as dietas aqui testadas apresentaram 14% de fibra dietética, aproximadamente 40% a mais que TWOMEY et al. (2003b). Desta forma, além da menor adição de enzimas no presente estudo empregou-se também maiores teores de PNA's, o que provavelmente também colaborou para a ausência de resultados das misturas de enzimas.

#### **5.4. Avaliação do pH e concentração de ácidos graxos de cadeia curta, ácido láctico e amônia das fezes**

Dentre os parâmetros fecais estudados (Tabela 8), o escore fecal foi o único que não diferiu entre dietas ( $p>0,05$ ). A produção de fezes aumentou e o teor de matéria seca e pH das fezes diminuíram com a inclusão de farelo de trigo ( $p<0,05$ ), sem efeito da adição de enzimas aos produtos ( $p>0,05$ ). Fibras insolúveis, como o farelo de trigo, possuem a característica de reter água, ocasionando aumento no volume fecal (MEYER; TUNGLAND, 2001). A capacidade de reter água está diretamente relacionada ao comprimento médio da fibra, para celulose e a fibra do farelo de trigo, a retenção de água varia de 3,5 a 10 vezes seu peso (KAWAUCHI, 2008). Do ponto de vista comercial, o volume e a consistência das fezes produzidas pelos cães são características relevantes. Estudos têm demonstrado o aumento na produção fecal devido à utilização de ingredientes vegetais. No entanto, não houve episódios diarreicos e o escore fecal se manteve dentro do ideal para todos os tratamentos.

Os resultados da avaliação dos produtos da fermentação estão na Tabela 8.

A redução do pH das fezes sinaliza maior fermentação intestinal nos cães mediante consumo de farelo de trigo (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991). Isto é confirmado pelas maiores concentrações de AGCC totais nas fezes destes animais ( $p<0,001$ ). Para estes parâmetros, não se verificou efeito da adição de enzimas.

**Tabela 8.** Produção, características, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e amônia fecal de cães mediante consumo das dietas experimentais com adição de diferentes misturas de enzimas.

ITEM	DIETAS				EPM <sup>1</sup>	Valor de p	CONTRASTE		
	CN	CP	ENZ1	ENZ2			ENZ2Pex	CN versus FT <sup>2</sup>	CP versus ENZ <sup>3</sup>
pH fecal	7,05 <sup>a</sup>	6,56 <sup>b</sup>	6,55 <sup>b</sup>	6,68 <sup>ba</sup>	6,46 <sup>b</sup>	0,09	0,0011	<0,0001	0,9691
Escore Fecal	4,08	4,05	4,10	4,03	4,21	0,17	-	-	-
MS fecal (%)	47,73 <sup>a</sup>	41,41 <sup>b</sup>	41,76 <sup>b</sup>	38,60 <sup>b</sup>	41,46 <sup>b</sup>	1,06	<0,0001	<0,0001	0,5174
g fezes MN cão/dia	53,24 <sup>b</sup>	90,86 <sup>a</sup>	90,78 <sup>a</sup>	97,55 <sup>a</sup>	88,26 <sup>a</sup>	6,77	0,0018	<0,0001	0,8660
g fezes MS cão/dia	25,28 <sup>b</sup>	37,79 <sup>a</sup>	37,90 <sup>a</sup>	37,51 <sup>a</sup>	36,62 <sup>ba</sup>	2,93	0,0344	0,0011	0,8973
<b>(mMol/kg de MS)</b>									
Ác. Acético	102,44 <sup>b</sup>	187,27 <sup>a</sup>	172,93 <sup>a</sup>	182,03 <sup>a</sup>	176,27 <sup>a</sup>	16,34	<0,0001	0,0003	0,5941
Ác. Propiônico	51,17 <sup>b</sup>	106,78 <sup>a</sup>	101,41 <sup>a</sup>	103,56 <sup>a</sup>	102,57 <sup>a</sup>	9,22	<0,0001	<0,0001	0,7128
Ác. Butírico	19,94 <sup>b</sup>	31,06 <sup>a</sup>	28,45 <sup>ba</sup>	28,77 <sup>ba</sup>	27,23 <sup>ba</sup>	2,45	<0,0001	0,0034	0,3152
AGCC totais	173,55 <sup>b</sup>	325,11 <sup>a</sup>	302,79 <sup>a</sup>	314,36 <sup>a</sup>	306,07 <sup>a</sup>	27,38	<0,0001	<0,0001	0,5878
Ác. Láctico	0,83	1,50	1,07	1,06	1,02	0,02	-	-	-
<b>(mgNH<sub>3</sub>/g MS fecal)</b>									
NH <sub>3</sub> fecal	0,526 <sup>a</sup>	0,433 <sup>ba</sup>	0,413 <sup>b</sup>	0,396 <sup>b</sup>	0,415 <sup>b</sup>	0,02	0,0013	0,0005	0,3935

CN – controle negativo; CP – controle positivo; ENZ1 – mistura de enzimas 1, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U β-glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198,4 U glicoamilase; 1,910 U fitase); ENZ 2 – mistura de enzimas 2, adicionada antes da extrusão por Kg de ração (4,5 U β-glucanase; 16 U xilanase; 1,5 U celulase; 198,4 U glicoamilase; 1,910 U fitase; 9000 U/kg α-amilase); ENZ2Pex – mistura de enzimas 2 adicionado por cobertura, após a extrusão, por Kg de ração.

<sup>1</sup>Erro padrão da média, n=6 animais por dieta.

<sup>2</sup> – CN versus FT (CP + ENZ1+ ENZ2 + ENZ2Pex).

<sup>3</sup> – CP versus ENZ (ENZ1+ENZ2+ ENZ2Pex).

<sup>a, b</sup> - Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Os teores de amônia fecal reduziram-se nos tratamentos com farelo de trigo em relação ao CN ( $P < 0,001$ ), sem efeito da adição de enzimas ( $p > 0,05$ ).

A maior produção intestinal de AGCC mediante consumo de farelo de trigo pode, até certo ponto, apresentar efeito positivo para a saúde intestinal. Somando-se este fato à diminuição do pH e amônia fecal, verifica-se maior atividade de bactérias ácido lácticas e menor fermentação de proteína no cólon. Assim, apesar da maior digestibilidade da proteína da dieta CN (a base de farinha de vísceras de frango) a maior disponibilidade de carboidratos fermentáveis nas dietas com farelo de trigo reduziu a fermentação de proteínas no cólon e alterou de forma benéfica a concentração de produtos finais de fermentação nas fezes cães (ADAMS, 2003; SWANSON; FAHEY, 2007).

O equilíbrio bacteriano intestinal é complexo, qualquer composto ingerido ou substância que passa pelo intestino é um substrato potencial para fermentação ou transformação bacteriana, mudando a composição e/ou atividade metabólica dos microrganismos (TESHIMA, 2003). Espécies de bactérias proteolíticas, que incluem os gêneros *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* e algumas espécies de *Eubacterium*, encontrando substrato produzem compostos tóxicos como amônia, aminas biogênicas e fenóis. Já a fermentação de carboidratos por *Bacterioides* e *Bifidobacterium* e por bactérias lácticas, como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Enterococcus* resulta na produção de AGCC, importante por aumentar a disponibilidade de energia para as células intestinais, contribuir positivamente na digestão e metabolismo do hospedeiro, além de atenuar os efeitos nocivos dos produtos da degradação das proteínas (ADAMS, 2003; TESHIMA, 2003; KAMRA, 2005; VANHOUTTE et al., 2005).

No presente estudo a concentração de butirato nas fezes aumentou em média 45% mediante consumo das dietas com farelo de trigo ( $p < 0,01$ ). Em estudos com camundongos SCHEPPACH et al. (2004) e HOLLMANN; LINDHAUER (2005) verificaram que a fermentação anaeróbica dos PNA's do trigo ocorre preferencialmente pelas bifidobactérias presentes no intestino, com importante produção de butirato. A concentração de ácido bútrico está relacionada com a capacidade moduladora da

expressão de apoptose de células inflamatórias, de modo que a adição de farelo ou dos grãos de trigo na dieta pode ser benéfica à saúde intestinal, controlando o desenvolvimento de lesões neoplásicas ou pré-neoplásicas. Acetato e propionato tiveram aumentos médios em concentração nas fezes dos cães de 57% e 49%, respectivamente. Estes AGCC podem estimular a produção de interferon-gama (CAVAGLIERI et al., 2003), ativando células efectoras e melhorando a imunidade e a eliminação de patógenos e outros antígenos (ABBAS, 2008), podendo assim melhorar a resposta imune intestinal dos animais.



## 6. CONCLUSÕES

A utilização de 25% de farelo de trigo aumenta a fibra da dieta, reduzindo a digestibilidade dos nutrientes e aumentando das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta com sucessiva diminuição da quantidade de amônia das fezes. A adição das misturas enzimáticas em dietas com farelo de trigo, nas doses e maneiras empregadas não resultaram em mudanças na digestibilidade e qualidade fecal. No entanto, o uso das enzimas  $\alpha$ -amilase e glicoamilase reduziram o custo de energia elétrica e aumentaram a produtividade da extrusora.

## 7. REFÊRÊNCIAS<sup>1</sup>

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.

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

ADAMS, C. A. Carbohydrates nutrition's: non-digestible oligosaccharides. In: \_\_\_\_\_ **Nutricines – food components in health and nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. 342 p.

ANDERSSON, Y.; HEDLUND, B.; JONSSON, L.; SVENSSON, S. Extrusion cooking of a high-fiber cereal product with crispbread character. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 58, n. 5, p. 370-374, 1981.

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**, Champaign, v. 62, p. 91-102, 1983.

ARAUJO, D. M.; SILVA, J. H. V.; MIRANDA, E. C.; ARAUJO, J. A.; COSTA, F. G. P.; TEIXEIRA, E. N. M. Farelo de trigo e complexo enzimático na alimentação de poedeiras semipesadas na fase de produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 5, p. 843-848, 2008.

ASPINALL, G. O. Chemistry of soybean carbohydrates. In: McCANN, L. **Soybean utilization alternatives**. St. Paul: Minnesota, 1988. p. 117-129.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. AAFCO. **Official publication 2009**. Washington, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MASSAS ALIMENTÍCIAS – ABIMA. Disponível em: [http://www.abima.com.br/est\\_mtrigo.asp](http://www.abima.com.br/est_mtrigo.asp). Acesso em: 17 jan. 2011.

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. AOAC. **Official and tentative methods of analysis**. 16. ed. Washington, 1995.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUNTANEN ,K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n.3 p. 257-270, 1992.

---

<sup>1</sup> - Elaborada de acordo com normas da NBR – 6023 – ago/2002.

BEDFORD, M. R. Mechanism of action and potential environmental benefits from the uses of feed enzymes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam v. 53, n. 2, p. 145–155, 1995.

BEDFORD, M. R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition – their current value and future benefits. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 1-13, 2000.

BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Marlborough: CABI Publishing, 2001. 432 p.

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

BURHAN A.; NISA, U.; GOKHAN, C.; OMER, C.; ASHABIL, A.; OSMAN, G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 1397-1403, 2003.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 254-267, 2005.

CAVAGLIERI, C.R.; NISHIYAMA, A.; FERNANDES, L. C.; CURI, R.; MILES, E. A.; CALDER, P.C. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and productions of pro and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. **Life Sciences**, Elmsford, v. 73, n. 13, p. 1683-1690, 2003.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. Enzimas. In: \_\_\_\_\_ **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989. 446 p.

CHOCT, M. Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance. *Feed Milling International*, v. 191, n.6, p.13-26, 1997.

CHOCT M.; KOCHER, A.; WATERS, D. L. E. A comparison of three xylanases on the nutritive value of two wheats for broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 92, p. 53–61, 2004.

CLASSEN, H. L. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 21-27, 1996.

COSSON, T.; VENDRELL, A. M. P.; TERESA, B. G.; REÑÉ, D.; TAILLADE, P.; BRUFAU, J. Enzymatic assays for xylanase and  $\beta$ -glucanase feed enzymes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 77, n. 4, p. 345-353, 1999.

COSTA, F.G.P.; OLIVEIRA, C.F.S.; MOURA, B.H.A. et al. Effects of exogenous enzymes (Allzyme® SSF and Allzyme Vegpro™) on performance of semi-heavy layers at peak production. In: INTERNATIONAL POULTRY SCIENTIFIC FORUM, 2010, Georgia. **Proceedings...** Georgia: POULTRY SCIENTIFIC, 2010f. (CD-ROM).

COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. Beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v. 17, p. 259-289, 1993.

COWIESON, A. J. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 119, n. 4, p. 293-305, 2005.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon: A review. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 70, n. 6, p. 443-459, 1991.

CUMMINGS, J. H.; EDMOND, L. M.; MAGGE, E. A. Dietary carbohydrates and health: do we still need the fibre concept ? **Clinical Nutrition Supplements**, v. 1, p. 5-17, 2004.

DILLON, A. Celulases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 243-270.

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**, Champaign, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.

EVERS, T.; MILLAR, S. Cereal grain structure and development: some implications for quality. **Journal of Cereal Science**, London, v. 36, n. 3, p. 261-284, 2002.

FAHEY, G. C.; MERCHEN, N. R.; CORBIN, J. E.; HAMILTON, A. K.; SERBE, K. A.; LEWIS, S. M.; HIRAKAWA, D. A. Dietary fiber for dogs: I - Effects of graded levels of dietary beet pulp on nutrient intake, digestibility, metabolizable energy and digesta mean retention time. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 12, p. 4221-4228, 1990b.

FROETSCHNER, J.; PANZER, D. D.; WILSON, J. W.; WILLIAMS, S. N. **Enzyme lowers energy input in extruded dog food**, 2006. Disponível em: <<http://www.allaboutfeed.net/article-database/enzyme-lowers-energy-input-in-extruded-dog-food-id1092.html>>. Acesso em: 01 fev. 2011.

GARCIA, E. R. M.; MURAKAMI, A. E.; FERRIANI BRANCO, A.; FURLAN, A.C.; MOREIRA, I. Efeito da suplementação enzimática em rações com farelo de soja e soja integral extrusada sobre a digestibilidade de nutrientes, o fluxo de nutriente na digesta ileal e o desempenho de frangos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n. 5, p. 1414-1426, 2000.

GENEROSO, R. A. R.; GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. R.; 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**, Viçosa, v. 37, n. 7, p. 1251-1256, 2008.

GIBSON, G. R.; ROBERTFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GOES, S. P.; RIBEIRO, M. L. L. Alfa-galactosidade: aspectos gerais e sua aplicação em produtos a base de soja. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 111-119, 2002.

GRIESHOP, C. M.; FAHEY, G. C. Jr. The role of soy in companion animal nutrition. In: Petfood Forum, Chicago IL, 2000. p.138-152.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

HELSEBY, N. A.; ZHUA, S.; PEARSON, A. E. Antimutagenic effects of wheat bran diet through modification of xenobiotic metabolising enzymes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 454, n. 2, p. 77-88, 2000.

HENDRIX, D. L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop science (Madison)**, Madison, v.25, n. 6, p.1306-1311, 1993.

HOLLMANN, J.; LINDHAUER, M. G. Pilot-scale isolation of glucuronoarabinoxylans from wheat bran. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 59, n. 2, p. 225-230, 2005.

HAUCK, B. Extrusion cooking system In: McELLINEY, R. R. Feed manufacturing technology IV. Arlington, 1994. p. 131-140.

HUBER, G. R. Carbohydrates in extrusion processing. **Food Technology**, Chicago, v. 43, n. 3, p. 160-161, 1991.

IMMERSEEL, F. V.; CAUWERTS, K.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Feed additives to control salmonella in poultry. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 58, p. 501-513, 2002.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, Bangalore, v.89, n.1, p. 124-134, 2005.

KAWAUCHI, I. M. **Farelo de glúten de milho 21 na alimentação de cães adultos**. 2008. 71f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

- KONIETZNY, U.; GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **Journal of Food Science Technology**, London, v. 37, n. 7, p. 791–812, 2002.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **Fems Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.
- LEHNEN, C. R.; LOVATTO, P. A.; ROSSI, C. A.; ANDREATTA, I.; SILVA, M. K. Digestibilidade ideal de nutrientes em suínos alimentados com dietas contendo fitase: uma meta-análise. In: III SEMINÁRIO: SISTEMAS DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA – ZOOTECNIA. 2007. (CD-ROM)
- MAES, C.; VANGENEUGDEN, B.; DELCOUR, J. A. Relative activity of two endoxylanases towards water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. **Journal of Cereal Science**, London, v. 39, n. 2, p. 181-186, 2004.
- MARQUARDT, R. R.; BRENES, A.; ZHANG, Z.; BOROS, D. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v.60, n. 3, p.321-330, 1996.
- MATHLOUTHI, N.; JUIN, H.; LARBIER, M. Effect of xylanase and  $\alpha$ -glucanase supplementation of wheat- or wheat- and barleybased diets on the performance of male turkeys. **British Poultry Science**, London, v. 44, n. 2, p. 291-298, 2003a.
- MATHLOUTHI, N.; MOHAMED, M.A.; LARBIER, M. Effect of enzyme preparation containing xylanase and  $\alpha$ -glucanase on performance of laying hens fed wheat/barley- or maize/soybean meal-based diets. **British Poultry Science**, London, v. 44, n. 1, p. 60-66, 2003b.
- MATHLOUTH, N., L. SAULNIER, B. QUEMENER AND M. LARBIER. Xylanase, B-glucanase and other side enzymatic activities have greater effects on viscosity of several feedstuffs than xylanase or B-glucanase used alone or in combination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 18, p. 5121-5127, 2002.
- MEYER, D.; TUNGLAND, B. Non-digestible oligosaccharides and polysaccharides: Their physiological effects and health implications. In.: **Advanced Dietary Fibre Technology**, MCCLEARY, B.V; PROSKY, L. Oxford, UK: Blackwell Science, 2001. p. 455-470.
- MIDDELBOS, I. S.; FASTINGER, N. D.; FAHEY, G. C. Jr. Evaluation of fermentable oligosaccharides In diets fed to dogs in comparison to fiber standards. **Journal Animal of Science**, v. 85, p. 3033-3044, 2007.
- NAGASHIRO, C. Enzimas na nutrição de aves. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2007, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 2007. p. 307-327.

- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 153, p. 375-380, 1944.
- NERY, V. L. H.; LIMA, J. A. F.; NELO, R. C. A. Adição de enzimas exógenas na alimentação para leitões de 10kg à 30kg de peso. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v.29, n. 3, p. 794-802, 2000.
- NIGAM, P.; SINGH, D. Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute. **Process Biochemistry**, New York, v. 30, n. 2, p. 117-124, 1995.
- NRC. National Research Council. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, 2006. 398p.
- PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZLEON, A.; SOCCOL, V. T. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**. Essex, v. 77, n. 3 , p. 203-214, 2001.
- PENZ Jr., A. M. Enzimas em rações de aves e suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998. Botucatu- SP. **Anais...**, p. 165-178.
- PLUSKE, J. R. LINDERMANN M. D. Maximizing response in pig and poultry diets containing vegetable proteins by enzyme supplementation. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 14., 1998, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: ALLTECH, 1998. p. 375-391.
- POND, W. G.; CHURCH, D. C.; POND, K. R. **Basic animal nutrition and feeding**, 4. ed, New York: John Wiley & Sons, 1995. 615 p.
- PROSKY, L.; ASP, N. G.; FURDA, I.; DEVRIES, J. W.; SCWEIZER, T. F.; HARLAND, B. F. Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products: Collaborative study. **Journal AOAC**, v.75, p.360-367, 1992.
- PRYCE, J. D. A modification of the Barker-Summerson Method for the determination of latic acid. **Analyst**, London, v. 94, n. 125, p. 1121-1151, 1969.
- RAVINDRAN, V.; CABAHUG, S.; RAVINDRAN, G; BRYDEN, W. L. Influence of Microbial Phytase on Apparent Ileal Amino Acid Digestibility of Feedstuffs for Broilers: **Poultry Science**, Champaign, v. 78, n. 5, p. 699-706, 1999.
- 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 de aves e suínos: tabelas brasileiras**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. 186 p.

SAMARASINGHE, K. R.; MESSIKOMMER, C. W. Activity of supplemental enzymes and their effect on nutrient utilization and growth performance of growing chickens as affected by pelleting temperature. **Archiv fur tierernahrung**, Berlin, v. 53, n. 1, p. 45-58, 2000.

SAS INSTITUTE. **SAS onlinedoc 9.13**. Cary, 2004.

SATHE, S. K.; REDDY, N. R. Introduction. In: REDDY, N. R.; SATHE, S. K. **Food phytates**, Florida: CRC Press, 2002. p. 1-4.

SCHEPPACH, W.; LUEHRS, H.; MELCHER, R. Antiinflammatory and anticarcinogenic effects of dietary fibre. **Clinical Nutrition Supplements**, v. 1, n. 2, p. 51-58, 2004.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 135, n. 2, p. 1-41, 2007.

SELVENDRAN, R. R.; ROBERTSON, J. A. The chemistry of dietary fibre: a holistic view of the cell wall matrix. In: SOUTHGATE, D.A.T.; WALDROM, K.; JOHNSON, I.T.; FENWICK, G.R. (Ed.) **Dietary Fiber: Chemical and Biological Aspects**, Royal Society of Chemistry Special Publication, n.83. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1990.

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

SILVA, S. S. P.; SMITHARD, R. R. Effect of enzyme supplementation of a rye-based diet on xylanase activity in the small intestine of broilers, on intestinal crypt cell proliferation and on nutrient digestibility and growth performance of the birds. **British Poultry Science**, London, v. 43, n. 2, p. 274-282, 2002.

SILVA, J. H. V.; MUKAMI, F.; ALBINO, L. F. T. Uso de rações à base de aminoácidos digestíveis para poedeiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 1446-1451, 2000.

SILVIO, J.; HARMON, D. L.; GROSS, K. L.; MCLEOD, K. R. Influence of fiber fermentability on nutrient digestion in the dog. **Nutrition**, New York, v. 16, n. 4, p. 289-295, 2000.

SMITIS, C. H. M. ANNISON, G. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutritional-towards a physiologically valid approach to their determination. **World Poultry Science Journal**, Champaign, v. 52, p. 204-221, 1996.

SOTO-SALANOVA, M. F.; GARCIA, O.; GRAHAM, H. Uso de enzimas em dietas de milho e soja para frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1996, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1996, p. 71-76.



SPRING, P.; NEWMAN, K. E.; WENK, C.; MESSIKOMMER, R.; VUKIC VRANJES, M. Effect of pelleting temperature on the activity of different enzymes. **Poultry Science**, Champaign, v. 75, n. 2, p. 357-361, 1996.

SWANSON, K. S.; FAHEY, G. C. Jr. **Prebiotics in companion animal**. 2007. Disponível em: [http://www.engormix.com//e\\_articles\\_iew.asp?art=414&AREA=MAS](http://www.engormix.com//e_articles_iew.asp?art=414&AREA=MAS). Acesso em: 16 jun. 2010.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: ed. 2003. p. 35-60,

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**, Amsterdam, 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 Technology**, Amsterdam, v. 108, p.71-82, 2003b.

VANHOUTTE, T.; HUYS, G.; DE BRANDT, E.; FAHEY, G. C. JR.; SWINGS J. Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, n. 1, p. 65-71, 2005.

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

WU, Y. B.; RAVINDRAN, V. Influence of whole wheat inclusion and xylanase supplementation on the performance, digestive tract measurements and carcass characteristics of broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 129-139, 2004.

XAVIER, L. P.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C.; SANTOS, A. V.; SIMONE S. G. D. Trypsin-like activity of Membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepdoptera: Noctuidae). **European Journal of Entomology** , Branisovska, v. 102, n. 2, p. 147-153, 2005.

YAMKA, R. M.; HETZLER, B. M.; HARMOM, D. L. Evaluation of low-oligosaccharide, low-phytate whole soybeans and soybean meal in canine foods. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 2, p. 393-399, 2005.

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 Technology**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 121–132, 2003.

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**, Chicago, v. 67, n. 1, p. 88-94, 2006.

YIN, Y-L.; MCEVOY, J. D. G.; SCHULZE, H. Apparent digestibility (ileal and overall) of nutrients and endogenous nitrogen losses in growing pigs fed wheat (var. Soissons) or its by-products without or with xylanase supplementation. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 119-132, 2000.

YIN, Y-L.; BAIDOO, S. K.; SCHULZE H.; SIMMINS, P. H. Effects of supplementing diets containing hulls barley varieties having different levels of non-starch polysaccharides with  $\beta$ -glucanase and xylanase on the physiological status of the gastrointestinal tract and nutrient digestibility of weaned pigs. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 97-107, 2001.

ZAMBOM, M. A. Digestibilidade in vitro da matéria seca e da parede celular da casca do grão de soja comparativamente a outros alimentos. In: RENIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. (CD-ROM)

ZANELLA, I. Suplementação enzimática em dietas avícolas. In: Pré-simpósio de Nutrição Animal, 2001, Santa Maria, **Anais...**, p. 37-49.

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**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 2441-9, 1996.