

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO AMINOACÍDICA DE FONTES PROTEICAS  
PARA CÃES UTILIZANDO DIFERENTES METODOLOGIAS

Autor: Marcelino Bortolo  
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Scapinello

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Dezembro – 2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

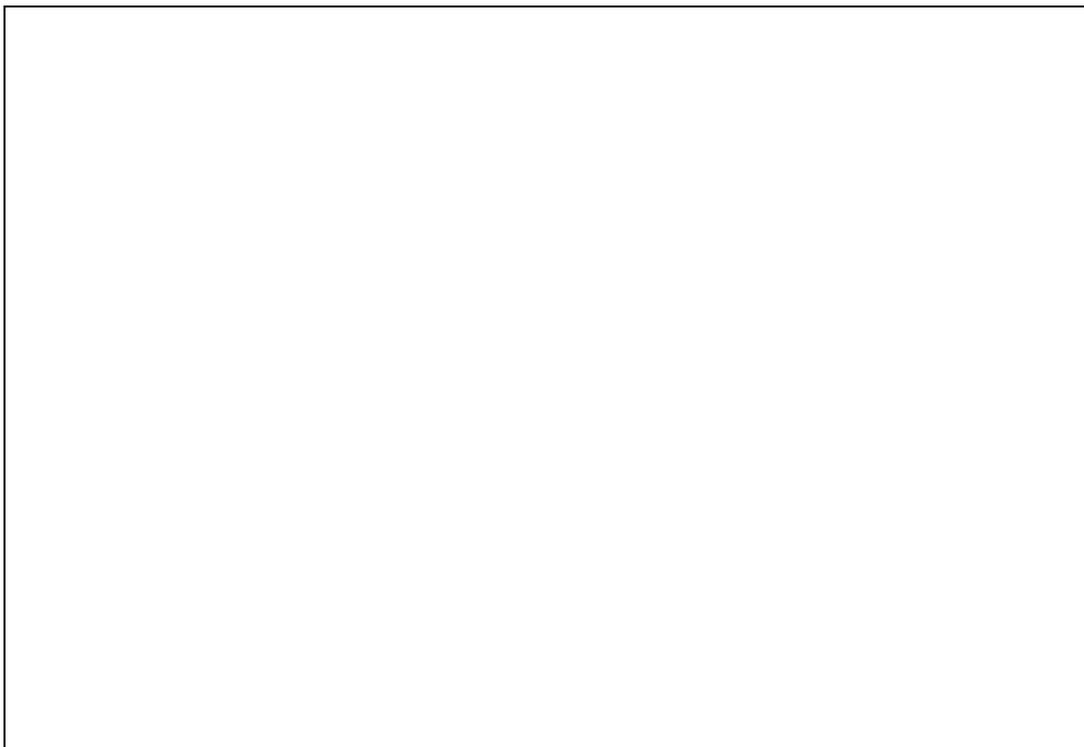
AVALIAÇÃO AMINOACÍDICA DE FONTES PROTEICAS  
PARA CÃES UTILIZANDO DIFERENTES METODOLOGIAS

Autor: Marcelino Bortolo  
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Scapinello

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Dezembro – 2008

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da  
Biblioteca Central da UEM



“Ainda que eu fale a língua dos homens  
e dos anjos, se não tiver amor,  
serei como o bronze que soa, ou como  
o címbalo que retine.  
Ainda que eu tenha o dom de profetizar  
e conheça todos os mistérios e toda a ciência;  
ainda que eu tenha tamanha fé a ponto  
de transportar montanhas,  
se não tiver amor nada serei.  
Ainda que eu distribua todos os  
meus bens entre os pobres  
e ainda que entregue meu próprio  
corpo para ser queimado,  
se não tiver amor,  
nada disso me aproveitará.”

Coríntios 13

A

meu Deus  
que me deu a direção  
em todas as coisas.

Aos

meus pais, Hygino e  
Antonia (*in memoriam*),  
porque foram o início de tudo

À

minha esposa Maristela pela compreensão  
demonstrada durante minhas ausências,  
companheirismo e pelo incentivo.

Às

minhas filhas Mariane e Maria Elisa,  
motivadoras e herança de  
Deus em minha vida

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

À Empresa Nutriara Alimentos Ltda, pela oportunidade oferecida e apoio para a realização deste curso, em especial, ao Marcos.

À Universidade Estadual de Maringá, por ter possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Scapinello, pela dedicada orientação, ensinamentos, estímulo e amizade.

Ao Prof. Alex Maiorka pela co-orientação, estímulo, amizade e apoio na realização dos trabalhos na UFPR.

À Universidade Federal do Paraná, Dpto de Zootecnia pela disponibilidade do canil LENUCAN e laboratório de análises.

Ao Departamento de Zootecnia, UEM, em especial o Prof. Geraldo T. dos Santos que muito contribuiu para a realização deste curso.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da UEM, Elias, Ivan, Furlan, Alice, Geraldo, Ulisses, Cimara e Furuya pelos valiosos ensinamentos.

Às colegas de curso Ana Paula e Nanci, pela amizade, apoio e demonstração de companheirismo.

À Ananda Félix pela dedicada atenção, simpatia e amor pela pesquisa e pelos animais experimentais e a sua companheira de trabalho Cleuza.

Aos funcionários do laboratório da UFPR, da UEM, da Nutriara e especialmente a Kerry Bioscience na Holanda, pelo auxílio na realização das análises.

Aos meus companheiros do trabalho pelo apoio e motivação recebidos durante todo o curso: Alexandre, Leonardo, Bueno, Sandra, entre outros tantos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

MARCELINO BORTOLO, filho de Hygino Bortolo e Antonia Recco Bortolo, nasceu em Arapongas, Paraná, no dia 22 de setembro de 1963.

Em dezembro de 1986, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 1987, foi contratado pela Secretaria de Agricultura do Estado do Paraná, seguido da Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural, Universidade Norte do Paraná e por último, Nutriara Alimentos Ltda onde exerce a função de Gerente Técnico de Pesquisa e Desenvolvimento.

Em dezembro de 1996 concluiu Especialização em Desenvolvimento Rural pela UFPR e em março de 1997, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Forragicultura, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de pastagens.

No dia 09 de dezembro de 2008, submeteu-se à banca para defesa da Tese.

## ÍNDICE

<b>RESUMO .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>I - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 – Aspectos da fisiologia digestiva dos cães .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 – Fontes proteicas.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3 – Perdas endógenas .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4 - Metodologias para a determinação da digestibilidade dos alimentos para cães .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5 – Técnicas para análise de aminoácidos.....</b>	<b>26</b>
<b>II – OBJETIVOS GERAIS .....</b>	<b>30</b>
<b>III - Avaliação aminoacídica fontes proteicas para cães utilizando diferentes metodologias .....</b>	<b>31</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>31</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>32</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>33</b>
<b>Material e métodos.....</b>	<b>35</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>41</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>61</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>66</b>

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivos avaliar a digestibilidade aparente de aminoácidos essenciais e não-essenciais das fontes proteicas farinha de carne e ossos bovina (FC), farinha de vísceras de frango (FV), farelo de glúten de milho 60% (FG) e farelo de soja (FS), matérias-primas normalmente utilizadas na formulação de dietas completas, assim como, a avaliação de metodologias para determinação da digestibilidade *in vivo* de técnicas de leitura de aminoácidos. Para avaliação das metodologias, utilizou-se a técnica tradicional de Coleta Total de excretas (CT) e para a técnica com indicadores (óxido crômico e a lignina modificada de eucalipto - LIPE<sup>®</sup>). Para a avaliação das técnicas de leitura de aminoácidos foram utilizadas a Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (HPLC), *Immobilized digestive enzyme assay* - IDEA e *Near Infrared reflectance* - NIR. O experimento foi realizado com doze cães adultos da raça Beagle em gaiolas metabólicas e as análises foram feitas em vários laboratórios específicos. O consumo das dietas experimentais não diferiu entre os diferentes ingredientes avaliados. A produção fecal na matéria natural da dieta com FS foi maior e diferiu de todas as outras dietas e teve o pior escore fecal. A LIPE superestimou a produção fecal na matéria seca (MS) em 22,32% comparados com a produção fecal de MS da CT. As maiores concentrações de aminoácidos essenciais foram encontradas nos ingredientes FG, seguido pela FV, FS e FC. Os resultados obtidos para os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) por meio da coleta total (CT) realizada pelo HPLC foram utilizados como padrão. O indicador LIPE mostrou ser uma metodologia eficiente para determinação dos CDA dos aminoácidos essenciais da

FV. A técnica IDEA não teve os valores de CDA diferentes em 76,4% e 70,5 % dos aminoácidos avaliados para FC e FV respectivamente, quando comparados com HPLC, porém diferiram totalmente dos CDAs do FS estimados pelo HPLC. Os CDAs determinados pelo IDEA para o FS foram superestimados. O NIR determinou com acurácia todos os CDAs da FV com exceção da histidina e treonina, porém para FC diferiu em 50% dos resultados. Utilizando o NIR somente a treonina e valina é diferiram dos resultados do HPLC. A lisina foi o aminoácido que teve a maior diferença de CDAs para o FG em todos os métodos utilizados comparados aos valores da literatura. As técnicas NIR e IDEA e a metodologia da LIPE<sup>®</sup> podem evitar o uso de animais em gaiolas metabólicas e a necessidade de infra-estruturas para se estimar os valores de aminoácidos digestíveis em cães.

## ABSTRACT

This work had the objectives to evaluate the nutritional profile of the protein sources as meat meal and bones, poultry meal, corn gluten 60% and soybean meal used in the formulation of complete and balanced diets for dogs, the evaluation of methodologies for determination of the apparent digestibility and the evaluation of techniques of amino acid determination. The nutritional profile evaluation had as focus the determination of the apparent digestibility of essential and not essential amino acids of these ingredients. For evaluation of the methodologies, it was the traditional technique of Total Collection of feces and for the technique with indicators the Chromic Oxide and the Lignin Modified of *Eucaliptus* (LIPE). For the evaluation of the techniques of amino acid determination it was used the liquid High Precision liquid Chromatography - HPLC, Immobilized digestive enzyme assay - IDEA and Near Infrared reflectance - NIR. The experiment was using Beagle dogs in metabolic cages and the analyses got in some specific laboratories. The consumption of the experimental diets did not differ between the evaluated ingredients. The fecal production in the natural matter of the diet with FS was higher and differed from all the other diets and had the worse fecal score. The LIPE overestimated the fecal production in the dry matter (DM) in 22,32% compared with the fecal production of DM of the CT. The highest essential amino acid concentrations were found in ingredients FG, followed by FV, FS and FC. The results gotten for the coefficients of apparent digestibility (CDA) through the total collection (CT) carried by the HPLC had been used as standard. The marker LIPE showed to be an efficient methodology for determination of the CDA of essential amino acids for FV. Technique IDEA respectively did not have different

values of CDA in 76,4% and 70,5% of amino acids evaluated for FC and FV, when compared with HPLC, however it totally differed from the CDAs of the FS gotten for HPLC. The CDAs determined by the IDEA for FS were overestimated. The NIR determined with accurate all the CDAs of FV with exception of the histidine and threonine, however for FC it differed in 50% of the results. Using the NIR only the threonine and valine were different from the results of the HPLC. The lysine was the amino acid that had the highest difference of CDAs for FG in all used methods compared with the values of literature. The techniques NIR and IDEA and the methodology of the LIPE® can prevent the use of animals in metabolic cages and the infrastructure necessity to estimate the values of digestible amino acids in dogs.

## **I - INTRODUÇÃO**

Reconhecidamente a nutrição de animais de companhia, especialmente os cães, tem sido foco de muitos questionamentos na atualidade no meio técnico, industrial e comercial. Poucos trabalhos científicos foram realizados para a solução de alguns requisitos básicos da nutrição canina. A utilização de conceitos da nutrição de aves e suínos ainda é muito comum e tem sido frequente devido a falta de informações específicas para as espécies canina e felina. Desta forma são esperados erros na nutrição animal em um setor que envolve volumes significativos em nossa economia e que vem crescendo ao redor de 11,2% ao ano (Associação Nacional dos Fabricantes de alimentos para animais de estimação - ANFALPET, 2007) necessitando de informações técnicas.

No Brasil, foram elaboradas aproximadamente 1.795 mil toneladas de alimentos para cães e gatos em 2007, que geraram um faturamento de 5,8 milhões de reais por ano. A população de animais de companhia no Brasil atinge os valores de 31 milhões de cães e 15 milhões de gatos, considerando os animais alimentados com alimentos balanceados (ANFALPET, 2008). Sabendo-se que este número cresce a cada dia, podemos observar a importância de alimentos balanceados e que possam garantir uma boa expectativa de vida a estes animais.

Em virtude da proximidade cada vez maior dos animais de companhia na vida dos seres humanos, o uso de conceitos e princípios da nutrição humana também tem sido usado em dietas para estes animais com frequência, tentando solucionar problemas e ansiedades criadas pelos seus proprietários ou criadores. Diferente da nutrição de espécies mais utilizadas para produção de proteína de origem animal para o consumo humano, os animais de companhia, especialmente os cães, têm algumas características peculiares que devem ser consideradas pelos nutricionistas quando da elaboração de dietas para cães. Entre elas, a longevidade, controle de obesidade, qualidade da pele e pelos, vivacidade, controle de alergias, um bom status de saúde, etc. Apesar da nutrição de animais de companhia não levar em consideração os aspectos, ganho de peso diário e conversão alimentar, entre outros utilizados na nutrição de animais para produção de carne e outros alimentos para humanos, entende-se que obter informações sobre a digestibilidade de proteínas e seus aminoácidos podem colaborar com os alvos nutricionais de longevidade, vivacidade, enfim qualidade de vida e status de saúde destes animais.

Considerando que os animais necessitam de nutrientes para sua manutenção, crescimento e reprodução, os ingredientes da dieta (denominada como alimento completo balanceado, conforme Instrução Normativa n.º 9 de julho de 2003 do Ministério da Agricultura e Abastecimento - MAPA) (BRASIL, 2002) têm a função de fornecer estes nutrientes para suprir as necessidades nutricionais do organismo do animal em condições saudáveis. Para isto, conhecer o valor biológico e a biodisponibilidade dos nutrientes nos ingredientes que compõem os alimentos é fundamental para um correto balanceamento das dietas para os animais de companhia (cães), conhecendo suas necessidades nutricionais. Isto permite estimar com uma melhor precisão a quantidade necessária para atender as necessidades nutricionais dos animais (POND et al., 1995).

A determinação da composição química e bromatológica dos nutrientes nos alimentos ou rações para cães, atualmente, é realizada pelos fabricantes basicamente através dos métodos: análises laboratoriais do produto final ou composição nutricional baseadas no conteúdo médio dos nutrientes contidos nos ingredientes provenientes de tabelas de composição de alimentos (CASE et al., 1998). Conforme a legislação vigente no Brasil, estas duas formas de avaliação são permitidas para registro e comercialização dos produtos (BRASIL, 2002).

Os alimentos para cães são apresentados aos consumidores tendo como base nutricional os nutrientes brutos ao invés de nutrientes digestíveis. Nas formulações dos alimentos também é utilizada a referência bruta, no entanto, esta prática pode induzir a algumas distorções nos valores nutricionais finais dos alimentos.

A ANFALPET (2007) publicou uma classificação de alimentos comerciais para cães e gatos. Nesta publicação foram definidos alguns padrões nutricionais que exigem valores mínimos de digestibilidade da matéria seca para que os alimentos sejam enquadrados na classificação adotada por esta entidade como: básico, padrão, prêmio e superprêmio. Cada fabricante deverá apresentar certificados ou laudos de digestibilidade para fazer o enquadramento do produto ou alimento nestas categorias, além de outros aspectos nutricionais e de qualidade. Isto implica em uma demanda significativa de testes de digestibilidade dos alimentos pelas indústrias do setor. Daí a importância de metodologias bem definidas e claras, assim como análises eficazes e rápidas. Com base nesta situação, a determinação da biodisponibilidade de nutrientes passa a ter cada dia mais importância no setor.

Alguns problemas metabólicos com consequências patológicas podem afetar drasticamente os animais que consomem alimentos formulados na base bruta levando, por exemplo, a doenças nutricionais quando um alimento é consumido por um longo período (DZANIS, 1994). O processamento dos alimentos, especialmente extrusão e secagem dos produtos, não estão previstos no momento da formulação e podem alterar os valores nutricionais dos alimentos afetando diretamente sua aceitabilidade, palatabilidade e biodisponibilidade dos nutrientes. A determinação dos coeficientes de digestibilidade dos alimentos representa uma medida quantitativa e qualitativa importante, pois determina a proporção de nutrientes biodisponíveis para os animais (CASE et al., 1998).

O estudo e a importância da digestibilidade de aminoácidos são relatados em outras espécies. Usando rações formuladas com valores de aminoácidos digestíveis provenientes de vários métodos de determinação, ELWELL e SOARES (1975), encontraram aumento de ganho de peso e melhores conversões quando utilizaram os valores de digestibilidade dos aminoácidos obtidos por meio do método tradicional de coleta total, em um ensaio de crescimento em frangos de corte.

Para os animais de companhia a determinação de aminoácidos digestíveis nos alimentos ainda é prática pouco explorada pelos fabricantes de alimentos. Sabe-se da importância destes para o processo vital dos animais, mas poucos resultados existem disponíveis. O fato mais importante não é propriamente econômico e sim nutricional. Balanceando-se dietas que atendam os requerimentos nutricionais de aminoácidos pode-se certamente, obter melhores resultados na longevidade e status de saúde dos animais.

As necessidades dietéticas de proteína são determinadas na medida em que satisfazem as necessidades em aminoácidos e nitrogênio do animal. Quanto mais estreita for a relação entre o perfil de aminoácidos suplementados pelo alimento e as exigências do animal (perfil corporal) maior será o valor biológico do alimento e menor será a porcentagem de proteína necessária na dieta.

As dietas proteicas para cães são importantes em função de duas razões: a primeira é que as proteínas proveem aminoácidos que os cães não podem sintetizar, mas são necessários para a síntese de muitas proteínas no corpo; a segunda é que as proteínas proveem aminoácidos dispensáveis (aminoácidos que podem ser sintetizados se existirem fontes de carbono e nitrogênio) que os animais necessitam para manutenção, crescimento, gestação e lactação. São dez os aminoácidos essenciais para cães: arginina (arg), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lis), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptofano (Thr) e valina (Val). A falta de aminoácidos essenciais em animais onívoros e cães resulta na redução do consumo de alimento (NRC, 2006).

Conhecendo a biodisponibilidade de um nutriente, pode-se afirmar que, quanto maior seu valor menor será a quantidade necessária na dieta para o atendimento das necessidades dos animais. Assim, alimentos para cães compostos por ingredientes de baixa disponibilidade devem apresentar maior quantidade de proteínas e gorduras, expressos na forma bruta em suas embalagens ou rótulos para compensar a baixa biodisponibilidade e atender as necessidades nutricionais dos animais (CARCIOFI, 2003). Os pesquisadores VAN KEULEN e YOUNG (1977) e POND et al (1995) afirmam que não é possível a determinação das necessidades nutricionais dos animais sem adequado conhecimento da biodisponibilidade de nutrientes dos alimentos que são utilizados.

Poucos resultados são encontrados na literatura a respeito deste aspecto até porque existem metodologias de pesquisas e análises laboratoriais que induzem a pequenos erros, mas quando somados podem gerar resultados pouco confiáveis.

Os procedimentos para medidas de digestibilidade em animais de companhia são descritos pelas Associações ANFALPET (Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Companhia) e a AAFCO (American Association of Feed Control Officials). Estes procedimentos são normalmente aceitos pela indústria de alimentos para animais de companhia. Entretanto, não significa que apresentam acurácia suficiente para determinação da digestibilidade. Desta forma, existe a necessidade de pesquisas que avaliem as metodologias e as técnicas de análises que podem subsidiar as instituições de pesquisa e os fabricantes de alimentos para cães.

### **1.1 – Aspectos da fisiologia digestiva dos cães**

O cão, embora da classe Mammalia e ordem Carnívora, da mesma forma que o gato, encontra-se na superfamília Canoidea, que inclui famílias com diferentes hábitos alimentar como onívoros e herbívoros (BORGES, 2002). Apesar de ser classificado como carnívoro, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é frequentemente considerado onívoro (CHURCH, 1991), pois seu trato digestório é mais parecido com o dos onívoros. São animais mamíferos, caracterizados por estômago simples, trato digestório curto e dentes caninos bastante desenvolvidos.

Taxonomicamente os cães são considerados por muitos nutricionistas como animais de hábito alimentar carnívoros. Com este conceito foram criadas dietas cuja base proteica deveria ser apenas de origem animal, gerando alimentos com altos níveis proteicos (fonte animal) e de gordura bruta (extrato etéreo) e baixos níveis de carboidratos e proteínas de origem vegetal alicerçada em serem dietas que possuiriam maior proximidade das dietas dos cães em seu habitat natural.

Este conceito está sendo modificado tendo em vista que os cães após dez mil anos de domesticação, têm ressaltado características alimentares de animais onívoros sem, porém, apresentarem qualquer modificação metabólica ou fisiológica. Outro aspecto

está baseado em que o setor industrial voltado para a alimentação canina, busca na fabricação destes alimentos, ingredientes com maior disponibilidade no mercado a preços mais acessíveis em função da distribuição de renda no Brasil.

O sistema digestório dos cães é constituído por um tubo que vai da boca ao ânus, sendo relativamente simples. Compreende os seguintes segmentos: boca e anexos (dentes, língua e glândulas salivares), esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon e reto) e ânus. Juntamente com estes devem ser considerados o fígado e o pâncreas como órgãos anexos e ligados aos processos de digestão dos alimentos.

A adaptação que os cães sofreram ao longo dos anos convivendo com o ser humano está baseada em características inerentes a sua capacidade natural de digestão. LASSITER e EDWARDS (1982) afirmam que se os animais forem alimentados com carne suas enzimas digestivas serão primeiramente liberadas para a digestão das proteínas. Por outro lado, se forem alimentados com altos níveis de carboidratos, a secreção gástrica apresenta elevadas taxas de carboidrases, para a degradação dos carboidratos.

Depois de ingeridos os alimentos e estando no estômago, os movimentos peristálticos misturam lentamente os alimentos com o suco gástrico, preparando-os para sua entrada no intestino delgado. Em geral, os líquidos saem do estômago com maior velocidade que os sólidos e o esfíncter pilórico controla a velocidade de passagem do alimento, que pode variar com o tamanho das partículas do mesmo e com a viscosidade do quimo (CASE et al., 1998).

Os alimentos, uma vez no intestino delgado formando o quimo, passam de um ambiente altamente ácido (estômago) para outro levemente alcalino, além de sofrer ação de diversas enzimas secretadas pelo pâncreas e outras substâncias que irão quebrar as moléculas de carboidratos, gorduras e proteínas, preparando-as para a absorção (CASE et al., 1998). É no intestino delgado que também ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes.

A partir do intestino delgado, o quimo passa para o intestino grosso onde ocorrem importantes processos de digestão não enzimática. O intestino grosso tem como principais funções a absorção de água e eletrólitos, o armazenamento de fezes e o desenvolvimento de processos de fermentação da matéria orgânica não degradada. O

esfíncter íleo cecal impede o refluxo do conteúdo do cólon para o intestino delgado e atua como válvula que somente permite o trânsito no sentido íleo-cecal.

A digestão microbiana, que ocorre no ceco, tem a principal função de agir no aproveitamento da fibra (LEEK, 1997). Cães e gatos apresentam baixa capacidade fermentativa no cólon, o que pode justificar o emprego de carboidratos estruturais como indicadores nestas espécies. Apesar deste fato, ANDREASI (1956) observou digestão de aproximadamente 6% da lignina e 10% da celulose em cães. Embora cães e gatos não apresentem exigências de fibras alimentares, sabe-se que este nutriente melhora a superfície absorptiva do cólon nestas espécies, além de manter o equilíbrio da flora microbiana do intestino grosso (SUNVOLD et al., 1995).

A digestão da proteína inicia-se no estômago, pela ação do ácido clorídrico, quebrando ligações entre as fitas de polipeptídios que estabilizam a molécula proteica, deixando, assim a fita mais aberta. Em seguida, a pepsina, uma endoenzima, inicia o processo de digestão propriamente dito, quebrando a molécula proteica em polipeptídios com peso molecular menor que o original.

Ao saírem do estômago, os peptídeos seguem para o intestino, onde a digestão proteica ocorre em duas fases: luminal (com ação de enzimas pancreáticas) e membranosa (com ação de enzimas produzidas pelo próprio intestino, que finalizam o processo de digestão, permitindo a absorção de aminoácidos e alguns oligopeptídios como di e tripeptídios).

Na fase luminal da digestão proteica, uma ação conjunta de endoenzimas (tripsina, quimiotripsina, elastase), que atuam no interior da cadeia polipeptídica e de exoenzima (carboxipeptidases A e B), que atuam nas extremidades da cadeia polipeptídica, produzem aminoácidos e oligopeptídios. À medida que este processo transcorre, por movimentos de mistura do intestino, os produtos da digestão tomam direção as paredes do intestino, aproximando-se das estruturas de absorção. Próximo a mucosa inicia-se a fase membranosa da digestão de proteína, onde enzimas produzidas pelo intestino (oligopeptidases, aminopeptidases, di e tripeptidases) encontram-se no glicocálice ou ligadas a membrana da célula absorptiva (enterócito) ou ainda dentro do enterócito (di e tripeptidases), finalizando o processo de digestão de proteínas e originando aminoácidos.

Considerando que algumas enzimas oligopeptidases como dipeptidases e tripeptidases podem atuar dentro do enterócito, isto indica a possibilidade de absorção

pela membrana apical do enterócito, de moléculas com dois ou três aminoácidos ligados. No entanto, a ação destas oligopeptidases no interior do enterócito faz com que somente aminoácidos passem pela membrana basolateral do enterócito, adentrando na circulação sanguínea do sistema porta.

Após esta etapa, os aminoácidos são absorvidos, num processo ativo com gasto de energia, ligados a transportadores presentes na membrana apical do enterócito, com sítios de ligação específicos para cada grupo de aminoácidos (básicos, ácidos e neutros). Uma vez dentro do enterócitos, os aminoácidos passam pela membrana basolateral do enterócito para o sistema porta por difusão e diferença de concentração.

As proteínas para cães têm uma importância para a sua nutrição em função das características fisiológicas e metabólicas que possibilitam uma digestão eficiente e rápida destes compostos. Os cães têm sido usados com um modelo de estudos para a nutrição humana nos últimos dois séculos e muitos destes trabalhos realizados por pesquisadores como MAGENDIE (1816), CHITTENDEN (1904), KAUFMANN (1905) e JACKSON (1928) revelaram a importância da proteína na nutrição de cães e dos seres humanos. Até que ROSE e RICE (1939) observaram que os mesmos dez aminoácidos essenciais para cães também eram essenciais para ratos (NRC, 2006) passando a usar estes animais para estimar exigência e disponibilidade de nutrientes.

Com exceção da prolina, todos os aminoácidos presentes na maioria das proteínas são  $\alpha$ -aminoácidos e possuem grupos  $\alpha$ -amino e  $\alpha$ -carboxílico, ambos envolvidos nas ligações peptídicas que são essenciais para a estruturação das proteínas. Cada aminoácido tem uma cadeia lateral sobre o  $\alpha$ -carbono que muda de tamanho a partir de um átomo de hidrogênio. Estas cadeias contribuem para a formação das estruturas secundárias e terciárias da proteína. Nutricionalmente são importantes as cadeias ácidas e básicas nas proteínas, pois podem doar e aceitar prótons dependendo do pH do meio em que a proteína está presente (NRC, 2006).

Muitos estudos têm sido conduzidos para determinar a disponibilidade de aminoácidos nos alimentos, entretanto, devido a variabilidade dos métodos, ainda não se chegou a um consenso sobre aquele que melhor avalia a digestibilidade de aminoácidos nos alimentos (ALBINO, 1991). De forma geral os conceitos de digestibilidade e disponibilidade para os animais definem o valor potencial da proteína dos ingredientes e dos alimentos. SIBBALD (1987) define a diferença entre os dois termos citando que a absorção dos nutrientes no sistema digestório é pré-requisito para a

sua utilização metabólica, mas não indica que tenha disponibilidade. Então a digestibilidade pode ser definida como a medida do desaparecimento da proteína e dos aminoácidos durante a passagem pelo sistema digestório, enquanto a disponibilidade é definida como a porção de aminoácidos da dieta que foi digerida, absorvida e utilizada para a síntese de proteínas.

Apesar de vários métodos serem utilizados para a determinação da disponibilidade biológica dos aminoácidos, são poucos os trabalhos que usam valores de aminoácidos disponíveis na formulação de rações (ALBINO et al., 1992b) ou alimentos para cães. Estes autores verificaram também, que todas as rações formuladas à base de aminoácidos digestíveis proporcionaram melhor conversão alimentar em frangos de corte.

A utilização da proteína é fator importantíssimo a ser considerado na formulação de rações para animais de companhia, especialmente a biodisponibilidade de aminoácidos nos alimentos ingeridos. A utilização das proteínas é dependente de fatores intrínsecos, inerentes ao alimento e fatores extrínsecos, como tipo de animal, idade, raça, e interações com outros nutrientes da dieta.

A concentração de aminoácidos nos alimentos varia em razão de vários fatores. Em grãos ocorrem variações entre espécie e, às vezes, dentro de espécie. O estágio fisiológico da planta, o solo, a estação do ano, além de outros fatores contribuem também para essas variações (ALBINO, 1991).

O teor de fibras do alimento, provenientes de ingredientes de origem vegetal, pode reduzir a digestibilidade dos aminoácidos e aumentar a perda de aminoácidos endógenos por provocar lesões nas células da mucosa do intestino e aumentar a produção de muco. A digestibilidade dos aminoácidos é reduzida em razão da formação de uma camada gelatinosa em torno dos mesmos. O farelo de soja apresentou menor digestibilidade da proteína quando comparado a fontes proteicas de origem animal (vísceras, pulmão e carne moída) em dietas fornecidas para cães (NEIRINK et al, 1991). Vale ressaltar que as fontes proteicas de origem animal utilizadas eram *in natura*, sendo esta muito pouca utilizada pela indústria principalmente em alimentos secos (< 12% de umidade). Segundo os autores este resultado pode estar relacionado com a maior quantidade de fibras deste ingrediente.

## 1.2 – Fontes proteicas

As proteínas têm funções essenciais na fisiologia animal, daí a importância para serem consideradas nas formulações de dietas para cães e, mais ainda, a composição das dietas estarem balanceadas em aminoácidos e se possível, digestíveis e de forma equilibrada (CARCIOFI, 2002). A utilização das proteínas pelos animais, por meio do trato gastrointestinal, é dependente de fatores intrínsecos, inerentes ao alimento e fatores extrínsecos, como tipo de animal, idade, raça, e interações com outros nutrientes da dieta. As fontes mais comuns de proteína de origem animal utilizados na fabricação de alimentos para cães são provenientes de tecidos animais (carnes frescas) e subprodutos (farinhas) derivados da indústria da carne bovina, ovina, suína, aves, peixe, ovos, leite, entre outras. E fontes de origem vegetal que incluem os grãos das oleaginosas (farelos e concentrados proteicos) e farelos obtidos após processos industriais.

Os aminoácidos contidos nas proteínas têm funções fisiológicas importantíssimas no organismo animal, envolvendo a formação das células de constituição corporal, síntese de proteínas de produção leite, pelos, pele, ossos, enzimas e hormônios, DNA e RNA, anticorpos, e transporte de nutrientes (SEIXAS et al.,2003), além disto, aminoácidos livres conferem sabor e paladar aos alimentos por meio dos neuroreceptores dos cães (NRC, 2006).

Os produtos de origem vegetal quando bem processados podem apresentar valor nutricional igual ou melhor do que os de origem animal. Dentre as fontes proteicas de origem vegetais mais comuns utilizadas na alimentação de cães existem o farelo de soja e o farelo de glúten de milho 60%. O farelo de soja é obtido a partir da moagem dos grãos de soja, para extração do óleo, que é destinado para consumo humano, e representa um dos ingredientes de maior importância utilizado em rações animais de produção, como também nos alimentos completos destinados a cães e gatos. Porém por ser um subproduto obtido após a extração do óleo de soja, o farelo de soja, passa por uma série de processamentos que podem afetar a sua qualidade nutricional. Além disso, a soja é uma planta leguminosa, que possui alguns fatores antinutricionais para os monogástricos, como: inibidores de tripsina, hemaglutininas, e outros, que devem ser destruídos pelo processamento térmico. A composição nutricional do farelo de soja é

avaliada através de análises bromatológicas como: umidade, proteína bruta, fibra bruta, cálcio e fósforo, que tem o objetivo de monitorar o padrão nutricional do ingrediente. No entanto, para garantir boa qualidade no processamento do farelo de soja utilizam-se análises como: atividade ureática e proteína solúvel que determinam a qualidade e disponibilidade dos nutrientes no farelo de soja, que podem ser afetados pelo processamento térmico inadequado do grão de soja, influenciando diretamente em seu valor nutricional.

O farelo de glúten de milho é obtido através da separação e concentração do glúten extraído do milho pelo processo de moagem úmida. É o resíduo seco de milho após a remoção da maior parte do amido e do gérmen, e da separação do farelo pelo processo empregado nas fabricações do amido de milho ou do xarope, por via úmida, ou ainda, pelo tratamento enzimático do endosperma. É uma excelente fonte de proteína e energia, mas não é muito palatável. Como nome comercial é denominado por protenose ou glutenose.

CARCIOFI (2002) observou que o farelo de glúten de milho 60% e o farelo de soja apresentaram maiores coeficientes de digestibilidade aparente para a proteína bruta do que farinha de carne e ossos e farinha de vísceras em cães. SÁ FORTES (2005), também trabalhando com cães para determinar a digestibilidade de diferentes fontes proteicas, verificou que o coeficiente de digestibilidade da proteína do farelo de soja (83,9%) foi maior do que a farinha de carne e ossos (80,1%) e a farinha de vísceras de frango (81,7%), e salienta que o processo de extrusão pode ter favorecido estes resultados para o farelo de soja. Neste mesmo trabalho, SÁ FORTES (2005) obteve os melhores resultados para a digestibilidade da proteína entre os ingredientes proteicos para o farelo de glúten de milho 60% que foi de 92,1%. Os ingredientes proteicos de origem vegetal, apesar de terem uma inclusão percentual não muito grande nas formulações de alimentos balanceados para cães (até 10%), têm apresentado resultados superiores aos ingredientes de origem animal. Neste contexto, SEIXAS et al. (2003) testaram dietas em cães com fontes proteicas de origem vegetal contra dietas com fonte de origem animal e verificaram que as dietas vegetarianas tiveram maiores valores de digestibilidade para a proteína bruta do que as dietas com fontes proteicas de origem animal.

Segundo o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2005) a farinha de carne e ossos é um ingrediente produzido por graxarias ou frigoríficos, sendo um subproduto da extração de gorduras a partir de ossos e outros tecidos da carcaça de animais (bovinos, suínos, ovinos, caprinos, equinos, bubalinos, etc.) não aproveitados para consumo humano. Este material é moído, cozido, prensado para extração da gordura e novamente moído. Não deve conter sangue, cascos, unhas, chifres, pelos e conteúdo estomacal, a não ser os obtidos involuntariamente dentro dos princípios de boas práticas de fabricação. Não deve conter matérias estranhas a sua composição e o cálcio não deve exceder a 2,5 vezes o nível de fósforo. Quando produzida em frigoríficos, normalmente é utilizado como matéria-prima, resíduos da desossa completa dos animais abatidos, e o tempo entre o abate e o processamento da farinha pode ser controlado, bem como as condições de estocagem do resíduo das carcaças até o momento de seu processamento. Quando produzido por graxarias, normalmente é utilizado como matéria-prima, resíduos de carcaças de animais coletados em açougues, supermercados, etc. Neste caso, não há controle das condições de estocagem do resíduo das carcaças até o momento de seu processamento. Quando a farinha de carne e ossos apresentar menos de 25% de cinzas, ou menos de 3,8% de fósforo, o produto passa a ser denominado apenas de Farinha de Carne (FC), possuindo aproximadamente 55% a 60% de proteína (DIFISA, 1989). Em função da origem do material, as farinhas podem ser classificadas como mistas (quando oriunda de diferentes espécies animais; ex: bovinos, suínos, ovinos etc.), ou simples (quando oriundas de uma única espécie animal; ex: farinha de carne e ossos bovina, farinha de carne e ossos suína, etc.).

A farinha de vísceras é obtida da cocção de vísceras de aves, sendo permitida a inclusão de cabeças e pés, no entanto, não deve conter penas, resíduos de incubatórios e outras matérias estranhas a sua composição, nem mesmo, deve apresentar contaminação com casca de ovo.

Nas fontes proteicas de origem animal, alguns aspectos como o conteúdo de matéria mineral e a temperatura de processamento a que são submetidas às farinhas de vísceras, carne e ossos, entre outras podem interferir negativamente na digestibilidade da proteína e consequentemente os aminoácidos (PARSONS et al., 1997). As variações nos teores de proteína bruta e dos aminoácidos nestes ingredientes de origem animal são muito grandes em função do processamento realizado pelas graxarias. FAHEY e

HUSSEIN (1997) encontraram variações em amostras de farinha de carne e ossos de até quatro pontos percentuais e 0,41 pontos percentuais para a lisina. Outro aspecto está relacionado com os altos níveis de matéria mineral nestas farinhas. CARCIOFI (2004) cita que o excesso de matéria mineral nas farinhas de origem animal pode levar a diminuição da digestibilidade dos alimentos balanceados.

A variabilidade encontrada nos níveis de aminoácidos nas farinhas de carne e ossos é dependente da relação de tecido ósseo e tendinoso, utilizados na elaboração das farinhas. Esta característica das farinhas pode ser observadas no trabalho de POZZA et al (2004) que avaliou em suínos diferentes partidas de fabricação de farinha de carne e ossos. Resultados com muita variabilidade também foram encontrados por ROSTAGNO et al (2005) para a composição de aminoácidos.

A esterilização das farinhas de carne e ossos está sendo exigido pelo Ministério da Agricultura do Brasil (MAPA) como medida preventiva para redução do risco a transmissão priônica da encefalopatia espongiforme bovina (EEB ou BSE) (BRASIL, 2003). Esta esterilização expõe, por meio das exigências do processo, as proteínas e os aminoácidos a uma temperatura de 133 graus Celsius, em 3,0 bar de pressão durante 20 minutos, conforme Instrução Normativa nº 15 de 29 de outubro de 2003 do MAPA. Visando avaliar estes efeitos, CARCIOFI et al. (2007) verificaram em cães o efeito da esterilização da farinha de carne e ossos submetida a temperatura de 133 °C, durante 20 minutos com 3 bar de pressão no digestor, sobre a digestibilidade da proteína em relação ao processamento tradicional. Usando galos cecotomizados os resultados indicaram que não houve variação nos valores de digestibilidade da proteína e outros nutrientes. O mesmo aconteceu com a digestibilidade verdadeira em relação aos aminoácidos digestíveis. Estes resultados diferem daqueles obtidos por JOHNSON et al. (1998) que verificaram menor coeficiente de digestibilidade de aminoácidos totais em dietas para cães contendo farinha de carne e ossos processada a 143 °C e a 129 °C.

### **1.3 – Perdas endógenas**

Para que se obtenha a digestibilidade verdadeira dos nutrientes e mais especificamente de aminoácidos é importante que seja considerado os componentes

endógenos como, mucina, células epiteliais, células microbianas, etc. provenientes do trato gastrointestinal. A digestibilidade verdadeira considera, para a obtenção de valores de digestibilidade, a fração fecal endógena.

Utilizando dietas com grande variação do conteúdo de proteína bruta, FAN (1995), estudou o impacto dos aminoácidos endógenos sobre a digestibilidade ileal de aminoácido em suínos, observando que a digestibilidade verdadeira ileal de aminoácidos foi constante. Entretanto, a digestibilidade aparente ileal aumentou com o aumento da concentração proteica até um plateau muito próximo da digestibilidade verdadeira. Isto ocorreu porque a contribuição endógena representa a maior contribuição quando se tem baixas concentrações de proteína nas dietas. Com 12% a 24 % de proteína no alimento a digestibilidade ileal da metionina variou de 88% a 92%, enquanto a verdadeira foi aproximadamente 94%. As estimativas do fluxo de nitrogênio endógeno ileal para gatos variou de 1,9 a 3,6 mg de N por grama de alimento seco ingerido quando medido em dietas livres de proteína versus alimentos com caseína hidrolisada enzimaticamente, respectivamente (HENDRICKS et al., 1996).

O conteúdo de fibras fermentáveis no alimento pode interferir nas medidas da digestibilidade do nitrogênio. Isto porque, a fermentação aumentada promove o aumento do crescimento microbiano, que aumenta o nitrogênio nas fezes e reduz a digestibilidade aparente do nitrogênio (HARMON, 2007).

Para se obter os valores de digestibilidade destes compostos e nutrientes muitas vezes são utilizados métodos evasivos (WALKER et al., 1994), tendo em vista a obtenção de melhores resultados de digestibilidade dos nutrientes contidos nos alimentos utilizados nas dietas de cães e gatos. Os componentes endógenos e as transformações oriundas dos micro-organismos no intestino delgado e grosso têm sido observados para melhor estimar esta digestibilidade dos alimentos (HARMON, 2007; YAMKA, 2005; YAMKA, 2006).

Alguns experimentos foram realizados para avaliar as metodologias utilizadas na determinação da digestibilidade verdadeira de aminoácidos. Galos cecotomizados foram usados para comparar a digestibilidade de aminoácidos no íleo com os obtidos em cães (JOHNSON et al., 1998). Estes autores concluíram que os valores obtidos para os aminoácidos digestíveis dos galos têm alta correlação com os obtidos para cães. Segundo CRISSEY e THOMAS (1987) a utilização de galos cecotomizados é outra

alternativa, uma vez que o ceco é o local de maior atividade microbiana. CARCIOFI et al. (2007) utilizaram galos cecotomizados para a mensurar as perdas endógenas de aminoácidos e nitrogênio e estimar o uso destes valores para a digestibilidade verdadeira em cães.

Por outro lado, avaliações *in vitro* também foram realizadas com resultados satisfatórios, porém com muitas dificuldades para obter um sistema que realmente seja compatível com o trato digestório de cães. Por isso, tem limitações de uso pelas indústrias do setor, apesar das altas correlações com a digestão *in vivo* (TONGLET et al., 2001).

O local no intestino delgado em que a digestão e a absorção de aminoácidos foram completadas é a porção terminal do íleo. Desta forma muitas pesquisas têm sido realizadas utilizando-se de cânulas neste local. A cirurgia para o uso das cânulas já vem de longo tempo e está reportada desde 1930, sendo que os mais recentes métodos têm sido publicados em suínos. Em cães, os primeiros estudos foram reportados por BRASS e SCHUNEMANN (1986) que descreveram o procedimento cirúrgico e mostraram que a digestibilidade aparente da matéria orgânica em cães canulados e não-canulados foi semelhante. Esta técnica foi muito aperfeiçoada e existem animais canulados que podem viver por vários anos. Apesar do sucesso nos resultados com o uso desta técnica, muitas dificuldades já foram constatadas com este procedimento cirúrgico, tais como: material com que são feitas as cânulas, os cães mordem e destroem as cânulas, é muito comum a formação de abscessos nas áreas próximas a fistula, além de problemas éticos nos centros de pesquisas em todo o mundo.

Entretanto, deve-se considerar que na porção terminal do íleo, o pH alto, a alta concentração de ácidos graxos de cadeia curta e o número de bactérias indicam a ocorrência de uma fermentação significativa (HARMON, 2007). HENDRICKS e SRITHARAN (2002) determinaram a digestão de nutrientes em vários locais do trato gastrointestinal utilizando animais sacrificados, registrando diferenças significativas de digestibilidade de alguns aminoácidos, como lisina e metionina comparadas com amostras coletadas nas fezes e no íleo. Isto indica que o local de coleta de amostras afeta as estimativas de digestibilidade, principalmente de aminoácidos e nitrogênio. Estima-se que 50% do Nitrogênio fecal é de origem bacteriana em cães (KARR-

LILIENTAL et al., 2004) e que a quantidade de nitrogênio varia com a fermentabilidade do alimento (fibras solúveis) em cães (SILVIO et al., 2000).

Comparativamente alguns resultados encontrados em aves, PARSONS et al (1982) estimaram que 20% dos aminoácidos perdidos nas excretas são de origem microbiana, e que galos cecotomizados produzem maior quantidade de aminoácidos endógenos na excreta que galos normais. JONHSON et al. (1986) citam que a taxa de degradação microbiana de aminoácidos é maior que a taxa de síntese, contribuindo para uma superestimativa da digestibilidade dos aminoácidos. Para eliminar esse efeito alguns pesquisadores utilizaram a metodologia de coleta da digesta na porção terminal do íleo, entretanto a técnica convencional requeria que as aves fossem sacrificadas. Uma modificação nesta técnica foi a introdução de uma cânula em T na porção final ileal, eliminando a necessidade do sacrifício das aves. A utilização de digesta ileal pode se prestar a outras determinações, como por exemplo, ácidos graxos. Do mesmo modo que ocorre com os aminoácidos, os microrganismos do intestino grosso e ceco podem bio-hidrogenar ácidos graxos insaturados, invalidando os dados de digestibilidade dos ácidos individualmente (AJUYAH et al., 1996).

SIBBALD (1976a) propôs uma metodologia para estimativa da energia metabolizável verdadeira que pode ser utilizada a determinação dos aminoácidos digestíveis. Esta metodologia considera a fração endógena e metabólica da dieta. Consiste basicamente em alimentar forçadamente galos adultos em balanço de nitrogênio com pequenas quantidades dos alimentos a serem testados. Para esta metodologia um grupo de animais é deixado em jejum, para obtenção das perdas metabólicas e endógenas. Esta metodologia é rápida e menos onerosa, porém é questionada pelo fato de que a excreção endógena e metabólica dos animais em jejum não é similar à excreção endógena e metabólica dos animais alimentados, pois os animais em jejum catabolizam quantidades variáveis de tecido corporal. LIKUSKI e DORELL (1978) avaliaram a digestibilidade aparente e verdadeira dos aminoácidos de várias amostras de farelo de milho e farelo de soja pela metodologia da alimentação forçada proposta por Sibbald. Os autores encontraram valores de digestibilidade verdadeira (corrigidas pelos valores de aminoácidos de aves em jejum) acima de 100% para o triptofano, cistina, metionina, lisina, tirosina, histidina e serina. A explicação para o ocorrido, segundo os mesmos pesquisadores, poderia ser as pequenas concentrações dos mesmos nos alimentos e excreta.

Uma técnica alternativa para determinar as perdas endógenas principalmente nitrogênio e aminoácidos é o uso de dietas isentas de proteína por meio da coleta total de excretas, pois pode evitar o uso de métodos evasivos em experimentação *in vivo*. Entretanto, esta técnica tem sofrido críticas devido a ausência de proteínas podendo resultar em redução na quantidade de enzimas gástricas e pancreáticas secretadas e um decréscimo geral na taxa de síntese proteica no corpo e no intestino. HENDRICKS et al. (2002) trabalhando com dietas isentas de proteínas em cães e ratos para comparar a excreção endógena ileal e fecal de aminoácidos, observaram que ocorre aumento no fluxo de aminoácidos endógenos quando da presença de peptídeos no trato digestório.

#### **1.4 - Metodologias para a determinação da digestibilidade dos alimentos para cães**

Alguns fatores relacionados com as metodologias a serem utilizadas interferem nos resultados tais como: período de adaptação, período de coleta de fezes, idade, condição de exercícios, raças, idade e forma de apresentação de alimentos (secos ou úmidos) a possibilidade de uso de diferentes tipos de indicadores e as diferentes técnicas e equipamentos para as análises laboratoriais. Para a realização dos ensaios de digestibilidade, a AAFCO (2006) recomenda um período de adaptação para cães de cinco dias no mínimo para que seja atingido o equilíbrio entre o consumo alimentar e a excreção fecal, além da normalização do trânsito intestinal dos indicadores.

Dois métodos são mais empregados para a realização de experimentos de digestibilidade *in vivo*: o método convencional ou de coleta total e o método dos indicadores. O método de coleta total é o mais utilizado para determinar a digestibilidade dos nutrientes e a energia metabolizável dos alimentos em várias espécies animais. Neste método o animal é alimentado com uma dieta de composição conhecida, sendo quantificado todo o consumo alimentar e a produção fecal num dado período de tempo. Desta forma é realizado um balanço entre o que foi ingerido e o que foi eliminado e a diferença corresponde aos nutrientes efetivamente digeridos e absorvidos. Para a realização destes testes, há necessidade dos animais serem mantidos em gaiolas metabólicas individuais apropriadas para a coleta total das fezes, sem que haja a contaminação por urina (AAFCO, 2006; ANFALPET, 2007). De forma indireta pode-se utilizar equações de predição por meio de parâmetros físicos e químicos (ROSTAGNO, 1990), apesar de que isto exige que se leve em conta para cálculos da

Energia Metabolizável que a proteína, carboidratos ou gorduras são considerados igualmente digestíveis (SIBBALD, 1980).

HENDRICKS e SRITHARAN (2002) compararam a digestibilidade da proteína e de aminoácidos até a porção distal do íleo com a porção total do trato digestório de cães e verificaram que existem diferenças significativas nos valores de aminoácidos digestíveis. Os cães utilizados neste experimento foram sacrificados para retirada das amostras de conteúdo intestinal do íleo.

O método de indicadores caracteriza-se por utilizar uma substância referência cuja principal característica é ser inerte no trato digestório. Este método é uma opção quando é muito difícil de mensurar a ingestão ou coleta total das fezes (FAHEY Jr. e JUNG, 1983; ZEOULA et al., 1992). Por ser inerte no trato digestório, o indicador ideal é eliminado nas fezes na mesma proporção em que foi ingerido pelo animal. A mensuração deste processo é denominada taxa de recuperação e considera-se um bom indicador uma substância que apresente este índice próximo de 100%. Isto significa que todo indicador ingerido é excretado inalterado pelo animal e recuperado em suas fezes na sua totalidade. Desta forma pode-se calcular os coeficientes de digestibilidade aparente de um nutriente sem a necessidade de se conhecer a ingestão do alimento em estudo ou a excreção fecal dos animais, desde que a substância empregada com esta finalidade apresente taxa de recuperação satisfatória.

As características ideais dos indicadores são descritas por KOTH e LUCKEY (1972, citado por HARMON, 2007) como não absorvível; não deve afetar ou ser afetado pelo trato gastrointestinal ou seus micro-organismos; devem estar fisicamente associado ou intimamente associado com o material a ser marcado; a análise ou leitura do indicador deve ser específica, sensível e não interferir nas outras análises.

Os indicadores também denominados de substâncias índices dividem-se em dois grupos: os indicadores externos e internos. Os externos são aqueles adicionados ao alimento e internos aqueles presentes naturalmente no alimento ou ingrediente da ração. Por estarem presentes nos alimentos ou ingredientes, os indicadores internos apresentam vantagens sobre os externos e também por distribuírem-se uniformemente na digesta durante o processo de digestão e excreção (PIAGGIO et al., 1991). Dentre os indicadores internos de digestibilidade destacam-se a fibra em detergente ácido, lignina e as cinzas insolúveis em ácido (CIA) (CARCIOFI et al., 1998).

O mais comum dos indicadores utilizado na pesquisa de nutrição em animais de companhia é o óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) (OLIVEIRA et al., 1991). Este método é utilizado quando se torna difícil a mensuração da ingestão ou a coleta total das fezes e é mais adequado e confortável para os animais (ZEOULA et al., 1992). Porém este indicador foi pouco testado em animais domésticos e em alguns trabalhos a taxa de recuperação destas substâncias não é adequada (VASCONCELOS, 2004; CARCIOFI et al., 1998). Este método é mais utilizado na determinação da digestibilidade de aminoácidos e outros nutrientes, sendo calculada com base nos níveis de óxido de crômico na ração, por meio de uso de um fator de indigestibilidade, obtido pela relação entre teor de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  da ração e o das fezes ou digesta (ALBINO et al., 1992). Desde 1954, por LLOYD e McCAY, têm sido reportados trabalhos com o uso de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . Alguns estudos realizados por HILL et al., (1996) compararam a eficiência ou taxa de recuperação deste composto como um indicador com o uso de cânulas no íleo em cães.

HARMON (2007) revisando vários trabalhos com o uso de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , observou que os resultados da taxa de recuperação tem uma variação de 62% a 127% com uma média de  $96,2 \pm 4$ , indicando  $r = 0,73$ ,  $n = 29$  e  $P < 0,0001$ . Este autor sugere que existe uma relação entre a taxa de recuperação do indicador com a taxa de digestibilidade do alimento, ou seja, a recuperação do indicador decresce com uma menor digestibilidade. Isto pode ser justificado devido a inter-relação da taxa de passagem do alimento de baixa digestibilidade que é aumentada pela associação do  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  com o alimento. CARCIOFI et al. (2007) citam que a taxa de recuperação em cães variou de 91% a 107% dependendo do alimento e método de análise. Estas grandes diferenças nas taxas de recuperação podem estar sendo afetadas por componentes da dieta. Como citado acima, alguns problemas têm sido associados ao emprego de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , tais como taxas de recuperação variáveis dependendo da composição do alimento, propriedades carcinogênicas, oxidação de gorduras insaturadas presentes na dieta e influência negativa no consumo de alimento pelos animais (JAGGER et al., 1992).

HILL et al. (2000) relataram que, embora o óxido crômico tenha atingido maiores concentrações na digesta ileal entre 4 e 9 horas após as refeições, o tempo de trânsito oroileal do óxido crômico em cães não diferiu do apresentado em animais alimentados com quatro dietas, variando segundo a proporção das fontes proteicas. Esta observação é importante na avaliação da eficiência deste indicador, uma vez que uma das

características relevantes na escolha de um indicador externo é que este deve misturar-se ao alimento e permanecer uniformemente distribuído na digesta.

A primeira descrição sobre o uso do óxido crômico na determinação da digestibilidade de alimentos para animais de estimação foi realizada por LLOYD e McCAY (1954) que avaliaram este indicador em cães e concluíram que os coeficientes de digestibilidade estimados com o uso desta substância foram próximos daqueles determinados pela coleta total.

KANE et al. (1981) não observaram diferenças entre os coeficientes de digestibilidade aparente da energia, matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo em oito rações para gatos, determinados pelo método de coleta total e do óxido crômico, sendo o último avaliado por espectrofotometria de absorção atômica. Apesar da proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos no estudo supracitado, os autores não disponibilizaram dados referentes a recuperação do óxido crômico, que presumivelmente foi superior a 100%, em virtude dos maiores coeficientes de digestibilidade encontrados por este método quando comparado a coleta total. Outros estudos utilizando este indicador para verificar o tempo de trânsito do alimento (PEACHEY et al., 2000) ou a digestibilidade de aminoácidos em gatos domésticos (HENDRIKS et al., 1995) também não disponibilizam dados referentes a sua recuperação.

Embora a AAFCO tenha estabelecido um protocolo para ensaio de digestibilidade em cães utilizando o óxido crômico como indicador, poucos experimentos nesta espécie avaliaram a adequação desta substância de forma que esta venha a ser empregada com segurança. Além disto, a AAFCO recomenda como método para a determinação laboratorial do cromo a espectrofotometria de absorção atômica e não faz inferências sobre o uso do método colorimétrico.

A quantificação do cromo em material biológico envolve a digestão da matéria orgânica, solubilização deste composto e determinação fotométrica simples ou por absorção atômica desta substância (WILLIAMS et al., 1962; FENTON e FENTON, 1979).

O método colorimétrico descrito por FENTON e FENTON (1979) apresenta alguns fatores que tornam sua utilização prática e segura, uma vez que esta técnica

elimina a etapa de digestão da matéria orgânica pelo ácido nítrico, possibilita a realização da digestão ácida dos minerais de um grande número de amostras simultaneamente e o cromo do material analisado é determinado por espectrofotometria simples. Apesar disto, a interferência na leitura da absorbância por outros componentes de cor presentes no alimento ou nas fezes pode limitar a precisão na quantificação do cromo contido no alimento ou nas fezes (KOZLOSKI et al., 1998).

SAHA e GILBREATH (1991a) compararam o método colorimétrico com a espectrofotometria de absorção atômica em um estudo de digestão em suínos, em três diferentes dietas. Observaram recuperação média de 97,96% pelo método colorimétrico e 103,03% pela espectrofotometria de absorção atômica, sendo estes resultados diferentes estatisticamente. Estes autores encontraram maior variabilidade dos resultados pela espectrofotometria de absorção atômica e atribuíram tais diferenças a maior sensibilidade deste método na determinação do cromo.

YIN et al. (2000) obtiveram taxa de recuperação ileal do óxido crômico superior a recuperação fecal em suínos, levando os autores a sugerirem uma retenção temporária ou absorção deste composto durante sua passagem pelo intestino grosso. Os fatores que contribuem para a retenção e/ou absorção deste indicador pelos suínos devem-se ao tempo de retenção da digesta ( $\pm 36$  hs), a ampla e complexa estrutura do cólon e a elevada gravidade específica do óxido crômico (LIDE e FREDERIKSE, 1995, citados por YIN et al., 2000).

HILL et al. (1996) observaram que a recuperação fecal do óxido crômico (87%) foi significativamente menor que a recuperação ileal (94%) em cães. Outro ponto a ser considerado é a taxa de esvaziamento gástrico dos animais após a alimentação, uma vez que em suínos, observou-se que o óxido crômico apresenta fluxo de eliminação pulsátil, que pode acompanhar o fluxo gástrico das partículas menores presentes no trato digestório (MROZ et al., 1996).

A característica de substância inerte no trato digestório é atendida parcialmente pelo óxido crômico, pois, embora esta substância não interfira na digestibilidade dos compostos orgânicos presentes no alimento, os coeficientes de digestibilidade da matéria mineral estimados por este método não se mostraram satisfatórios (FERNANDEZ et al., 1999).

O indicador óxido crômico ainda apresenta outra característica que é a inconstância na eliminação fecal desta substância, durante o dia ou mesmo entre os dias. Isto pode estar relacionado com a concomitante variação da eliminação fecal ou consistência das fezes dos animais. Além disto, o óxido crômico necessita de um período de adaptação de aproximadamente cinco dias para que haja equilíbrio em sua eliminação fecal, em suínos (SAHA e GILBREATH, 1991).

LLOYD e McCAY (1954) obtiveram coeficientes de digestibilidade aparente muito próximo entre os determinados pelo método de coleta total e óxido crômico em cães, considerando substituível a coleta total de excretas, por este indicador. Resultados semelhantes foram obtidos por ANDREASI (1956) que encontrou uma recuperação do óxido crômico na mesma espécie de 97,8%, determinado pelo método colorimétrico. LÔBO Jr. et al. (2001) também trabalhando com cães, obtiveram recuperação de 93,7% deste mesmo indicador, quantificado pela espectrofotometria de absorção atômica.

Apesar dos problemas relatados com o uso do óxido crômico nos estudos de digestibilidade, não foi encontrado, até o momento, um indicador que preencha todos os requisitos de substância índice considerada ideal. Além disso, os resultados encontrados em estudos envolvendo suínos e cães apresentam resultados satisfatórios (SAHA e GILBREATH, 1991a; JAGGER et al., 1992; VAN LEEUWEN et al., 1996; LÔBO Jr. et al., 2001; KAVANAGH et al., 2001).

O óxido crômico pode ser fornecido aos animais misturado nas rações, em cápsulas, suspenso em óleos, em comprimidos, peletizado, impregnado em papel ou introduzido diretamente no trato digestório (HOLT, 1993). JAGGER et al. (1992) observaram que o óxido crômico fornecido misturado a ração de suínos na concentração de 0,5% reduz o consumo de alimento pelos animais, embora esta influência negativa apresente efeito transitório, podendo ser suprimido por um período de adaptação à dieta superior a cinco dias.

LÔBO Jr. et al. (2001) forneceram duas vezes ao dia cápsulas contendo óxido crômico para cães e obtiveram taxa de recuperação deste indicador de 93,7%. Apesar dos resultados, o método de coleta total de fezes empregado neste estudo, não permitiu que houvesse colheita por amostragem das fezes, como se realiza pelo método dos indicadores. Neste trabalho, não foi possível a obtenção de dados relativos à homogeneização fecal do óxido crômico fornecido desta maneira.

HENDRIKS e SRITHARAN (2002) utilizaram o indicador óxido crômico em dietas para cães para avaliar o efeito da microbiota do intestino grosso e na porção distal do íleo sobre a digestibilidade das proteínas e de aminoácidos. Eles observaram que a digestibilidade aparente não é o melhor método para se estimar a absorção de proteínas e certamente também não é para aminoácidos em cães. Apesar do intestino grosso ser relativamente pequeno, os nutrientes da dieta ou endógeno são metabolizados pela microbiota e mascaram os resultados. O coeficiente de digestibilidade aparente para a proteína foi 8,5% mas alto que na porção ileal.

Como indicador o óxido crômico também foi utilizado em animais canulados para medir a taxa de recuperação e padrão de excreção do óxido crômico no íleo de cães por HILL et al, 1996, os quais observaram uma completa recuperação do Óxido crômico na porção ileal do intestino.

VASCONCELLOS (2004) realizou trabalho com gatos avaliando a aplicabilidade de indicadores em substituição ao método de coleta total comparando este método com o uso de indicadores internos o teor de cinzas insolúveis e lignina e externo o óxido crômico na determinação de coeficientes de digestibilidade aparente, tendo em vista que estes indicadores até então não tenham sido avaliados para espécie doméstica. A CIA apresentou taxas de recuperação satisfatórias em gatos, enquanto a lignina não. O Óxido crômico apresentou taxas de recuperação satisfatórias confirmando ser um método confiável em substituição a coleta total em gatos domésticos. Este autor, tentando solucionar o problema da homogeneização na dieta do Óxido Crômico, testou uma técnica de encapsulamento deste marcador. Compararam-se os coeficientes de digestibilidade determinados pela coleta total de fezes e os obtidos pelo indicador, sendo os resultados satisfatórios em gatos.

A CIA é um dos indicadores internos utilizados com certa frequência. A cinza dos alimentos contém principalmente os seguintes cátions: cálcio, potássio, sódio, magnésio, ferro, cobre, cobalto e alumínio; e ânions: sulfato, cloreto, silicato, fosfato, entre outros (SILVA e QUEIROZ, 2002). É caracterizada como a porção mineral inabsorvível pelo trato gastrointestinal, composto, basicamente, por sílica. Este indicador é determinado gravimetricamente por meio do tratamento da matéria mineral presente no alimento ou nas fezes com solução de ácido clorídrico (VOGTMANN et al., 1975).

Como normalmente os ingredientes que compõem os alimentos para animais de companhia são de origem animal e com altas concentrações de minerais, a CIA pode ser uma alternativa muito útil para a pesquisa com cães. Porém, quando estes alimentos são constituídos por vegetais, seus componentes minerais são muito variáveis, além de alguns apresentarem altas concentrações de sílica (SILVA e QUEIROZ, 2002). As gramíneas tendem a apresentar maiores teores de CIA quando comparados aos grãos de cereais, devido as maiores concentrações de sílica em seu tecido (THONNEY et al., 1985). Algumas sílicas como, por exemplo, os aluminossilicatos encontrados no solo, apresentam importantes funções na nutrição das plantas, devido as suas propriedades como substâncias zeólitas ou trocadoras de base, o que justifica sua presença nos ingredientes de origem vegetal (PAULING, 1966).

ZEOULA et al. (1992) determinaram as concentrações de CIA em alguns ingredientes utilizados na alimentação de bovinos e constataram teores deste material de 9,31% na palha de arroz, 0,67% no farelo de soja, 0,14% no milho moído, 0,15% na raspa de mandioca e 0,24% no sorgo moído. Concentrações de CIA inferiores a 0,75% no alimento foram consideradas por THONNEY et al. (1985) como críticas para o uso desta substância como indicador, pois variações devido à amostragem e erros analíticos comprometem a estimativa da digestibilidade nestas condições.

Embora as metodologias empregadas para a determinação da CIA sejam bastante divergentes entre os trabalhos, este indicador apresenta, em geral, índices de recuperação satisfatórios (ZEOULA et al., 1992; VAN LEEUWEN et al., 1996).

VAN KEULEN e YOUNG (1977) testaram três diferentes concentrações de ácido clorídrico (concentrado, 4N e 2N) na determinação laboratorial da CIA. Observaram diferenças entre os resultados analíticos obtidos pelos três métodos que se refletiram na taxa de recuperação deste indicador, que foi, respectivamente, de 103%, 96,7% e 95,8%. Apesar destas diferenças, os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca estimados pelos três procedimentos não diferiram daqueles determinados pelo método de coleta total nas ovelhas. Estes autores concluíram, ainda, que as baixas concentrações de CIA em um dos alimentos estudados (0,21%) resultaram em maiores variações analíticas em comparação aos alimentos contendo concentrações superiores desta substância.

LÔBO Jr. et al. (2001) não observaram diferença entre os coeficientes de digestibilidade aparente determinados pelo método de coleta total e CIA em cães adultos, apresentando esta última uma taxa de recuperação média de 93,9% ( $\pm 17,7$ ). Deve-se considerar que este experimento incluiu cinco dias de colheita de fezes e uma única ração.

Com o objetivo de facilitar e amenizar algumas desvantagens dos métodos tradicionais, como óxido crômico e coleta total de fezes, foi desenvolvida uma substância denominada lignina modificada de eucalipto (LIPE<sup>®</sup>). Alguns pesquisadores (MORAIS et al., 1991 e 1994; PILÓVELOSO et al., 1993) conseguiram extrair e caracterizar estruturalmente a lignina a partir de uma variedade de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). Mais tarde, SALIBA et al., 1999, concluíram que esta lignina possuía características estruturais e físico-químicas altamente estáveis no trato gastrointestinal dos animais e totalmente recuperada nas fezes. Assim, surgiu a possibilidade da utilização da LIPE<sup>®</sup> como indicador para testes de digestibilidade nos animais.

Com vistas em testar a eficiência da LIPE<sup>®</sup> como indicador externo, VASCONCELOS et al., 2007, realizaram um estudo para determinar a digestibilidade da energia metabolizável em frangos de corte comparando com o método de indicador com óxido crômico e coleta total de fezes. Eles concluíram que a LIPE<sup>®</sup> permitia resultados semelhantes comparados com as metodologias analisadas para aqueles ingredientes. Utilizando frangos de corte, estes autores obtiveram valores de digestibilidade da energia bruta do farelo de soja de 69,42% para coleta total de fezes, 69,10 % para o Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e de 68,40 % para a LIPE<sup>®</sup>. Para o glúten de milho 60% foi de 74,51, 75,81 e 74,05% para coleta total de excretas, óxido crômico e LIPE<sup>®</sup>, respectivamente.

Como observado nos trabalhos citados com os vários tipos de indicadores, na escolha de uma substância marcadora devem-se considerar as características do trato digestório da espécie em estudo, platô de excreção da substância índice, a disponibilidade de equipamentos para a determinação laboratorial do indicador, o custo do método empregado (indicador e análise laboratorial), a segurança dos reagentes utilizados e, principalmente, dar preferência a um indicador que reúna a maior parte dos atributos de uma substância índice ideal.

## 1.5 – Técnicas para análise de aminoácidos

Assim como as metodologias de determinação de digestibilidade, é importante abordar também sobre as análises de nutrientes, especialmente os aminoácidos. Existem várias técnicas de leitura de aminoácidos. Estas técnicas de leitura ou mensuração de aminoácidos são muitas vezes questionadas pelos pesquisadores devido a eficiência das calibrações dos equipamentos e colunas utilizadas nas análises, podendo gerar resultados pouco precisos ou duvidosos.

As análises quantitativas de cada aminoácido em uma mistura qualquer após a hidrólise de proteína constituem uma técnica muito complexa e de difícil calibração de equipamentos. Com a cromatografia e sua automação estas análises deram um salto muito significativo na sua eficiência. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE, em inglês HPLC, é um método cromatográfico que consiste em um sistema dinâmico de separação de composto por dois meios: uma fase estacionária formada por partículas sólidas ou líquidas e uma fase móvel que pode ser gasosa ou líquida, com a função de transportar as moléculas componentes da amostra através do sistema cromatográfico (BRIGHTWAIT e SMITH, 1985, citado por BERNARDI, 2000).

Mesmo com esta alta tecnologia para análise de aminoácidos ainda necessita-se de alguns métodos alternativos para a mensuração exata ou completa recuperação de alguns aminoácidos, mais especificamente, a cistina, metionina e triptofano.

O processo de leitura, quantificação e identificação dos aminoácidos em uma mistura inicia-se com a fase estacionária em que a parte sólida e líquida do composto é acondicionada em um recipiente normalmente em uma coluna de vidro ou aço inoxidável, denominada de coluna cromatográfica (FALLON et al., 1987). Durante a passagem pela coluna cromatográfica, a mistura de componentes dissolvidos na fase móvel entra em contato com as partículas da fase estacionária. Neste momento, ocorre uma competição entre as duas fases pelos componentes da amostra, que dependendo das suas propriedades físicas e afinidade pela fase estacionária, produz uma distribuição, onde cada componente da mistura é distribuído através da fase estacionária e da fase móvel, passando assim por todo o sistema (BRIGHTWAIT e SMITH, 1985, citado por BERNARDI, 2000). As forças químicas e físicas que atuam sobre a mistura de componentes da amostra e as duas fases são responsáveis pela retenção destes

componentes na coluna cromatográfica. As diferenças e a magnitude destas forças determinam a resolução e a separação de cada componente individual. Estas forças são basicamente divididas em cinco tipos: força de dispersão ou de Van der Waals, que atuam sobre as moléculas causando distorção momentânea sobre a sua configuração eletrostática; interações dipolares; pontes de hidrogênio; interações dielétricas e interações eletrostáticas ou de coulomb (FALLON et al., 1987).

Antes de se fazer qualquer separação e quantificação de aminoácidos por cromatografia, deve-se fazer uma hidrólise nas proteínas e peptídeos formando uma mistura de componentes, extraindo os aminoácidos destas estruturas de forma rápida e eficiente. São utilizados três tipos de hidrólises, com suas vantagens e desvantagens: hidrólise enzimática, hidrólise alcalina e hidrólise ácida. Dentre estas, a hidrólise alcalina é especificamente utilizada para a identificação do triptofano.

A técnica do NIR – *Near- Infrared Reflectance Spectroscopy* tem sido avaliada para determinação da concentração dos nutrientes em alimentos para cães e gatos, em virtude da rapidez e por ser um método não-destrutivo que estima a composição química e nutritiva de alimentos e dietas balanceadas (CASTRILLO et al., 2005) assim como em várias espécies animais. A limitação deste método é a dificuldade de se obter amostras com dados *in vivo* para uma calibração precisa. No entanto, alguns trabalhos têm sido realizados para ajustar estes dados e dar mais confiabilidade aos seus resultados.

O equipamento utilizado para uso desta técnica é de alta precisão e efetua análises de alimentos e outras amostras orgânicas através de emissão de radiação eletromagnética sendo empregado para caracterizar substâncias orgânicas e algumas inorgânicas baseando-se na aplicação da matemática à química analítica (quimiometria). Esta técnica resume-se na integração da espectroscopia, estatística e computação de dados.

O NIR baseia-se no fato de que as ligações covalentes das substâncias orgânicas absorvem a energia eletromagnética, usando essa absorção para estimar o número e tipo de ligações moleculares nas amostras. O princípio mecânico seria o de iluminar uma amostra com luz de comprimento de onda específico e conhecido da região do infravermelho próximo. A absorção de luz então é medida por diferenças entre a quantidade de luz emitida pelo NIR e a quantidade de luz refletida pela amostra (VAN

KEMPEM e JACKSON, 1996), relação através da qual pode-se prever sua composição química, desde que as leituras obtidas possam ser instantânea, efetivamente comparadas e ajustadas na matriz de um banco de dados armazenados que calibra o *software* de logística do equipamento.

Para obter uma calibração de determinado nutriente, como por exemplo, as proteínas, é necessário um grande número de amostras, isso porque, embora exista uma relação entre carboidratos e proteína na população de referência, esse relacionamento não representa a população geral. Ou seja, essa relação pode existir em um determinado alimento, mas, não existir em outro. Pode existir em uma amostra de um alimento e não em outra daquele mesmo alimento. Dessa forma as amostras utilizadas para calibrar o equipamento e para desenvolver as equações devem representar muito bem a população a ser predita no futuro. Nesse caso, utiliza-se um grande número de amostras colhidas em diferentes anos e regiões geográficas distintas, que caracterizem e reflitam as possíveis mudanças a serem preditas (alguns autores citam entre 100 e 500 amostras para estabelecer espectros). Depois de calibrado o equipamento para um determinado componente amostral, ele ainda não está pronto para ser utilizado, pois a acurácia de calibração deve ser testada em um processo denominado validação. Nesse caso, várias amostras desconhecidas são analisadas pelo NIR, usando a calibração a ser testada e pela técnica de referência na bancada do laboratório de análises químicas. A diferença entre o valor predito pelo NIR e o real, obtido pela análise de referência, é utilizada para calcular o erro padrão de predição, que determina a acurácia da calibração. A seleção do tratamento matemático final para representar a melhor equação para cada variável estudada será baseada no valor mais baixo do erro padrão de calibração (EPC) e no erro padrão de validação (EPV), combinados com os valores de coeficientes de determinação ( $R^2$ ), obtidos nas etapas de validação e calibração (SALIBA et al, 2001)

Atualmente muitas empresas utilizam este equipamento para obter dados químicos e nutricionais, porém não para estimar a energia metabolizável. CASTRILLO et al. (2005) analisaram 56 rações comerciais para *petfood* cuja composição química e digestibilidade aparente *in vivo* eram conhecidas. Estes autores concluíram que a precisão usando NIR para prever o valor de energia das rações extrusadas para cães é similar, ou melhor, do que quando realizada por análise química.

Outra técnica que está sendo desenvolvida por empresas particulares é chamada de IDEA<sup>®</sup> – *Immobilized Digestive Enzyme Assay*. Tem como principal objetivo quantificar os valores de proteína e aminoácidos digestíveis nos ingredientes das rações. É uma técnica que utiliza um pool multienzimático que mede os grupos  $\alpha$ -amino liberados durante a hidrólise da proteína e peptídeos. Esta técnica pode ter algumas vantagens em relação a outras técnicas *in vivo* e *in vitro* que foram desenvolvidas para medir a qualidade de proteínas nos alimentos e ingredientes utilizados nas rações para animais. Como por exemplo, o uso de galos cecectomizados, que se caracteriza por ser de custo elevado e demorada. Técnicas *in vitro* que são mais rápidas, porém menos precisas nos dados como a análise de uréase, a solubilidade em hidróxido de potássio, o índice de solubilidade do nitrogênio, índice de dispersividade da proteína e digestibilidade em pepsina.

SCHASTEEN et al., (2007) avaliaram a correlação existente entre o Teste Enzimático de Digestibilidade (IDEA) com a digestibilidade verdadeira de aminoácidos do farelo de soja em frangos de corte e verificaram que existe uma alta correlação entre eles além de ser uma análise prática, rápida e de baixo custo. O coeficiente de correlação foi de 0,90 e 0,88 para lisina e cistina, respectivamente. Salientam, no entanto que as fontes proteicas de origem animal por terem alta variabilidade na digestibilidade de aminoácidos merecem desenvolvimento e aprimoramento para as técnicas *in vitro* atuais.

As técnicas laboratoriais citadas para determinação da digestibilidade e disponibilidade de nutrientes em alimentos para cães e gatos são de fundamental importância para o desenvolvimento da nutrição destes animais e conseqüentemente dos produtos fabricados pelas empresas deste setor. Muitas destas técnicas podem ser modificadas tendo em vista a necessidade de ajustes para melhor determinação dos coeficientes de utilização dos nutrientes. A padronização de técnicas é uma necessidade entre os pesquisadores, assim como a AAFCO tem feito com intuito de proteger e aplicar os resultados obtidos em todo o mundo da pesquisa com cães e gatos.

## **II – OBJETIVOS GERAIS**

O presente trabalho tem como objetivo a determinação do perfil aminoacídico do farelo de soja, farelo de glúten de milho 60%, farinha de carne e ossos e farinha de vísceras por meio de ensaios de digestibilidade, utilizando os métodos de coleta total e indicadores como óxido crômico e lignina modificada extraída de eucalipto. Outro objetivo é comparar as técnicas de análises de aminoácidos utilizando NIR, IDEA e HPLC.

## **Avaliação aminoacídica fontes proteicas para cães utilizando diferentes metodologias**

**Resumo:** Este trabalho teve como objetivo avaliar a digestibilidade aparente dos aminoácidos de quatro fontes proteicas usadas na alimentação de cães, utilizando as metodologias coleta total de fezes e, como indicadores lignina modificada e óxido crômico, além de três técnicas de leitura de aminoácidos HPLC, NIR e IDEA. Foram utilizados doze cães da raça Beagle, com 4 anos de idade e peso vivo médio de 13,39 kg alojados, individualmente em gaiolas metabólicas, em delineamento quadrado latino triplo (quatro dietas, quatro períodos e três repetições por período). Foram elaboradas cinco dietas experimentais: dieta referência (DR) e quatro dietas com farinha de vísceras (FV), farinha de carne e ossos (FC), farelo de glúten de milho 60% (FG) ou farelo de soja (FS), substituindo 30% da matéria seca da dieta referência. Cada período teve duração de dez dias, sendo cinco dias de adaptação e cinco dias para coleta de fezes e urina, quando então os animais eram realocados para receberem diferentes dietas de forma que, ao final, todos os animais passassem a receber todas as dietas experimentais. Os resultados obtidos para os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) por meio da coleta total (CT) realizada pelo HPLC foram utilizados como padrão. O indicador LIPE mostrou ser uma metodologia eficiente para determinação dos CDA dos aminoácidos essenciais da FV. A técnica IDEA não teve os valores de CDA diferentes em 76,4% e 70,5 % dos aminoácidos avaliados para FC e FV respectivamente, quando comparados com HPLC, porém foi diferente totalmente dos CDAs do FS estimados pelo HPLC. Os CDAs determinados pelo IDEA para o FS foram superestimados. O NIR determinou com acurácia todos os CDAs da FV com exceção da histidina e treonina, porém para FC diferiu em 50% dos resultados. Utilizando o NIR somente a treonina e valina é diferente dos resultados do HPLC. A lisina foi o aminoácido que teve a maior diferença de CDAs para o FG em todos os métodos utilizados comparados aos valores da literatura.

**Palavras-chaves:** HPLC, NIR, IDEA, aminoácidos digestíveis, lignina, nutrição canina.

## **Amino acidic evaluation of the protein sources for dogs using different methodologies**

**Abstract:** This work had as objective to evaluate the apparent digestibility of amino acids in four protein sources used to feed dogs, being used the methodologies of total feces collection and as markers modified lignin and chromic oxide, besides three techniques of amino acid reading. Twelve adult Beagle were used, with 4 years old and 13,39 kg average weight allocated individually in metabolic cages, in an experimental design of a triple latin square (four diets, four periods and three animals each treatment per period). The experimental diets were reference feed (DR) and four diets with poultry meal (FV), meat and bones meal (FC), corn gluten meal 60% (FG) or soybean meal (FS) substituting 30% of the dry matter of the feed reference. Each period had duration of ten days, being five days of adaptation and five days of total feces collection, then the animals were reallocated to receive different diets so at the end, all the animals received all the experimental diets. The results gotten for the coefficients of apparent digestibility (CDA) by means of the total collection (CT) carried by the HPLC had been used as standard. The marker LIPE showed to be an efficient methodology for determination of the CDA of essential amino acids of the FV. The IDEA respectively did not have different values of CDA in 76,4% and 70,5% of amino acids evaluated for FC and FV, when compared with HPLC, however it totally different from the CDAs of the FS gotten for the HPLC. The CDAs determined by the IDEA for FS were overestimated. The NIR determined with accurate all the CDAs of FV with exception of histidine and threonine, however for FC it differed in 50% of the results. Using the NIR only threonine and valine were different from the results of HPLC. The lysine was the amino acid that had the biggest difference of CDAs for the FG in all the used methods compared with the values of literature.

**Keywords:** HPLC, NIRS, IDEA, digestible amino acids, lignin, dog nutrition.

## Introdução

Para os animais de companhia, a utilização de valores de aminoácidos digestíveis nos alimentos ainda é uma prática pouco explorada pelos fabricantes de alimentos. Alguns fatores relacionados com as metodologias a serem utilizadas para a avaliação nutricional de alimentos podem interferir nos resultados tais como: período de adaptação, período de coleta de fezes, idade, condição de exercícios, raças, forma de apresentação de alimentos (secos ou úmidos), possibilidade de uso de diferentes tipos de indicadores e a diferentes técnicas e equipamentos para as análises laboratoriais. Existem, basicamente, dois métodos para a realização de experimentos de digestibilidade *in vivo*: o método convencional ou de coleta total e dos indicadores (ANFALPET, 2007).

Um dos métodos mais convencionais para determinar a digestibilidade de nutrientes na nutrição de cães é o uso da coleta total de excretas havendo, para tanto, a necessidade dos animais serem mantidos em gaiolas metabólicas individuais apropriadas para a coleta total das fezes, sem que haja a contaminação por urina (AAFCO, 2006).

Outro método, dos indicadores, caracteriza-se por utilizar uma substância referência cuja principal característica é ser inerte no trato digestório. As características ideais dos indicadores são descritas por HARMON (2007) como não absorvíveis, não devem afetar ou serem afetados pelo trato gastrointestinal ou seus micro-organismos, devem estar fisicamente associados ou intimamente associados com o material a ser marcado, a análise ou leitura dos indicadores deve ser específica, sensível e não interferir nas outras análises.

O mais comum dos indicadores utilizado na pesquisa de nutrição em animais de companhia é o óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ). Este método é utilizado quando se torna difícil a mensuração da ingestão ou a coleta total das fezes e é mais adequado e confortável para os animais (ZEOULA et al., 1992). Porém, este indicador foi pouco testado em animais domésticos, mas mostrou que a taxa de recuperação desta substância é adequada (VASCONCELOS, 2004).

Na tentativa de aprimorar esta técnica de avaliação de alimentos utilizando indicadores nas dietas, foi desenvolvida uma substância denominada LIPE<sup>®</sup>, que é uma

lignina modificada de eucalipto. Pesquisadores (MORAIS et al., 1991 e 1994; PILÓVELOSO et al., 1993) conseguiram extrair e caracterizar estruturalmente a lignina a partir de uma variedade de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). Mais tarde, SALIBA et al. (1999) concluíram que esta lignina possuía características estruturais e físico-químicas altamente estáveis no trato gastrintestinal dos animais e totalmente recuperada nas fezes. Assim, surgiu a possibilidade da utilização da LIPE<sup>®</sup> como indicador para testes de digestibilidade nos animais.

De forma geral, os conceitos de digestibilidade e disponibilidade para os animais definem o valor potencial da proteína dos ingredientes e dos alimentos. SIBBALD (1987) define a diferença entre os dois termos, citando que a absorção dos nutrientes no sistema digestório é pré-requisito para a sua utilização metabólica, mas não indica que tenha disponibilidade. Então a digestibilidade pode ser definida como a medida do desaparecimento da proteína e dos aminoácidos durante a passagem pelo sistema digestório, enquanto a disponibilidade é definida como a porção de aminoácido da dieta que foi digerida, absorvida e utilizada para a síntese de proteína.

Existem várias técnicas de leitura de aminoácidos. O uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (HPLC), um método cromatográfico que consiste em um sistema dinâmico de separação de compostos por dois meios: uma fase estacionária formada por partículas sólidas ou líquidas e uma fase móvel que pode ser gasosa ou líquida, com a função de transportar as moléculas componentes da amostra através do sistema cromatográfico (BERNARDI et al, 2003). Outra alternativa é a utilização do NIR (*Near Infrared Reflectance*) espectrômetro de alta precisão que efetua análises de alimentos e outras amostras orgânicas (e algumas inorgânicas) por meio do princípio de emissão de radiação eletromagnética. É uma integração da espectroscopia, estatística e computação de dados. Finalmente, o IDEA<sup>®</sup> – *Immobilized Digestive Enzyme Assay*, que quantifica os valores de proteína e aminoácidos digestíveis nos ingredientes das rações. É uma técnica que utiliza um pool multi-enzimático que mede os grupos  $\alpha$ -amino liberados durante a hidrólise da proteína e peptídeos.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar a digestibilidade de aminoácidos em quatro fontes proteicas utilizadas na alimentação de cães (farinha de vísceras de aves, farinha de carne e ossos, farelo de glúten de milho 60% e farelo de soja) utilizando as metodologias de determinação de digestibilidade coleta total de

excretas e, como indicador a lignina modificada de eucalipto (LIPE<sup>®</sup>) e óxido crômico. Sendo que as amostras de fezes e as dietas foram analisadas por diferentes técnicas de leitura de aminoácidos: HPLC, NIR e IDEA<sup>®</sup>.

## **Material e métodos**

O presente trabalho foi realizado na Universidade Federal do Paraná, no Campus de Ciências Agrárias, no Laboratório de Estudos de Nutrição Canina do Departamento de Zootecnia (LENUCAN) em Curitiba, Estado do Paraná, durante o período de setembro a novembro de 2007.

Foram utilizados doze cães adultos, machos e fêmeas, com idade entre 4 anos, da raça Beagle, com peso médio de 13,39 kg ( $\pm$  1,73), previamente vacinados, desverminados e submetidos ao exame clínico, hematológico e coproparasitológico. Estes animais foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas medindo 1,00 m x 0,80 m, instaladas em uma sala sem climatização, com ventilação natural. Todos os animais estavam habituados com a rotina das gaiolas metabólicas.

As cinco dietas foram elaboradas em extrusora nono fuso, na empresa Nutriara Alimentos Ltda, na cidade de Araçongas/Pr, sendo uma dieta referência (DR) balanceada de acordo com as exigências nutricionais de cães adultos conforme indicações da Association of American Feed Controls Official - AAFCO (2006) e outras quatro dietas testes, nas quais a farinha de vísceras de aves, farinha de carne e ossos bovina, farelo de glúten de milho 60% e o farelo de soja 45% foram incorporados às dietas testes, substituindo aproximadamente 30% da matéria seca das matérias-primas de origem animal e vegetal da dieta referência conforme MATERSON et al (1965). Para evitar erros na formulação de vitaminas e minerais, foi mantido, portanto, um núcleo fixo em todas as dietas, composto por minerais, vitaminas e aditivos.

Tabela 1 – Composição bromatológica<sup>1</sup> e química dos ingredientes proteicos utilizados nos alimentos para cães.

Ingredientes	MS	PB	EE	MN	FB	Ca	P	EB*
Farinha de carne	94,53	47,68	12,74	32,19	-	11,13	5,32	3870,7
Farinha de vísceras	95,93	59,92	15,92	15,76	-	5,07	2,32	4921,3
Farelo de glúten de milho 60%	95,77	64,57	7,21	1,38	1,27	-	-	5646,3
Farelo de soja	89,87	45,03	1,68	5,34	5,34	-	-	4023,0

<sup>1</sup>Análises realizadas no laboratório de análises da Nutriara Alimentos Ltda e Laboratório de Nutrição animal do DZO/UEM. \*Energia bruta obtida através de bomba calorimétrica (LNA/DZO).

A densidade dos alimentos foi determinada pesando-se uma amostra em um recipiente com volume conhecido, indicando grau de expansão e cozimento do alimento acabado em gramas por litro. A atividade de água ou água livre dos alimentos foi determinada fazendo-se a leitura das amostras dos alimentos após o *coating* por meio de equipamento Aqualab<sup>®</sup>. As características físicas das dietas experimentais estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Características físicas das dietas experimentais

Dietas	Densidade (g/L)	Atividade de água (w <sub>a</sub> )
Dieta referência (DR)	387,00	0,567
Dieta com farinha de carne (FC)	405,09	0,545
Dieta com farinha de vísceras (FV)	402,78	0,598
Dieta com glúten de milho 60% (FG)	423,91	0,534
Dieta com farelo de soja (FS)	378,52	0,522

<sup>1</sup>Análises realizadas no laboratório de Análises Químicas da Nutriara Alimentos Ltda, Araçongas/PR

O indicador óxido crômico (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) sofreu secagem prévia por 12 horas, em estufa, a temperatura de 105<sup>o</sup> C e foi incorporado nas dietas no momento da mistura na dosagem de 0,35%. A LIPE<sup>®</sup> foi administrada diariamente aos animais através de cápsulas com concentração de 100 mg de LIPE<sup>®</sup>/cápsula/dia/animal, segundo recomendações de SALIBA et al (2003). As cápsulas foram administradas a todos os animais 24 horas antes das coletas, durante os cinco dias de coletas.

O fornecimento das dietas foi dividido em duas etapas. A primeira etapa, com duração de 10 dias, correspondeu ao fornecimento da dieta referência aos doze animais. A segunda corresponde ao fornecimento das dietas testes, sendo que os animais foram distribuídos em delineamento de triplo quadrado latino (quatro dietas testes versus quatro períodos e três animais recebendo cada dieta por período). Cada período experimental foi constituído de 10 dias, sendo cinco para adaptação às dietas e cinco dias de coleta total de fezes e urina, perfazendo um total de 50 dias experimentais. Nos períodos de adaptação os animais foram mantidos três dias em baias coletivas com acesso a área de exercício, e nos dois últimos dias do período adaptação eram colocados nas gaiolas para o período de coletas.

As dietas experimentais foram fornecidas aos animais durante todo o período de adaptação e colheita, duas vezes ao dia (7h30min e 17h30min), sendo as sobras quantificadas imediatamente antes da próxima refeição. As quantidades fornecidas foram estimadas segundo a equação do NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC, 2006) para necessidades energéticas diárias (NEM) para cães em canil.

$$\text{NEM (kcal/dia)} = 130 \times \text{Peso vivo}^{0,75}$$

O volume das dietas disponibilizado por animal por dia foi calculado considerando a densidade energética (EM) das dietas de 3500 kcal/kg.

Durante o período de coleta, as fezes e urina de cada cão foram recolhidas, no mínimo, duas vezes ao dia após as refeições, tomando-se o cuidado de não deixar sobras nas gaiolas e nos baldes coletores de urina. Todo o material das fezes e urina foi congelado após a pesagem. Para a colheita da urina foram utilizados baldes plásticos contendo 1,0 ml de ácido sulfúrico (1,0 Eq), adaptados ao fundo da bandeja coletora da gaiola metabólica. Ao final de cada período toda a urina recolhida de cada cão foi homogeneizada, os volumes anotados e uma alíquota de 10% separada e congelada para as futuras análises laboratoriais. Da mesma forma, as fezes foram homogeneizadas, pesadas e armazenadas a temperatura de -10° C. Ao final do experimento todas as fezes foram descongeladas, pesadas novamente, desidratadas em estufa de ventilação forçada (65° C) por 72 horas e uma amostra foi moída em peneira de malha 1,0 mm. Estas amostras foram enviadas para os laboratórios para a realização das análises laboratoriais.

As análises bromatológicas dos ingredientes, dietas, fezes e urina foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, no Laboratório de Análises da Nutriara Alimentos Ltda, em Arapongas, Estado do Paraná, em duplicata Matéria Seca (MS), Proteína bruta (PB), Energia bruta (EB), Extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), Fibra em detergente ácido (FDA) e Fibra em detergente neutro (FDN), Fibra bruta (FB), Matéria mineral (MM), Ca, P e óxido crômico. A matéria

orgânica (MO – dietas e ingredientes) calculada pela fórmula:  $100 - MM\%$  na MS. Extrativos não-nitrogenados (ENN) foi calculado pela fórmula:  $100 - (PB + MM + EEHA + FB + UM)$ . A energia metabolizável (EM) foi calculada utilizando-se os valores obtidos em bomba calorimétrica das fezes e urina dos animais por meio da fórmula:  $EM = EB - (EB \text{ fezes} + EB \text{ urina})$ . A composição bromatológica das dietas experimentais encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Composição bromatológica<sup>1</sup> das dietas experimentais

Nutrientes	Dieta Referência	Dietas Teste			
		Farinha de carne	Farinha de vísceras	Glúten de milho 60%	Farelo de soja
Proteína Bruta, %	24,32	32,83	31,47	33,46	31,76
Extrato Etéreo, %	10,37	15,43	12,15	13,87	11,81
Matéria Mineral, %	7,64	12,41	9,60	7,08	7,60
Fibra Bruta, %	2,41	2,17	2,52	1,57	2,20
FDN, %	12,18	13,13	13,53	12,42	11,04
FDA, %	4,05	2,67	3,50	2,42	4,24
Cálcio (Ca), %	1,70	3,27	2,32	1,75	1,42
Fósforo (P), %	1,10	1,90	1,47	2,08	1,02
Energia Metabolizável <sup>2</sup> , kcal/kg	3562,4	3891,6	3743,9	4053,9	3872,2
Extrativos Não Nitrogenados, %	54,47	36,70	44,09	43,31	45,85
Matéria Orgânica, %	92,36	87,59	90,40	92,92	92,40
Umidade, %	8,03	6,70	7,29	5,91	5,64
Matéria Seca, %	93,24	93,82	93,66	95,07	95,36

<sup>1</sup>Análises realizadas no Laboratório de Análises da Nutriara Alimentos Ltda e Laboratório de Nutrição Animal DZO/UEM//Maringá-Pr; <sup>2</sup> A EM foi determinada utilizando-se a energia bruta das excretas; FDN, fibra detergente neutro; FDA, fibra detergente ácido.

O escore fecal foi mensurado sempre pelo mesmo pesquisador, para auxiliar na avaliação da qualidade das fezes utilizando o método subjetivo. Atribuiu-se notas de 1 a 5 no momento da coleta de fezes, sendo: 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 das gaiolas; 4 = fezes bem formadas e consistentes e que não aderem ao piso; 5 = fezes bem formadas, duras e secas (SÁ FORTES, 2005).

A concentração dos aminoácidos dos ingredientes proteicos foi analisada utilizando-se as três técnicas propostas NIR, HPLC e IDEA<sup>®</sup>. As técnicas NIR e IDEA<sup>®</sup> apresentaram em seus relatórios os teores de aminoácidos totais e digestíveis. Não foram determinados os teores de aminoácidos não essenciais para a técnica NIR porque não existia no laboratório utilizado para estas análises curvas de predição de aminoácidos digestível para estes ingredientes proteicos. Com isto, calculou-se os coeficientes de digestibilidade de cada aminoácido para cada ingrediente proteico para estes dois métodos. Portanto, não se utilizou o fator substituição proposto por Matterson para a determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos por estas técnicas.

As amostras para estas análises foram encaminhadas aos laboratórios de análises da Universidade Federal de Santa Maria/RS – LAMIC do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Novus International Inc. em St. Louis, nos Estados Unidos, respectivamente. Os equipamentos usados para estas análises foram: NIR sistema de leitura com raio infravermelho marca FOSS<sup>®</sup> e IDEA<sup>®</sup> – *Immobilized Digestive Enzyme Assay*, metodologia de determinação de aminoácidos digestíveis da NOVUS.

As dietas experimentais, os ingredientes proteicos e as fezes dos animais foram analisadas pela técnica de HPLC/CLAE, pelo laboratório da empresa Kerry Bioscience, em Almére, na Holanda. Os dados gerados pelo HPLC de concentração de aminoácidos serviram de parâmetro para os cálculos realizados quando foram usadas as metodologias coleta total de fezes e como os indicadores LIPE e óxido crômico. Para realizar a técnica de HPLC hidrólise ácida e leitura por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de troca iônica com reação pós-coluna com ortoftaloleido (OPA), utilizou-se cromatógrafo de fase líquida JLC-500/V *Amino Tac<sup>TM</sup> Amino Acid Analyzer*.

Nos ingredientes, dietas e fezes foram analisados os aminoácidos essenciais: Valina (VAL), Metionina (MET), Isoleucina (ISO), Leucina (LEU), Treonina (TRE), Fenilalanina (FEN), Histidina (HIST), Lisina (LIS), Arginina (ARG), e os não essenciais: Aspartato (ASP), Tirosina (TIR), Serina (SER), Glutamina (GLU), Prolina (PRO), Glicina (GLI), Alanina (ALA) e Cistina (CIS).

Para a realização dos cálculos dos coeficientes de digestibilidade aparente foram determinados os teores de proteína bruta, matéria seca, energia bruta e de cada um dos aminoácidos nos ingredientes, nas fezes, na urina e nas dietas experimentais. Os cálculos dos coeficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos digestíveis, da proteína bruta, matéria seca e energia metabolizável foram determinados pelas fórmulas:

$$CDA_{\text{nutrienteD}}(\%) = [(\text{Nutriente}_{\text{ing}} - \text{Nutriente}_{\text{exc}})/\text{Nutriente}_{\text{ing}}] \times 100$$

$$CDA_{\text{nut}_{\text{ingrediente}}}(\%) = CDA_{\text{DR}} + [(CDA_{\text{DT}} - CDA_{\text{DR}})/\text{fator de substituição}]$$

$$CDA_{\text{aa}_{\text{ingr}}}(\%) = CDA_{\text{aa}_{\text{DR}}} + [(CDA_{\text{aa}_{\text{DT}}} - CDA_{\text{aa}_{\text{DR}}})/\text{fator de substituição}]$$

Onde:

$CDA_{\text{nutrienteD}}$  = coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes PB, MS e EM das cinco dietas experimentais;

$CDA_{\text{nut}_{\text{ingrediente}}}$  = coeficiente de digestibilidade aparente do nutriente (PB, MS e EM) dos quatro ingredientes proteicos avaliados;

$CDA_{\text{aa}_{\text{ingr}}}$  = coeficiente de digestibilidade aparente dos aminoácidos nos ingredientes avaliados;

$CDA_{\text{aa}_{\text{DR}}}$  = coeficiente de digestibilidade aparente dos aminoácidos da dieta referência;

$CDA_{\text{aa}_{\text{DT}}}$  = coeficiente de digestibilidade aparente dos aminoácidos da dieta teste.

As análises estatísticas das variáveis estudadas foram realizadas utilizando-se *software* estatístico SAS (1996) e o modelo estatístico abaixo descrito.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + M_j + AM_{ij} + e_{ijk}$$

onde,

$Y_{ijk}$  = valor observado das variáveis estudadas, obtidos para o alimento  $i$ , utilizando os diferentes métodos de análise de aminoácidos  $i$ ;

$\mu$  = constante geral;

$A_i$  = Efeito da matéria-prima  $i$ , sendo  $i = 4$ , (Farinha de vísceras de aves, farinha de carne e ossos, farelo de soja e farelo de glúten de milho);

$M_j$  = Efeito da metodologia de determinação de digestibilidade dos aminoácidos  $j$ , sendo  $j = 3$  (uso de coleta total, óxido crômico e LIPE); quando da avaliação das técnicas mediu-se o efeito da técnica de análise de aminoácidos  $j$ , sendo  $j = 3$  (uso de HPLC, NIR e IDEA).

$e_{ijk}$  = erro aleatório associado a cada observação.

Para comparação das médias foi utilizado o Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

## **Resultados e Discussão**

Os valores médios de consumo das cinco dietas experimentais, a produção fecal mensurada por meio da coleta total de fezes, a produção fecal estimada pelos indicadores LIPE e óxido crômico e o escore fecal estão expressos na Tabela 4.

O consumo médio diário das dietas experimentais não diferiu ( $p > 0,05$ ). A produção fecal média dos animais estimada pela LIPE (59,6 g/dia) foi 22,31% superior que os valores reais para a produção de MS fecal/dia obtidos via coleta total de fezes (46,3 g/dia). Este resultado pode ser explicado por possíveis erros nas estimativas de valores utilizados pela metodologia que utiliza a espectrofotometria como técnica de mensuração. No entanto não houve diferença entre as médias da produção fecal estimada pela LIPE ( $p > 0,05$ ).

Os resultados apresentados na Tabela 4 permitiram observar que a produção fecal na matéria natural da dieta com farelo de soja foi maior quando comparadas as médias das outras dietas.

Uma maior concentração de água nas excretas (escore fecal de 3,12) pode ter causado este volume acentuado em relação as outras dietas. Isto também pode ser justificado pela maior concentração de FDA desta dieta (Tabela 2). Maiores concentrações de fibras indigestíveis levam a um maior volume fecal em cães. BURROWS et al. (1982) e BARDON & FIOTAMONT (1983) verificaram que fontes de fibra ricas em celulose aumentaram a taxa de passagem no intestino delgado, diminuindo a digestibilidade dos nutrientes. Além disso, as frações solúveis da fibra

aumentam a viscosidade intestinal diminuindo a digestão dos nutrientes (CHOCT & ANNISON, 1992), proporcionando maior produção de fezes. Nos resultados verificados por CLAPPER et al (2001) a dieta com farelo de soja também proporcionou maior produção de fezes que as dietas com farinha de vísceras. Porém, trabalhando em testes de digestibilidade com cães, SÁ FORTES (2005) não encontrou diferenças na produção fecal (g MS/dia) para dietas com ingredientes proteicos de origem animal (farinha de carne e farinha de vísceras) e vegetal (farelo de glúten e farelo de soja). Os oligossacarídeos presentes nesta fração fibrosa do farelo de soja como, estaquiase e rafinose, são os principais responsáveis pelo alto teor de água nas fezes, pois são altamente fermentáveis no cólon. Elas podem alterar a microflora e a fisiologia do colón com a produção de ácidos graxos de cadeia curta ou ácidos graxos voláteis, assim como, esvaziamento gástrico e a absorção de nutrientes no intestino delgado quando estão na porção proximal do trato gastrointestinal (BORGES, 2003).

Tabela 4. Média do consumo das dietas, produção fecal na matéria natural (MN) e na matéria seca pelos métodos da coleta total (CT), produção fecal estimada pela LIPE e cromo (Cr) e escore das fezes para as dietas experimentais fornecidas aos cães

Dietas	Consumo (gMS/dia)	Produção fecal/animal/dia				Escore fecal <sup>1</sup>
		MN (g/dia)	MS CT (g/dia)	MS Cr (g/dia)	MS LIPE (g/dia)	
Referência	229,2 <sup>a</sup>	126,1 <sup>b</sup>	44,7 <sup>ab</sup>	48,3 <sup>b</sup>	60,2 <sup>a</sup>	3,89 <sup>b</sup>
Farinha de carne	245,6 <sup>a</sup>	120,3 <sup>b</sup>	50,4 <sup>a</sup>	56,3 <sup>a</sup>	58,1 <sup>a</sup>	4,75 <sup>a</sup>
Farinha de vísceras	245,0 <sup>a</sup>	128,0 <sup>b</sup>	50,3 <sup>a</sup>	50,3 <sup>ab</sup>	59,9 <sup>a</sup>	4,05 <sup>b</sup>
Glúten de milho	248,4 <sup>a</sup>	120,0 <sup>b</sup>	41,7 <sup>b</sup>	48,4 <sup>b</sup>	59,8 <sup>a</sup>	3,59 <sup>c</sup>
Farelo de soja	249,6 <sup>a</sup>	166,8 <sup>a</sup>	44,1 <sup>ab</sup>	49,2 <sup>b</sup>	59,8 <sup>a</sup>	3,12 <sup>d</sup>
Média	243,6	132,2	46,3	50,5	59,6	3,90
CV	10,61	14,02	11,40	10,59	8,67	7,56

<sup>1</sup> escore fecal classificado: 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 das gaiolas; 4- fezes bem formadas e consistentes e que não aderem ao piso; 5- fezes bem formadas, duras e secas. Médias na coluna diferem pelo Teste de Tukey (p< 0,05).

As dietas com farinhas de carne e vísceras apresentaram os maiores volumes fecais médios no método tradicional de coleta total de fezes. Mas quando se utilizou o

indicador cromo, a dieta com farinha de vísceras foi a que apresentou o maior valor estimado de produção fecal em g/dia ( $p > 0,05$ ). O mesmo não aconteceu com as estimativas de produção fecal geradas pelo indicador LIPE, cuja análise não diferiu entre as médias de produção fecal na MS g/dia. ( $p > 0,05$ ).

O escore fecal indicou que a pior consistência das fezes (3,12) se deu com a dieta com farelo de soja em virtude da maior umidade encontrada e a dieta com farinha de vísceras apresentou o melhor escore fecal. O escore fecal considerado ideal e aceitável varia entre 3,5 e 4, acima disso pode predispor os animais a retenção fecal, o que prejudica a saúde intestinal. A farinha de carne apresentou valor médio muito acima do indicado como ideal e muito próximo do escore máximo. SÁ FORTES (2005) encontrou o valor médio de 4,1 para a dieta com farinha de carne e ossos, sendo também o maior valor encontrado entre todas as dietas com ingredientes proteicos testados em seu trabalho. Como a avaliação do escore fecal é subjetiva, ou seja, depende de fatores não quantitativos e relacionados a pessoa que o faz, é muito importante que a mesma pessoa faça sempre a avaliação durante a coleta de todas as amostras de fezes, para desta maneira, usar os mesmos critérios subjetivos. Isto pode justificar as diferenças entre este trabalho e o apresentado por SÁ FORTES (2005).

Os resultados obtidos pelo método HPLC para a concentração de aminoácidos essenciais e não-essenciais totais dos ingredientes proteicos analisados estão expressos na Tabela 5 e 6, respectivamente.

Os valores encontrados na Tabela 6 para a concentração de aminoácidos essenciais no ingrediente farinha de carne e ossos são muito semelhantes àqueles obtidos por JOHNSON et al (1998) e ROSTAGNO et al (2005) porém estes últimos autores citados, encontraram maior diferença apenas para o conteúdo de lisina que foi de 17,67% comparado com o valor deste trabalho. Em função da variabilidade de farinhas de carne e ossos encontradas no mercado provenientes de diferentes conteúdos de nutrientes das matérias-primas, como ossos e tecido tendinoso, pode-se encontrar resultados com grande variação para a concentração de aminoácidos segundo POZZA et al (2004).

O farelo de glúten de milho 60% apresentou as maiores concentrações de aminoácidos essenciais, seguido pela farinha de vísceras, farelo de soja e a farinha de carne e ossos. As concentrações do total de aminoácidos essenciais do farelo de soja em

relação à farinha de carne e ossos foi 16,5% superior, apesar de ambos ingredientes normalmente apresentarem teores de proteína bruta similares. Comparados com os resultados obtidos por ROSTAGNO et al (2005) apesar de serem descritos para suínos, a farinha de vísceras foi o ingrediente que apresentou as menores variações de concentração de aminoácidos. O mesmo ocorreu com o farelo de glúten de milho 60%, que apresentou grandes variações nas concentrações dos aminoácidos treonina e valina, e o farelo de soja, com grande variação na metionina de 44,75%.

Tabela 5. Composição aminoácidos essenciais (em % da matéria seca) dos ingredientes proteicos testados e dieta referência

Aminoácidos Essenciais	Ingredientes				Dieta
	FC	FV	FG	FS	DR
Arginina	3,76	4,19	2,08	3,37	1,39
Fenilalanina	1,70	2,41	4,18	2,58	1,12
Histidina	0,80	1,20	1,38	1,24	0,52
Isoleucina	1,27	2,25	2,63	2,37	0,84
Leucina	2,91	4,27	10,95	3,78	2,20
Lisina	2,66	3,50	1,01	2,96	0,10
Metionina	0,67	1,12	1,16	0,36	0,35
Treonina	1,61	2,43	2,47	1,91	0,86
Valina	2,04	2,93	3,14	2,30	1,14
Soma Aas <sub>e</sub>	17,42	24,30	29,00	20,87	8,52

Resultados obtidos pelo método HPLC no Laboratório da Kerry Bioscience em Almêre/Holanda. Aas<sub>e</sub> – aminoácidos; FC – farinha de carne e ossos bovina; FV – farinha de vísceras de frango; FG – farinha de glúten de milho 60%; FS – farelo de soja; Aas<sub>e</sub> aminoácidos essenciais.

Considerando a somatória de aminoácidos não-essenciais, da mesma maneira que os aminoácidos essenciais, o farelo de glúten de milho apresentou os maiores valores de concentração de aminoácidos não-essenciais, seguidos pela farinha de vísceras, farinha de carne e farelo de soja. Os valores obtidos para os teores de aminoácidos essenciais e não-essenciais na dieta referência suprem as necessidades nutricionais de cães adultos em manutenção preconizados pelo NRC (2006).

As médias dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) não diferiram ( $p > 0,05$ ), para os aminoácidos arginina, histidina e treonina nos três métodos de

determinação de digestibilidade avaliados. No entanto, para fenilalanina e isoleucina os CDAs mostraram-se diferentes ( $p > 0,05$ ). Os CDA da leucina, lisina, metionina e valina apresentaram interação entre os métodos e os ingredientes, sendo os métodos coleta total de fezes, indicador óxido crômico e LIPE diferentes ( $p > 0,05$ ) em cada um dos ingredientes.

Tabela 6. Composição em aminoácidos não-essenciais (em % da matéria seca) dos ingredientes proteicos testados e da dieta referência

Aas <sub>ne</sub>	Ingredientes				Dieta
	FC	FV	FG	FS	DR
Aspartato	3,73	4,91	4,12	5,57	1,89
Tirosina	1,04	1,68	2,96	1,52	0,63
Serina	2,00	2,91	3,47	2,48	1,21
Glutamina	6,13	7,96	14,47	8,94	3,76
Prolina	5,27	4,43	6,11	2,47	1,87
Glicina	8,29	6,47	1,85	2,14	1,82
Alanina	4,10	4,09	5,77	2,11	1,56
Cistina	0,28	0,68	0,69	0,45	0,29
Soma Aas <sub>ne</sub>	30,84	33,13	39,44	25,68	13,03

Resultados obtidos pelo método HPLC no Laboratório da Kerry Bioscience em Almere/Holanda. Aas<sub>ne</sub> – aminoácidos; FC – farinha de carne e ossos bovina; FV – farinha de vísceras de frango; FG – farinha de glúten de milho 60%; FS – farelo de soja

Os resultados dos CDA dos aminoácidos essenciais obtidos utilizando-se a LIPE para o ingrediente farelo de glúten de milho 60%, mostraram que existem grandes diferenças, especialmente em relação à lisina (50,43%), sendo inferior aos obtidos por ROSTAGNO et al (2005) que é de 91,7% em aves e 85,9% em suínos.



Tabela 7 – Coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) médios dos aminoácidos essenciais das quatro fontes proteicas e nos três métodos de determinação da digestibilidade em cães<sup>1</sup>

Ingredientes	Método	CDA dos aminoácidos essenciais								
		Arginina	Fenilalanina	Histidina	Isoleucina	Leucina*	Lisina*	Metionina*	Treonina	Valina*
Farinha de carne	CT	79,04	81,83	83,82	79,74	80,98 <sup>a</sup>	83,74 <sup>a</sup>	80,34 <sup>a</sup>	87,40	83,09 <sup>b</sup>
	Cr	88,26	89,08	90,38	87,70	88,71 <sup>a</sup>	89,80 <sup>a</sup>	87,89 <sup>a</sup>	91,56	89,53 <sup>ab</sup>
	LIPE	82,11	88,94	90,45	89,57	86,89 <sup>a</sup>	95,98 <sup>a</sup>	87,54 <sup>a</sup>	99,64	93,72 <sup>a</sup>
Farinha de vísceras	CT	87,31	79,10	86,15	79,40	78,82 <sup>b</sup>	89,28 <sup>a</sup>	84,14 <sup>b</sup>	89,54	75,73 <sup>b</sup>
	Cr	94,92	91,60	95,10	92,50	91,25 <sup>a</sup>	97,82 <sup>a</sup>	94,01 <sup>a</sup>	97,86	90,67 <sup>a</sup>
	LIPE	89,38	82,96	90,77	85,96	81,80 <sup>b</sup>	98,99 <sup>a</sup>	89,03 <sup>ab</sup>	98,81	91,72 <sup>ab</sup>
Farelo de glúten de milho 60%	CT	87,72	99,83	92,61	91,83	106,12 <sup>a</sup>	69,83 <sup>a</sup>	100,30 <sup>a</sup>	97,05	93,72 <sup>a</sup>
	Cr	90,84	96,98	93,07	91,43	101,16 <sup>a</sup>	77,52 <sup>a</sup>	96,89 <sup>a</sup>	94,25	81,72 <sup>ab</sup>
	LIPE	79,43	95,50	85,71	83,16	105,17 <sup>a</sup>	50,43 <sup>b</sup>	95,57 <sup>a</sup>	88,84	86,99 <sup>a</sup>
Farelo de soja	CT	99,12	93,31	96,58	89,06	87,48 <sup>a</sup>	102,32 <sup>a</sup>	79,22 <sup>ab</sup>	89,30	83,74 <sup>ab</sup>
	Cr	99,01	95,21	97,32	85,18	92,06 <sup>a</sup>	99,92 <sup>a</sup>	87,00 <sup>a</sup>	92,81	89,56 <sup>a</sup>
	LIPE	98,64	90,74	95,40	85,18	82,93 <sup>b</sup>	102,60 <sup>a</sup>	71,27 <sup>b</sup>	85,38	77,84 <sup>b</sup>

\*Interação entre método e ingrediente sendo, o método diferente dentro de cada ingrediente para cada aminoácido; <sup>†</sup>valores obtidos por meio de análises dos aminoácidos no HPLC. Médias na coluna diferem pelo Teste de Tukey (p< 0,05).



Os métodos coleta total e indicador óxido crômico e LIPE apresentaram CDAs dos aminoácidos acima de 100% para a leucina no ingrediente farelo de glúten de milho 60%. Este mesmo ingrediente também apresentou valores semelhantes para a metionina quando avaliados no método coleta total. Os CDAs da lisina para o farelo de soja determinados pelo método coleta total e LIPE, também apresentaram resultados semelhantes. A possível explicação pode estar relacionada com as concentrações destes aminoácidos nos ingredientes e nas fezes, levando a erros de análises, assim como, as limitações e possibilidades de erros na aplicação dos métodos de inclusão das matérias-primas nas dietas teste e finalmente, os cálculos por extrapolação.

Outros autores encontraram resultados semelhantes em avaliações com outras espécies animais, como por exemplo, LIKUSKI e DORELL (1978) com valores acima de 100% para o triptofano, cistina, metionina, lisina, tirosina, histidina e serina, da soja e cevada. Da mesma forma, BRAGG et al. (1970) encontraram digestibilidades maiores que 100% para a cistina no farelo de soja, trabalhando com aves modificadas cirurgicamente. BORGES (1999) também encontrou resultados acima de 100% para coeficientes de digestibilidade aparente para a ISO em aves quando avaliou diferentes fontes energéticas.

As médias dos CDAs não diferiram ( $p > 0,05$ ) para os aminoácidos cistina, serina e tirosina nos três métodos de determinação de digestibilidade (Tabela 9). No entanto, para os aminoácidos aspartato, glicina, prolina e glutamina as médias dos CDAs apresentaram-se diferentes entre os métodos coleta total e indicadores. O CDA da alanina apresentou interação entre método e ingrediente, sendo os métodos coleta total, óxido crômico e LIPE diferentes ( $p < 0,05$ ) em cada um dos ingredientes.



Tabela 8 – Coeficientes de digestibilidade aparente médios dos aminoácidos não-essenciais das quatro fontes proteicas e nos três métodos de determinação da digestibilidade em cães<sup>1</sup>

Ingredientes	Métodos	CDA dos aminoácidos não essenciais							
		Alanina*	Aspartato	Cistina	Glicina	Glutamina	Prolina	Serina	Tirosina
Farinha de carne e ossos	CT	80,29 <sup>a</sup>	74,42	67,62	79,19	76,31	74,92	79,79	83,88
	Cr	88,50 <sup>b</sup>	84,56	80,87	88,17	86,14	85,74	87,95	89,68
	LIPE	88,30 <sup>a</sup>	83,56	74,39	85,62	81,56	79,13	87,22	94,65
Farinha de vísceras	CT	77,86 <sup>b</sup>	74,53	80,38	82,35	78,52	85,57	82,14	77,22
	Cr	87,96 <sup>a</sup>	90,08	93,04	93,43	91,20	94,58	93,41	91,57
	LIPE	70,10 <sup>b</sup>	80,39	86,77	86,76	81,70	89,40	87,40	83,96
Farelo de glúten de milho 60%	CT	101,56 <sup>a</sup>	88,91	95,72	79,47	101,53	96,02	99,73	108,83
	Cr	97,78 <sup>a</sup>	89,53	94,09	84,82	98,39	95,27	96,84	101,43
	LIPE	97,68 <sup>a</sup>	78,60	88,81	66,14	98,49	90,71	95,02	107,15
Farelo de soja	CT	73,80 <sup>b</sup>	100,23	94,85	71,66	96,80	86,74	93,71	95,23
	Cr	84,21 <sup>a</sup>	98,87	96,11	83,29	97,31	91,74	95,48	95,88
	LIPE	64,30 <sup>c</sup>	100,03	92,38	61,34	95,50	81,82	91,17	93,21

\*Interação entre método e ingrediente sendo, o método diferente dentro de cada ingrediente para cada aminoácido; <sup>1</sup>valores obtidos por meio de análises de aminoácidos no HPLC. Médias na coluna diferem pelo Teste de Tukey (p< 0,05).



O CDA do aspartato apresentou valores acima de 100% para o ingrediente farelo de soja, quando estimado pelos métodos coleta total e LIPE. O mesmo ocorreu com o CDA da glutamina para o farelo de glúten de milho 60% no método coleta total. O farelo de glúten de milho 60% apresentou CDA acima de 100% para a tirosina em todos os três métodos avaliados. Semelhante ao que foi citado para os aminoácidos essenciais, a possível explicação pode estar relacionada com as concentrações destes aminoácidos nos ingredientes e nas fezes, levando a erros de análises, assim como, as limitações e possibilidades de erros na aplicação dos métodos de inclusão das matérias-primas nas dietas teste e finalmente, os cálculos por extrapolação.

As técnicas de análise ou leitura de aminoácidos avaliadas foram comparadas com as duas diferentes metodologias para determinação da digestibilidade de aminoácidos a coleta total e os indicadores óxido crômico e LIPE nos ingredientes proteicos farinha de carne e ossos, farinha de vísceras e no farelo de soja (Tabelas 9, 10 e 11). Os resultados obtidos pela técnica HPLC via coleta total foram considerados como padrão e referência de comparação para os valores obtidos para as técnicas NIR e IDEA. Não foram obtidos valores de CDA para o farelo de glúten de milho através das técnicas NIR e IDEA por não terem curvas de calibração no NIR e testes enzimáticos suficientes para assegurarem resultados precisos.

Através da Tabela 9, onde se avaliou a farinha de carne e ossos, observou-se que 77% dos resultados para os coeficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos essenciais estimados por meio da técnica IDEA foram semelhantes a técnica HPLC pelos métodos coleta total e indicador óxido crômico. A técnica IDEA não apresentou ser um bom método de leitura para os CDAs dos aminoácidos histidina, metionina, glutamina e prolina para a fonte proteica farinha de carne e ossos ( $p < 0,05$ ). O CDA estimado pelo IDEA para a histidina apresentou diferenças para a técnica HPLC em todos os métodos. Para os aminoácidos essenciais da farinha de carne a IDEA não demonstrou ser boa técnica quando comparados com a LIPE, pois 50% destes aminoácidos diferiram dos valores da CT ( $p < 0,05$ ). Já para os aas não-essenciais a IDEA só foi diferente para o aminoácido aspartato quando comparado com o indicador LIPE. De uma maneira geral o IDEA mostrou que em 76,4% dos resultados para farinha de carne foi semelhante a técnica de HPLC usando coleta total, sendo este o principal parâmetro de análise utilizado nas pesquisas com aminoácidos.

Tabela 9 – Coeficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos da farinha de carne e ossos para cães utilizando IDEA e NIR comparados com HPLC (coleta total, óxido crômico e LIPE)

Dietas	Aminoácidos	Técnicas de leitura de aminoácidos <sup>1</sup>				
		IDEA <sup>®</sup>	HPLC			
			Coleta total	Cromo	LIPE	
Farinha de carne e ossos	Arginina	87,90	Ns	Ns	*	
	Fenilalanina	89,30	Ns	Ns	Ns	
	Histidina	79,40	*	*	*	
	Isoleucina	86,60	Ns	Ns	Ns	
	Leucina	87,60	Ns	Ns	Ns	
	Lisina	83,50	Ns	Ns	*	
	Metionina	86,00	*	Ns	Ns	
	Treonina	83,00	Ns	*	*	
	Valina	84,40	Ns	Ns	*	
	Alanina	85,20	Ns	Ns	Ns	
	Aspartato	69,30	Ns	*	*	
	Cistina	64,90	Ns	*	Ns	
	Glicina	85,60	Ns	Ns	Ns	
	Glutamina	83,60	*	Ns	Ns	
	Prolina	84,40	*	Ns	Ns	
	Serina	81,20	Ns	*	Ns	
	Tirosina	89,90	Ns	Ns	Ns	
			NIRS <sup>2</sup>			
		Arginina	87,95	*	Ns	*
		Fenilalanina	91,20	*	Ns	Ns
	Histidina	79,22	Ns	*	*	
	Isoleucina	88,19	*	Ns	Ns	
	Leucina	89,39	*	Ns	Ns	
	Lisina	82,13	Ns	Ns	*	
	Metionina	85,14	Ns	Ns	Ns	
	Treonina	78,83	*	*	*	
	Valina	85,21	Ns	Ns	*	

<sup>1</sup>Teste t com  $p < 0,05$ ; <sup>2</sup> não foram obtidos CDA dos aas não-essenciais para esta técnica; Ns – diferença estatisticamente não significativa.

Para a técnica NIR os melhores resultados foram observados quando comparados com o HPLC usando indicador óxido de cromo, onde apenas para a histidina e treonina diferiram quanto aos CDAs ( $p < 0,05$ ). O CDA da treonina para farinha de carne estimado pelo NIR mostrou resultado muito abaixo do estimado pelo HPLC na coleta total e com os indicadores óxido crômico e LIPE. Uma possível habilidade do NIR para predizer com precisão os CDA de aminoácidos em fontes proteicas de origem animal é citada por QIAO e VAN KEMPEN (2004). Em outro

trabalho VAN KEMPEN e BODIN (1998) concluíram que o NIR pode prever com 88% a 95% a digestibilidade da lisina e 80% a 86% da metionina para a farinha de carne e ossos e farinha de vísceras. No entanto, foi encontrado para o NIR diferença ( $p < 0,05$ ) para os valores de CDAs dos aminoácidos arginina, fenilalanina, isoleucina, leucina e treonina para a farinha de carne e ossos quando comparados com a coleta total.

As técnicas IDEA e NIR apresentaram resultados de 70,5% para os CDA dos aminoácidos essenciais e não-essenciais e 77,7% para essenciais, respectivamente, demonstrando serem bons instrumentos para estimar CDA para a farinha de vísceras (Tabela 10) quando comparados com o HPLC usando coleta total, exceto para os aminoácidos histidina e treonina para ambas as técnicas e lisina aspartato e cistina para o IDEA.

No entanto, foi evidente a desigualdade dos CDAs gerados pelo IDEA e NIR para principalmente os aminoácidos essenciais, quando comparados com o método de indicadores como o óxido crômico e a LIPE. Para a farinha de vísceras os CDAs da histidina e treonina estimados pelo IDEA e NIR foram diferentes ( $p < 0,05$ ) em todos os métodos medidos pelo HPLC. Além destes, os CDAs do aspartato, cistina e lisina estimados pelo IDEA também não apresentaram eficiência para a farinha de vísceras em nenhum dos métodos mensurados pelo HPLC, pois seus valores mostraram-se muito abaixo dos valores obtidos pelos outros métodos, com exceção da lisina que foi maior e diferiu da coleta total ( $p > 0,05$ ). Entretanto, os valores dos CDAs apresentados para os aminoácidos arginina, fenilalanina, valina, glicina e prolina por meio do IDEA foram semelhantes em todos os métodos (coleta total e indicadores) mensurados pelo HPLC.

Utilizando-se o NIR apenas houve diferença apenas para os CDAs dos aminoácidos histidina e treonina, mostrando ser possível utilizar com precisão esta técnica para a farinha de vísceras para os outros aminoácidos essenciais, quando comparados com o padrão HPLC via coleta total.

Para o farelo de soja os valores de CDA dos aminoácidos estimados pelo IDEA foram altos em relação aos obtidos pelos NIR e HPLC (coleta total, óxido de cromo e LIPE) (Tabela 11).

Tabela 10 – Coeficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos da farinha de vísceras para cães utilizando IDEA e NIR comparados com HPLC (coleta total, óxido crômico e LIPE)

Dietas	Aminoácidos	Técnicas de leitura de aminoácidos <sup>1</sup>				
		IDEA <sup>®</sup>	HPLC			
			Coleta total	Cromo	LIPE	
Farinha de vísceras	Arginina	84,20	Ns	Ns	Ns	
	Fenilalanina	84,10	Ns	Ns	Ns	
	Histidina	71,40	*	*	*	
	Isoleucina	78,90	Ns	*	*	
	Leucina	80,50	Ns	*	*	
	Lisina	71,80	*	*	*	
	Metionina	77,70	Ns	*	*	
	Treonina	75,10	*	*	*	
	Valina	76,80	Ns	*	*	
	Alanina	79,90	Ns	*	Ns	
	Aspartato	59,30	*	*	*	
	Cistina	50,60	*	*	*	
	Glicina	81,20	Ns	Ns	Ns	
	Glutamina	76,60	Ns	*	Ns	
	Prolina	78,90	Ns	Ns	Ns	
	Serina	74,20	Ns	*	*	
	Tirosina	85,50	Ns	Ns	*	
		NIR <sup>2</sup>				
		Arginina	84,10	Ns	Ns	Ns
		Fenilalanina	83,86	Ns	Ns	Ns
	Histidina	75,57	*	*	*	
	Isoleucina	82,02	Ns	Ns	*	
	Leucina	82,96	Ns	*	Ns	
	Lisina	79,71	Ns	*	*	
	Metionina	83,61	Ns	Ns	Ns	
	Treonina	75,10	*	*	*	
	Valina	79,92	Ns	*	*	

<sup>1</sup>Teste t com  $p < 0,05$ ; <sup>2</sup> não foram obtidos CDA dos aas não essenciais para esta técnica. Ns – diferença estatisticamente não significativa.

Como consequência disto, não houve para nenhum dos aminoácidos similaridade nos resultados para a coleta total, apenas 35,3% e 47,1% dos dados foram semelhantes para os indicadores óxido crômico e LIPE, respectivamente. Estes resultados diferem dos obtidos por SHASTEEN et al (2007), que avaliando a relação entre valores do IDEA e digestibilidade *in vivo* do farelo de soja em frangos de corte, concluíram que a curva padrão do IDEA apresenta alta correlação (88% a 90%) com os resultados obtidos *in vivo*, com valores de CDA para alguns aminoácidos de 89,0% para lisina, 91,5% para metionina, 86,0% para cistina e 88,2% para treonina. Isto pode ser

explicado pelo fato do IDEA ser uma técnica desenvolvida para determinar aminoácidos digestíveis para as espécies suínos e aves e não para cães, em se tratando do ingrediente farelo de soja e superestimou os valores dos CDAs de todos os aminoácidos.

Tabela 11 – Coeficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos do farelo de soja para cães utilizando IDEA e NIR comparados com HPLC (coleta total, óxido crômico e LIPE)

Dietas	Aminoácidos	Técnicas de leitura de aminoácidos <sup>1</sup>			
		IDEA <sup>®</sup>	HPLC		
			Coleta total	Cromo	LIPE
Farelo de soja	Arginina	95,10	*	*	*
	Fenilalanina	95,90	*	*	*
	Histidina	94,50	*	Ns	Ns
	Isoleucina	95,50	*	*	Ns
	Leucina	94,90	*	*	*
	Lisina	92,40	*	Ns	Ns
	Metionina	95,30	*	*	*
	Treonina	93,10	*	Ns	Ns
	Valina	93,60	*	Ns	Ns
	Alanina	90,60	*	Ns	Ns
	Aspartato	92,44	*	*	*
	Cistina	96,50	*	*	*
	Glicina	94,30	*	Ns	Ns
	Glutamina	94,80	*	*	*
	Prolina	96,80	*	*	*
	Serina	96,21	*	*	*
	Tirosina	98,70	*	*	Ns
			NIR <sup>2</sup>		
	Arginina	89,07	*	Ns	*
	Fenilalanina	85,78	Ns	Ns	Ns
	Histidina	89,83	*	Ns	Ns
	Isoleucina	86,73	*	Ns	Ns
	Leucina	83,79	Ns	Ns	Ns
	Lisina	87,84	Ns	Ns	*
	Metionina	83,93	Ns	Ns	Ns
	Treonina	82,08	Ns	*	*
	Valina	81,41	Ns	*	*

<sup>1</sup>Teste t com  $p > 0,05$ ; <sup>2</sup> não foram obtidos CDA dos aas não essenciais para esta técnica; Ns – diferença estatisticamente não significativa.

A técnica NIR, apresentou em geral muitos resultados semelhantes ( $p > 0,05$ ) aos valores gerados pelo HPLC em todos os métodos para os aminoácidos essenciais do farelo de soja. Isto indica que as curvas de predição para estimar a digestibilidade do farelo de soja usando o NIR, são adequadas para quase todos os aminoácidos essenciais, exceto a arginina e histidina e isoleucina, quando comparadas

com o padrão coleta total. Considerando que os outros aminoácidos são mais importantes para o desenvolvimento dos cães e que o farelo de soja é rico nestes aminoácidos, esta técnica poderia ser utilizada para este ingrediente na determinação de aminoácidos digestíveis para cães. Da mesma forma que o IDEA, as equações de calibração do NIR estão baseados em resultados para suínos e aves porém os resultados obtidos neste trabalho indica uma melhor eficiência para o farelo de soja usando esta técnica.

As concentrações dos aminoácidos essenciais e não-essenciais digestíveis na matéria seca dos ingredientes proteicos estão apresentados nas Tabelas 12 e 13, estimadas pelas diferentes metodologias (coleta total de fezes, indicadores óxido crômico e LIPE) e técnicas de análises de aminoácidos HPLC, NIR e IDEA. Cabe ressaltar que as perdas endógenas de nitrogênio e aminoácidos oriundos de secreção enzimáticas, descamações do epitélio, mucina, entre outros fatores podem ter influenciado nos resultados de concentração de aminoácidos digestíveis dos ingredientes proteicos estudados.

O valor da concentração de metionina para o farelo de soja mostrou-se muito abaixo em todas as técnicas e métodos, quando comparado ao valor obtido por ROSTAGNO et al. (2005) para este ingrediente em aves e suínos que foi de 0,58%. Da mesma maneira, a concentração de lisina para o farelo de glúten de milho 60% ficou 66 % abaixo dos valores obtidos pelos mesmos autores. Diferenças significativas também ocorreram nos valores de concentração para a lisina e treonina da farinha de carne com 22,3% a 22,7 % maiores do que os obtidos por ROSTAGNO et al. (2005), respectivamente.

Tabela 12 – Concentração de aminoácidos essenciais digestíveis nos ingredientes proteicos utilizados na alimentação de cães determinada por meio de diferentes metodologias e técnicas de leitura de aminoácidos.

Aa <sub>ed</sub>	Ingredientes proteicos																	
	Farinha de carne e ossos					Farinha de vísceras					Farelo de soja					Glúten de milho		
	HPLC			IDEA	NIR	HPLC			IDEA	NIR	HPLC			IDEA	NIR	HPLC		
	CT	Cr	LIPE			CT	Cr	LIPE			CT	Cr	LIPE			CT	Cr	LIPE
Arg	2,97	3,32	3,09	3,31	3,31	3,66	3,98	3,75	3,53	3,52	3,34	3,34	3,32	3,20	3,00	1,82	1,89	1,65
Fen	1,39	1,51	1,51	1,52	1,55	1,91	2,21	2,00	2,03	2,02	2,41	2,46	2,34	2,47	2,21	4,17	4,05	3,99
His	0,67	0,72	0,72	0,64	0,63	1,03	1,14	1,09	0,86	0,91	1,20	1,21	1,18	1,17	1,11	1,28	1,28	1,18
Isso	1,01	1,11	1,14	1,10	1,12	1,79	2,08	1,93	1,78	1,85	2,11	2,02	2,02	2,26	2,06	2,42	2,40	2,19
Leu	2,36	2,58	2,53	2,55	2,60	3,37	3,90	3,49	3,44	3,54	3,31	3,48	3,13	3,59	3,17	11,62	11,08	11,52
Lis	2,23	2,39	2,55	2,22	2,18	3,12	3,42	3,46	2,51	2,79	3,03	2,96	3,04	2,74	2,60	0,71	0,78	0,51
Met	0,54	0,59	0,59	0,58	0,57	0,94	1,05	1,00	0,87	0,94	0,29	0,31	0,26	0,34	0,30	1,16	1,12	1,11
Treo	1,41	1,47	1,60	1,34	1,27	2,18	2,38	2,40	1,82	1,85	1,71	1,77	1,63	1,78	1,51	2,40	2,33	2,19
Val	1,70	1,83	1,91	1,72	1,74	2,22	2,66	2,39	2,25	2,34	2,00	2,06	1,79	2,15	1,87	2,97	2,92	2,73
Soma	14,2	15,5	15,6	14,9	14,9	20,2	22,8	21,5	19,0	19,7	19,4	19,6	18,7	19,7	17,8	28,6	27,9	27,1

Aa<sub>ed</sub> aminoácidos essenciais digestíveis; Aa<sub>limd</sub> aminoácidos limitantes digestíveis (met + tre + lis); HPLC High performance liquid chromatography; IDEA Immobilized Digestive Enzyme Assay; NIR Near Infrared; CT coleta total; Cr cromo; LIPE lignina de eucalipto modificada.

Tabela 13 – Concentração de aminoácidos não-essenciais digestíveis nos ingredientes proteicos utilizados na alimentação de cães determinada através de diferentes metodologias e técnicas de leitura de aminoácidos.

Aa <sub>ned</sub>	Ingredientes proteicos														
	Farinha de carne e ossos				Farinha de vísceras				Farelo de soja				Glúten de milho		
	HPLC			IDEA	HPLC			IDEA	HPLC			IDEA	HPLC		
	CT	Cr	LIPE		CT	Cr	LIPE		CT	Cr	LIPE		CT	Cr	LIPE
Asp	2,78	3,36	3,12	2,58	4,37	4,40	3,95	2,91	4,11	5,51	5,59	5,15	3,66	3,69	3,24
Cis	0,23	0,26	0,21	0,18	0,65	0,64	0,59	0,34	0,43	0,43	0,42	0,43	0,66	0,65	0,42
Gli	6,83	7,75	7,10	6,93	6,83	5,49	5,61	5,25	1,53	1,78	1,31	2,02	1,47	1,57	1,22
Glu	4,81	5,59	5,00	5,12	8,08	7,83	6,50	6,10	8,65	8,70	8,54	8,48	14,69	14,24	14,25
Pro	4,51	4,98	4,17	4,45	4,25	4,22	3,96	3,50	2,14	2,27	2,02	2,39	5,87	5,82	5,54
Ser	1,64	1,87	1,74	1,62	2,90	2,82	2,54	2,16	2,32	2,37	2,26	2,39	3,46	3,36	3,30
Tir	0,80	0,95	0,98	0,93	1,83	1,70	1,41	1,44	1,45	1,46	1,42	1,50	3,22	3,00	3,17
Soma	21,6	24,76	22,32	21,81	28,91	27,1	24,56	21,7	20,63	22,52	21,56	22,36	33,03	32,33	31,14
Total <sup>1</sup>	35,88	40,28	37,96	36,79	49,13	49,92	46,07	40,79	40,03	42,13	40,27	42,06	61,58	60,18	58,21

Aa<sub>ned</sub> aminoácidos não-essenciais digestíveis; <sup>1</sup> Somatória de todos os aminoácidos digestíveis; HPLC High Performance Liquid Chromatography; IDEA Immobilized Digestive Enzyme Assay; CT coleta total; Cr cromo; LIPE lignina de eucalipto modificada.

## Conclusões

Pelos resultados obtidos a LIPE como indicador mostrou ser um método eficaz para a determinação de coeficientes de digestibilidade de aminoácidos essenciais para farinha de vísceras, mas, ineficiente para valina na farinha de carne, lisina no farelo de glúten de milho e leucina e alanina no farelo de soja.

O IDEA mostrou ser uma técnica que pode ser utilizada para estimar os valores de vários aminoácidos digestíveis com exceção da histidina, metionina glutamina e prolina para a farinha de carne e ossos e histidina, aspartato, lisina, treonina e cistina para a farinha de vísceras. Enquanto o farelo de soja não pode ser aplicado para nenhum dos aminoácidos.

Para os aminoácidos histidina, lisina metionina e valina da farinha de carne e ossos o NIR pode ser utilizado para cães. Não mostrou acurácia para os aminoácidos histidina e treonina na farinha de vísceras e arginina, histidina e isoleucina no farelo de soja.

As metodologias utilizadas para leitura de aminoácidos NIR e IDEA, e para determinação da digestibilidade LIPE, considerando as exceções citadas, podem ser utilizadas pela indústria de *pet food* para determinação de aminoácidos digestíveis diminuindo o tempo e os custos com infraestrutura e animais experimentais. Porém mais estudos devem ser realizados para aumentar a variabilidade dos dados destas duas técnicas de análise e método de determinação da digestibilidade.

### III - CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINO, L.F.T., ROSTAGNO, H.S., FONSECA, J.B., TAFURI, M. L., et al. Uso de aminoácidos disponíveis e proteína digestível na formulação de rações para pintos de corte. *Rev. Soc. Bras. Zoot.*, v. 21, n.6, p.1069-1076, 1992b.
- ALBINO, L.T.F. Sistemas de avaliação nutricional de alimentos e suas aplicações na formulação de rações para frangos de corte. Viçosa, MG, UFV, Impr. Univ., 1991, 141 p (Tese Doutorado).
- ANDREASI, F. Estudos de métodos indiretos (óxido crômico e lignina) para a determinação da digestibilidade aparente no cão. 1956, 60p. Tese (Livre Docência), São Paulo, Universidade de São Paulo.
- ANFALPET. Associação Nacional dos fabricantes de alimentos para animais de companhia. Perfil Petfood 2008. São Paulo, SP. 2008.
- ANFALPET. Guia nutricional pet. In: **Guia de identidade e qualidade pet**. PIQPET. 1ª edição. São Paulo, SP. p. 20-24. 2007.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS - AAFCO. **Dog and cat food substantiation methods**. Canada, 2006, 467p.
- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 14. ed. Washington, 1984. 1141 p.
- BARDON, T.; FIOTAMONT, J., Nature of the effects of bran on digestive transit in pigs. *Br. Journal Nutrition*, v. 50, p.685-690, 1983.

- BERNARDI, C. R.; LUIZ, M. T. B.; ZANOTTO, D. L.; GUIDONI, A. L. Preparo de hidrolisados protéicos para análises de aminoácidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 23(3): 317-322, 2003.
- BORGES, F. M. O. Valores Energéticos e Aminoácidos Digestíveis do Grão de Trigo e seus Subprodutos para aves. Tese de Doutorado, UFV – Viçosa. 1999.
- BORGES, F.M.O. Utilização do sorgo em alimentos para animais de estimação. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2, Anais..., Uberlândia, Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002, p.39-48.
- BRAGG, D.B., IVY, C.A., STEPHENSON, E.L, Methods for determining amino acid availability of feeds. **Poult. Sci.**, n. 47,p. 2135-2137, 1970.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº08, de 11 de outubro de 2002. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 2, p1-6.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 15, de 29 de outubro de 2003. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 3, p1-8.
- BRASS, W., SCHUNEMANN, C. Permanence fistulas in the ileum and colon of the dogs: implantation, maintenance, use and effect on the digestive process. *Fortshtr Tierphysiol Tierernahrg*,v.19,p. 7-13.1986.
- BURROWS, C.F.; KROMFELD, D.S.; BANTA, C.A.; ERRITT, A.M. Effects of fiber on digestibility and transit time in dogs. **Journal Nutrition**, v.112, p.1726-1732, 1982.
- CARCIOFI, A.C.; PRADA, F.; MORI, C.S. Uso de indicadores internos na avaliação da digestibilidade aparente de alimentos para gatos – comparação de métodos. *Ciência Rural*. Santa Maria, v. 28, n. 2, p. 299-302, 1998.
- CARCIOFI, A.C. Proteína na alimentação de cães e gatos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 2, **Anais...**, Campinas, Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002, p. 31-44.
- CARCIOFI, A.C. Proposta de normas e padrões nutricionais para a alimentação pet. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 3, **Anais...**, Campinas, Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2003, p.71-84.
- CARCIOFI, A.C.; VASCONCELOS, R.S.; DE OLIVEIRA, L.D. et al. Chromic oxide as a digestibility marker for dogs. A comparasion of methods of analysis. *Animal and feed Science Technology*. v. (in press) 2007.
- CASE, L.P.; CAREY, D.P.; HIRAKAWA, D.A. Nutrição Canina e Felina – Manual para profissionais. Madrid, Harcourt Brace, 1998, 424p.
- CASTRILLO, C.; BAUCCELLS, M. VICENTE, F.; MUÑOZ, F.; ANDUEZA, D. Energy evaluation of extruded compound foods for dogs by near-infrared spectroscopy. *J. Anim. Physiology and Anim. Nutr.* 89:194-198,2005.

- CHERNEY, D.J.R. Characterization of forages by chemical analysis. In: GIVENS, D.J. et al. Forage evaluation in ruminant nutrition, Oxon, CABI, 2000, p.281-300.
- CHITTENDEN, R.H. 1904. The effect of low proteid diet on high proteid animals. Pp. 229-265 in *The Nutrition of Man* Chittenden, ed. New York: Frederick A. Stokes.
- CHOCT, M.; ANNISON, G. Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets.
- CHURCH, D.C. *Livestock Feeds and Feeding*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey Third Edition. p.434. 1991.
- CLAPPER, G. M.; GRIESHOP, C.M.; MERCHEN, N.R.; RUSSETT, J.C.; BRENT, J.L.; FAHEY, G.C. Ileal and total tract nutrient digestibilities and fecal characteristics of dogs as affected by soybean protein inclusion in dry, extruded diets. **Journal Animal Science**, v.79, p.1523-1532, 2001.
- Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. São Paulo: SINDIRAÇÕES/ANFAL. Campinas CBNA/SDR/MA. 1998. 371p.
- CRISSEY, S.D., THOMAS, O.P. Comparison of the sensitivities of growth and digestibility studies using intact, cecotomized, and cannulated roosters. **Poult. Sci.**, n. 66, v. 5, p. 866-874, 1987.
- CUNNIF, P. *Official Methods analysis of AOAC International*. 16 ed., Gaithersburg:AOAC, 1996, v.1, chap. 4, p.1-45.
- DIFISA-Divisão de Fiscalização de Alimentos para Animais. Padrões oficiais de matérias-primas destinadas à alimentação animal. Brasília, 1989.
- DZANIS, D. A. The association of American Feed Control Officials dog and cat food nutrient profiles; Substantiation of nutritional adequacy of complete and balanced pet foods in the United States. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, p. 2535s-2539s, 1994.
- ELWELL, D., SOARES Jr, J.H. Amino acid bioavailability: a comparative evaluation of several assay techniques. **Poult. Sci.**, n.54, v. 1, p. 78-85, 1975.
- FAHEY Jr., G.C.; JUNG, H.G. Lignin as a marker in digestion studies: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.57, n.1, p.220-225, 1983.
- FALLON, A.; BOOTH, R. F. G. & BELL, L. D.. **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Applications of HPLC in Biochemistry**. Vol. 17. Amsterdam: Elsevier, 1987. 338 p. (3a. impressão, 1993).
- FAN, M.Z.; SAUER, W.C. Determination of apparent ileal amino acid digestibility in barley and canola meal for pigs with the direct, difference, and regression methods. *Journal of Animal Science*, v. 73 p. 2364-2374. 1995.
- FENTON, T.W.; FENTON, E. An improved procedure for determination of chromic oxide in food and feces. **Canadian Journal of Animal Science**, v.59, p.631-634, 1979.

- FERNANDEZ, F. et al. Dietary chromic oxide does not affect the utilization of organic compounds but can alter the utilization of mineral salts in gilthead sea bream *Sparus aurata*. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.129, p.1053-1059, 1999.
- GROSS, K. L.; WEDEKING, K. J.; COWELL, C. S.; SCHOENHERR, W. D.; JEWELL, D. E.; ZICKER, S. C.; DEBRAEKELEER, J.; FREY, R. A. Nutrientes. In: HAND, M. S.; THATCHER, D. D.; REMILLARD, R. L.; ROUDEBUSH, P. (Ed.) **Small Animal Clinical Nutrition**. 4 edition. Marceline: Walsworth, 2000. 1192p.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 9. ed. Philadelphia: H. Brace, 1996. p.877-882.
- HARMON, D.L. Experimental approaches to study the nutritional value of food ingredients for dogs and cats. **Revista Bras. de Zootecnia**. Jaboticabal, SP. 2007.
- HENDRICKS, W. H.; SRITHARAN, K. Apparent ileal and fecal digestibility of dietary protein is different in dogs. Waltham International Symposium: Pet Nutrition Coming of Age. **American Society for Nutritional Sciences**. J. Nutr. 132:1692S-1694S, 2002.
- HENDRICKS, W.H.; SRITHARAN, K; HODGKINSON, S.M. Comparison of the endogenous ileal and faecal amino acid excretion in the dog (*Canis familiaris*) and the rat (*Rattus rattus*) determined under protein-free feeding and peptide alimentation. **J. Animal Physiol.** a. Anim. Nutr. 86, p. 333-341. Berlin. 2002.
- HENDRIKS, W.H.; MOUGHAN, P.J.; TARTTELIN, M.F. – Gut endogenous nitrogen and amino acid excretions in adult domestic cats fed a protein-free diet or an enzymatically hydrolyzed casein-based diet. **Journal of Nutrition**, v. 125, Bethesda, p 955-962, 1996.
- HILL, R.C. et al. The use of chromic oxide as a marker for measuring small intestinal digestibility in cannulated dogs. **Journal of Animal Science**, Champaign, n.74, p 1629-1634, 1996.
- HILL, R.C. et al. The effect of texturized vegetable protein containing soy carbohydrate on oroileal transit of chromic oxide in cannulated dogs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.78, p.2633-2638, 2000.
- HOLT, N.W. Calibration curves for the determination of low levels of chromium in feces. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.73, p.109-115, 1993.
- JACKSON, R. W., B.E.Sommer, and W.C. Rose. 1928. Experiments on the nutritive properties of gelatin. **J. Biol. Chem.** 80: 167-186.
- JAGGER, S.; et al. – evaluation of inert markers of the determination of ileal and faecal apparent digestibility values in the pig. **British Journal of Nutrition**, London, n.68, p 729-739, 1992.
- JOHNSON, M.L.; PARSONS, C.M.; FAHEY, C.G.; MERCHEN, N.R. Effects of species raw material source, ash content, and processing temperature on amino acid digestibility of animal by-product meals by cecectomized roosters and ileally cannulated dogs. **Journal Animal Science**, v.76, p.1112-1122. 1998.

- KANE, E.; MORRIS, J. G.; ROGERS, Q. R. – acceptability and digestibility by adults cats of diets made with various sources and levels of fat. **Journal of Animal Science**, Champaign, n.53,n.6, p 1516-1523,1981.
- KARR-LILIENTHAL, L. K.; GRIESHOP, C. M.; SPEARS, J. K. et al. Estimation of the proportion of bacterial nitrogen in canine feces using diaminopimelic acid as an internal bacterial marker. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 1707-1712, 2004.
- KAUFFMAN, M. 1905. Über den ersatz von eiweiß durch leim im stoffwechsel. *Pflüger's Arch.* 109: 440-465.
- KAVANAGH, S. et al. – A comparison of total collection and marker technique for the measurement of apparent digestibility of diets for growing pigs. **Animal Feed Science and Technology**, New York, v 89, p 49-58,2001.
- KENDALL, P. T.; SMITH, P. M.; HOLME, D. W. – Comparative evaluation of net digestive and absorptive efficiency in dogs and cats fed a variety of contrasting diet types. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v.40, p.577-587, 1981.
- KOSLOSKI, G.V.; FLORES, E.M.M.; MARTINS, A.F. Use of chromium oxide in digestibility studies: Variations of the results as a function of the measurement method. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Philadelphia, v.76, p.373-376, 1998.
- LEE, K.H., QI, G.H., SIM, J.S. Metabolizable energy and amino acid availability of full-fat seeds, meals, and oils of flax and canola. **Poult. Sci.**, n. 74, v. 8, p. 1341-1348, 1995.
- LEEK, B.F. Digestão no estômago dos ruminantes. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. *Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos*. 11 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997, p.353-379.
- LIKUSKI, H.J.A., DORRELL, H. G. A bioassay for rapid determinations of amino acid availability values. **Poult. Sci.**, n. 57, v. 10, p. 1658-1660, 1978.
- LLOYD, L.E.; McCAY, C.M. The use of chromic oxide in digestibility and balance studies with dogs. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.53, n.4, p.613-622, 1954.
- LÔBO JR., M.F. et al. Coeficientes de digestibilidade aparente pelos métodos de indicadores e coleta total de fezes em cães. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n.6, p.691-694, 2001.
- MAGENDIE, M.F 1816. Sur les propriétés nutritives des substances qui ne contiennent pas d'azote *Ann. Chim. Phys.*3:66-77.
- MATTERSON, L.D.; POTTER, L.M.; STUTZ, M.W. et al. **The metabolizable energy of feed ingredients for chickens**. Research Report, v.7, n.1, p. 11-14, 1965.
- McCARTHY, J.F.; AHERNE, F.X.; OKAY, D.B. Use of HCl insoluble ash as an index material for determining apparent digestibility with pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.54, march, p.107-109, 1974.
- MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; PILÓ-VELOSO, D. Determinação do grau de condensação e do número de grupos metoxila por unidade monomérica de ligninas do *Eucalyptus grandis* por espectroscopia FTIR. **Quím. Nova**, v.17, p.5-8, 1994.

- MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; PILÓ- VELOSO, D. Studies of *Eucalyptus grandis* Lignin. Part 1: Estimation of lignin and polyphenols contents in *Eucalyptus grandis* by Infrared spectroscopy. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.2, p.129-131, 1991.
- MROZ, Z. et al. Apparent digestibility of nutrients in diets with different energy density, as estimated by direct calorimetry and marker methods for pigs with or without ileal-cecal cannulas. **Journal of the Animal Science**, Champaign, v.74, p.403-412, 1996.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Protein and Amino Acids. **Nutrient requirements of dogs and cats**. National Academy of Sciences. Washington, 2006. p. 111-144.
- NEIRINK, K., ISTASSE, L., GABRIEL, A., VAN EENAEME, C., BIENFAIT, J. Amino acid composition and digestibility of four protein sources for dogs. **Journal Nutrition**, v. 121, p. S64-S65, 1991.
- NUNES, R. V., BUTERI, C. B., NUNES, C. G. V., ALBINO, L.F.T., ROSTAGNO, H. S. Fatores antinutricionais dos ingredientes destinados a alimentação animal. In: Simpósio sobre ingredientes na alimentação animal. **Anais...** Campinas, SP. CBNA, 2001. p.235-272.
- OLIVEIRA, R.F.M. Estudo da recuperação fecal do Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e dos indicadores CIA, CIDA e LIGNINA em períodos de coleta de dois a sete dias, em bovinos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.20, n.5, p.522-531, 1991.
- PARSONS, C.M. In vitro and in vivo assays for determining amino acids bioavailability. Compendium of Continuing Education for the Practcing Veterinaria.v.22, p 9-11, 2000.
- PAULING, L. A Química do Silício. In: Química Geral. Rio de Janeiro, W.H. Freeman and Company, 2 ed., 1966, p.679-692.
- PIAGGIO, L.M.; et al. – Avaliação das cinzas insolúveis em ácido, fibra, em detergente ácido indigestível e lignina em detergente ácido indigestível como indicadores internos da digestibilidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.20, n.3, p 306-312, 1991.
- PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E.A.; MORAIS, S.A.L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Quím. Nova**, v.16, p.435-448, 1993.
- POND, W.G.; CHURCH, D.C.; POND, K.R. Basic Animal Nutrition and feeding, New York, John Wiley & Sons, 4<sup>th</sup>. Ed., 1995, 615p.
- POZZA, P.C.; GOMES, P.C.; DONZELE, J.D. et al. Digestibilidade ileal aparente e verdadeira de aminoácidos de farinha de carne e ossos para suínos. **Rev. Bras. de Zootecnia**, v. 33, n. 5, p. 1181-1191. 2004.
- QIÃO, Y; VAN KEMPEN, T.A.T.G. Technical note: Comparison of raman, mid, and near infrared spectroscopy for predicting the amino acid content in animal meals. Department of Animal Science, North Carolina State University. **Journal Of Animal Science**, 82:2596-2600. 2004.

- ROGERS, Q. R.; TAYLOR, T. P.; MORRIS, J. G. Optimizing dietary amino acid patterns at various levels of crude protein for cats. **Journal Nutrition**, London, v. 128, p. 2577S-2580S, 1998.
- ROSE, W.C., and E.E. Rice. 1939. The significance of the amino acids in canine nutrition. **Science** 90 : 186-187.
- ROSTAGNO, H. S. Valores de alimentos e de exigências nutricionais utilizados na formulação de rações para aves. In: Avicultura. Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Campinas 1990, Anais, Viçosa: **Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 1990, p.11-30.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; FERREIRA, A.S.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D.C. **Tabelas brasileiras para aves e suínos (composição de alimentos e exigências nutricionais)**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 186p.
- SA FORTES, C. M. L. Valor nutricional de ingredientes energéticos e protéicos para cães. Tese de Doutorado, UNESP, Jaboticabal/SP. 2005.
- SAHA, D.C.; GILBREATH, R.L. Analytical recovery of chromium from diet and faeces determined by colorimetry and atomic absorption spectrophotometry. *Journal of Science of Food and Agriculture*, Philadelphia, v.55, p.433-446, 1991a.
- SALIBA, E. O. S.; RODRÍGUEZ, N. M.; GONÇALVES, L. C. et al. Estudo comparativo da lignina isolada da palha de milho, com outros indicadores em ensaios de digestibilidade aparente. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 36., 1999, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: SBZ, 1999.
- SALIBA, E.O.S.; NETO. M.M.G.; RODRIGUEZ, N.M.; MIRANDA, L.F.; OBEID, J.A.; TEIXEIRA, G.L.; OLIVEIRA, M. A. Predição da composição química do sorgo in natura pela técnica da espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS). Anais 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Piracicaba. 2001.
- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**. Statistical edition. Cary: SAS Institute, 1996. 754p.
- SCHASTEEN, C. S.; WU, J.; PARSONS, C. M. Correlation of an immobilized digestive enzyme assay with poultry true amino acid digestibility for soybean meal. **Poultry Science Association Inc**. Vol 86:343-348. 2007.
- SEIXAS, J. R. C., ARAÚJO, W. A., FELTRIN, C. A., MUCIO, C. R. Fontes protéicas para alimentos pet. In: III Simpósio sobre Nutrição de Animais de Estimação. **Anais...** Campinas: CBNA, 2003. P. 97-116.
- SIBBALD, I. R. 1987. Estimation of the bioavailable amino acids in feedingstuffs for poultry and pigs: A review with emphasis on balance experiments. **Can.J.Anim. Sci.** 67:221-300.
- SIBBALD, I.R., Metabolizable energy in poultry nutrition. **Bioscience**, v.30, n. 11, p. 746-741, 1980.

- SIBBALD, I.R. A bioassay for true metabolizable energy in feedingstuffs. *Poult. Sci.*, n. 55, p. 303-308, 1976a.
- SILVA, D. J. **Análises de alimentos**: métodos químicos e biológicos. Viçosa, editora UFV, 1990. 166 p.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. O método Van Soest na determinação da qualidade das forragens. In: **Análises de alimentos**: métodos químicos e biológicos. Viçosa, editora UFV, 2002, p. 97-128.
- SILVIO, J., D.L. Harmon, K.L. Gross, and K. R. McLeond.2000. Influence of fiber fermentability on nutrient digestion in the dog. **Nutr.** 16: 289-295
- SUNVOLD, G. D., F.C. Fahey, Jr., N.R. Merchen, D. Bourquin, E.C. Titgemeyer, LL.L. Bauer, and G. A. Reinhart. 1995. Dietary fiber for cats: In vitro fermentation of sected fiber sources by cat fecal inoculum and in vivo utilization of diets containing selected fiber sources and their blends. **J. Anim. Sci.** 73: 2329-2339.
- THONNEY, M.L. et al. Sources of variations of dry matter digestibility measured by the acid insoluble ash marker. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, p.661-668, 1985.
- TONGLET, C., ET AL. Prediction of protein digestibility in dog food by a Multi-enzymatic method: a useful technique to develop. **Journal of Animals Physiology and Animal Nutrition** (Berlin), v. 5,p. 189-194, 2001.
- VAN KEMPEN, T. A. T. G.; BODIN, J. C. Near infrared reflectance spectroscopy appears to be superior to nitrogen-based regression as a rapid tool in predicting the poultry digestible amino acid content of commonly used feedstuffs. **Anim. Feed Sci. Technol.** 76: 139-147. 1998.
- VAN KEMPEM, T.; JACKSON, D. NIRS may provide rapid evaluation of amino acids. *Feedstuffs*,v.2, p.12-15,1996.
- VAN KEULEN, J.; YOUNG, B.A. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.44, n.2, p.282-287, 1977.
- VAN LEEUWEN, P. Apparent ileal dry matter and crude protein digestibility of rations fed to pigs and determined with the use of chromic oxide (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) and acid-insoluble ash as digestive markers. **British Journal of Nutrition**, London, n.76, p. 551-562, 1996.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, Oct. 1991.
- VASCONCELLOS, R.S. Utilização de indicadores nos ensaios de digestibilidade aparente em gatos domésticos. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2004. 69p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade d Ciências Agrárias e Veterinárias, 2004.

- VASCONCELOS, C. H. F.; VELOSO, J. A. F.; SALIBA, E. O. S.; BAIÃO, N. C.; LARA, L. J. C. Uso da LIPE<sup>®</sup> como indicador externo na determinação da energia metabolizável de alimentos em frangos de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.2, p.459-465, 2007.
- VOGEL. **Análise química quantitativa**, revisada por, G.H. Jeffery et al. Traduzido por Horácio Macedo. 5ª ed. Rio de Janeiro, LTC, 1992.
- VOGTMANN, H.; PFIRTER, H.P.; PRABUCKI, A.L. A new method of determining metabolizability of energy and digestibility of fatty acids in broiler diets. **British Journal of Poultry Science**, v.16, n.5, p.531-534, 1975.
- WALKER, J.A.; HARMON, D.L.; GROSS, K.L.; COLLINS, G.F. Evaluation of nutrient utilization in the canine using the ileal cannulation technique. **J. Nutr.** 124:2672S-2676S. 1994.
- WILLIAMS, C.H.; DAVID, D.J.; IISMAA, O. – The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, n.59, p 381-385, 1962.
- YANKA, R.M.; HARMON, D.L.; SCHOENHERR, W.D. et al. 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 Veterinarian Research**. v. 67. p. 88-94, 2006.
- YANKA, R.M.; HETZLER, B.M.; HARMON, D.L. Evaluation of low-oligosaccharide, low phytate whole soybeans and soybean meal in canine foods. **Journal of Animal Science**. v. 83, p. 393-399. 2005a.
- YIN, Y.L. et al. Apparent digestibility (ileal and overall) of nutrient as evaluated with PVTC-cannulated or ileo-rectal anastomised pigs fed diets containing two indigestible markers. **Livestock Production Science**, Champaign, v.62, p.133-141, 2000.
- YUSTE, P., BRENES, A., VIVEROS, A. Energia metabolizable verdadera y digestibilidades de los aminoácidos y del almidón de dos variedades de guisantes (*P. sativum*, var. Frisson y local) con distinta concentración en taninos en pollos adultos. **Invest. Agr., Prod. San. Anim.**, 10, v. 3, 201-209, 1995.
- ZEOULA, L.M.; et al. – Utilização de cinza insolúvel em ácido, óxido crômico e celulose em estudos de digestão. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.21, n.1, p. 73-82, 1992.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)