

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ALTERNATIVAS NUTRICIONAIS PARA PREVENIR A
FORMAÇÃO DE BOLAS DE PELOS EM GATOS

Autora: Tânia Zóia Miltenburg
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Coorientador: Prof.^a. Dr.^a Paula Toshimi Matumoto Pinto

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2017

ALTERNATIVAS NUTRICIONAIS PARA PREVENIR A FORMAÇÃO DE BOLAS DE PELOS EM GATOS

Autora: Tânia Zóia Miltenburg
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Coorientador: Prof.^a. Dr.^a Paula Toshimi Matumoto Pinto

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal.”

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

M662a Miltenburg, Tânia Zóia
Alternativas nutricionais para prevenir a
formação de bolas de pelos em gatos / Tânia Zóia
Miltenburg -- Maringá, 2017.
62 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos.
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Paula Toshimi Matumoto
Pintro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia - Área de Concentração:
Produção Animal, 2017.

1. Enzima. 2. Felinos. 3. Fibra insolúvel. 4.
Tricobezoares - Prevenção. I. Vasconcellos, Ricardo
Souza, orient. II. Pintro, Paula Toshimi Matumoto,
coorient. III. Universidade Estadual de Maringá.
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia - Área de Concentração:
Produção Animal. IV. Título.

CDD 21.ed. 636.8

AHS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ALTERNATIVAS NUTRICIONAIS PARA PREVENIR A
FORMAÇÃO DE BOLAS DE PÊLOS EM GATOS**

Autora: Tânia Zóia Miltenburg
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 10 de março de 2017.

Prof. Dr. Luciano Trevizan

Profª Drª Roseane Marina Peralta

Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
(Orientador)

“Por isso não desanimamos. Embora exteriormente estejamos a desgastar-nos, interiormente estamos sendo renovados dia após dia,

Pois os nossos sofrimentos leves e momentâneos estão produzindo para nós uma glória que pesa mais do que todos eles.”

(2 Coríntios 4:16-17)

*À minha família,
Aos amigos especiais,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proteger todos os dias e por todas as bênçãos da minha vida.

Aos meus pais (Godofredo e Anelise), que nunca mediram esforços para que eu pudesse ter a melhor educação possível, por todo o amor e incentivo e sempre me apoiarem em minhas decisões. Todas as minhas conquistas são dedicadas à vocês.

Ao meu irmão, Guilherme e minha cunhada, Isabela, por sempre estarem ao meu lado me apoiando em Maringá.

Ao meu orientador, Ricardo Vasconcellos, pelos ensinamentos e conselhos, pelo tempo e ajuda, apoio, humildade e paciência. É um exemplo de ética e trabalho a ser seguido. É uma honra tê-lo como orientador.

Aos membros da banca de defesa, Luciano Trevizan e Rosane Peralta, obrigada por aceitarem o convite e contribuírem para o aperfeiçoamento do trabalho.

À equipe do CEENUFEL, por toda a ajuda, conversa, risadas e principalmente conhecimento durante o experimento, pelas segundas-feiras de aprendizado nas reuniões e pelo companheirismo. Também aos nossos queridos filhos (gatos), que me fizeram companhia durante 65 dias.

Às amigas de Holambra, em especial Jéssica e Marina, as quais, mesmo distantes, deram força desde o início da minha pós, e durante meu experimento estiveram presentes mandando mensagens de força e conversando dia após dia.

Aos amigos da pós-graduação e graduação, pelos dias intermináveis de estudo e pelos dias de descontração: Camilla, Santo Inácio, Kazuo, Lucas, Clayton, Melina.

Aos professores do departamento de Zootecnia-UEM, pelo aprendizado.

Aos funcionários da FEI, em especial Sr. Luis, que ajudou durante o experimento.

À Capes, pela bolsa concedida durante o mestrado.

À Universidade Estadual de Maringá, por possibilitar a execução deste trabalho.

À PremieR PET, pelo financiamento do projeto.

BIOGRAFIA

TÂNIA ZÓIA MILTENBURG, filha de Godofredo Antonio Maria Miltenburg e Anelise Zóia Miltenburg, nasceu na cidade de Holambra, São Paulo, no dia 02 de agosto de 1992.

Em março de 2010, iniciou no curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá – Paraná, foi bolsista de iniciação científica (Pibic), sob orientação do Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco e também foi bolsista do Programa de Extensão Tutorial (PET), concluindo o curso em dezembro de 2014.

Em março de 2015, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, na Universidade Estadual de Maringá, na área de Produção Animal, realizando estudos na área de nutrição de animais de companhia (cães e gatos).

ÍNDICE

| | Página |
|---|-----------|
| LISTA DE TABELAS..... | viii |
| LISTA DE FIGURAS..... | ix |
| I – INTRODUÇÃO GERAL | 10 |
| 1. Revisão Bibliográfica..... | 11 |
| 1.1. Formação de tricobezoares (bolas de pelos) em gatos e prevenção | 11 |
| 1.2. Efeitos da adição da fibra de cana na dieta | 13 |
| 1.3. Utilização de enzimas em dietas para gatos | 14 |
| 1.3.1. Proteases..... | 15 |
| 1.3.1.1. Influência do pH e temperatura na atividade enzimática das proteases | 17 |
| 1.3.2. Queratina | 17 |
| 1.3.2.1. Degradação da queratina | 18 |
| 1.3.2.2. Queratinases | 19 |
| 2.0. Referências Bibliográficas..... | 21 |
| II- OBJETIVOS GERAIS..... | 24 |
| III – ALTERNATIVAS NUTRICIONAIS PARA A PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE BOLAS DE PELOS EM GATOS. | 25 |
| RESUMO | 25 |
| INTRODUÇÃO | 27 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 28 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 39 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabela 1. Composição centesimal (%) e composição química analisada da ração controle (Co) e ração alta fibra (AF)..... | 34 |
| Tabela 2. Peso corporal inicial e final e consumo de matéria seca e energia metabolizável (EM) dos gatos alimentados com as dietas experimentais. | 47 |
| Tabela 3. Consumo médio diário, coeficiente de digestibilidade aparente e energia metabolizável, digestibilidade <i>in vitro</i> e características fecais de gatos..... | 50 |
| Tabela 4. Estimativa do número total médio de bolas de pelos excretadas em cada um dos tratamentos. | 55 |
| Tabela 5. Distribuição da frequência de bolas de pelos grandes, médias e pequenas em cada tratamento. | 56 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Atividade enzimática de quatro enzimas comerciais em diferentes concentrações sob pH 8,0 e temperatura de 55 ⁰ C utilizando a RBBR-queratina de penas como substrato. | 40 |
| Figura 2. Efeito do pH na atividade enzimática da Enzima 1..... | 40 |
| Figura 3. Efeito da temperatura na atividade enzimática da Enzima 1. | 42 |
| Figura 4. Efeito do tempo de incubação na atividade relativa da Enzima 1..... | 43 |
| Figura 5. Atividade enzimática da Enzima 1 em diferentes concentrações sob pH 7,0 e temperatura 39 ⁰ C utilizando a RBBR-queratina de pelos como substrato..... | 44 |
| Figura 6. Atividade enzimática da enzima microencapsulada em diferentes condições de pH – Ensaio 1: 2 h em ph 2,0 + 4 h em pH 6,0; Ensaio 2: 6 h em ph 6,0..... | 46 |

I – INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos principais países do mercado pet mundial, posicionando-se em terceiro lugar e possuindo a quarta maior população de animais de estimação do mundo, com 132 milhões (52,2 milhões de cães, 38 milhões de aves, 22,1 milhões de felinos, entre outros). O mercado pet nacional apresentou um crescimento de 5,7% em relação a 2015, sendo o mercado de alimentos o principal em termos de faturamento (67,6% do total), com aproximadamente 2,59 milhões de toneladas produzidas em 2016 (ABINPET, 2016).

Atualmente, com o estreitamento da relação entre animais de estimação e seus donos, os pets são considerados “membros da família” e os proprietários estão cada vez mais preocupados com a alimentação, buscando meios de garantir longevidade e qualidade de vida repercutindo diretamente na busca de dietas de melhor qualidade.

O objetivo primordial da dieta consiste em fornecer nutrientes adequados para atender a demanda metabólica dos animais. No entanto, além de satisfazer as necessidades nutricionais, elas podem influenciar em diversas funções do organismo e desempenhar papéis prejudiciais ou benéficos em algumas patologias. Sendo assim, novos estudos em nutrição estão sendo expandidos na área do uso de alimentos para promover bem-estar, melhorar a saúde e minimizar o risco de doenças (Bontempo, 2005). Em gatos, as dietas podem auxiliar no controle da formação de bolas de pelos, por exemplo.

As bolas de pelos, ou tricobezoares, são formadas naturalmente em gatos por causa de seu hábito higiênico de autolimpeza ou *grooming*. Os felinos passam em torno de 25 a 30% do seu tempo se lambendo (Panaman, 1981) e ingerem quantidades variáveis de pelos que podem ser enovelados formando as bolas dentro do trato gastrointestinal. Estas

bolas, normalmente, são eliminadas através de vômitos ou defecação, em alguns casos, quando não é possível sua eliminação, podem causar obstrução esofágica, gástrica ou do intestino delgado, constipação e colite (Barrs et al., 1999), além de perda de peso. Pouco se conhece sobre estratégias nutricionais para redução da formação de bolas de pelos em gatos, porém, a mais utilizada atualmente é a inclusão de fibras nas rações, sendo as fibras insolúveis as mais recomendadas (Beynen et al., 2011; Loureiro et al., 2014).

As fibras insolúveis aumentam a taxa de passagem pelo trato gastrointestinal, aumentando a excreção dos pelos e diminuindo dessa maneira a formação e o tamanho dos tricobezoares (Beynen et al., 2011). Essa estratégia apenas minimiza o problema, não solucionando-o por definitivo. Uma vez que o pelo é composto principalmente por queratina e as enzimas digestivas presentes no estômago e intestino delgados são incapazes de digerir-las, a adição de queratinases na ração poder ser considerada uma alternativa para degradação das bolas de pelos.

O objetivo desse estudo foi avaliar a inclusão da fibra insolúvel nas dietas, associada ou não à adição da queratinases, como alternativa nutricional no controle da formação das bolas de pelos em gatos e sua influência na digestibilidade das rações e características fecais.

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Formação de tricobezoares (bolas de pelos) em gatos e prevenção

O *grooming* é um comportamento normal dos gatos e serve para a remoção da sujeira e gordura presente na pelagem (Eckstein e Hart, 2000). Os felinos passam em torno de 25 a 30% do seu tempo se lambendo, no entanto esse tempo pode aumentar quando são alojados em um espaço limitado ou em situações de estresse (Panaman, 1981; Willemse et al., 1994). A presença de uma estrutura farpada na língua dos gatos e o hábito de autolimpeza permitem a ingestão de quantidades variáveis de pelos. Um gato de pelagem curta perde em média 28 g de pelo por kg de peso corporal por ano, sendo que dois terços dessa quantidade é ingerida pelo animal (Hendriks et al., 1997).

Uma hipótese sobre a formação de tricobezoares em gatos é o fato deles não possuírem o complexo mioelétrico migratório (CMM) no estômago. Em outras espécies, as ondas peristálticas se iniciam no estômago e continuam ao longo do trato intestinal, movendo o material estomacal não digerido até o cólon durante o período de jejum. Já nos felinos, o CMM foi detectado apenas perto do íleo (Barrs et al., 1999; Twedt, 1994).

Desta forma, o peristaltismo não move os pelos ingeridos, os quais se enredam na mucosa gástrica e formam massas sólidas no estômago ou intestino delgado (Dann et al., 2004; DeBakey e Ochsner, 1939).

Embora qualquer gato possa apresentar bolas de pelos, alguns fatores podem aumentar a formação destas, como por exemplo o comprimento da pelagem (pelos longos), época de troca de pelagem (primavera e outono), alterações na estrutura ou motilidade gastrintestinal (distúrbios da motilidade primária, doenças inflamatórias ou neoplásicas, divertículos ou hérnias hiatais) e *grooming* excessivo por comportamento neuropatológico, doenças dermatológicas ou presença de ectoparasitas (Norsworthy et al., 2010; Weber et al., 2015).

Os tricobezoares podem ser eliminados através da regurgitação ou pela defecação (Malik, 2003). Os principais sinais clínicos são vômitos, tosse e náuseas. Na maioria dos casos, as bolas de pelos não induzem a graves problemas de saúde, porém podem causar obstrução (esofágica, gástrica ou do intestino delgado), constipação, colite, perda de peso progressiva e como consequência, anorexia (Barrs et al., 1999; Beynen et al., 2011). Barrs et al. (1999) relataram 5 casos de gatos domésticos que apresentaram obstrução intestinal parcial ou completa devido aos tricobezoares.

O tratamento preventivo é indicado para gatos que sofrem regularmente com bolas de pelos. Algumas sugestões são a escovação dos animais para retirada dos pelos soltos, uso de laxantes ou lubrificantes à base de petróleo (Cannon, 2013) e inclusão de fibra insolúvel na dieta (Loureiro et al., 2014). As fibras insolúveis são adicionadas nas rações de prevenção de tricobezoares com o intuito de aumentar a taxa de passagem dos pelos pelo trato gastrintestinal, minimizando a formação de bolas e, conseqüentemente, evitar a obstrução ou constipação (Weber et al., 2015).

Weber et al. (2015) avaliaram o efeito da inclusão de celulose (5,17% e 9,68%) mais casca de psyllium (0,5%) na excreção de pelos soltos em gatos de pelagem curta e longa. Obtiveram aumento de 81% e 113% na excreção de pelos quando os animais de pelagem longa foram alimentados com as dietas de 5,17% e 9,68% de celulose mais 0,5% de psyllium, respectivamente. Já, os gatos de pelos curtos não houve efeito da dieta. Segundo Loureiro et al. (2014), a inclusão de fibra de cana na dieta (10% e 20%) reduziu o número total de tricobezoares excretados nas fezes de gatos, porém a inclusão de celulose (10%) não apresentou efeito. Os sinais clínicos da existência de bolas de pelos como vômito, náusea e tosse foram reduzidos em 79%, 91% e 70%, respectivamente, quando gatos receberam dieta suplementada com 4% de celulose (Beynen et al., 2011).

1.2. Efeitos da adição da fibra de cana na dieta

A fibra dietética ou alimentar é definida como “todos os polissacarídeos não amiláceos (celulose, hemicelulose, pectinas, gomas e mucilagens) e lignina, que não são digeridos pelas secreções endógenas do trato digestivo do homem” (Trowell et al., 1976). Substâncias como inulina, fruto ligossacarídeos e amido resistente foram incluídos no conceito de material fibroso uma vez que não são digeridos, mas fermentados (Roberfroid e Delzenne, 1998).

As fibras podem ser classificadas em relação à sua solubilidade: solúvel e insolúvel. As primeiras geralmente são fermentáveis, viscosas e formam um gel em solução. Essas características podem afetar o tempo de esvaziamento gástrico (Russell e Bass, 1985), o trânsito intestinal, volume e consistência das fezes (Fahey et al., 1990) e a produção de ácidos graxos de cadeia curta no intestino (Muir et al., 1996). As pectinas, gomas, mucilagens e algumas hemiceluloses representam as fibras solúveis e são encontradas em legumes, frutas, leguminosas, entre outros (De Angelis, 2001).

As fibras insolúveis são pouco fermentáveis, não formam gel e são excretadas praticamente em sua forma intacta. Devido à sua baixíssima digestibilidade, aumentam o bolo fecal e conseqüentemente o peso das fezes, além de estimular o peristaltismo com sua ação agressiva na musculatura da parede intestinal (NRC, 2006). Também pode diminuir a absorção e digestão dos nutrientes no intestino delgado pela ação de microrganismos sobre a fibra, que cria uma barreira física à atuação de determinadas enzimas digestivas (Vanderhoof, 1998). A lignina, celulose e algumas hemiceluloses são consideradas fibras insolúveis e são encontradas em verduras, farelos (De Angelis, 2001) e bagaço de cana.

O bagaço de cana é um resíduo da extração do caldo, após esmagamento da cana nas moendas para fabricação de álcool e açúcar. A fibra de cana é o resultado do processo de refinamento do bagaço de cana de açúcar, que é moído finamente até 100% do material atingir tamanho inferior a 0,4 milímetros. A fibra de cana é composta por 53,5% de celulose, 31,3% de hemicelulose, 6,4% de lignina, 2,6% de proteína bruta, 2,6% de matéria mineral e conteúdo inexpressivo de gordura (Velooso Junior, 2011). Possui em torno de 91% de fibra dietética total, sendo praticamente 100% de fibra insolúvel (Pinto, 2007).

A digestibilidade dos nutrientes tem forte relação com o nível de fibras da dieta, no entanto os valores podem variar de acordo com as fontes de fibra, características físico-químicas e níveis de inclusão (Sunvold et al., 1995). Loureiro et al. (2016) avaliaram a digestibilidade de dietas enriquecidas com fibra de cana (10% e 20%) para gatos e observou redução linear na digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo em hidrólise ácida, fibra dietética total, energia bruta e energia metabolizável. Também foi verificado aumento linear no número de defecações e peso médio da defecação com a inclusão da fibra de cana. Fischer et al. (2012), ao suplementarem dietas extrusadas para gatos com 12,8% de fibra de cana, também constataram redução nos coeficientes de digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e extrato etéreo em hidrólise ácida. Em relação à produção de fezes, a dieta com adição de fibra de cana apresentou valores maiores que a dieta controle.

1.3. Utilização de enzimas em dietas para gatos

A suplementação de enzimas exógenas em dietas para gatos não é comum, no entanto, para animais de produção, principalmente suínos e aves, é realizada há muitos anos. A adição de enzimas tem por objetivo reduzir ou eliminar os fatores antinutricionais, aumentar a digestibilidade da dieta, tornar os nutrientes biologicamente mais disponíveis e reduzir a poluição ambiental diminuindo a excreção de matéria seca dos animais (Guenter, 1997).

As enzimas são proteínas globulares altamente especializadas e sua atividade catalítica está relacionada com a integridade da sua conformação, desta forma, qualquer mudança em sua estrutura original pode afetar sua ação (Lehninger et al., 2011). Os fatores que podem influenciar a atividade catalítica são divididos em intrínsecos, os quais se referem ao organismo do animal, como temperatura corporal, pH, comprimento e tempo de trânsito no trato gastrointestinal, concentração do substrato em razão da velocidade de hidrólise enzimática, resistência das enzimas exógenas ao ataque das enzimas endógenas (Acamovic e Cleary, 1996) e fatores ligados ao ambiente externo e ao processamento das rações, como por exemplo temperatura, pH, calor e pressão. Desta forma, para se obter resultados com a adição da enzima, deve-se levar em consideração todos os fatores acima, de maneira à conciliar a escolha de uma enzima que possa atender os objetivos propostos e se encaixar nas condições de produção requeridas.

A escolha da enzima e sua forma de incorporação na dieta varia de acordo com o seu objetivo. Podem ser adicionadas com o intuito de melhorar o processo de extrusão, sendo aplicadas como aditivos; como suprimento às enzimas não produzidas pelo organismo (xilanasas, fitases, celulase e β -glucanase); como complemento às enzimas sintetizadas endogenamente (amilase, lipase e protease), para potencializar o processo digestivo; e, diretamente no ingrediente a ser utilizado na ração, para aumentar sua qualidade, por exemplo o tratamento enzimático da farinha de penas (Carciofi et al., 2012; Sa et al., 2013; Pacheco et al., 2015). No entanto, não foi encontrado na literatura trabalhos que utilizaram enzimas para degradar bolas de pelos em gatos. Em um estudo com ratos, Krugner-Higby et al. (1996) forneceram uma dieta semipurificada e procederam com terapia de proteólise utilizando a enzima do mamão juntamente com enzimas comerciais para degradar as bolas de pelos, porém não obtiveram sucesso e encontraram 100% dos tricobezoares quando efetuaram a necropsia dos ratos. Para humanos, encontram-se estudos sobre o tratamento de fitobezoares (massa sólida formada por compostos orgânicos não digeríveis) no qual utilizam enzimas, como por exemplo a papaína e celulase (Kramer e Pochapin, 2012; Iwamuro et al., 2014).

Dessa forma, a utilização de proteases pode ser uma alternativa para degradação de tricobezoares em gatos domésticos, além de poder ter influência na melhora da digestibilidade dos nutrientes.

1.3.1. Proteases

Dentre as enzimas comercializadas, as proteases, também denominadas de proteinases ou peptidases, correspondem a 60% do mercado mundial de enzimas industriais (Ward et al., 2009), sendo as responsáveis por catalisar a hidrólise peptídica de proteínas e fragmentos de proteínas. As peptidases modificam os substratos com grande seletividade e especificidade, como exemplo as reações de ativação de formas zimogênicas em enzimas líticas e o processamento e transporte de enzimas extracelulares (Rao et al., 1998).

As proteases são usualmente classificadas em relação ao (i) tipo de reação catalisada, em endo ou exoproteases, dependendo do local de clivagem; (ii) pH de atividade ótima, em ácidas, neutras ou alcalinas; (iii) natureza química e mecanismo do sítio catalítico, em serino, cisteíno, apartil, treonino ou metaloproteases; e (iv) relações

evolutivas no que diz respeito à sua estrutura (Page e Di Cera, 2008; Rao et al., 1998; Rawlings e Barrett, 2000).

As enzimas proteolíticas possuem um papel importante nos processos fisiológicos, patológicos e também tecnológicos, causando alterações irreversíveis ou destruição dos substratos (Barrett et al., 2001).

Os principais processos fisiológicos e patológicos que elas atuam são o catabolismo de proteínas, a coagulação do sangue, crescimento e migração celular, inflamação, crescimento de tumores e metástases, transporte e secreção de proteínas através da membrana, liberação de hormônios e precursores proteicos. De forma geral, as proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para a absorção da célula e as intracelulares participam da regulação do metabolismo (Rao et al., 1998).

Em relação aos processos tecnológicos, as peptidases são utilizadas na produção de detergentes devido à especificidade para alguns substratos do material a ser removido; na indústria de alimentos são amplamente utilizadas em laticínios, amaciante de carnes (Merheb et al., 2007). Na área farmacêutica são utilizadas na composição de auxiliares digestivos e combinações com antibióticos. Também são inseridas nos processos de tratamento de resíduos industriais, alimentação animal (Schallmey et al., 2004) e síntese proteica (Sumantha et al., 2006).

As enzimas proteolíticas comerciais são obtidas de plantas, animais e microrganismos. As proteases produzidas por plantas (papaína, bromelaína, queratinases e ficina) passam por um processo de obtenção mais demorado pela necessidade de espaço para cultivo, condições climáticas ideais e período de desenvolvimento da planta. Já as de origem animal (tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina e quimosina) dependem da disponibilidade de animais para abate, tornando o processo dispendioso. Dessa forma, as proteases produzidas por microrganismos apresentam vantagens frente às outras fontes devido ao seu rápido crescimento e pequeno espaço para cultivo (Rao et al., 1998). As proteases microbianas possuem a vantagem de serem mais estáveis em relação às homólogas das plantas e animais e o seu processo de produção, além da obtenção mais fácil, é um método que permite produzir grandes quantidades (Wiseman e Rebolgar, 1991).

Os fungos e as bactérias são os microrganismos responsáveis pela produção de proteases pela maior facilidade para o cultivo e obtenção da enzima. Na maioria dos casos, as enzimas fúngicas encontram um pH ótimo para o crescimento no ácido ou

neutro, não sendo termoestáveis. Já as enzimas bacterianas possuem um pH ótimo próximo do alcalino ou neutro, sendo com frequência termoestáveis (Wiseman e Rebolgar, 1991).

1.3.1.1. Influência do pH e temperatura na atividade enzimática das proteases

Para se obter a atividade enzimática máxima, existe uma zona de pH ideal. As enzimas, assim como outras proteínas, possuem muitos grupos ionizáveis, sendo que a mudança de pH pode alterar sua conformação, sua capacidade de ligação com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo. Como consequência, pode ocorrer a troca na velocidade máxima de reação, na afinidade da enzima pelo substrato e alteração na estabilidade da enzima, dependendo do tempo que esta se submete ao pH desfavorável (Wiseman e Rebolgar, 1991).

Assim como para o pH, a temperatura também possui uma zona ideal para atividade enzimática máxima. Ao elevar a temperatura, há aumento na agitação das moléculas e assim maior frequência das colisões entre a enzima e o substrato. Por outro lado, dependendo do grau de elevação, pode ocorrer a desnaturação da enzima, que tem sua estrutura modificada e passa a ter uma conformação desprovida de atividade. Desta forma, a uma determinada temperatura, a atividade enzimática irá diminuir conforme aumenta o tempo de incubação. Em relação às baixas temperaturas, não há efeito desnaturante, entretanto, a repetição de transições sólido-líquido ou congelamento-descongelamento pode causar perdas na atividade enzimática (Scriban, 1991).

1.3.2. Queratinas

As queratinas, definidas como proteínas estruturais fibrosas insolúveis, são as principais constituintes da pele, pelos, penas, unhas, cascos, chifres e escamas (Gupta e Ramnani, 2006). A principal característica que diferencia a queratina de outras proteínas fibrosas, como o colágeno e elastina, é o elevado teor de resíduo de cisteína (Katoh et al., 2004).

Estas proteínas são resistentes à degradação por proteases comuns, como a tripsina, pepsina e papaína (Brandelli, 2008). As características de resistência à degradação e insolubilidade da queratina se dão principalmente pela composição e configuração molecular de seus aminoácidos constituintes (Riffel et al., 2003). Elas apresentam um

firme empacotamento da cadeia proteica em α -hélice e β -pregueamentos e também um elevado nível de enovelamento da cadeia peptídica. Além disso, altos graus de ligação inter e intracadeia são formadas através de ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, as quais são facilitadas pelo alto conteúdo de cisteína (Onifade et al., 1998). Dessa forma, as queratinas foram essenciais nos processos adaptativos dos animais, agindo como barreiras mecânicas, térmicas e estruturais (Busson et al., 1999).

As queratinas são classificadas como α -queratina, β -queratina e γ -queratina (Voet et al., 1999; Kornilowicz-Kowalska e Bohacz, 2011). As α -queratinas possuem uma concentração de resíduo de cisteína elevada (10,5% - 17%), faz com que formem várias pontes dissulfeto e estabilizem a estrutura quaternária da queratina (Lehninger et al., 2011). Elas também são denominadas de queratina “dura” (Voet et al., 1999) e constituem apenas apêndices de mamíferos, como garras, cascos, unhas e cabelos/pelos (Lehninger et al., 2011). Já as β -queratinas possuem menor quantidade de cisteína (4,2% - 7,6%) e maior prevalência dos resíduos de aminoácidos serina, glicina, prolina e alanina, resultando na diminuição de pontes dissulfeto (Kornilowicz-Kowalska e Bohacz, 2011). Devido à essa característica é denominada também de queratina “mole” e compõe penas e escamas (Voet et al., 1999). As γ -queratinas são proteínas não estruturais, formadas por proteínas globulares e ricas em pontes de dissulfeto. São encontradas na cutícula capilar (Kornilowicz-Kowalska e Bohacz, 2011). Segundo Ramnani e Gupta (2004), a cadeia polipeptídica da conformação β é mais facilmente hidrolisada que a α -queratina.

1.3.2.1. Degradação da queratina

Apesar da alta estabilidade da queratina e da incapacidade das enzimas proteolíticas de mamíferos e aves em hidrolisá-las, existem microrganismos decompositores naturais, que utilizam a queratina como substrato, que são chamados de microrganismos queratinolíticos (Bach et al., 2011). Estes organismos produzem proteases específicas, denominadas de queratinases, com capacidade de degradar materiais queratinosos (Onifade et al., 1998).

A investigação sobre a atuação desses microrganismos é crescente pela sua importância industrial no processamento de couros, produção de rações, tratamento e aproveitamento de resíduos da indústria avícola, entre outros (Onifade et al., 1998).

Tanto fungos como bactérias são capazes de produzir queratinases, no entanto, como a maioria das espécies de fungos queratinolíticos são patogênicos, e portanto com

potencial biológico limitado, os estudos atuais focam na utilização de bactérias queratinolíticas (Riffel et al., 2003). O gênero de bactéria mais pesquisado é o *Bacillus* (Kim et al., 2001). Entre as espécies podem ser citadas *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. amyloliquefaciens*.

A forma como ocorre a degradação da queratina ainda não é totalmente elucidada (Kornilowicz-Kowalska e Bohacz, 2011). Uma primeira teoria considera que haja apenas a atuação de queratinases, no entanto, preparações puras de queratinases frequentemente são incapazes de hidrolisar totalmente a queratina, possivelmente pela existência de pontes dissulfeto (Brandelli et al., 2010).

Já uma segunda teoria supõe um mecanismo de duas fases: sulfitólise e proteólise. Primeiramente é realizada quebra das pontes de dissulfeto pelo sulfeto inorgânico, no caso de fungos ou redução de pontes de dissulfeto por uma enzima similar a dissulfeto redutase, no caso de bactérias. Em seguida os produtos da quebra e da redução são expostos à ação das queratinases e outras proteases. Alguns autores propõem que a sulfitólise e proteólise ocorrem simultaneamente (Kornilowicz-Kowalska e Bohacz, 2011).

1.3.2.2. Queratinases

As queratinases, enzimas produzidas por microrganismos queratinolíticos, são proteases específicas que se distinguem das outras peptidases pela sua maior capacidade de hidrolisar a queratina. Seu mecanismo de ação catalítica ainda não está elucidado, porém, supõe-se que são simples proteases que atuam em conjunto com agentes redutores ou outras enzimas com atividade de dissulfeto-redutase. A maioria delas são induzidas pela presença da queratina e são ativas apenas no meio extracelular (Onifade et al., 1998).

As atividades queratinolíticas microbianas e especificidades enzimáticas por substrato descritas na literatura são variadas, fato que pode ser explicado pelas diferentes espécies existentes e metodologias utilizadas. Algumas queratinases hidrolisam apenas queratina, enquanto outras, como a *Bacillus licheniformis*, são capazes de hidrolisar vários substratos, como soro-albumina bovina, colágeno, elastina, entre outras (Chitte et al., 1999).

As propriedades físico-químicas destas enzimas são diversas, variando conforme a espécie do microrganismo produtor. A maioria pertence à classe das serina proteases, porém, também foram encontradas tiol e metalopeptidases. Os pH e temperaturas de

maior atividade também variam bastante, sendo a maioria alcalina, pH 7,5 – 10, e moderadamente termofílicas, 45 - 90°C (Bernal et al., 2003).

Queratinases são muito importantes, pois hidrolisam cabelos, penas, colágeno e desobstruem sistemas de esgoto durante o tratamento de águas residuárias (Chitte et al., 1999). Também são aplicadas em indústria de alimentos, têxteis, de couro e no tratamento de resíduos do processamento industrial de aves domésticas (Frag e Hassan, 2004). São utilizadas na medicina na eliminação de calos humanos e também em casos de acne e psoríase (Vignardet et al., 2001).

2.0. Referências Bibliográficas

- ABINPET. 2016. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de estimação.
- Acamovic, T. M. C., and B. V. Cleary. 1996. Optimising the response. Feed Mix No. 4, Doetinchen.
- Bach, E. et al. 2011. Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65: 102-107.
- Barrett, A. J., N. D. Rawlings, and E. A. O'Brien. 2001. The MEROPS Database as a Protease Information System. *Journal of Structural Biology* 134: 95-102.
- Barrs, V. R. et al. 1999. Intestinal Obstruction by Trichobezoars in Five Cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 1: 199-207.
- Bernal, C., L. Vidal, E. Valdivieso, and N. Coello. 2003. Keratinolytic activity of *Kocuria rosea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 255-261.
- Beynen, A. C., J. Middelkoop, and D. H. J. Saris. 2011. Clinical Signs of Hairballs in Cats Fed a Diet Enriched with Cellulose. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 6.
- Bontempo, V. 2005. Nutrition and health of dogs and cats: evolution of petfood. *Veterinary research communications* 29 Suppl 2: 45-50.
- Brandelli, A. 2008. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food and Bioprocess Technology* 1: 105-116.
- Brandelli, A., D. J. Daroit, and A. Riffel. 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied microbiology and biotechnology* 85: 1735-1750.
- Busson, B., P. Engstrom, and J. Doucet. 1999. Existence of various structural zones in keratinous tissues revealed by X-ray microdiffraction. *Journal of Synchrotron Radiation* 6: 1021-1103.
- Cannon, M. 2013. Hair balls in cats: a normal nuisance or a sign that something is wrong? *J Feline Med Surg* 15: 21-29.
- Carciofi, A. C. et al. 2012. Amylase utilization for the extrusion of dog diets. *Animal Feed Science and Technology* 177: 211-217.
- Chitte, R. R., V. K. Nalawade, and S. Dey. 1999. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Letters in Applied Microbiology* 28: 131-136.
- Dann, J. R., M. A. Adler, K. L. Duffy, and C. J. Giffard. 2004. A Potential Nutritional Prophylactic for the Reduction of Feline Hairball Symptoms. *The Journal of Nutrition* 134: 2124S-2125S.
- DeBakey, M., and A. Ochsner. 1939. Bezoars and concretions. *Surgery* 5: 132-160.
- Eckstein, R. A., and B. L. Hart. 2000. The organization and control of grooming in cats. *Applied Animal Behaviour Science* 68: 131-140.
- Fahey, G. C., Jr. et al. 1990. Dietary fiber for dogs: I. Effects of graded levels of dietary beet pulp on nutrient intake, digestibility, metabolizable energy and digesta mean retention time. *Journal of animal science* 68: 4221-4228.
- Fischer, M. M. et al. 2012. Fiber fermentability effects on energy and macronutrient digestibility, fecal traits, postprandial metabolite responses, and colon histology of overweight cats1. *Journal of animal science* 90: 2233-2245.
- Guenter, W. 1997. Practical experiences on the use of enzymes. In: R. R. Marquardt and Z. Han (eds.) *Enzymes in Poultry and Swine Nutrition*. International Development Research Centre, Ottawa.

- Gupta, R., and P. Ramnani. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied microbiology and biotechnology* 70: 21-33.
- Hendriks, W. H., M. F. Tarttelin, and P. J. Moughan. 1997. Seasonal Hair Growth in the Adult Domestic Cat (*Felis catus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 116: 29-35.
- Hervera, M., M. D. Baucells, F. Blanch, and C. Castrillo. 2007. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by in vitro analyses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 91: 205-209.
- Iwamuro, M. et al. 2014. In vitro analysis of gastric phytobezoar dissolubility by coca-cola, coca-cola zero, cellulase, and papain. *Journal of clinical gastroenterology* 48: 190-191.
- Katoh, K., T. Tanabe, and K. Yamauchi. 2004. Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity. *Biomaterials* 25: 4255-4262.
- Kim, J. M., W. J. Lim, and H. J. Suh. 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry* 37: 287-291.
- Kornilowicz-Kowalska, T., and J. Bohacz. 2011. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste management (New York, N.Y.)* 31: 1689-1701.
- Kramer, S. J., and M. B. Pochapin. 2012. Gastric phytobezoar dissolution with ingestion of diet coke and cellulase. *Gastroenterology and Hepatology* 8: 770-772.
- Krugner-Higby, L., T. Wolden-Hanson, A. Gendron, and R. L. Atkinson. 1996. High prevalence of gastric trichobezoars (hair balls) in Wistar-Kyoto rats fed a semi-purified diet. *Laboratory animal science* 46: 635-639.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, and M. M. Cox. 2011. *Lehninger princípios de bioquímica*. ARTMED.
- Loureiro, B. A. et al. 2016. Insoluble fibres, satiety and food intake in cats fed kibble diets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*.
- Loureiro, B. A. et al. 2014. Sugarcane fibre may prevents hairball formation in cats. *Journal of nutritional science* 3: e20.
- Malik, R. 2003. Sequelae of trichobezoars (Hair balls) passing through the intestinal tract. *J Feline Med Surg* 5: 357-358.
- Merheb, C. W., H. Cabral, E. Gomes, and R. Da-Silva. 2007. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry* 104: 127-131.
- Muir, H. E., S. M. Murray, G. C. Fahey, Jr., N. R. Merchen, and G. A. Reinhart. 1996. Nutrient digestion by ileal cannulated dogs as affected by dietary fibers with various fermentation characteristics. *Journal of animal science* 74: 1641-1648.
- NRC. 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. In: N. R. Council (ed.). p 398. The National Academy, Whashington, DC.
- Onifade, A. A., N. A. Al-Sane, A. A. Al-Musallam, and S. Al-Zarban. 1998. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology* 66: 1-11.
- Page, M. J., and E. Di Cera. 2008. Evolution of Peptidase Diversity. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 30010-30014.
- Panaman, R. 1981. Behaviour and Ecology of Free-ranging Female Farm Cats (*Felis catus* L.). *Zeitschrift für Tierpsychologie* 56: 59-73.
- Penz Jr, A. M. 1998. Enzimas em rações de aves e suínos. *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. p 165-178, Botucatu- SP.

- Pinto, M. V. P. 2007. Utilização digestiva de dietas com diferentes fontes fibrosas e determinação de curvas glicêmicas em cães adultos. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.
- Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 597-635.
- Rawlings, N. D., and A. J. Barrett. 2000. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 28: 323-325.
- Riffel, A., F. Lucas, P. Heeb, and A. Brandelli. 2003. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Archives of Microbiology* 179: 258-265.
- Roberfroid, M. B., and N. M. Delzenne. 1998. Dietary fructans. *Annual review of nutrition* 18: 117-143.
- Russell, J., and P. Bass. 1985. Canine gastric emptying of fiber meals: influence of meal viscosity and antroduodenal motility. *The American journal of physiology* 249: G662-667.
- Sa, F. C. et al. 2013. Enzyme use in kibble diets formulated with wheat bran for dogs: effects on processing and digestibility. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 97 Suppl 1: 51-59.
- Santos, R., A. A. Firmino, C. M. de Sa, and C. R. Felix. 1996. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus fresenius*. *Current microbiology* 33: 364-370.
- Schallmey, M., A. Singh, and O. P. Ward. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology* 50: 1-17.
- Scriban, R. 1991. *Biotechnology. Edagricole*.
- Sumantha, A., C. Larroche, and A. Pandey. 2006. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technology and Biotechnology* 44 (2).
- Sunvold, G. D. et al. 1995. Dietary fiber for dogs: IV. In vitro fermentation of selected fiber sources by dog fecal inoculum and in vivo digestion and metabolism of fiber-supplemented diets. *Journal of animal science* 73: 1099-1109.
- Trowell, H. et al. 1976. Letter: Dietary fibre redefined. *Lancet (London, England)* 1: 967.
- Twedt, D. C. 1994. Diseases of the stomach. In: R. G. Sherding (ed.) *The cat: Diseases and Clinical Management*. p 1193-1195. Churchill Livingstone, New York.
- Vanderhoof, J. A. 1998. Immunonutrition: the role of carbohydrates. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 14: 595-598.
- Veloso Junior, R. R. 2011. Nível de fibra e tipo de processamento na digestibilidade, ingestão e parâmetros bioquímicos da arara canindé (*Ara ararauna* L. - aves, psittacidae). Tese, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.
- Voet, D., J. G. Voet, and C. W. Pratt. 1999. Fundamentos de bioquímica. ARTMED.
- Ward, O. P., M. B. Rao, and A. Kulkarni. 2009. Proteases, Production. In: M. Schaechter (ed.) *Encyclopedia of Microbiology*. p 495-511. Academic Press. , San Diego.
- Weber, M., L. Sams, A. Feugier, S. Michel, and V. Biourge. 2015. Influence of the dietary fibre levels on faecal hair excretion after 14 days in short and long-haired domestic cats. *Veterinary Medicine and Science* 1: 30-37.
- Willemsse, T., M. Mudde, M. Josephy, M. Josephy, and B. M. Spruijt. 1994. The effect of haloperidol and naloxone on excessive grooming behavior of cats. *European Neuropsychopharmacology* 4: 39-45.
- Wiseman, A., and M. C. Rebollar. 1991. Manual de biotecnología de los enzimas. Acribia.

II- OBJETIVOS GERAIS

O estudo objetivou avaliar o efeito da inclusão de fibra insolúvel, associada ou não ao complexo enzimático, composto por proteases, sobre a prevenção da formação de bolas de pelos em gatos domésticos e seus efeitos sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes, energia e características fecais.

III – Alternativas nutricionais para a prevenção da formação de bolas de pelos em gatos.

(Journal of Animal Science)

RESUMO: O hábito de autolimpeza é característico de gatos e como consequência disto o consumo de pelos é inevitável. Dessa maneira, a formação de bolas de pelos ocorre naturalmente nesta espécie e eventualmente pode causar distúrbios gastrointestinais como vômito, disquezia, constipação e obstrução intestinal. Atualmente as principais formas de prevenir este problema são a associação de manejo do animal e aumento no teor de fibras na dieta. Neste estudo, objetivou-se avaliar a inclusão de uma fibra insolúvel, associada ou não ao complexo de proteases contendo queratinase, na prevenção da formação de bolas de pelos em gatos, observando os efeitos do complexo enzimático, sobre a digestibilidade e energia metabolizável aparente da dieta e características fecais. O estudo foi dividido em duas etapas: pré-experimento e experimento. A fase pré-experimental foi realizada com o intuito de avaliar a atividade enzimática *in vitro* de quatro enzimas comerciais e selecionar a de maior desempenho para a realização do experimento com os animais. Também foi avaliada a atividade da enzima escolhida sobre o pelo e determinado suas melhores condições de atuação (concentração, pH, temperatura e tempo de hidrólise). O experimento foi conduzido em blocos ao acaso (2 blocos x 4 dietas x 3 repetições por bloco), com duração de 57 dias cada. As dietas experimentais constituíram-se de: controle (Co), baixa adição de fibra insolúvel e sem enzima; controle com enzima (Co_{enz}); alta fibra (AF): com adição de 14,84% de fibra de cana e sem enzima; alta fibra com enzima (AF_{enz}). A energia metabolizável das rações foi estimada de acordo com sua composição bromatológica e a quantidade fornecida foi calculada individualmente de acordo com as necessidades energéticas para gatos em manutenção. O consumo de cada animal foi mensurado diariamente. Para cada dieta, foram determinados os coeficientes de digestibilidade *in vitro*, a digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e a energia metabolizável (EM), através da coleta total de fezes, sem coleta de urina. Para quantificação das bolas de pelos, as fezes dos animais foram coletadas em quatro momentos (dias -2 a 0; 15 a 17; 31 a 33 e 47 a 49). Durante as coletas dos tricobezoares e teste de digestibilidade *in vivo*, as fezes foram coletadas, avaliadas através do escore fecal e pesadas. A produção de fezes diária foi calculada. No teste *in vitro*, a enzima apresentou atividade sobre o pelo, porém, em altas concentrações. A temperatura e pH que a enzima apresentou melhor atividade foi em 55^oC e 8, respectivamente. O consumo de MS foi maior (P = 0,005) para as dietas contendo alta inclusão de fibra de cana. A ingestão de EM não diferiu (P = 0,068) entre os tratamentos. A inclusão da enzima não teve efeito sobre o CDA dos nutrientes, da EB e da EM. A adição de alto nível de fibra de cana reduziu (P<0,05) o CDA de todos os nutrientes, EB e EM. A produção de fezes (P<0,05) aumentou com a inclusão de fibras. O escore fecal não diferiu entre as dietas (P = 0,236). A MS da fezes foi igual (P = 0,918) para todos os tratamentos. A adição de fibra insolúvel e enzima, separadamente, não reduziu o número médio total de bolas de pelos excretadas. No entanto, quando associadas, foi verificado a redução no número total médio de bolas de pelos excretadas (P = 0,0344). Não houve associação entre o tamanho de bolas de pelos excretadas em relação aos tratamentos (P = 0,3763).

Palavras-chave: enzima, felinos, fibra insolúvel, prevenção, tricobezoares.

ABSTRACT: The grooming habit is common in cats, so the intake of hair is inevitable. In this way, the formation of hairballs occurs naturally in this species and may eventually cause gastrointestinal disorders such as vomiting, dyschisis, constipation and intestinal obstruction. Currently the main ways to prevent this problem are the association of animal management and the increase of fiber content in the diet. This study aimed to evaluate the inclusion of an insoluble fiber, associated or not to a complex of proteases containing keratinase, to prevent the formation of hairballs in cats, observing the effects of the enzymatic complex on the digestibility and apparent metabolizable energy of the diet and fecal characteristics. The study was divided into two stages: pre-experiment and experiment. The pre-experimental phase was carried out with the purpose of evaluating the *in vitro* enzymatic activity of four commercial enzymes and selecting the one with the highest performance to perform the experiment with the animals. The activity of the enzyme chosen on the hair was also evaluated and its best performance conditions (concentration, pH, temperature and hydrolysis time) were determined. The experiment was conducted in randomized blocks (2 blocks x 4 diets x 3 replications per block), each lasting 57 d. The experimental diets consisted of: control (Co), low addition of insoluble fiber and without enzyme; Control with enzyme (Co_{enz}); High Fiber (HF): with addition of 14.8% of sugarcane fiber and without enzyme; High Fiber with enzyme (HF_{enz}). The metabolizable energy of feed was estimated according to its bromatological composition and the amount supplied was calculated individually according to the energy requirements for cats in maintenance. The consumption of each animal was measured daily. For each diet, it was determined the *in vitro* digestibility coefficients, the apparent digestibility (CDA) of the nutrients and the metabolizable energy (ME) through the total collection of feces, without collection of urine. For quantification of hairballs, the animals' feces were collected in four moments (at days -2 to 0; 15 to 17; 31 to 33 and 47 to 49). During the tricobezoars' collection and the *in vivo* digestibility test, the feces were collected, evaluated through the fecal score and weighed. The daily fecal production was calculated. In the *in vitro* test, the enzyme showed enzymatic activity over the hair in high concentrations. The temperature and pH of the enzyme showed the best activity were at 55°C and 8, respectively. The dry matter's consumption was higher ($P = 0.005$) for diets containing high addition of sugarcane fiber. The ME intake did not differ ($P = 0.068$) between treatments. The enzyme's inclusion had no effect on the CDA of nutrients, gross energy (GE) and ME. The addition of high level of sugarcane fiber reduced ($P < 0.05$) the CDA of all nutrients, GE and ME. The feces' production increased ($P < 0.05$) with the inclusion of fibers. The fecal score did not differ between diets ($P = 0.236$). The feces's DM was the same ($P = 0.918$) for all diets. The addition of insoluble fiber and enzyme, separately, did not reduce the total mean number of excreted hairballs. However, when they were associated, a reduction in the total mean number of excreted hairballs was observed ($P = 0.0344$). There was no association between the size of excreted hairballs in relation to treatments ($P = 0.3763$).

Key words: enzyme, felines, insoluble fiber, prevention, tricobezoars

INTRODUÇÃO

As bolas de pelos (tricobezoares) são formadas naturalmente em gatos devido seu hábito higiênico de autolimpeza. Os felinos passam de 25 a 30% do seu tempo se lambendo, podendo ser maior quando alojados em um espaço limitado ou em situações de estresse (Panaman, 1981; Willemse et al., 1994). Um gato de pelagem curta perde em média 28 g de pelo por kg de peso corporal por ano, sendo que dois terços dessa quantidade é ingerida (Hendriks et al., 1997).

O modo como os tricobezoares são formados em gatos ainda não é totalmente elucidado, porém acredita-se que é pela ausência do complexo mioelétrico migratório a partir do estômago, que é responsável pela motilidade gastrointestinal no período interdigestório. Diferente de outros mamíferos, o complexo mioelétrico migratório foi detectado nos felinos apenas perto do íleo (Twedt, 1994). Desta forma, o peristaltismo não move os pelos ingeridos, os quais se enredam na mucosa gástrica e formam massas sólidas no estômago ou intestino delgado (DeBakey e Ochsner, 1939).

Normalmente os tricobezoares são eliminados através de vômitos ou defecação, no entanto, em alguns casos mais graves podem causar obstrução intestinal (Barrs et al., 1999). Pouco se conhece sobre estratégias nutricionais para redução da formação de bolas de pelos em gatos, porém, a mais utilizada atualmente é a inclusão de fibras insolúveis nas rações (Loureiro et al., 2014).

As fibras insolúveis aumentam a taxa de passagem pelo trato gastrintestinal, aumentando a excreção dos pelos e diminuindo dessa maneira a formação e o tamanho dos tricobezoares (Beynen et al., 2011). Essa estratégia apenas minimiza o problema, não solucionando-o totalmente. Uma vez que o pelo é composto principalmente por queratina e as enzimas digestivas presentes no estômago e intestino delgado são incapazes de digerir-las, a adição de queratinases na dieta poder ser uma alternativa para degradação dos pelos.

As queratinases são em geral extraídas e purificadas a partir de microrganismos dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces* e *Aspergillus* e possuem ação proteolítica eficiente sobre a queratina de penas, por exemplo (Farag e Hassan, 2004). Desta forma, hipotetizou-se que estas enzimas, se utilizadas na dieta, possam também atuar sobre pelos ingeridos, reduzindo a formação de tricobezoares em gatos.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da inclusão de fibra insolúvel, associada ou não ao complexo enzimático de proteases como alternativas nutricionais no controle da formação de bolas de pelos em gatos e o efeito destes aditivos sobre a digestibilidade dos nutrientes, energia e características fecais de gatos.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá, protocolo nº 1748100215.

Este estudo foi dividido em duas etapas, denominadas pré-experimento e experimento. Durante a fase pré-experimental o objetivo foi definir a protease comercial a ser empregada nas dietas, determinar a atividade enzimática e as melhores condições de atuação da enzima. Uma vez definidas estas condições, o experimento foi realizado no intuito de avaliar os efeitos das intervenções nutricionais com fibra insolúvel, associada ou não ao complexo de proteases sobre a prevenção da formação de bolas de pelos em gatos.

Pré-experimento

O pré-experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) da Universidade Estadual de Maringá, campus de Maringá.

Determinação da enzima e concentração

Quatro complexos de proteases provenientes de diferentes microrganismos foram selecionados: Enzima 1 (*Bacillus liqueniformis*), Enzima 2 (*Bacillus liqueniformis* PWD-1); Enzima 3 (*Aspergillus niger*) e Enzima 4 (*Serratia proteamaculans* HY-3).

O ensaio de atividade enzimática foi feito segundo o método de Rodrigues Marcondes et al. (2008), porém com algumas modificações. O substrato de queratina azure utilizado nos ensaios foi produzido com penas de frango moídas. Para isso, as penas foram obtidas de um frigorífico de aves e lavadas com dodecil sulfato de sódio a 1% para eliminar eventuais resíduos de sangue, sujeira e gordura. Após a lavagem, o material foi colocado em estufa ventilada (Marconi, MA035, Piracicaba, São Paulo) a 55°C por 48 horas para secagem. Em seguida, foram trituradas em moinho tipo bola.

Para o preparo da queratina azure, foi pesado 1 g de amostra de penas de frango moídas e 0,15 g de RBBR (Remazol Brilliant Blue R, Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) em um becker de 500 mL. Foi adicionado 30 mL de água e agitado durante 10 min. Após isso, adicionou-se, gota a gota, 10 mL de solução de Na₂SO₄ (10 mg/10 mL água) com agitação durante 5 min. Foi alcalinizado com NaOH (0,5 g/10 mL de água) e mantido 90 min em agitação. Após esse tempo, a amostra foi filtrada a vácuo e lavada com a mistura 2:1 (etanol/acetato de sódio [0,05M] em água) até não liberar mais cor. Posteriormente foi lavado com 100 mL de etanol/água (4:1), depois apenas com 100 mL de etanol e mais uma vez com 100 mL de acetona. Após essas etapas, a amostra foi seca em temperatura ambiente.

Para o ensaio de atividade enzimática, foi adicionado 10 mg de queratina azure e 1,5 mL de solução tampão fosfato (pH 8) em tubo falcon (15 mL). Volume gradativo (100, 200, 400, 600 e 800 µL) de solução de enzima (50 mg/L) recentemente preparada foi adicionado em cada tubo com a finalidade de obter concentrações final de: 0,0005;

0,001; 0,002; 0,003 e 0,004 mg de enzima/mg de queratina azure. Os tubos foram submetidos à temperatura de 55°C em banho-maria durante 3 horas. O branco foi determinado pelo mesmo processo anterior, no entanto com a solução de enzima fervida (inativada) antes de ser incubada. Os tubos com as amostras foram recolhidos e centrifugados (centrífuga Hermle, Z323K, Wehingen) a 1077 x g rcf durante 10 min sobre temperatura de 15°C. O sobrenadante das amostras foi filtrado com peneira com malha de nylon e foi medido a absorvância a 578 nm (BioPlus, P200, Barueri). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que resultou no aumento de 0,01 na absorvância. Os ensaios foram feitos em duplicatas.

Determinação das melhores condições de atuação da enzima

A determinação das melhores condições de atuação da enzima escolhida foi feita utilizando o método de atividade enzimática citado acima empregando a concentração de 0,003 mg de enzima/mg de queratina azure. Foram testadas diferentes temperaturas (45, 55, 65, 75°C), pH (6, 7, 8, 9) e tempos de hidrólise (0, 1, 2, 3, 4h). Os ensaios foram feitos em duplicatas. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo o maior valor de atividade considerado como 100%.

Avaliação da atividade enzimática sobre os pelos e definição da concentração enzimática

Foi conduzido um ensaio de atividade enzimática para avaliar a capacidade da enzima em hidrolisar pelos. Essa etapa seguiu o mesmo padrão das etapas anteriores, com apenas algumas modificações. Para preparar a amostra de queratina azure foram utilizados pelos moídos (exclusivamente brancos) em substituição as penas moídas, os quais foram obtidos dos mesmos gatos utilizados no experimento. A solução de enzima foi preparada na concentração de 400 mg/L e foram adicionadas diferentes quantidades desta solução (100, 200, 400 e 800 µL) para se obter concentração final de: 0,004; 0,008;

0,016 e 0,032 mg de enzima/mg de queratina azure. As concentrações testadas foram maiores que nos ensaios com as penas por causa da maior dificuldade de hidrólise dos pelos. O ensaio de atividade enzimática foi conduzido apenas em temperatura de 39°C e pH em torno de 7,0 (parâmetros fisiológicos do gato).

Avaliação da atividade enzimática da enzima microencapsulada em pH 2,0 e 6,0

Com o intuito de adicionar a enzima diretamente na ração dos animais, procedeu com o revestimento com polimetacrilato (Rheapol L100, Cornileus Pharmaceutical, Índia) para torná-la resistente ao pH ácido do estômago. Após esse processo, foi realizada a atividade enzimática para concluir se o revestimento foi efetivo. A metodologia de atividade enzimática foi a mesma supracitada, porém, o pH da solução foi modificado. Dois ensaios foram realizados simultaneamente. No primeiro, a enzima foi submetida diretamente ao pH 2 e permaneceu 2 h incubada (simulando o tempo de retenção no estômago), após esse tempo, o tubo foi retirado do banho-maria e o pH foi ajustado para 6, e a enzima foi incubada mais 4 h. Finalizando esse período, as amostras foram retiradas e foi medida a absorbância. No segundo ensaio, as enzimas foram submetidas apenas ao pH 6, do início ao fim da incubação.

Experimento

Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Felinos Domésticos, localizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá, campus de Maringá.

Animais, Dietas e Delineamento Experimental

Foram utilizados 24 gatos adultos saudáveis, sem raça definida, com idade aproximada de 2 anos, peso corporal médio de $3,8 \pm 0,56$ kg, castrados, sendo 12 machos e 12 fêmeas.

Foram formulados dois alimentos, uma ração controle com baixo nível de fibra (Co) e uma ração teste com alta inclusão de fibra (AF) com menor inclusão de proteína e gordura. A modificação dietética em AF em relação ao Co foi realizada com o propósito de se obter um alimento com maior taxa de passagem pelo trato gastrintestinal, reduzindo a probabilidade da formação de bolas de pelos. As dietas foram formuladas de acordo com as recomendações nutricionais para gatos em manutenção da FEDIAF (2012). A fórmula e composição química das rações estão apresentadas na Tabela 1. Além das diferentes dietas, os animais receberam cápsulas gastrorresistentes via oral contendo enzima (5 mg/gato/dia, SID) ou placebo (amido purificado). A enzima empregada neste estudo foi produzida pelo gênero *Bacillus liqueniformis*. Desta forma, foram constituídos quatro tratamentos, em um esquema fatorial 2 x 2, sendo duas dietas, suplementadas ou não com enzima, conforme descrito a seguir:

- Controle (Co) – ração Co + cápsula placebo;
- Controle suplementado com enzima (Co_{enz}) - ração Co + cápsula com enzima.
- Alta fibra (AF) - ração AF + cápsula placebo;
- Alta fibra suplementado com enzima (AF_{enz}) – ração AF + cápsula com enzima;

O experimento foi realizado em dois períodos com 12 gatos em cada. Cada bloco incluiu 3 gatos por tratamento, totalizando 6 gatos. Cada período teve duração de 57 dias, distribuídos da seguinte forma: dias -7 a -3 para adaptação dos animais às gaiolas e ração Controle; dias -2 a 0 para quantificação de tricobezoares nas fezes recebendo apenas a ração Controle; dias 1 a 9 para adaptação aos tratamentos citados acima; dias 10 a 14 para adaptação às gaiolas; dias 15 a 17 para quantificação de tricobezoares nas fezes; dias 26 a 30 para adaptação às gaiolas; dias 31 a 33 para quantificação de tricobezoares nas fezes; dias 42 a 46 para o ensaio de digestibilidade e dias 47 a 49 para quantificação dos tricobezoares.

Durante os dias de adaptação às gaiolas, coleta de tricobezoares e ensaio de digestibilidade os animais permaneceram em gaiolas metabólicas individuais (1 m x 1 m x 0,5 m). No restante dos dias, os gatos foram alojados em gatil coletivo e nos momentos da alimentação (8 às 9 h e 14 às 15 h) foram alocados em gaiolas individuais. A cápsula foi fornecida antes da refeição da tarde. A energia metabolizável das rações foi estimada de acordo com sua composição bromatológica e a quantidade fornecida foi calculada individualmente de acordo com as necessidades energéticas (NRC, 2006). As sobras foram pesadas ao final do dia e o consumo mensurado. A água foi fornecida *ad libitum*.

Os ingredientes da ração foram moídos em moinho de martelos modelo GTM1001 (Garthen, Machados – Navegantes, Santa Catarina) com peneira de 0,8 mm e extrusados em extrusora de rosca simples (Inbramaq, capacidade 150kg/h, Ribeirão Preto, Brasil). A densidade e flutuação dos *kibbles* foram controlados a cada 10 min na saída da extrusora e do secador.

Tabela 1. Composição centesimal (%) e composição química analisada da ração controle (Co) e ração alta fibra (AF).

| Ingredientes | Co | AF |
|--|-----------|-----------|
| Farinha de vísceras de aves | 30,99 | 28,73 |
| Milho grão | 13,34 | 26,10 |
| Fibra de cana | 0,73 | 14,84 |
| Quirera de arroz | 10,00 | 10,00 |
| Glúten de milho 60% | 20,93 | 6,85 |
| Farelo de soja 45% | 10,00 | 5,00 |
| Gordura de aves | 9,68 | 3,47 |
| Palatabilizante | 2,00 | 2,00 |
| Premix ¹ | 1,00 | 1,00 |
| Fosfato bicálcico | 0,35 | 0,85 |
| Sal comum | 0,50 | 0,50 |
| Cloreto de potássio | 0,09 | 0,28 |
| Cloreto de colina 60% | 0,27 | 0,27 |
| Antifúngico ² | 0,10 | 0,10 |
| Antioxidante sintético ³ | 0,02 | 0,02 |
| Composição química analisada das dietas na matéria seca | | |
| Proteína Bruta (g/1000 kcal EM) | 88,98 | 81,12 |
| Extrato Etéreo Hidrólise Ácida (g/1000 kcal EM) | 38,68 | 28,57 |
| Fibra Bruta (g/1000 kcal EM) | 4,60 | 28,08 |
| Matéria Mineral (g/1000 kcal EM) | 27,94 | 30,04 |
| Energia Bruta (kcal/kg) | 4563 | 4358 |
| Energia Metabolizável (kcal/kg) | 3676 | 3269 |

¹ – Composição do Premix Mineral Vitamínico: Vitamina A: 2250000 UI/kg, Vitamina B1: 1250 mg/kg, Vitamina B12: 5000 mcg/kg, Vitamina B2: 1000 mg/kg, Vitamina B6: 1000 mg/kg, Vitamina D3: 187500 UI/kg, Vitamina E: 7500 UI/kg, Vitamina K3: 25 mg/kg, Ácido Pantotênico: 1250 mg/kg, Ácido Fólico: 200mg/kg, B.H.T.: 5000 mg/kg, Biotina: 17,5 mg/kg, Cobre: 1250 mg/kg, Colina: 60 g/kg, Ferro: 20 g/kg, Iodo: 87,5 mg/kg, Manganês: 1875 mg/kg, Niacina: 15 g/kg, Selênio: 25 mg/kg, Zinco: 18,75 g/kg.

² – Composição do Antifúngico: Ácido Propiônico: 350 g/kg, Sorbato de potássio: 150 g/kg, Hidróxido de amônia: 30 g/kg.

³ – Composição do Antioxidante: BHT: 100 g/kg, Ácido cítrico: 35 g/kg, BHA: 10 g/kg, Etoxiqum: 10 g/kg.

Digestibilidade aparente dos nutrientes, energia metabolizável e qualidade de fezes

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e energia metabolizável das rações foram determinados pelo método de coleta total de fezes, sem coleta de urina, segundo recomendações da AAFCO (2010). O consumo alimentar foi mensurado diariamente. As fezes foram coletadas durante cinco dias consecutivos, pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais previamente identificados por animal e armazenadas em freezer (-15°C).

Após o fim da coleta, as fezes foram descongeladas e colocadas em estufa de ventilação forçada (Marconi, MA035, Piracicaba, São Paulo) a 55°C durante 72 h para efetuar a pré-secagem. A amostra de cada animal foi moída separadamente em moinho tipo faca tipo “willey” (Marconi, Piracicaba, São Paulo) equipado com peneira de 1 mm e homogeneizadas para posteriores análises laboratoriais. As rações passaram pelo mesmo procedimento de moagem.

Nas amostras de fezes foram determinados os teores de matéria seca (método: 934.01), proteína bruta (método: 954.01) e matéria mineral (método: 942.05) segundo procedimento descrito pela AOAC (1995). Para as rações, além desses citados, também foram analisados o extrato etéreo hidrólise ácida (método: 954.02) e fibra bruta (FB). A energia bruta (EB) das rações e fezes foi determinada em bomba calorimétrica adiabática. Estas análises foram realizadas em duplicatas e repetidas quando variavam mais de 5%.

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca, proteína bruta, matéria orgânica, matéria mineral e energia bruta segundo AAFCO (2010). A energia metabolizável foi calculada considerando os valores de energia digestiva e proteína digestível das dietas.

A qualidade das fezes foi determinada por meio do escore fecal segundo metodologia descrita por Carciofi et al. (2008). Atribuiu-se notas de 0 a 5, sendo: 0 = fezes líquidas; 1 = fezes pastosas e sem forma; 2 = fezes macias, mal formadas e que assumem o formato do recipiente de colheita; 3 = fezes macias, formadas e úmidas, que marcam o piso; 4 = fezes bem formadas e consistentes que não marcam o piso; 5 = fezes bem formadas, porém duras e secas. O escore entre 3 e 4 são considerados normais.

Quantificação de tricobezoares nas fezes

A quantificação de tricobezoares nas fezes dos gatos foi realizada segundo metodologia descrita por Loureiro et al. (2014). As fezes produzidas entre os dias -2 a 0 (momento 0 – controle), 15 a 17 (momento 1), 31 a 33 (momento 2) e 47 a 49 (momento 3) foram coletadas, pesadas e congeladas em freezer a (-15°C), formando assim uma amostra por animal, bloco e momento de avaliação.

Ao final do período de coleta, as amostras de fezes foram descongeladas e pesadas. Para a contagem de tricobezoares, as fezes foram lavadas com água corrente em peneiras de *nylon* com diâmetro de 14,5 cm e furos de 2 mm x 1 mm até todo o material fecal se dissolver e ficarem retidas apenas as bolas de pelos. Os tricobezoares coletados foram então secos em estufa de ventilação forçada (Marconi, MA035, Piracicaba, São Paulo) a 55°C por 24h e lavados com uma mistura 1:1 (v:v) de éter de petróleo e éter etílico até retirar o resíduo aderido aos pelos. Em seguida os tricobezoares foram pesados, classificados em pequenos (menor de 1 cm), médios (entre 1 e 2 cm) e grandes (maiores do que 2 cm) e contados.

Digestibilidade *in vitro*

Os coeficientes de digestibilidade *in vitro* das rações foram determinados segundo o método descrito por Hervera et al. (2007), sendo modificada a quantidade de amostra utilizada (de 1 g para 0,75 g), seguindo as recomendações de Ponciano Neto et al. (2015)

para dietas extrusadas para gatos. As condições de incubação *in vitro* simularam os processos de digestão em duas etapas, no estômago e intestino delgado, utilizando sistema enzimático contendo as enzimas pepsina e pancreatina. Amostras de ração (Co e TT) foram moídas em moinho tipo faca “willey” (Marconi, Piracicaba, São Paulo) com peneira de 1 mm e em seguida 0,75 grama de cada amostra foi pesada em frascos Erlenmeyer de 50 mL. Vinte e cinco mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 6) foram adicionados a cada frasco e homogeneizados. A esta solução foi adicionado 10 mL de 0,2 M de HCl e o pH foi ajustado para pH 2,0 com solução de 1M HCl e 1M NaOH. Em seguida, 1 mL de solução de pepsina, recentemente preparada foi adicionada, contendo 10 mg de pepsina (P7000, Sigma-Aldrich). Os frascos foram fechados e as amostras incubadas em banho-maria a 39°C durante 2 horas sob agitação constante. Após 2 horas de incubação, os balões foram resfriados e foi adicionado 10 mL de tampão fosfato (0,2 M, pH 6,8) e 5 mL de NaOH 0,6 M. O pH foi ajustado a 6,8 com a solução de HCl e NaOH como descrito no passo anterior. Em seguida, 1 mL de solução de pancreatina (P1625, Sigma-Aldrich) preparada na hora, contendo 100 mg de pancreatina em pó, foi adicionada em cada balão. Posteriormente, os frascos foram incubados novamente em banho-maria a 39°C, durante 4 horas, sob agitação constante. Após a segunda fase de incubação, o balão foi resfriado e adicionou-se 5 mL de ácido sulfossalicílico 20%. As proteínas solubilizadas, mas não digeridas foram precipitadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. O resíduo não digerido foi então filtrado utilizando-se cadinhos de vidro de porosidade 2. Após lavagens sucessivas (a cada 3 min), duas vezes com 10 mL de etanol a 96% e duas vezes com acetona a 99%, o resíduo não digerido foi seco em estufa a 105°C e pesado.

Para simular o ensaio de digestibilidade *in vivo* conduzido no experimento com os animais, adicionou-se a enzima (queratinase - a mesma utilizada nas cápsulas fornecidas

aos animais) em diferentes etapas da digestibilidade *in vitro*. Cada amostra foi avaliada em triplicatas. Os tratamentos (adições) seguem descritos abaixo:

- ✓ Co: foi utilizada amostra da ração Co e a digestibilidade *in vitro* foi executada como descrito acima, sem adição da enzima (queratinase);
- ✓ Co_{enz}: foi utilizada amostra da ração Co e foi adicionado 0,062 mg de enzima (queratinase) na segunda fase de digestão;
- ✓ AF: foi utilizada amostra da ração AF e a digestibilidade *in vitro* foi executada como descrito acima, sem adição da enzima (queratinase);
- ✓ AF_{enz}: foi utilizada amostra da ração AF e foi adicionado 0,054 g de enzima (queratinase) na segunda fase de digestão.

Análise estatística

Os resultados referentes ao consumo, digestibilidade, qualidade e produção fecal foram submetidos à análise de variância. Quando diferenças foram verificadas pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e por contraste ortogonal. Considerou-se significativo valores de $P < 0,05$. Estas análises foram conduzidas utilizando o programa estatístico Minitab Statistical Software (State College PA, USA).

Os resultados referentes às bolas de pelos foram avaliados pelo modelo de regressão de Poisson e também pelo teste qui-quadrado. O modelo de regressão Poisson foi aplicado da seguinte maneira: sendo Y_1, Y_2, \dots, Y_n uma amostra aleatória independente de uma variável aleatória Y , tal que $Y_i \sim Poisson(\lambda)$, o modelo de regressão linear generalizado com efeitos mistos utilizando a função de ligação foi dado por:

$$g(\lambda) = \eta = \log(\lambda) = \underbrace{\beta_0 + \beta_1 \text{Trat}2_i + \beta_2 \text{Trat}3_i + \beta_3 \text{Trat}4_i}_{\text{Fixo}} + \underbrace{b_1 \text{Ani}_i + b_2 \text{Peri}_i}_{\text{Aleatório}}$$

em que λ é a média total de bolas observadas na i -ésima unidade experimental. Em que $\text{Trat } 2 = \text{Co}_{\text{enz}}$, $\text{Trat } 3 = \text{AF}$ e $\text{Trat } 4 = \text{AF}_{\text{enz}}$. Os tratamentos foram considerados como efeitos fixos e animal e período foram considerados efeitos aleatórios.

O teste qui quadrado é um teste de hipóteses que tem o objetivo de avaliar a associação existente entre variáveis qualitativas, que nesse caso foi o tamanho de bola (pequena, média e grande) com relação ao tratamento utilizado. Assim, as hipóteses testadas foram:

H₀: Não há associação entre o tipo de bola com relação aos tratamentos.

versus

H₁: Há associação entre o tipo de bola com relação aos tratamentos.

Se o p-valor for menor que o nível de significância fixado, tem-se evidências amostrais para rejeitar a hipótese nula, ou seja, o tipo de bola retornada e o tratamento recebido estão evidentemente associados a nível $\alpha\%$ de significância. O nível de significância fixado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pré-Experimento

Determinação da enzima a ser utilizada e sua concentração

Entre os quatro complexos enzimáticos utilizados a enzima 1 apresentou maior atividade enzimática em relação às demais, sendo a escolhida para os estudos. A enzima 2 apresentou atividade enzimática baixa quando comparada com o resultado da enzima 1, porém maior que a 3 e 4, as quais apresentaram atividade nula.

Em relação às diferentes concentrações de adição da enzima, verificou-se aumento linear da atividade enzimática até 0,003 mg/mg substrato com pequeno declínio no valor de 0,004 mg/mg substrato para a Enzima 1. Desta forma, determinou-se a utilização da concentração de 0,003 mg/mg substrato para os demais testes (Fig. 1).

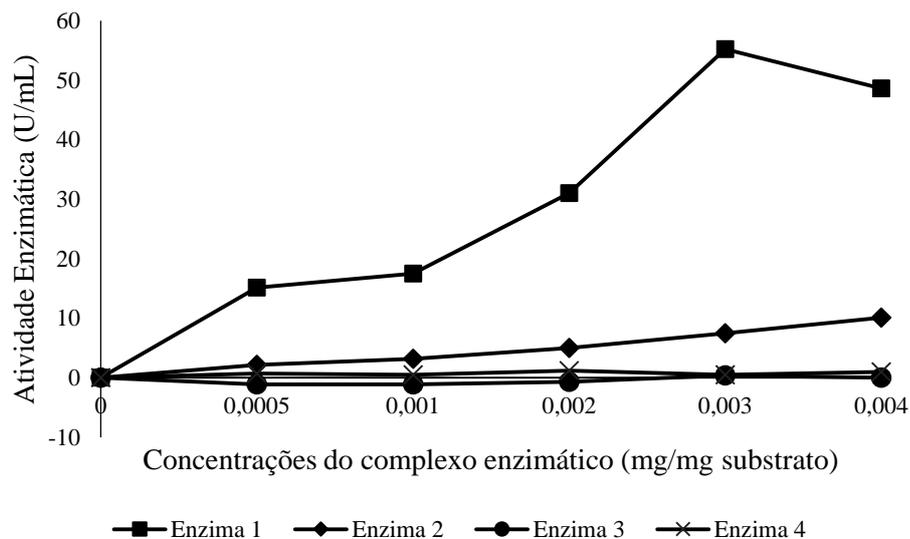


Figura 1. Atividade enzimática de quatro enzimas comerciais em diferentes concentrações sob pH 8,0 e temperatura de 55°C utilizando a RBBR-queratina de penas como substrato.

Determinação das melhores condições de atuação da enzima

A enzima 1 apresentou melhor atividade enzimática na faixa de pH alcalino (7.0 – 9.0), com atividade máxima em pH 8.0 (Fig. 2).

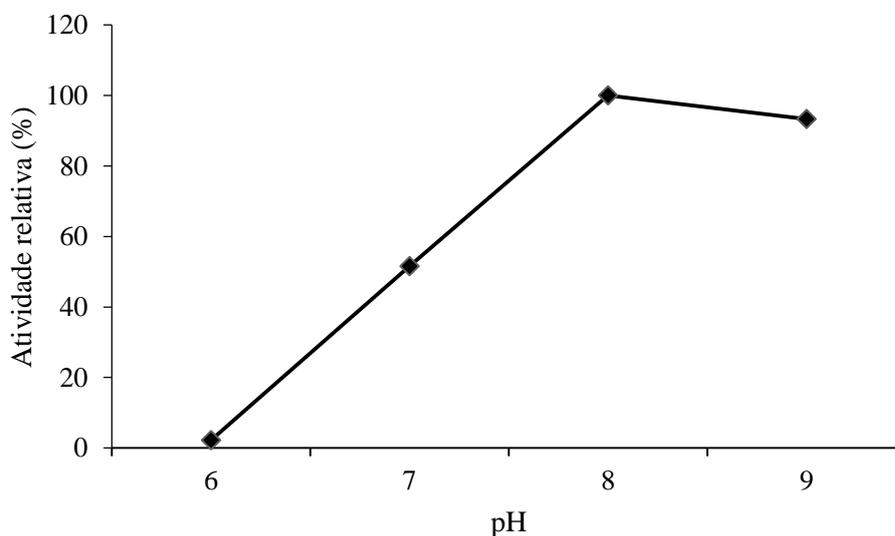


Figura 2. Efeito do pH na atividade enzimática da Enzima 1.

Segundo Lehninger et al. (2011) as enzimas possuem uma faixa de pH na qual a atividade catalítica é máxima, sendo que a atividade decresce em pH maior ou menor.

Assim como outras proteínas, as enzimas possuem grupos ionizáveis, pertencentes à resíduos de aminoácidos da molécula, de maneira que as trocas de pH podem alterar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo.

A enzima que apresentou melhor resultado neste estudo é proveniente de *Bacillus liqueniformis* e a faixa de pH ótima é similar à observada para outras queratinases bacterianas. Segundo Gupta and Ramnani (2006), as queratinases da maioria das bactérias possuem atividade ótima em pH neutro ao alcalino. Cheng et al. (1995) avaliaram a atividade enzimática de uma queratinase produzida pelo *Bacillus licheniformis* PWD-1 em diferentes faixas de pH utilizando penas como substrato e obtiveram melhor resultado em pH 8.0. O mesmo pH ótimo foi encontrado por Silva et al. (2014) ao avaliarem uma queratinase produzida pelo *Bacillus subtilis* S14. Daroit et al. (2011) encontraram pH ótimo de 7.0 ao produzir uma queratinase utilizando *Bacillus sp* P45.

Para o estudo em questão, é muito importante a atuação da enzima em pH próximo ao 7.0, como o objetivo é fornecer a queratinase aos animais, esta deve apresentar atividade enzimática no pH próximo ao fisiológico do intestino delgado do gato, que se situa em torno de 6.8 (NRC, 2006).

A faixa de temperatura com maior atividade enzimática variou de 45 a 65°C, com o valor ótimo de 55°C, seguida de uma queda linear com o aumento da temperatura (Figura 3). De acordo com Rao et al. (1998), as proteases bacterianas apresentam termotolerância relativamente baixa.

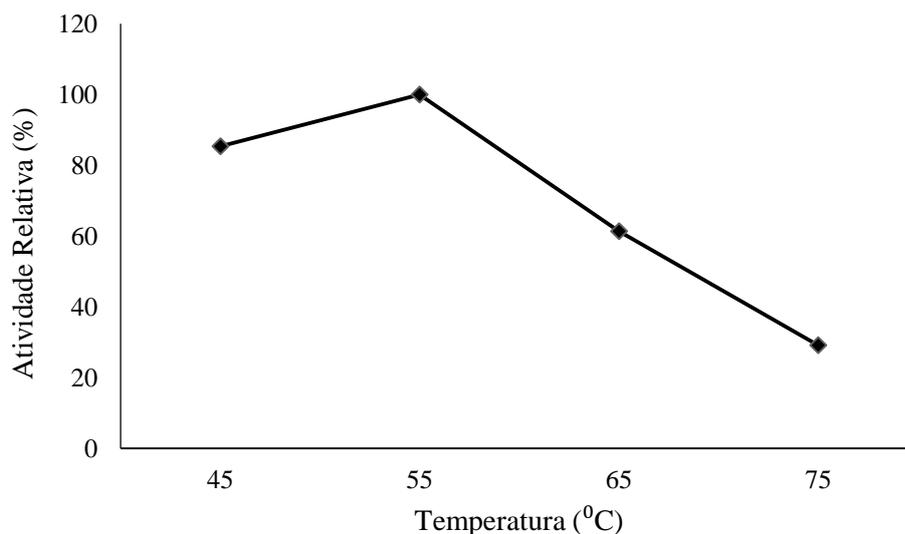


Figura 3. Efeito da temperatura na atividade enzimática da Enzima 1.

Com exceção de algumas moléculas de RNA catalíticas, todas as enzimas são proteínas, portanto, sua atividade catalítica depende da integridade de sua estrutura nativa. Quando desnaturada ou dissociada, sua atividade é nula (Lehninger et al., 2011). Quando a enzima é exposta à temperaturas mais elevadas, há modificação em sua estrutura terciária e quaternária, que passa de uma conformação ativa para uma conformação desprovida de atividade. Desta forma, a atividade enzimática diminui conforme aumenta o tempo de incubação. No entanto, de maneira semelhante ao pH, a enzima também possui uma temperatura ótima de atividade. A elevação da temperatura até um determinado grau aumenta a agitação das moléculas e assim também aumenta a frequência das colisões entre a enzima e o substrato, elevando a atividade enzimática (Scriban, 1991).

A temperatura ótima encontrada nesse estudo é similar ao de outras queratinases do gênero *Bacillus*. Segundo Gupta e Ramnani (2006) a temperatura ótima das queratinases variam de 30 a 80°C, embora Rao et al. (1998) afirmaram que a temperatura ótima de proteases bacterianas é em torno de 60°C, corroborando com o presente estudo. Lateef et al. (2010) avaliaram a temperatura ótima de atividade de uma queratinase produzida a

partir de uma bactéria encontrada em penas (*Bacillus cereus* LAU 08) e determinaram o valor ótimo sendo de 50°C. Silva et al. (2014) e Daroit et al. (2011) também encontraram este valor ótimo.

Em relação ao tempo de incubação, foi verificado aumento significativo na atividade enzimática na primeira hora. Nas horas seguintes, apesar da elevação da atividade, esta não foi tão significativa como na hora 1 (Fig. 4).

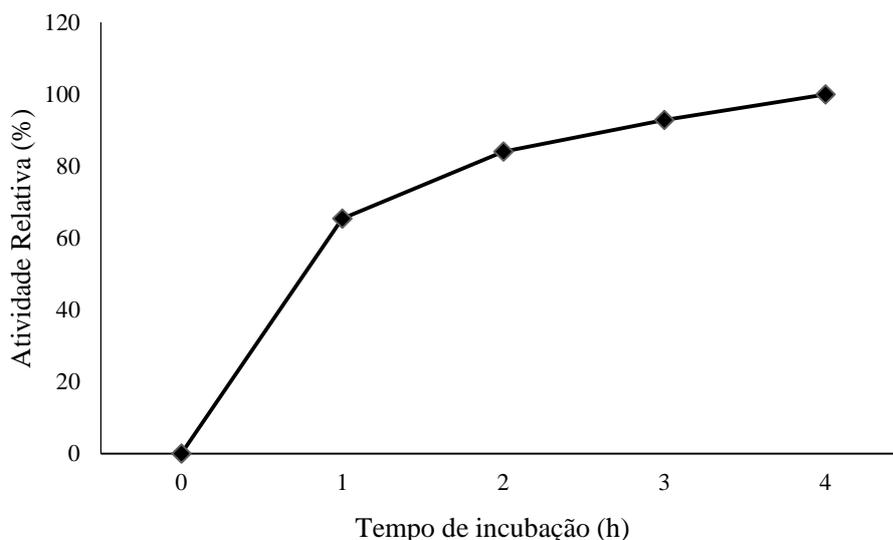


Figura 4. Efeito do tempo de incubação na atividade relativa da Enzima 1.

Avaliação da atividade enzimática sobre os pelos e definição da concentração enzimática

Primeiramente, foi conduzido um experimento de atividade enzimática utilizando as mesmas concentrações de enzima empregadas no ensaio com as penas (0,0005; 0,001; 0,002; 0,003 e 0,004 mg de enzima/mg de queratina azure). No entanto, a atividade enzimática no pelo sob essas concentrações foi baixa, como demonstrado na Fig. 5.

Um segundo ensaio foi conduzido aumentando as concentrações de enzima para 0,008; 0,016 e 0,032 mg de enzima/mg de queratina azure. Apesar do aumento significativo da atividade com a elevação das concentrações, esta foi menos ativa nos pelos quando comparada à atividade utilizando a pena como substrato, que em menor

concentração (0,003 mg de enzima/mg de substrato) apresentou maior atividade (55,25 U/mL).

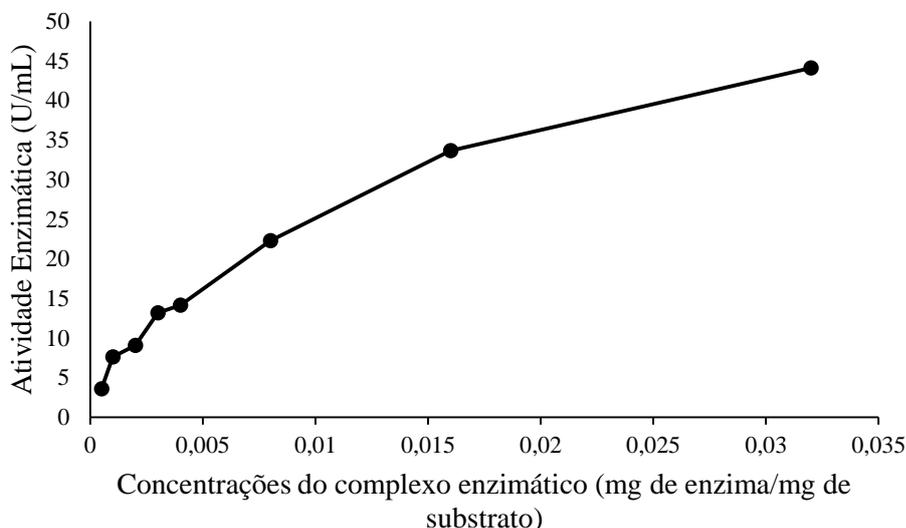


Figura 5. Atividade enzimática da Enzima 1 em diferentes concentrações sob pH 7,0 e temperatura 39°C utilizando a RBBR-queratina de pelos como substrato.

A baixa atividade enzimática encontrada nesse ensaio pode ser explicada pela utilização de pH e temperatura diferentes dos utilizados no ensaio com as penas. Como o objetivo era simular os parâmetros fisiológicos do intestino delgado do gato, a temperatura e pH empregados foram 39°C e 7,0, respectivamente. Esses valores diferem dos valores ótimos de atividade encontrados para essa enzima, os quais estão descritos acima.

Além disso, a estrutura molecular da queratina que compõe as penas e pelos são diferentes. As penas são compostas por uma queratina de menor tamanho, as β -queratinas, enquanto os pelos são formados por queratinas maiores, as α -queratinas. As β -queratinas possuem quantidade maior de aminoácidos não essenciais e o monômero apresenta um único tamanho, enquanto que as α -queratinas necessitam de dois monômeros de tamanhos distintos para formação do filamento, refletindo em configurações terciárias e estruturas de filamentos diferentes (Brush, 1996).

A estrutura das queratinas dependem de sua estrutura primária. A α -queratina é caracterizada por ser rica em resíduos de cisteína nas regiões terminais, sendo que na região central é composta por uma sequência de sete aminoácidos (*a-b-c-d-e-f-g*) em que as posições *a* e *d* são ocupadas por resíduos apolares. A associação desses resíduos resulta em uma formação de superespiralamento das cadeias em paralelo uma sobre as outras, formando uma estrutura filamentar (Jones et al., 1997). Essas estruturas se agregam facilmente à outras, devido aos domínios N e C-terminal, formando dímeros (protofilamentos) que juntos constituem uma protofibrila. A junção de quatro protofibrilas formam uma microfibrila que se associa à outras formando a estrutura superior da α -queratina, a macrofibrila (Lehninger et al., 2011). Já a β -queratina é composta por uma longa sequência de polipeptídeos que alternam em resíduos de glicina, alanina e serina, sempre apresentando uma glicina entre um resíduo e outro. Desta maneira as glicinas ficam alocadas na parte superior do plano β -pregueada enquanto os outros situam-se abaixo do plano. Então, pares de folhas pregueadas são empacotados, sendo a estabilização destas permitida por pontes de hidrogênio. A associação linear de monômeros forma os microfilamentos e a associação destes forma as fibras de β -queratinas, as quais são estabilizadas, dessa vez, por pontes dissulfeto (Garrett e Grisham, 1995). Dessa maneira, é perceptível que a estrutura dos pelos é muito mais complexa que as da penas, dificultando a ação das enzimas. Segundo Ramnani e Gupta (2004), a cadeia polipeptídica da conformação β é mais facilmente hidrolisada que a α -queratina.

Avaliação da atividade enzimática da enzima microencapsulada em pH 2,0 e 6,0

A microencapsulação da enzima não foi efetiva, apresentando atividade enzimática praticamente nula após ser submetida ao pH 2,0 (Fig.1). Dessa maneira, foi necessário encapsular a enzima em cápsulas gastrorresistentes para fornecer aos animais.

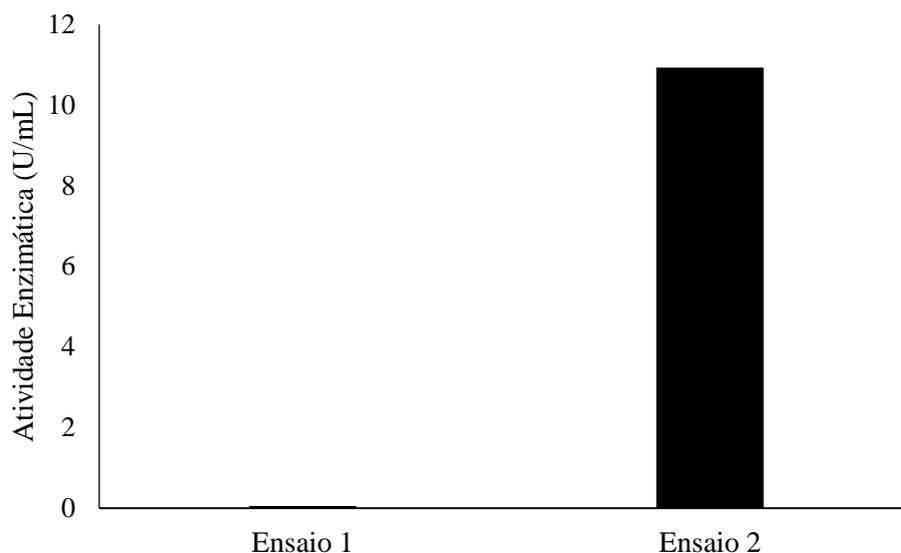


Figura 6. Atividade enzimática da enzima microencapsulada em diferentes condições de pH – Ensaio 1: 2 h em pH 2,0 + 4 h em pH 6,0; Ensaio 2: 6 h em pH 6,0.

Experimento

Peso corporal e consumo

Os animais apresentaram redução no peso corporal independente da dieta consumida, sendo mais acentuada para o tratamento AF_{enz} (Tabela 2). No entanto, não houve diferença significativa entre o peso inicial e final (P=0,570). Todas as dietas foram adequadamente consumidas pelos gatos, sem episódios de recusa, vômitos ou diarreia, o que sugere a tolerância em relação à inclusão de fibras e enzima nas concentrações empregadas.

A média de ingestão de matéria seca por kg^{0,67} de peso corporal durante o experimento foi maior para as dietas que continham teores de fibra insolúvel elevado (P=0,005). No entanto, a ingestão de EM foi semelhante entre os tratamentos, embora com tendência a menor ingestão nos tratamentos com alta fibra (P=0,068).

Tabela 2. Peso corporal inicial e final e consumo de matéria seca e energia metabolizável (EM) dos gatos alimentados com as dietas experimentais.

| Item | Dietas ¹ | | | | EPM ² | p |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------------|-------|
| | Co | Co _{enz} | AF | AF _{enz} | | |
| Peso corporal (kg) | | | | | | |
| Inicial | 3,84 | 3,80 | 4,09 | 3,80 | 0,23 | 0,800 |
| Final | 3,76 | 3,79 | 3,97 | 3,61 | 0,23 | 0,760 |
| Diferença: inicial x final | 0,08 | 0,01 | 0,12 | 0,19 | | 0,570 |
| Consumo médio | | | | | | |
| MS, g/(kg PC) ^{0,67} /dia | 21,24 ^b | 21,22 ^b | 23,94 ^a | 23,54 ^{ab} | 0,78 | 0,005 |
| EM, kcal/(kg PC) ^{0,67} /dia | 78,54 | 79,51 | 72,66 | 73,28 | 2,35 | 0,068 |

¹Co - Controle; Co_{enz} – Controle mais enzima; AF – Alta fibra; AF_{enz} – Alta fibra com enzima

² Erro padrão da média; n=6

^{a-b} Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Alguns autores (Hirsch et al., 1978; Kanarek, 1975) descreveram a incapacidade do gato em regular o peso corporal pelo aumento da ingestão de ração quando alimentados com dietas diluídas com fibras. Segundo Goggin et al. (1993) e Loureiro (2012), os trabalhos citados acima apresentaram falhas metodológicas que podem afetar a confiabilidade dos resultados, como por exemplo, a baixa palatabilidade e a forma como a dieta foi fornecida, farelada, no estudo de Hirsch et al. (1978), e a informação incompleta sobre a composição das dietas e pequeno número de animais (dois por tratamento) no estudo de Kanarek (1975). Neste estudo, do ponto de vista estatístico a ingestão energética dos animais foi semelhante, independentemente da dieta, não havendo efeito da fibra na ingestão calórica das dietas. No entanto, a ingestão energética foi 8,3% menor nos grupos submetidos à dieta com alta fibra e o que provavelmente contribuiu para a tendência dos gatos a ingerir menor quantidade de energia, neste caso foi o método de alimentação, por tempo controlado. Para se ter a medida de consumo individual, os gatos foram confinados em gaiolas, duas vezes ao dia, e permaneciam com a quantidade calculada de alimento disponível por duas horas. Desta forma, a diluição energética da

dieta com alta fibra pode ter dificultado maior ingestão compensatória de MS em curto período de tempo visando atender as necessidades energéticas.

Loureiro et al. (2016), obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo e verificou aumento do consumo de matéria seca mediante a inclusão de fibra (10% de celulose; 10 e 20% de fibra de cana) na dieta, sem alteração da ingestão de energia metabolizável. Oliveira (2012) também não identificou variação de consumo de energia metabolizável ao suplementar dietas de gatos com fibra insolúvel (fibra de cana) e solúvel (carboximetilcelulose).

O teor energético dos alimentos é o principal fator que regula a ingestão voluntária dos animais monogástricos. Os gatos consomem quantidade suficiente de energia para manter seu metabolismo de acordo com sua fase fisiológica (manutenção, crescimento, reprodução, lactação e atividade física). Dessa forma, os gatos ingerem quantidades de alimento necessária para satisfazer sua demanda energética. Assim, alimentos menos energéticos (ricos em matéria fibrosa e mineral) são consumidos em maior quantidade que os alimentos contendo maior teor de energia (por exemplo, maior teor de lipídeos) (Félix et al., 2010). Segundo Miller (1965), os gatos possuem a capacidade de regular o consumo de energia quando é fornecida uma dieta com palatabilidade moderada e nutricionalmente balanceada.

Uma das hipóteses de que o consumo de fibras estimula mais efetivamente a saciedade é baseada, no fato de que esta promove a distensão gástrica e estimula a regulação do consumo, através de respostas nervosas de neurotransmissores (tensorreceptores), localizados na mucosa gástrica (Burton-Freeman, 2000). Porém, gatos apresentam, relativamente, alta capacidade de armazenamento no estômago (em torno de 60 a 62%) e ingerem alimentos altamente energéticos, quando comparados com ruminantes, portanto o mecanismo de distensão gástrica é pouco efetivo no controle de

ingestão desta espécie (Félix et al., 2010). Segundo Loureiro et al. (2016), a inclusão de fibra insolúvel não promoveu saciedade em gatos, sendo esta pouco efetiva na regulação da ingestão energética.

Consumo e digestibilidade

A ingestão de matéria seca, matéria orgânica e fibra bruta foi maior ($P < 0,05$) para as dietas que continham fibra, independente da adição de enzima. Já para as variáveis extrato etéreo em hidrólise ácida e proteína bruta, o consumo foi maior ($P < 0,05$) para os tratamentos controle, sem influência da enzima. A redução no consumo de proteína e gordura quando alimentados com a dieta AF e AF_{enz}, pode ser explicada pela menor quantidade presente destes nutrientes na dieta AF, propositalmente formulada visando promover maior taxa de passagem no trato digestório evitando assim a formação de bolas de pelos (Tabela 3).

Tabela 3. Consumo médio diário, coeficiente de digestibilidade aparente e energia metabolizável, digestibilidade *in vitro* e características fecais de gatos.

| Item | Dietas ¹ | | | | EPM ² | p | Contrastes | |
|---|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|------------------|--------|-----------------|------------------|
| | Co | Co _{enz} | AF | AF _{enz} | | | Fb ⁶ | Enz ⁷ |
| Ingestão, g/ (kg PC)^{0,67}/dia | | | | | | | | |
| Matéria Seca | 22,34 ^b | 21,97 ^b | 25,86 ^a | 25,80 ^a | 0,84 | 0,0001 | 0,0001 | NS |
| Matéria Orgânica | 20,05 ^b | 19,72 ^b | 23,32 ^a | 23,27 ^a | 0,77 | 0,0001 | 0,0001 | NS |
| Proteína Bruta | 7,31 ^a | 7,19 ^{ab} | 6,86 ^b | 6,84 ^b | 0,13 | 0,007 | 0,01 | NS |
| Extrato Etéreo hidrólise ácida | 3,18 ^a | 3,13 ^a | 2,42 ^b | 2,41 ^b | 0,16 | 0,0001 | 0,0001 | NS |
| Fibra Bruta | 0,38 ^b | 0,37 ^b | 2,38 ^a | 2,37 ^a | 0,42 | 0,0001 | 0,0001 | NS |
| Coeficientes de digestibilidade aparente (%) | | | | | | | | |
| Matéria Seca | 69,92 ^a | 71,35 ^a | 62,27 ^b | 60,89 ^b | 2,20 | 0,0001 | 0,0001 | NS |
| Matéria Orgânica | 75,25 ^a | 76,63 ^a | 66,82 ^b | 65,87 ^b | 2,26 | 0,0001 | 0,0001 | NS |
| Proteína Bruta | 83,40 ^{ab} | 84,75 ^a | 79,67 ^b | 78,96 ^b | 1,47 | 0,003 | 0,0001 | NS |
| Matéria Mineral | 23,37 ^a | 25,23 ^a | 20,45 ^{ab} | 15,15 ^b | 2,40 | 0,008 | 0,003 | NS |
| Energia Bruta | 78,57 ^a | 79,64 ^a | 69,17 ^b | 68,43 ^b | 2,35 | 0,0001 | 0,0001 | NS |
| Energia Metabolizável (kcal/g MS) | 3,70 ^a | 3,75 ^a | 3,04 ^b | 3,01 ^b | 0,15 | 0,0001 | 0,001 | NS |
| Coeficiente de digestibilidade <i>in vitro</i> (%) | | | | | | | | |
| Matéria Seca | 75,55 ^a | 73,65 ^a | 69,80 ^b | 68,30 ^b | 1,81 | 0,000 | 0,0001 | NS |
| Matéria Orgânica | 73,63 ^a | 73,99 ^a | 67,82 ^b | 68,78 ^b | 1,74 | 0,000 | 0,0001 | NS |
| Características fecais | | | | | | | | |
| Fezes na MN (g/(kg PC) ^{0,67} /dia) ³ | 18,68 ^{bc} | 18,05 ^c | 27,07 ^{ab} | 29,28 ^a | 2,95 | 0,003 | 0,0001 | NS |
| Fezes na MS (g/(kg PC) ^{0,67} /dia) ⁴ | 6,72 ^b | 6,30 ^b | 9,77 ^a | 10,07 ^a | 0,77 | 0,0001 | 0,0001 | NS |
| MS fecal (%) | 36,19 | 35,24 | 37,21 | 35,88 | 1,91 | 0,918 | NS | NS |
| Escore fecal ⁵ | 4 | 3,5 | 4,3 | 4,3 | 0,31 | 0,236 | NS | NS |

¹Co - Controle; Co_{enz} - Controle mais enzima; AF - Alta fibra; AF_{enz} - Alta fibra com enzima

²Erro padrão da média; n=6

³Produção de fezes na matéria natural por quilograma de peso metabólico por dia

⁴Produção de fezes na matéria seca por quilograma de peso metabólico por dia

⁵Baseado na escala: 0 = fezes líquidas; 1 = fezes pastosas e sem forma; 2 = fezes macias, mal formadas e que assumem o formato do recipiente de colheita; 3 = fezes macias, formadas e úmidas, que marcam o piso; 4 = fezes bem formadas e consistentes, que não aderem ao piso; 5 = fezes bem formadas, duras e secas

^{a-b}Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

⁶Contraste ortogonal: com fibra (AF e AF_{enz}) versus sem fibra (Co e Co_{enz})

⁷Contraste ortogonal: com enzima (AF_{enz} e Co_{enz}) versus sem enzima (AF e Co)

A adição de enzima não influenciou a digestibilidade aparente dos nutrientes, independente da dieta fornecida. Vale salientar que neste estudo a dose de enzima foi relativamente baixa, pois a quantidade de enzima fornecida aos animais (5 mg/gato/dia) foi calculada baseada na estimativa da ingestão de pelos e não de proteína da dieta.

Pacheco et al. (2014) avaliaram a inclusão de um complexo enzimático (amilase, celulase, xilanase, β -glucanase, fitase, protease e pectinase) sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes de dietas para cães contendo níveis crescentes de farelo de arroz integral (0, 20 e 40%) e não verificou influência da enzima sobre a digestibilidade. Sá et al. (2013) também não verificaram efeitos na digestibilidade aparente dos nutrientes quando adicionaram celulase, xilanase, β -glucanase, fitase, glicoamilase e α -amilase em dietas para cães. Tortola et al. (2013) também não obtiveram resultados diferentes sobre a digestibilidade dos nutrientes ao suplementar a dieta para cães com protease, celulase, pectinase, fitase, xilanase e β -glucanase. Diferente dos resultados em cães, Zhang et al. (2014), em trabalho realizado com leitões, avaliaram a inclusão de concentrações gradativas (0, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 mg/kg de ração) de um complexo multienzimático (amilase, protease e xilanase) sobre a digestibilidade aparente total e verificou aumento na digestibilidade com a adição das enzimas. Em outro estudo com leitões, Omogbenigun et al. (2004) também relataram o aumento da digestibilidade dos nutrientes ao adicionar um complexo enzimático contendo xilanase, glucanase, amilase, protease, invertase e fitase.

Não foram encontrados estudos com a inclusão de enzimas na dieta de gatos e seus efeitos sobre a digestibilidade. Conforme pode ser verificado nos estudos citados, os resultados são controversos e esta variação pode ser devido ao complexo enzimático utilizado (atividade enzimática e dosagem), às dietas empregadas no estudo (processamento, ingredientes, níveis nutricionais), às características da população do

estudo (espécie, homogeneidade de resultados), entre outros, e até o presente momento não permite indicações de uso destes aditivos na nutrição de animais de companhia.

Os coeficientes de digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, matéria mineral e energia bruta, e a energia metabolizável aparente foram menores ($P < 0,005$) para as dietas contendo alta fibra (AF e AF_{enz}). Outros estudos com gatos têm demonstrado resultados semelhantes. Oliveira (2012) avaliou o impacto da suplementação de fibra de cana (16,48% e 18,89%) e de carboxi metil celulose (10,11% e 12,60%) e verificou também a redução do CDA dos nutrientes, exceto para o amido. Fischer et al. (2012), ao suplementarem a dieta com 12,8% de fibra de cana constatou diminuição do CDA dos nutrientes, exceto para o amido e FDT. Loureiro et al. (2016), ao incluir celulose (10%) e fibra de cana (10% e 20%) em dietas para gatos, observou redução do CDA dos nutrientes e também da energia bruta e energia metabolizável aparente, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Prola et al. (2010) constataram redução da digestibilidade apenas da MS e da EB, ao adicionar 4,0% de celulose em dieta úmida para gatos, enquanto a digestibilidade da PB e do EEA não foram reduzidas.

A fibra de cana, fonte de fibra insolúvel, empregada nas dietas deste estudo, é composta por 53,5% de celulose e 6,4% de lignina (Veloso Junior, 2011). Possui em torno de 91% de fibra dietética total, sendo praticamente 100% de fibra insolúvel (Pinto, 2007). Esse tipo de fibra é pouco fermentável e é eliminada praticamente em sua forma intacta. Devido à suas características, estimula o peristaltismo, provocando o aumento da velocidade de passagem da digesta e da motilidade, diminuindo a absorção dos nutrientes. Dessa maneira, a redução da digestibilidade dos nutrientes encontrada nesse estudo está relacionada com a adição da fibra de cana nas dietas.

Digestibilidade *in vitro*

O coeficiente de digestibilidade *in vitro* da MS e MO foi maior para os tratamentos Co e CO_{enz} (P=0,0001) em relação aos tratamentos AF e AF_{enz}, resultados semelhantes aos verificados pelo método *in vivo*. Apesar dos coeficientes de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* apresentarem resultados ligeiramente diferentes, houve grande concordância dos dados por estes métodos. Para a digestibilidade da MS e MO, os coeficientes de correlação de Pearson (R) entre os dois métodos foram respectivamente 0,93 e 0,98. Sabe-se que os métodos de digestibilidade *in vitro* apresentam limitações de uso, no entanto são métodos mais rápidos, simples e eliminam a necessidade de uso de animais na pesquisa. Porém, para gatos este método ainda não é validado e os estudos *in vivo* são necessários e produzem resultados mais confiáveis. Segundo Palagianio (2011), existe uma superestimação da digestibilidade da energia dos alimentos pelos métodos *in vitro*, a qual pode estar ligada à incompleta recuperação do material sólido não digerido (ex: fibras solúveis) e também à utilização de solventes durante a fase de lavagem dos resíduos (que dissolvem todas as gorduras presentes na amostra), assumindo que a digestibilidade da gordura é 100%. Outro fator que contribui para diferenças entre os métodos é que a digestibilidade *in vitro* é comparada com a digestibilidade aparente na maior parte das vezes, que fornece valores subestimados quando comparada com a digestibilidade verdadeira, esta considera as perdas endógenas que não são consideradas pelos métodos *in vitro*. Ainda, os métodos *in vitro* possivelmente superestimam a absorção dos minerais, uma vez que a maior parte destes minerais é composta por cálcio e fósforo e em pH ácido, estes elementos são solubilizados na etapa que simula a digestão gástrica em pH 2,0 e são considerados como absorvidos, é bem diferente do que ocorre *in vivo*, estes minerais apresentam taxa de absorção relativamente baixa.

A digestibilidade *in vitro* dos tratamentos Co e CO_{enz} subestimou o coeficiente de digestibilidade da MO em relação ao método *in vivo*. Resultado semelhante foi

encontrado por Ponciano Neto et al. (2015). Segundo a mesma autora, esse fato pode ser explicado pela fibra presente nos alimentos, que não é degradada pelas enzimas utilizadas no método *in vitro*, porém, no intestino do animal estas são fermentadas em algum grau pelos microrganismos e absorvidas como ácidos graxos voláteis. Já para as dietas AF e AF_{enz}, os valores de digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica foram superestimados, provavelmente por possuírem maior teor de fibra insolúvel, que são muito pouco fermentadas no intestino dos gatos, portanto, teve maior correlação com a digestibilidade *in vitro*. Estas divergências de resultados levantam a necessidade de maior número de estudos visando aprimorar os resultados pelos modelos *in vitro*.

Características fecais

A porcentagem de MS nas fezes não diferiu ($P=0,918$) entre os tratamentos. A produção fecal na MS e MN por kg de peso metabólico por dia foi maior ($P<0,05$) para os gatos que receberam as dietas com fibra de cana (AF e AF_{enz}) em relação aos que receberam a ração Co. Esse resultado pode ser explicado pela menor digestibilidade dessas dietas, maior consumo e também pelo fato da fibra de cana ser excretada praticamente intacta, aumentando a massa fecal. O escore fecal foi numericamente menor para as dietas Co e Co_{enz}, porém não foram estatisticamente diferentes ($P=0,236$) dos outros tratamentos. A fibra de cana possui elevada capacidade de absorver água, dessa maneira, há absorção da água livre presente no bolo fecal, tornando as fezes mais consistentes e secas e, conseqüentemente, melhorando o escore fecal (Loureiro et al., 2016). Segundo Prola et al. (2010), a celulose de fibras longas também apresentou característica de se ligar à água das fezes e torná-las mais duras e secas.

Diferentemente dos resultados obtidos nesse estudo, alguns autores relataram aumento da MS fecal de gatos quando alimentados com dietas suplementadas com fibras insolúveis (Fekete et al., 2004; Prola et al., 2010; Fischer et al., 2012; Oliveira, 2012).

Loureiro et al. (2016) obteve o mesmo resultado que o trabalho presente, não observando diferenças na MS ao incluir fibra de cana e celulose na dieta de gatos. Em relação ao escore fecal, todos os estudos citados acima obtiveram fezes mais firmes e secas ao incluir fibra insolúvel na dieta, embora alguns não relataram diferença estatística. No entanto, o escore fecal possui grande interesse comercial e as diferenças visuais devem ser levadas em consideração.

Incidência de bolas de pelos

A adição de enzima e fibra, separadamente, não influenciou a média do número total de bolas de pelos excretadas (Co_{enz} : $P = 0,3633$ e AF : $P = 0,5947$), como demonstrado na Tabela 4. No entanto, a adição de fibra insolúvel associada à enzima reduziu a média do número total de bolas de pelos excretadas (AF_{enz} : $P = 0,0344$).

Tabela 4. Estimativa do número total médio de bolas de pelos excretadas em cada um dos tratamentos.

| | Co | Co_{enz} | AF | AF_{enz} |
|--|------|------------|--------|------------|
| Média do nº total de bolas de pelos ¹ | 3,72 | 4,35 | 4,08 | 2,41 |
| Valor p | - | 0,3633 | 0,5947 | 0,0344 |

¹Número total médio de bolas calculado pela somatória de e^{β_0} mais e^{β^T} de cada tratamento.

Apesar da fibra insolúvel ser utilizada em rações comerciais para redução da incidência de bolas de pelos, apenas um estudo (Loureiro et al., 2014) foi encontrado na literatura corroborando esta hipótese, no qual gatos alimentados com dieta contendo 20% de fibra de cana apresentaram redução na média do número total de tricobezoares excretados quando comparado com a dieta controle. Entre os outros estudos encontrados (Dann et al., 2004; Beynen et al., 2011; Cannon, 2013) as informações são provenientes de questionários avaliados pelos proprietários dos gatos sobre os sinais clínicos, como náusea, vômitos e tosse, tornando os resultados subjetivos. No trabalho de Weber et al. (2015), apesar de relatarem maior excreção de pelos quando gatos de pelos longo foram

alimentados com celulose e psyllium, as fezes foram moídas inteiras, portanto não se conhece a forma como os pelos foram excretados (bolas ou soltos).

Segundo Weber et al. (2015), poucos estudos têm sido realizados para avaliar a eficácia das dietas na incidência de tricobezoares, provavelmente pela dificuldade de quantificar precisamente as bolas de pelos. O método utilizado no presente estudo mostrou-se subjetivo, havendo a necessidade do desenvolvimento de novos métodos mais acurados. O procedimento de lavagem das fezes parece desfazer algumas bolas de pelos pequenas, ainda em formação, nas quais os pelos não estão completamente envelados. Outro ponto desfavorável, refere-se à pesagem dos tricobezoares. Muitos deles continham resíduo de digesta internamente, afetando parcialmente os resultados.

Verificou-se através do teste qui-quadrado (Tabela 5) que não há associação entre o tamanho de bola de pelo em relação aos tratamentos ($P = 0,3763$).

Tabela 5. Distribuição da frequência de bolas de pelos grandes, médias e pequenas em cada tratamento.

| | Tratamentos | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-------------|-------|-------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------|-------|-------|
| | Co | | | Co _{enz} | | | AF | | | AF _{enz} | | |
| Tamanho ¹ | G | M | P | G | M | P | G | M | P | G | M | P |
| Número de bolas | 2 | 24 | 41 | 9 | 31 | 32 | 7 | 24 | 39 | 3 | 13 | 18 |
| % no tratamento | 2,99 | 35,82 | 61,19 | 12,50 | 43,06 | 44,44 | 10 | 34,29 | 55,71 | 8,82 | 38,24 | 52,94 |
| % na categoria | 8,70 | 23,66 | 28,56 | 36,43 | 28,44 | 20,74 | 29,15 | 22,65 | 26,00 | 25,72 | 25,25 | 24,71 |
| % no geral | 0,82 | 9,88 | 16,87 | 3,70 | 12,76 | 13,17 | 2,88 | 9,88 | 16,05 | 1,23 | 5,35 | 7,41 |

¹ G = bola de pelo grande, M = bola de pelo média e P = bola de pelo pequena.

Segundo Cannon (2013), os tricobezoares menores podem causar obstrução intestinal parcial, com certo desconforto associado, porém na maioria dos casos eles são eliminados pelas fezes, resultando na resolução completa dos sinais clínicos. Já as bolas de pelos maiores, apesar de serem menos ocorrentes, estão frequentemente associadas à sinais clínicos mais graves. Embora os tamanhos de bola de pelo não apresentaram associação aos tratamentos ($P = 0,3763$), é possível verificar uma tendência de diminuição de bolas de pelos grandes nas dietas com alta fibra em relação ao tratamento Co_{enz}. O

tratamento Co apresentou menor número de bolas de pelos grandes, divergindo do resultado esperado, porém foi observado, desde o início do experimento e período de adaptação, menor predisposição pelos animais inseridos nesse tratamento em formar bolas de pelos grandes.

Segundo Weber et al. (2015), a densidade do revestimento do pelo, bem como as proporções relativas de pelos de proteção e de subpelo podem variar com a raça e isto pode impactar na excreção dos pelos. No presente estudo, os gatos utilizados eram sem raça definida e de pelos curtos. Foi possível verificar pela análise estatística efeito aleatório de animal, que foi aplicado no modelo estatístico. Alguns gatos utilizados no estudo claramente eliminavam um número de bolas muito maior do que outros, independente do tratamento, sugerindo predisposição individual para a formação de bolas de pelos.

Como conclusões, o complexo de protease empregado neste estudo apresenta ação queratinolítica sobre pelos de gatos, *in vitro*, em doses mais elevadas do que em penas. No entanto, quando avaliado *in vivo*, este complexo enzimático apenas reduziu o número total de bolas de pelos quando associado a fibra insolúvel. A fibra insolúvel, isoladamente, também não reduziu o número total de bolas de pelos. Não houve associação entre o tamanho de bola de pelo em relação aos tratamentos A digestibilidade *in vitro* e *in vivo* não foi modificada pela utilização de proteases na dieta de gatos, no entanto, a fibra de cana reduziu significativamente a digestibilidade da MS, MO, PB e EB quando utilizada na concentração de 28 g/1,000 kcal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAFCO. 2010. Official Publication. In: A. o. A. F. C. O. Inc (ed.), West Lafayette.
- Barrett, A. J., N. D. Rawlings, and E. A. O'Brien. 2001. The MEROPS Database as a Protease Information System. *Journal of Structural Biology* 134: 95-102.
- Barrs, V. R. et al. 1999. Intestinal Obstruction by Trichobezoars in Five Cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 1: 199-207.
- Bernal, C., L. Vidal, E. Valdivieso, and N. Coello. 2003. Keratinolytic activity of *Kocuria rosea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 255-261.
- Beynen, A. C., J. Middelkoop, and D. H. J. Saris. 2011. Clinical Signs of Hairballs in Cats Fed a Diet Enriched with Cellulose. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 6.
- Bontempo, V. 2005. Nutrition and health of dogs and cats: evolution of petfood. *Veterinary research communications* 29 Suppl 2: 45-50.
- Brandelli, A. 2008. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food and Bioprocess Technology* 1: 105-116.
- Brandelli, A., D. J. Daroit, and A. Riffel. 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied microbiology and biotechnology* 85: 1735-1750.
- Bressollier, P., F. Letourneau, M. Urdaci, and B. Verneuil. 1999. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2570-2576.
- Brush, A. H. 1996. On the origin of feathers. *Journal of Evolutionary Biology* 9: 131-142.
- Burton-Freeman, B. 2000. Dietary fiber and energy regulation. *J Nutr* 130: 272S-275S.
- Butterwick, R. F., and P. J. Markwell. 1997. Effect of amount and type of dietary fiber on food intake in energy-restricted dogs. *American journal of veterinary research* 58: 272-276.
- Cannon, M. 2013. Hair balls in cats: a normal nuisance or a sign that something is wrong? *J Feline Med Surg* 15: 21-29.
- Carciofi, A. C. et al. 2008. Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post-prandial glucose and insulin response*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92: 326-336.
- Case, L. P., D. P. Carey, and D. A. Hirakawa. 1997. *Nutrição canina e felina: manual para profissionais*. Harcourt Brace de España.
- Cheng, S. W. et al. 1995. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 59: 2239-2243.
- Chitte, R. R., V. K. Nalawade, and S. Dey. 1999. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Letters in Applied Microbiology* 28: 131-136.
- Dann, J. R., M. A. Adler, K. L. Duffy, and C. J. Giffard. 2004. A Potential Nutritional Prophylactic for the Reduction of Feline Hairball Symptoms. *The Journal of Nutrition* 134: 2124S-2125S.
- Daroit, D. J., A. P. F. Corrêa, and A. Brandelli. 2011. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65: 45-51.
- De Angelis, R. C. 2001. *Conceitos de nutrientes não tradicionais. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde.*, Belo Horizonte - MG.
- DeBakey, M., and A. Ochsner. 1939. Bezoars and concretions. *Surgery* 5: 132-160.

- Eckstein, R. A., and B. L. Hart. 2000. The organization and control of grooming in cats. *Applied Animal Behaviour Science* 68: 131-140.
- Fahey, G. C., Jr. et al. 1990. Dietary fiber for dogs: I. Effects of graded levels of dietary beet pulp on nutrient intake, digestibility, metabolizable energy and digesta mean retention time. *Journal of animal science* 68: 4221-4228.
- Farag, A. M., and M. A. Hassan. 2004. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 85-93.
- FEDIAF. 2012. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. In: E. P. F. I. Federation (ed.), Bélgica.
- Fekete, S. G., I. Hullar, E. Andrasofszky, and F. Kelemen. 2004. Effect of different fibre types on the digestibility of nutrients in cats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 88: 138-142.
- Félix, A. P., S. G. Oliveira, and A. Maiorka. 2010. Fatores que interferem no consumo de alimentos em cães e gatos. In: S. L. Vieira et al. (eds.) *Consumo e Preferência Alimentar dos Animais Domésticos*. p 315. Phytobiotics Brasil, Londrina.
- Fischer, M. M. et al. 2012. Fiber fermentability effects on energy and macronutrient digestibility, fecal traits, postprandial metabolite responses, and colon histology of overweight cats. *Journal of animal science* 90: 2233-2245.
- Garrett, R., and C. M. Grisham. 1995. *Biochemistry*. Saunders College Pub.
- Goggin, J. M., H. F. Schryver, and H. F. Hintz. 1993. The effects of ad libitum feeding and caloric dilution on the domestic cat's ability to maintain energy balance. *Feline Pract.* 21: 7-11.
- Gupta, R., and P. Ramnani. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied microbiology and biotechnology* 70: 21-33.
- Hendriks, W. H., M. F. Tartelin, and P. J. Moughan. 1997. Seasonal Hair Growth in the Adult Domestic Cat (*Felis catus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 116: 29-35.
- Hervera, M., M. D. Baucells, F. Blanch, and C. Castrillo. 2007. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by in vitro analyses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 91: 205-209.
- Hirsch, E., C. Dubose, and H. L. Jacobs. 1978. Dietary control of food intake in cats. *Physiol Behav* 20: 287-295.
- Iwamuro, M. et al. 2014. In vitro analysis of gastric phytobezoar dissolubility by coca-cola, coca-cola zero, cellulase, and papain. *Journal of clinical gastroenterology* 48: 190-191.
- Jones, L. N. et al. 1997. Intermediate filament structure: hard alpha-keratin. *Biophysical chemistry* 68: 83-93.
- Kanarek, R. B. 1975. Availability and caloric density of the diet as determinants of meal patterns in cats. *Physiology & Behavior* 15: 611-618.
- Kane, E., Q. R. Rogers, and J. G. Morris. 1981. Feeding behavior of the cat fed laboratory and commercial diets. *Nutrition Research* 1: 499-507.
- Katoh, K., T. Tanabe, and K. Yamauchi. 2004. Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity. *Biomaterials* 25: 4255-4262.
- Kim, J. M., W. J. Lim, and H. J. Suh. 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry* 37: 287-291.
- Kornilowicz-Kowalska, T., and J. Bohacz. 2011. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste management (New York, N.Y.)* 31: 1689-1701.

- Kramer, S. J., and M. B. Pochapin. 2012. Gastric phytobezoar dissolution with ingestion of diet coke and cellulase. *Gastroenterology and Hepatology* 8: 770-772.
- Krugner-Higby, L., T. Wolden-Hanson, A. Gendron, and R. L. Atkinson. 1996. High prevalence of gastric trichobezoars (hair balls) in Wistar-Kyoto rats fed a semi-purified diet. *Laboratory animal science* 46: 635-639.
- Lateef, A. et al. 2010. Keratinolytic activities of a new feather-degrading isolate of *Bacillus cereus* LAU 08 isolated from Nigerian soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64: 162-165.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, and M. M. Cox. 2011. *Lehninger princípios de bioquímica*. ARTMED.
- Loureiro, B. A. 2012. Avaliação das propriedades nutricionais e funcionais da fibra insolúvel na alimentação de gatos, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - UNESP, Jaboticabal - SP.
- Loureiro, B. A. et al. 2016. Insoluble fibres, satiety and food intake in cats fed kibble diets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*.
- Loureiro, B. A. et al. 2014. Sugarcane fibre may prevents hairball formation in cats. *Journal of nutritional science* 3: e20.
- Malik, R. 2003. Sequelae of trichobezoars (Hair balls) passing through the intestinal tract. *J Feline Med Surg* 5: 357-358.
- Merheb, C. W., H. Cabral, E. Gomes, and R. Da-Silva. 2007. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry* 104: 127-131.
- Miller, H. 1965. Essential nutrients and their role in metabolism. In: G. D. R. Center (ed.) *Basic guide to canine nutrition*. p 12-14. Gaines Dog Research Center, New York.
- Muir, H. E., S. M. Murray, G. C. Fahey, Jr., N. R. Merchen, and G. A. Reinhart. 1996. Nutrient digestion by ileal cannulated dogs as affected by dietary fibers with various fermentation characteristics. *Journal of animal science* 74: 1641-1648.
- Norsworthy, G. D., S. F. Grace, M. A. Crystal, and L. P. Tilley. 2010. *The Feline Patient*. Wiley.
- NRC. 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. In: N. R. Council (ed.). p 398. The National Academy, Washington, DC.
- Oliveira, M. C. C. 2012. Efeito da fibra solúvel e insolúvel e do teor de proteína sobre a saciedade e respostas hormonais em gatos. Mestrado, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - UNESP, Jaboticabal - SP.
- Omogbenigun, F. O., C. M. Nyachoti, and B. A. Slominski. 2004. Dietary supplementation with multienzyme preparations improves nutrient utilization and growth performance in weaned pigs. *Journal of animal science* 82: 1053-1061.
- Onifade, A. A., N. A. Al-Sane, A. A. Al-Musallam, and S. Al-Zarban. 1998. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology* 66: 1-11.
- Pacheco, G. F., C. S. Marcolla, G. S. Machado, A. M. Kessler, and L. Trevizan. 2014. Effect of full-fat rice bran on palatability and digestibility of diets supplemented with enzymes in adult dogs. *Journal of animal science* 92: 4598-4606.
- Page, M. J., and E. Di Cera. 2008. Evolution of Peptidase Diversity. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 30010-30014.
- Palagiano, C. 2011. Effects of extrusion process variables on the nutritional quality of dry dog feeds. Tese, Università degli Studi di Padova.
- Panaman, R. 1981. Behaviour and Ecology of Free-ranging Female Farm Cats (*Felis catus* L.). *Zeitschrift für Tierpsychologie* 56: 59-73.

- Pinto, M. V. P. 2007. Utilização digestiva de dietas com diferentes fontes fibrosas e determinação de curvas glicêmicas em cães adultos. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.
- Ponciano Neto, B. et al. 2015. Digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica em alimentos para gatos XIV Congresso CBNA PET, Ribeirão Preto - SP.
- Prola, L., B. Dobenecker, P. P. Mussa, and E. Kienzle. 2010. Influence of cellulose fibre length on faecal quality, mineral excretion and nutrient digestibility in cat. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 94: 362-367.
- Ramnani, P., and R. Gupta. 2004. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. *Biotechnology and applied biochemistry* 40: 191-196.
- Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 597-635.
- Rawlings, N. D., and A. J. Barrett. 2000. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 28: 323-325.
- Riffel, A., F. Lucas, P. Heeb, and A. Brandelli. 2003. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Archives of Microbiology* 179: 258-265.
- Roberfroid, M. B., and N. M. Delzenne. 1998. Dietary fructans. *Annual review of nutrition* 18: 117-143.
- Rodrigues Marcondes, N. et al. 2008. New feather-degrading filamentous fungi. *Microbial ecology* 56: 13-17.
- Russell, J., and P. Bass. 1985. Canine gastric emptying of fiber meals: influence of meal viscosity and antroduodenal motility. *The American journal of physiology* 249: G662-667.
- Sa, F. C. et al. 2013. Enzyme use in kibble diets formulated with wheat bran for dogs: effects on processing and digestibility. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 97 Suppl 1: 51-59.
- Schallmeyer, M., A. Singh, and O. P. Ward. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology* 50: 1-17.
- Scriban, R. 1991. *Biotechnologia*. Edagricole.
- Silva, L. A. D., A. J. Macedo, and C. Termignoni. 2014. Production of keratinase by *Bacillus subtilis* S14. *Annals of Microbiology* 64: 1725-1733.
- Simpson, K. A., N. M. Martin, and S. R. Bloom. 2009. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 53: 120-128.
- Tortola, L. et al. 2013. Enzyme effects on extruded diets for dogs with soybean meal as a substitute for poultry by-product meal. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 97 Suppl 1: 39-50.
- Trowell, H. et al. 1976. Letter: Dietary fibre redefined. *Lancet (London, England)* 1: 967.
- Twedt, D. C. 1994. Diseases of the stomach. In: R. G. Sherding (ed.) *The cat: Diseases and Clinical Management*. p 1193-1195. Churchill Livingstone, New York.
- Vanderhoof, J. A. 1998. Immunonutrition: the role of carbohydrates. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 14: 595-598.
- Veloso Junior, R. R. 2011. Nível de fibra e tipo de processamento na digestibilidade, ingestão e parâmetros bioquímicos da arara canindé (*Ara ararauna* L. - aves, psittacidae). Tese, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

- Vignardet, C., Y. C. Guillaume, L. Michel, J. Friedrich, and J. Millet. 2001. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. *International journal of pharmaceutics* 224: 115-122.
- Voet, D., J. G. Voet, and C. W. Pratt. 1999. *Fundamentos de bioquímica*. ARTMED.
- Weber, M., L. Sams, A. Feugier, S. Michel, and V. Biourge. 2015. Influence of the dietary fibre levels on faecal hair excretion after 14 days in short and long-haired domestic cats. *Veterinary Medicine and Science* 1: 30-37.
- Willemse, T., M. Mudde, M. Josephy, M. Josephy, and B. M. Spruijt. 1994. The effect of haloperidol and naloxone on excessive grooming behavior of cats. *European Neuropsychopharmacology* 4: 39-45.
- Wiseman, A., and M. C. Rebollar. 1991. *Manual de biotecnología de los enzimas*. Acribia.
- Zhang, G. G., Z. B. Yang, Y. Wang, W. R. Yang, and H. J. Zhou. 2014. Effects of dietary supplementation of multi-enzyme on growth performance, nutrient digestibility, small intestinal digestive enzyme activities, and large intestinal selected microbiota in weanling pigs. *Journal of animal science* 92: 2063-2069.