

ESTUDO LONGITUDINAL DAS ALTERAÇÕES NA DIGESTIBILIDADE DA DIETA MEDIDAS *IN VIVO* E *IN VITRO* E NOS METABÓLITOS DE FERMENTAÇÃO INTESTINAL EM CÃES EM CRESCIMENTO

EDUARDA L. FERNANDES¹, LAIANE S. LIMA¹, LORENNNA. N. A SANTOS¹, RENATA B. M. S. SOUZA¹, HELOÍSA L. SILVA¹, THAINÁ B. MEDEIROS¹, MÁRCIA F. K. ALMEIDA¹, PRISCILA M. S. VILLA¹, ANANDA P. FÉLIX¹.

¹Universidade Federal do Paraná, UFPR, Campus de Ciências Agrárias, Curitiba, PR, Brasil.
Contato: eduarda_lorena@ufpr.br / Apresentador: EDUARDA L. FERNANDES

Resumo: Objetivou-se avaliar a influência da idade sobre a digestibilidade medida *in vivo* e *in vitro*, energia metabolizável (EM) da dieta, metabólitos de fermentação intestinal e características fecais em cães em crescimento. Foram avaliados 8 cães da raça Beagle aos 2, 5, 8, 11 e 14 meses de idade. Os cães foram alimentados com o mesmo alimento seco extrusado por 20 dias, de acordo com as necessidades de EM. As fezes foram coletadas para análise dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da dieta e características fecais. No 5º dia de coleta total de fezes de cada período, fezes frescas foram coletadas para avaliação de pH, amônia, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR). Os CDAs da matéria seca (MS) e extrato etéreo (EE), a EM e as concentrações fecais de AGCR foram maiores nos cães mais novos ($P < 0,05$). O CDA da proteína bruta (PB) e as concentrações fecais de AGCC foram maiores nos cães mais velhos ($P < 0,05$). Cães mais novos tiveram menor teor de matéria seca e maior produção fecal, resultando em menor escore fecal ($P < 0,05$). A digestibilidade *in vitro* superestimou os valores de digestibilidade encontrados *in vivo*. Conclui-se que a idade interfere na maioria dos CDAs da dieta, nas características fecais e nos metabólitos de fermentação intestinal em cães.

PalavrasChaves: AGCC; filhotes; funcionalidade intestinal.

LONGITUDINAL STUDY ON THE ALTERATIONS IN DIET DIGESTIBILITY MEASURED *IN VIVO* AND *IN VITRO* AND IN INTESTINAL FERMENTATIVE METABOLITES IN GROWING DOGS

Abstract: The study aimed to evaluate the influence of age on digestibility measured *in vivo* and *in vitro*, metabolizable energy (ME) of the diet, intestinal fermentation metabolites, and fecal characteristics in growing dogs. Eight Beagle dogs were evaluated at 2, 5, 8, 11, and 14 months of age. The dogs were fed the same dry extruded food for 20 days, according to ME requirements. Feces were collected for analysis of the apparent digestibility coefficients (ADC) of the diet and fecal characteristics. On the 5th day of total feces collection for each period, fresh feces were collected to assess pH, ammonia, short-chain fatty acids (SCFA), and branched-chain fatty acids (BCFA). The ADCs of dry matter (DM) and ether extract (EE), ME, and fecal concentrations of BCFA were higher in younger dogs ($P < 0.05$). Crude protein (CP) ADC and fecal concentrations of SCFA were higher in older dogs ($P < 0.05$). Younger dogs had lower dry matter content and higher fecal production, resulting in a lower fecal score ($P < 0.05$). *In vitro* digestibility overestimated the ADC values found *in vivo*. It can be concluded that age interferes with most of the diet's ADCs, fecal characteristics, and intestinal fermentation metabolites in dogs.

Keywords: Intestinal functionality; puppies; SCFA.

Introdução: A maioria dos ensaios de digestibilidade são conduzidos *in vivo*. Entretanto, com a crescente demanda pela redução no uso de animais em pesquisas, têm-se estudado metodologias *in vitro* em substituição às convencionais (Hervera et al., 2007). Ainda, os ensaios nutricionais *in vivo* e *in vitro* geralmente avaliam apenas os efeitos da dieta, sem considerar a possível influência da idade sobre a digestibilidade dos nutrientes e indicadores de funcionalidade intestinal. Durante o crescimento, os cães estão em processo de desenvolvimento do sistema gastrointestinal (SGI), apresentando microbioma intestinal imaturo, o que pode limitar suas funções (Garrigues et al., 2022). Assim, objetivou-se avaliar a influência da idade sobre os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) medidos *in vivo* e *in vitro* e energia metabolizável (EM) da dieta, metabólitos de fermentação intestinal e características fecais em cães em crescimento.

Material e Métodos: O estudo foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais. Foram utilizados 8 cães da raça Beagle (4 machos e 4 fêmeas), entre 2 ($56 \pm 17,9$ dias) e 14 meses ($424 \pm 15,28$ dias) de idade. Durante esse período, os cães foram alimentados com a mesma dieta seca extrusada para crescimento em quantidade para sustentar a curva de crescimento saudável. Quando os cães tinham 2, 5, 8, 11 e 14 meses de idade, foram realizados ensaios de digestibilidade *in vivo* por meio do método de coleta total de fezes (AAFCO, 2016). As fezes foram analisadas quanto à matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EE), matéria mineral (MM) e energia bruta (EB) (AOAC, 1995). A EM foi calculada segundo a AAFCO (2016). Os CDA *in vitro* foram determinados em triplicata segundo Hervera et al. (2007). No 5º dia de coleta total de cada período, fezes frescas foram coletadas para análises de pH (medido em pHmetro digital), amônia (Brito et al., 2010) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR), por cromatografia gasosa. As características fecais foram avaliadas pelo conteúdo de MS fecal (MSf), produção e escore (1 = fezes líquidas à 5 = fezes secas). Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste Shapiro Wilk e quando atendida essa premissa, foram submetidos à análise de regressão, totalizando 8 repetições ($P < 0,05$).

Resultado e Discussão: Foi observado comportamento quadrático na ingestão por quilo de peso metabólico ($\text{kg}^{0,75}$) e no CDA do EE ($P < 0,05$, Tabela 1). Além disso, houve redução linear do CDA da MS e na EM em cães mais velhos ($P < 0,05$, Tabela 1), o que corrobora com o menor CDA do EE observado. Houve aumento linear no CDA da PB ao longo do

crescimento ($P < 0,05$, Tabela 1), sugerindo que a maior ingestão de PB por kg^{0,75} pode exceder a capacidade de absorção do SGI, reduzindo a digestibilidade em filhotes (Ephraim et al., 2020). Foram observadas maiores CDA *in vitro* de MS (74,0%), MO (71,5%), PB (84,5%) e EB (81,4%), em comparação com a análise *in vivo* ($P < 0,05$). Isso porque, os métodos *in vitro* não contabilizam as perdas endógenas e assumem que os componentes solubilizados *in vitro* são digeríveis e absorvíveis *in vivo* (Hervera et al., 2007). Houve aumento linear no teor de MS e escore fecal com a idade, corroborando com a redução linear na produção de fezes em cães mais velhos ($P < 0,05$, Tabela 1). As concentrações de AGCR totais diminuíram linearmente dos 2 até os 14 meses de idade ($P < 0,05$, Tabela 2). O que pode ser atribuído à maior ingestão por kg^{0,75} por cães mais jovens e menor CDA da PB nesse grupo, gerando maior quantidade de substrato nitrogenado no cólon e maior fermentação por bactérias proteolíticas (Ephraim et al., 2020). Ainda, observou-se comportamento quadrático nas concentrações fecais de AGCC totais ($P < 0,05$, tabela 2), provavelmente devido ao desenvolvimento progressivo do SGI. Não houve efeito da idade sobre as demais variáveis ($P > 0,05$).

Tabela 1: Médias de ingestão, coeficientes de digestibilidade aparente (CDA,%), energia metabolizável (EM, kcal/kg) e características fecais de cães em crescimento.

Item	Idade (meses)					EPM ¹	P-L ²	P-Q ²
	2	5	8	11	14			
Ingestão/kg^{0,75}/dia								
Matéria seca, g	59,8	59,8	42,1	37,9	37,9	1,65	0,005	<0,001
Matéria orgânica, g	53,9	53,8	37,9	34,3	33,6	1,49	0,005	<0,001
Proteína bruta, g	14,6	14,6	10,3	9,3	9,1	0,41	0,005	<0,001
Fibra dietética total, g	3,8	3,8	2,8	2,5	2,4	0,11	0,004	<0,001
Extrato etéreo, g	7,0	7,0	4,9	4,5	4,4	0,20	0,005	<0,001
Energia bruta, g	277,6	277,0	198,3	180,7	173,2	7,57	0,004	<0,001
EM, kcal	209,8	205,7	147,0	132,6	144,3	6,18	0,143	<0,001
CDA (%)								
Matéria seca	71,9	70,1	68,2	68,5	67,5	0,43	<0,001	0,208
Matéria orgânica	75,4	74,3	74,1	75,0	73,0	0,31	0,103	0,982
Proteína bruta	76,0	75,7	77,3	79,3	77,1	0,31	0,001	0,521
Extrato etéreo	86,0	83,0	81,2	84,0	83,5	0,37	<0,001	<0,001
Energia bruta	76,2	75,3	75,4	75,6	73,7	0,31	0,059	0,616
EM	3512,7	3469,2	3434,3	3427,0	3370,2	15,00	0,002	0,990
Características fecais								
Matéria seca	26,9	28,4	32,0	33,7	35,5	0,58	<0,001	0,921
Produção de fezes (g/dia) ³	269,2	313,4	231,7	201,2	202,0	7,64	<0,001	0,063
Escore fecal	3,0	3,1	3,6	3,8	3,9	0,09	<0,001	0,888

¹EPM = erro padrão da média; ²Probabilidades ($P < 0,05$); ³Produção = g fezes produzidas na matéria natural/animal/dia.

Tabela 2: Médias de pH, amônia, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC; mMol/g) e ramificada (AGCR; mMol/g) das fezes de cães em crescimento.

Item	Idade (meses)					EPM ¹	P-L ²	P-Q ²
	2	5	8	11	14			
Amônia	0,14	0,19	0,13	0,11	0,14	0,01	0,097	0,413
pH	6,54	6,58	6,76	6,71	6,39	0,07	0,993	0,916
Acetato	63,43	76,35	176,10	142,00	134,96	8,21	<0,001	<0,001
Propionato	26,29	29,87	61,18	56,01	50,53	2,70	<0,001	<0,001
Butirato	7,87	9,08	15,09	12,79	12,98	0,53	<0,001	<0,001
AGCC total	97,60	112,02	242,90	210,80	198,50	10,90	<0,001	<0,001
Isovalerato	5,93	5,65	6,26	5,79	5,10	0,09	0,069	0,039
Valérico	5,55	5,28	4,88	4,56	4,79	0,08	<0,001	0,177
Isobutirato	5,84	5,64	5,93	5,59	5,24	0,07	0,019	0,044
4 metil valerato	0,56	0,54	0,64	0,64	0,58	0,01	0,067	0,165
Hexanóico	0,68	0,63	0,69	0,56	0,63	0,02	0,063	0,006
Heptanóico	5,58	5,28	4,74	4,45	4,22	0,09	<0,001	0,167
AGCR total	18,59	17,75	18,25	17,03	15,76	0,23	<0,001	0,184

¹EPM = erro padrão da média; ²Probabilidades ($P < 0,05$).

Conclusão: A idade pode influenciar na digestibilidade da dieta em cães, com aumento no CDA da PB e redução no CDA da MS e EE dos 2 aos 14 meses. Ainda, há melhora na consistência e aumento nas concentrações fecais de AGCC e redução dos AGCR com a progressão da idade. A digestibilidade *in vitro* tende a superestimar os CDA dos nutrientes da dieta em comparação com o método *in vivo*.

Agradecimentos: Agradecimento ao CNPQ e ao Instituto PremieRpet pelo apoio à pesquisa e VB alimentos pelo suporte ao laboratório.

Referências Bibliográficas: Association of American Feed Control Officials, 2016. Dog and Cat Nutrient Profiles. Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporated. AAFCO, Oxford, IN, USA. Association of the official Analytical Chemists, 1995. Official Methods of Analysis, Sixteenth ed. AOAC, Washington, D.C., USA. BRITO, C. B. M. et al. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, n. 3-4, p. 150–155, 1 ago. 2010. EPHRAIM, E. et al. Varying Protein Levels Influence Metabolomics and the Gut Microbiome in Healthy Adult Dogs. **Toxins**, v. 12, n. 8, p.517, 12 ago. 2020. GARRIGUES, Q. et al. Gut microbiota development in the growing dog: A dynamic process influenced by maternal, environmental and host factors. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2 set. 2022. HERVERA, M. et al. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by *in vitro* analyses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, n. 5-6, p. 205–209, jun. 2007. URREGO, M. I. G. et al. Effects of different protein sources on fermentation metabolites and nutrient digestibility of brachycephalic dogs. **Journal of Nutritional Science**, v. 6, 2017.