

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**PAMELA PRESTES SEZEROTTO
Zootecnista/UFSM**

**PALATABILIDADE, DIGESTIBILIDADE E PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO DO
SPRAY DRIED DE FÍGADO DE FRANGO HIDROLISADO EM GATOS**

**Porto Alegre (RS), Brasil
2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**PAMELA PRESTES SEZEROTTO
Zootecnista/UFSM**

**PALATABILIDADE, DIGESTIBILIDADE E PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO DO
SPRAY DRIED DE FÍGADO DE FRANGO HIDROLISADO EM GATOS**

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Zootecnia. Área de concentração Produção Animal, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Orientador: Luciano Trevizan
Coorientador: Ricardo de Souza
Vasconcellos**

**Porto Alegre (RS), Brasil
2022**

CIP - Catalogação na Publicação

Prestes Sezerotto, Pamela
PALATABILIDADE, DIGESTIBILIDADE E PRODUTOS DE
FERMENTAÇÃO DO SPRAY DRIED DE FÍGADO DE FRANGO
HIDROLISADO EM GATOS / Pamela Prestes Sezerotto. --
2022.

105 f.

Orientador: Luciano Trevizan.

Coorientador: Ricardo de Souza Vasconcellos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. proteína. 2. características fecais. 3. produtos
de fermentação. 4. ácido butírico. 5. ácido valérico.
I. Trevizan, Luciano, orient. II. de Souza
Vasconcellos, Ricardo, coorient. III. Título.

Pamela Prestes Sezerotto
Zootecnista

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 26.05.22
Pela Banca Examinadora

Homologado em:
Por



LUCIANO TREVIZAN
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

SERGIO LUIZ VIEIRA
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



Ananda Portella Félix
UFPR



Fabio Ritter Marx
Kemin Nutrisurance - EUA



Gerusa Silveira Machado
Consultora



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de

Agronomia

DEDICO

Aos meus pais **Marlei Prestes Sezerotto** e **Gerson Luiz Pinheiro Sezerotto**, por todo apoio, amor e aguentarem comigo todos os altos e baixos da vida.

À minha irmã **Samanta Prestes Sezerotto**, por todo apoio, amor, ajuda nos momentos que eu precisei e ser meu ombro amigo.

AGRADECIMENTOS

Palavras nunca serão suficientes para agradecer a minha família, por todo apoio e incentivo. Eles compreendem e sabem cada fase que passei nesses últimos dois anos e quanto tudo isso me fez mudar. Obrigada pai **Gerson Luiz Pinheiro Sezerotto**, obrigada mãe **Marlei Prestes Sezerotto** e minha irmã **Samanta Prestes Sezerotto**. Vocês foram e sempre serão essenciais em qualquer etapa da minha vida.

Obrigada aos meus fieis escudeiros durante todo esse processo, sozinhos não vamos a lugar nenhum e vocês foram muito importantes para que todo esse trabalho fosse construído. **Caroline, Ariane, Luiz, João, Shirley, Patrick, Fernando, Josy, Ingrid e Laura**. Obrigada por estarem comigo nos dias de trabalho, catando cocozinho e tornando tudo o mais leve possível. E, um muito obrigada especial a minha querida amiga **Joyce**, que além de se tornar meu braço direito nas atividades do experimento, se tornou minha família de Maringá. Você e a tua família foram essenciais para os meus dias longe de casa.

Obrigada **Prof. Dr. Ricardo Vasconcellos** por me receber tão bem no seu grupo, me fazer parte dele e me fazer evoluir muito lá dentro. Ao **Prof. Dr. Luciano Trevizan**, por todo o ensino e apoio ao longo desses dois anos, que foram essenciais para o meu crescimento e evolução profissional.

Obrigada a todos que de alguma forma estiveram presentes na minha vida durante esse processo, todos estarão sempre no meu coração.

Obrigada ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida.

Eu, juntamente com todas essas pessoas desenvolvemos um trabalho incrível, com resultados muito interessantes que logo estarão ganhando esse mundo.

Obrigada a todos!

PALATABILIDADE, DIGESTIBILIDADE E PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO DO *SPRAY DRIED* DE FÍGADO DE FRANGO HIDROLISADO EM GATOS

Autor: Pamela Prestes Sezerotto

Orientador: Prof. Dr. Luciano Trevizan

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito de duas fontes de proteína de origem animal *spray dried* de fígado de frango hidrolisado (HCLP) e farinha de vísceras de frango (PBM) adicionadas em concentrações crescentes e em substituição a concentração de carboidrato, afim de atingir concentração proteica final de 24%, 32% e 40%, em dietas para gatos adultos. Foram utilizados 36 gatos adultos saudáveis, distribuídos em um delineamento em blocos casualizados no tempo composto por um fatorial 2x3. Avaliou-se digestibilidade de nutrientes e energia, características fecais e urinárias, o impacto nos produtos oriundos de fermentação intestinal e a palatabilidade após 30 dias de alimentação com as dietas experimentais. O coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da gordura foi menor nos tratamentos HCLP 32% e controle 32% de proteína. O CDA do carboidrato foi menor nos tratamentos HCLP 24% e controle 32%. Não houve diferença significativa entre número de defecações, volume urinário, ganho de peso e peso metabólico dos animais ($P < 0,05$), mas houve uma tendência de aumento do pH urinário nas dietas HCLP 40% e uma diminuição de pH urinário nos animais que consumiram as dietas controle 24% ($P = 0,0021$). A MS fecal foi menor para os gatos que consumiram as dietas hidrolisadas, havendo maior conteúdo de água, mas sem interferir no escore fecal. Houve aumentos lineares de acetato fecal, butirato, isovalerato, valerato, 4-metil valerato, ácidos graxos voláteis (AGV) total heptanóico, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR) com dietas hidrolisadas. O butirato apresentou diminuição, e o isobutirato e amônia aumentaram à medida que houve aumento na inclusão proteica. Não houve diferença significativa quando comparamos a interação entre fonte e nível para pH fecal, MS fecal e produtos de fermentação. Para os períodos de coleta, dia 0 e 30, houve decréscimos lineares para pH fecal, propionato e isobutirato, e aumentos para butirato, valerato, AGCR total e lactato. Os gatos apresentaram razão de ingestão superior para as dietas hidrolisadas, sendo que as concentrações de 40% de proteína foram mais preferíveis aos de 32%, independente da fonte proteica. A dieta com hidrolisado a 40% de proteína foi a preferida pelos gatos. O *spray dried* hidrolisado proteico foi preferível pelos gatos e mostraram-se sensíveis aos níveis de inclusão, preferindo níveis mais altos. Não houve alteração nas características fecais, porém foram observados aumento nos níveis de ácidos graxos importantes para a saúde e manutenção da população bacteriana intestinal, como o butirato e valerato.

Palavras-chave: proteína. características fecais. produtos de fermentação. ácido butírico. ácido valérico.

PALATABILITY, DIGESTIBILITY AND FERMENTATION PRODUCTS OF SPRAY DRIED CHICKEN LIVER POWDER HYDROLYSATE IN CATS

Author: Pamela Prestes Sezerotto

Advisor: Prof. Dr. Luciano Trevizan

ABSTRACT

This study evaluated the effect of two sources of protein of animal origin *spray dried* from hydrolyzed chicken liver (HCLP) and chicken offal meal (PBM) added in increasing concentrations and replacing the carbohydrate concentration, in order to reach final protein concentration of 24%, 32% and 40% in adult cat diets. Thirty-six healthy adult cats were used, distributed in a randomized block design consisting of a 2x3 factorial. Digestibility of nutrients and energy, fecal and urinary characteristics, impact on products from intestinal fermentation and palatability after 30 days of feeding with the experimental diets were evaluated. The apparent digestibility coefficient (ADC) of fat was lower in the HCLP 32% and control 32% protein treatments. The carbohydrate ADC was lower in the 24% HCLP and 24% control treatments. There was no significant difference between the number of defecations, urinary volume, weight gain and metabolic weight of the animals ($P < 0.05$), but there was a tendency for an increase in urinary pH in the HCLP 40% diets and a decrease in urinary pH in the animals who consumed the control diets 24% ($P = 0.0021$). Fecal DM was lower for cats that consumed hydrolyzed diets, with higher water content, but without interfering with the fecal score. There were linear increases in fecal acetate, butyrate, isovalerate, valerate, 4-methyl valerate, total heptanoic volatile fatty acids (VFA), short chain (SCFA) and branched (SCFA) fatty acids with hydrolyzed diets. Butyrate showed a decrease, and isobutyrate and ammonia increased as there was an increase in protein inclusion. There was no significant difference when we compared the interaction between source and level for fecal pH, fecal DM and fermentation products. For the collection periods, day 0 and 30, there were linear decreases for fecal pH, propionate and isobutyrate, and increases for butyrate, valerate, total AGCR and lactate. Cats had a higher intake ratio for hydrolyzed diets, with 40% protein concentrations being more preferable to 30%, regardless of the protein source. The diet with 40% protein hydrolyzate was preferred by cats. The *spray dried* protein hydrolyzate was preferred by cats and they were sensitive to inclusion levels, preferring higher levels. There was no change in fecal characteristics, but an increase in the levels of fatty acids important for the health and maintenance of the intestinal bacterial population, such as butyrate and valerate, was observed.

Key words: hydrolysed spray dried. fecal characteristics. products of fermentation. butyric acid. valeric acid.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Proteínas hidrolisadas	18
2.2 Proteínas: digestão e fermentação intestinal	20
2.3 Produtos finais de fermentação	22
2.4 Aminas biogênicas	24
2.3.1 Microrganismos produtores	29
2.4.2 Principais alimentos sujeitos a contaminação por aminas biogênicas	30
2.4.3 Toxicologia	35
3. OBJETIVOS	38
4. HIPÓTESES	39
CAPÍTULO II	40
INTRODUCTION	43
MATERIAL AND METHODOS	44
Dietary treatments	44
Digestibility assay	45
End products fermentation	46
Palatability assay	47
RESULTS	48
DISCUSSION	50
CONCLUSION	56
RREFERENCES	57
Capítulo III	84
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICES	98

RELAÇÃO DE TABELAS

Capítulo I:	Página
Tabela 1. Aminas biogênicas, seus aminoácidos precursores e principais efeitos no organismo.	27
Tabela 2. Principais alimentos sujeitos a contaminação por aminas biogênicas e seus microrganismos produtores	30
 Capítulo II	
Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets.	65
Table 2. Difference between source protein and levels under nutrient intake, total tract apparent digestibility coefficient and metabolizable energy of cats fed diets containing different protein sources and levels (mean \pm mean standard error).	68
Table 3. Nutrient intake, coefficient of total tract apparent digestibility and metabolizable energy of cats fed diets containing different sources and levels of protein (mean \pm standard error of the mean).	70
Table 4. Difference between source protein and levels under fecal and urinary characteristics, and weight gain of cats fed diets containing different protein sources and levels (mean \pm mean standard error).	72
Table 5. Fecal and urinary characteristics, and weight gain of cats fed diets containing different sources and levels of protein (mean \pm standard error of the mean).	73
Table 6. Difference between source protein and levels under fecal pH, fecal dry matter, volatile fatty acids (mMol/g of dry matter), ammonia (mMol NH ₃ /kg dry matter) and lactic acid concentration (mMol/kg of dry matter) on feces of dogs fed diets containing different protein sources and levels (mean \pm mean standard error).	74
Table 7. Volatile fatty acids (mMol/g dry matter), ammonia (mMol NH ₃ /kg dry matter) and lactic acid concentration (mMol/kg dry matter) on	76

the feces of cats fed diets containing different sources and levels of protein (mean \pm standard error of the mean), in the day 0.

Table 8.	Difference between day 0 and day 30 under fecal pH, fecal dry matter, volatile fatty acids (mMol/g dry matter), ammonia (mMol NH ₃ /kg dry matter) and lactic acid concentration (mMol/kg dry matter) on feces of cats fed diets containing different protein sources and levels (mean \pm mean standard error).	80
Table 9.	Test power according to the intake ratio of the diets used in the palatability test.	82

RELAÇÃO DE FIGURAS**Capítulo I:****Página**

Figura 1. Estruturas das aminas biogênicas

25

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

- ADC:** Apparent digestibility coeficiente;
- AGCC:** Ácidos graxos de cadeia curta;
- AGCR:** Ácidos graxos de cadeia ramificada;
- BCFA:** Branched-chain fatty acids;
- CGE:** Eletroforese em gel capilar;
- CGL:** Cromatografia gás-líquido;
- CGS:** Cromatografia gás-sólido;
- CIEF:** Isoelétrico capilar de focalização;
- CITP:** Isotacoforese capilar;
- CLAE:** Cromatografia líquida de alta eficiência;
- CMS:** Carne mecânicamente separada;
- CP:** Crude protein;
- CZE:** Eletroforese em zona capilar;
- DAO:** Diaminoxidase;
- DM:** Dry matter;
- FDA:** Food and Drug Administration;
- HCLP:** Hydrolysed chicken liver powder;
- MAO:** Monoaminoxidase;
- MEKC:** Cromatografia eletrocínética micelas;
- MS:** Matéria seca;
- OM:** Organic matter;
- PAO:** Poliaminoxidase;
- PB:** Proteína Bruta;
- PBM:** Poultry byproduct meal
- SCFA:** Short-chain fatty acids;
- VFA:** Volatile fatty acids;

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

As dietas comerciais para cães e gatos são formuladas com o objetivo de produzir alimentos completos, para que os animais possam ser completamente nutridos somente pelo consumo exclusivo deste alimento. No entanto, alguns animais exigem algumas alterações pontuais na fonte de alimentos, na quantidade ou na qualidade dos nutrientes fornecidos pela fórmula em virtude de alguma enfermidade ou exigência terapêutica, servindo como um alimento que auxilia o tratamento de um processo patológico ou de uma alteração metabólica, neste caso as dietas são chamadas de coadjuvantes.

As dietas coadjuvantes, portanto, são auxiliares no tratamento de patologias, especialmente as crônicas, reduzindo a morbidade e aumentando a longevidade dos pacientes. Produzir dietas que apresentem benefícios digestivos e metabólicos são um grande desafio para pesquisadores de nutrição animal. Desenvolver ingredientes que tenham propriedades funcionais é fundamental.

A intolerância e a hipersensibilidade alimentar são problemas recorrentes na clínica de animais de companhia. A substituição da fonte proteica na dieta, por uma proteína pouco comum, pode ser uma forma de tratar um paciente com hipersensibilidade alimentar a uma determinada proteína. Em alguns casos críticos, em que há um processo alérgico envolvido a troca da fonte proteica pode não ser suficiente para a remissão dos sintomas e neste caso somente proteínas com baixo peso molecular podem passar despercebidas pelo sistema imune permitindo ao animal viver normalmente. Eis a importância de proteínas de diferentes origens e hidrolisadas.

Várias técnicas de processamento têm sido utilizadas para melhorar a qualidade dos alimentos para cães e gatos. Uma delas é o uso da hidrólise proteica. O fator relevante para a utilização de hidrolisado é a palatabilidade, pois peptídeos e aminoácidos produzem uma grande variedade de sabores, como o doce e o amargo. A confecção de proteínas hidrolisadas requer processos enzimáticos e térmicos que permitem a formação de cadeias curtas de polipeptídeos e aminoácidos livres. No entanto, este processo que libera aminoácidos os deixa mais propensos a serem metabolizados. A descarboxilação de aminoácidos resulta na formação de aminas biogênicas, compostos que em geral estão negativamente associados à saúde animal. Estes processos podem ocorrer durante a produção industrial das proteínas hidrolisadas ou dentro da luz do trato gastrointestinal do animal mediante o contato de aminoácidos livres com microrganismos. Dessa forma, não somente proteínas hidrolisadas estão propensas a formação de aminas biogênicas, no intestino dos animais, mas qualquer conteúdo de proteína indigestível.

Ainda, a presença de conteúdo indigestível no intestino afeta a microbiota do cólon e a fermentação realizada por ela, gerando diferentes ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, lactato, amônia e mesmo aminas biogênicas, que podem ser absorvidas e ter interferência no metabolismo ou simplesmente podem interferir na qualidade fecal.

Dietas contendo alto conteúdo de proteína ou com proteína de baixa digestão podem gerar maior conteúdo de proteína indigestível que certamente atingirá o cólon e será fermentada. Dessa forma, o objetivo deste estudo é entender como concentrações crescentes de proteína bruta, em substituição ao carboidrato nas dietas, a partir de proteína convencional (farinha de vísceras de aves) e *spray dried* de fígado de frango interferem na palatabilidade, digestibilidade, fermentação no cólon e suas consequências nas características urinárias e fecais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteínas hidrolisadas

O interesse pela utilização de proteínas hidrolisadas nas dietas vem apresentando um aumento crescente, uma vez que apresentam propriedades funcionais tanto para fins clínicos como no uso em geral. Estas proteínas vêm sendo utilizadas há várias décadas na formulação nutricional para indivíduos que não digerem a proteína intacta (MAHMOUD; MALONE; CORDLE, 1992). Atualmente, vários produtos utilizam como fonte proteica os hidrolisados, como em dietas geriátricas, suplementos energéticos, dietas para controle de peso, terapêuticas ou ainda dietas entéricas (BENÍTEZ; IBARZ; PAGAN, 2008). Além de serem utilizados na indústria de alimentos como substitutos lácteos, suplementos protéicos, estabilizadores de bebidas e realçadores de sabor (FRØKJAER, 1994).

Lahl e Braun (1994) citam que para a seleção de uma proteína hidrolisada são levados em consideração alguns critérios importantes, como o: valor nutricional, custo, sabor e alergenicidade. A partir disso, são classificadas de acordo com os tipos de preparação, os quais podem ser: semi-elementar que apresenta fórmula com alto ou extenso grau de hidrólise com peptídeos apresentando peso molecular inferior a 5.000 Daltons; e hidrólise ácida, ou seja, fórmulas com um baixo grau de hidrólise ou parcialmente hidrolisado (MALDONADO *et al.*, 1998), esse tipo de fórmula apresenta uma proporção de proteínas que estão intactas ou ligeiramente degradadas, com peptídeos entre 8.000 e 20.000 daltons (WAHN, 1995).

A hidrólise de proteína pode ser realizada a partir de alguns métodos: a hidrólise alcalina, a hidrólise enzimática e a hidrólise ácida ou a combinação de dois ou mais destes métodos (ADLER-NISSEN, 1986; LAHL & BRAUN, 1994). Dentre os métodos a hidrólise enzimática é a mais indicada, uma vez que destrói os epítomos sequenciais, além de que, adicionar enzimas ao invés de reagentes químicos melhora as propriedades do produto final. Em adição, o processo de hidrólise enzimática é mais simples, eficiente e envolve condições alcalinas moderadas que não destroem as proteínas recuperadas por racemização e outras reações químicas (FONKWE & SINGH, 1996).

Outro método, é a secagem por pulverização, que surgiu como uma ferramenta na Segunda Guerra Mundial, para reduzir o peso dos alimentos, facilitando assim o transporte. Este método consiste na transformação de um ingrediente, chamado de alimento, em estado líquido para forma de pó em um ambiente gasoso quente. O processo é contínuo e o alimento seco pode se apresentar na forma pó, grânulo ou de aglomerado, de acordo com as propriedades

físicas e químicas deste, o design do secador e as propriedades finais desejadas do pó (KILLEEN, 2000).

Os hidrolisados de proteínas têm sido utilizados para melhorar os alimentos comerciais para cães e gatos, em dietas convencionais e dietas com fim terapêutico. A principal utilização em dietas para animais de companhia é para o manejo de hipersensibilidade alimentar, pois cada vez mais estes animais estão sendo expostos a uma grande variedade de proteínas a medida que aumenta a variedade de dietas comerciais. As dietas contendo hidrolisado de proteína foram relatadas como eficazes e bem toleradas, quando administrada como dieta de eliminação para o diagnóstico de reações alimentares adversas em cães (LOEFFLER *et al.*, 2004).

Quando se aborda doenças inflamatórias do intestino as dietas contendo hidrolisados de proteína demonstram vantagem quando comparadas com dietas contendo proteínas intactas, pois diminui a preocupação de ocorrer hipersensibilidade dietética. Essas novas fontes de proteínas têm se mostrado eficazes em cães e gatos com uma variedade de doença inflamatória do intestino delgado e grosso (NELSON; DIMPERIO; LONG, 1984; GUILFORD *et al.*, 2001). Ainda há muita divergência de informações sobre a ação de hidrolisados proteicos na recuperação de lesões na mucosa intestinal, alguns estudos demonstram recuperação das vilosidades quando a dieta é composta com hidrolisados (POULLAIN *et al.*, 1989). Acredita-se que as dietas de proteína hidrolisada também sejam aliadas no gerenciamento de insuficiência pancreática, por aumentar a digestibilidade e ao mesmo tempo reduzir alergenicidade.

A utilização dos hidrolisados apresentam inúmeros benefícios à nutrição animal, porém, a matéria-prima que irá produzir o hidrolisado deve apresentar potencial para se tornar uma farinha de alta qualidade. Na indústria de processamento de aves, são produzidos subprodutos e resíduos. O fígado de aves é considerado um subproduto comestível que constitui quase 4% do peso corporal (BOWES & JULIAN, 1988) e uma excelente fonte de proteína, minerais, vitaminas e colesterol (KIM, 2011). Várias técnicas de processamento estão sendo utilizadas para que esses subprodutos tenham seu uso otimizado nas dietas para animais, um deles é a utilização em forma hidrolisada, tornando o ingrediente mais funcional e sendo adicionados em alimentos com proteínas de baixa qualidade (BHASKAR *et al.* 2007).

O principal problema envolvendo as proteínas hidrolisadas é a imunogenicidade, pois a hidrólise reduz a alergenicidade mas não elimina o risco de produzir reações imunomediadas. Outro fator relevante é a palatabilidade de alimentos que contenham esses hidrolisados, pois peptídeos e aminoácidos produzem uma grande variedade de sabores, como por exemplo, o sabor doce, o qual já se tem conhecimento (IWAMURA, 1981). Já a sensação do gosto amargo

ocorre devido hidrólise, pois os fragmentos hidrofóbicos dos peptídeos ficam expostos e podem ser degustados. Conforme os fragmentos de peptídeos e aminoácidos livres diminuem de tamanho, o amargor diminui (ADLER-NISSEN, 1986).

A osmolaridade de proteínas hidrolisadas aumenta progressivamente com a hidrólise, podendo causar descamação de enterócitos (TEICHBERG *et al.*, 1978). A partir disso acredita-se que a utilização de hidrolisados em dietas para cães é prejudicial, porém o estudo de LOEFFLER *et al.* (2004) mostrou que em 46 cães alimentados com dieta contendo proteína hidrolisada, 21 deles mostrou melhora nos sinais gastrointestinais, sendo que 19 deles os sinais resolveram completamente e cinco deles apresentaram fezes mais firmes e volumosas.

Para a devida utilização de hidrolisados se faz necessário a avaliação das propriedades funcionais, ou seja, o comportamento físico ou a performance das proteínas nos alimentos. Esta avaliação permite que a indústria selecione o hidrolisado que irá compor a formulação, uma vez que afetam o processamento, a estabilidade de armazenamento, qualidade organoléptica e a eficácia biológica e nutricional do produto (MAHMOUD, 1994).

2.2 Proteínas: digestão e fermentação intestinal

As proteínas, além de fundamentais na composição de dietas, também estão presentes nas estruturas celulares, tecidos estruturais e controlam reações que ocorrem no organismo como o transporte de íons e outras moléculas para dentro e para fora da célula, por todo o corpo (COLVILLE, 2010). Os aminoácidos são considerados suas unidades formadoras e o que determina a função das proteínas é a sequência dos mesmos (COLVILLE, 2010). De acordo com a proporção dos mesmos dentro das proteínas pode ocorrer limitação na utilização de outros aminoácidos, os responsáveis por essa limitação são os conhecidos aminoácidos limitantes (VIEITES *et al.*, 2000), responsáveis também pela escolha da fonte proteica.

As fontes proteicas utilizadas em dieta para cães e gatos são classificadas de acordo com duas categorias: proteínas de origem vegetal, a qual incluem os grãos e os farelos de subprodutos de processos industriais de grãos e vegetais; e origem animal, provenientes de tecidos animais ou de subprodutos da indústria de carnes. Os ingredientes proteicos de origem animal mais comumente usados na indústria *petfood* são: farinha de subprodutos de frango, farinha de fígado de frango, farinha de carne de frango, farinha de penas hidrolisadas, farinha de peixe, farinha de carne e ossos de carneiro, farinha de carne e ossos bovina, farinha de vísceras de aves, carne mecanicamente separada (CMS), ovos em pó, leite em pó (integral,

semi-desnatado e desnatado). Os ingredientes de origem vegetal são: farelo de soja, farinha de glúten de milho e trigo, proteína isolada de soja e proteína micronizada de soja.

As farinhas de origem animal são compostas por resíduos de abatedouros e são utilizadas nas composições de dietas como importantes fontes proteicas. A farinha de vísceras de aves é um subproduto de abatedouros industriais, composta por resíduos de abates de aves e resultado do processamento de cabeça, pescoço, pés, dorso, sangue, intestinos e até a inclusão indevida de penas (BUTOLO, 2002). Na composição não é permitido a presença de penas, resíduos de incubatório, casca de ovo ou qualquer matéria estranha no produto (SINDICARIÇÕES, 2009). Apresenta alta porcentagem de cinzas (HARDY, 1996), dependendo da porcentagem de inclusão dos resíduos (WILSON, 1995; NENGAS; ALEXIS; DAVIES, 1999), o que resulta também na elevada disponibilidade de cálcio e fósforo (MILLAMENA, 2002).

Para a produção desta farinha de origem animal, os resíduos passam por um processamento composto por 3 etapas: cozimento sob pressão úmida (110 a 130 °C) por 3 a 6 horas de prensagem para remoção da gordura, secagem e moagem (HERTRAMPF & PIEDAD-PASCUAL, 2000; FERNANDES, 2011). Este processamento é capaz de destruir patógenos associados negativamente à saúde dos animais, como por exemplo a *Salmonella* sp. (SILVA 2009). Porém, mesmo após o processamento, são capazes de apresenta problemas, sendo dois considerados principais: a contaminação por *Salmonella* sp. e a não padronização da sua composição (FERNANDES, 2011). Este alimento apresenta deficiência em metionina, lisina e triptofano, do mesmo modo que seu teor proteico varia entre 55 a 68% (NENGAS; ALEXIS; DAVIES, 1999; EL-SAYED, 1999; FARIA; HAYASHI; SOARES, 2002). Quando comparada com a farinha de peixe, Pezzato *et al.* (2002) e Meurer, Hayashi e Boscolo (2003) encontraram coeficientes de digestibilidade para proteína bruta semelhantes, 87,24% para farinha de vísceras de aves e 82,03% para farinha de peixes.

Outro subproduto de abatedouros é a farinha de carne e ossos bovinos, muito utilizada na nutrição animal é excelente fonte proteica (teor de proteína bruta de 35 a 55%) e importante fonte de cálcio e fósforo (VIEITES *et al.*, 2000). Geralmente, é produzida em graxarias e frigoríficos a partir da desossa parcial ou completa da carcaça de bovinos, ou seja, composta de ossos e resíduos de tecidos dos animais e não deve conter cascos, chifres, pelos, conteúdo estomacal, sangue e outras matérias-primas (MAPA – Instrução Normativa Nº 34 de 28/05/2008). De acordo com Lesson e Summers (1997), a cada tonelada de carne preparada para o consumo humano, 300 kg são descartados como produtos não comestíveis e destes cerca de 200 kg se transformam em farinha de carne. Apresenta uma coloração dourada a marrom

com densidade de 657 a 689 kg/m³, além de ser um ingrediente rico em proteína bruta, cálcio e fósforo. Os aminoácidos da farinha de carne e ossos, por exemplo, são menos digestíveis que os presentes no farelo de soja (ALBINO, 1991; PUPA, 1995).

Para a produção das farinhas de origem se faz necessário a retirada dos excessos de água, triturar os resíduos não comestíveis do abate, drenar, prensar e centrifugar a gordura e os resíduos sólidos moídos em forma de farinha (CAMPESTRINI, 2005). Esses ingredientes podem apresentar valores nutricionais não estáveis ou padrões, devido à variação na proporção das matérias-primas utilizadas, dos sistemas, da temperatura e do tempo de processamento aos quais são submetidos (SHIRLEY & PARSONS, 2000).

De acordo com a FEDIAF (2021) cães adultos exigem níveis dietéticos de 18% de proteína em alimentos com 4000 kcal/kg, já os gatos apresentam uma exigência de 25% de proteína. Isso se dá, devido aos gatos possuírem um metabolismo específico e desta forma suas exigências nutricionais de proteína, aminoácido arginina, vitamina B6 e niacina são maiores (CAPPELLI *et al.*, 2015). No passado, cães e gatos dependiam unicamente de caça para sua sobrevivência, ou seja, a dieta era composta, geralmente, por outra espécie animal. Já com a domesticação, esses animais passaram por algumas mudanças alimentares, como a introdução de fibras na dieta. Os gatos são considerados animais carnívoros, portanto suas necessidades nutricionais estariam presentes nas carnes. Porém, com o avanço na nutrição de animais de companhia, a alimentação a partir de rações tem feito parte da rotina destes animais, respeitando o equilíbrio dos nutrientes (PANTOJA *et al.*, 2018). Levando em consideração o perfil nutricional que esses animais apresentavam, discute-se muito sobre a superioridade ou não de proteína animal sobre a proteína vegetal. Desta forma, os ingredientes proteicos devem apresentar algumas características importantes como: palatabilidade, digestibilidade e composição de aminoácidos, que se remetem ao seu valor biológico (POND *et al.*, 1995); relação proteína:cinzas, que são mais próximas em ingredientes de origem animal e mais distantes ou favoráveis nos de origem vegetal (COWELL *et al.*, 2000).

2.3 Produtos finais de fermentação

A população microbiana intestinal é responsável por manter a saúde dos animais, promovendo melhor absorção e aproveitamento dos alimentos, mas também é responsável pela formação de alguns metabólitos. Estes, podem afetar benéficamente ou maleficamente, e são avaliados afim de compreender a qualidade e funcionalidade de ingredientes e dietas. A população bacteriana intestinal é composta por diversos microrganismos, e estes são

responsáveis pela formação de produtos finais de fermentação, assim como enzimas, a partir de substratos disponíveis das dietas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2001).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) com maior importância são os ácidos acético, propiônico e butírico. Em diferentes espécies de animais os AGCC estão ligados ao requerimento energético basal, já em gatos estão diretamente ligados à nutrição das células do intestino (BROSEY; HILL; SCOTT, 2000).

Os nutrientes que compõem as dietas para cães e gatos, estão ligeiramente ligados a saúde intestinal destes animais, uma vez que ao serem fermentáveis tornam-se disponíveis para a ação bacteriana, sendo substrato para a fermentação intestinal (DROCHNER & MEYER, 1991). Carboidratos, por exemplo, apresentam fibras e amido resistente, assim como açúcares não absorvidos. Estes compostos, ao alcançarem o cólon, tornarem-se substratos para as bactérias e resultam na produção de AGCC e ácido láctico, reduzindo pH e modificando a microbiota intestinal (CAMPBELL & FAHEY, 1997).

O ácido butírico é a principal fonte de energia para os colonócitos, sendo importante regulador do crescimento e diferenciação celular (NRC, 2006). Além disso, os colonócitos são células as quais compõem a mucosa intestinal, atuando no peristaltismo e reduzindo a entrada de compostos nitrogenados na corrente sanguínea.

Assim como o butirato, o ácido acético e propiônico ao serem absorvidos na corrente sanguínea servem como fonte de energia ao animal. A presença de AGCC estão relacionados na função digestiva, uma vez que estimulam a secreção de glucagon like-peptide 2 (GLP-2) (NRC, 2006), responsáveis pela diferenciação e proliferação celular e o transporte de nutrientes no intestino delgado.

A saúde intestinal de gatos é avaliada a partir da dieta consumida, a mucosa e a população bacteriana existente no trato intestinal. A dieta está inteiramente ligada a função metabólica, uma vez que é responsável por disponibilizar substrato para estas bactérias. Gatos, geralmente, alimentam-se de dietas com altos teores de proteína de origem animal, o que resultam em maiores concentrações de aminoácidos livres não digeríveis no intestinal, estando propícios a fermentação bacteriana.

A fermentação dos aminoácidos livres, está relacionada a produção de compostos putrefativos. Os principais compostos resultantes são amônia, lactato, ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), que envolve o ácido valérico, isovalérico e isobutírico, e aminas biogênicas. Os AGCRs são derivados de aminoácidos, o ácido valérico origina-se do aminoácido leucina e isoleucina e o ácido isobutírico da valina (NAKAE & ELLIOT, 1965). Em um estudo, onde os gatos foram alimentados com carne crua, eles apresentaram níveis mais

altos de amônia fecal e AGCR devido à reduzida digestibilidade da PB (KERR *et al.* 2012). E esses dados são semelhantes em gatos selvagens alimentados com alta proteína, observado por Vester (2010). Os metabólitos resultantes da proteína não digerida, resultam em mau odor das fezes e também podem ser tóxicos em altas concentrações (KUZMUK *et al.*, 2005).

O lactato, também está envolvido com bactérias intestinais, é resultado da fermentação de carboidratos no cólon (FISCHER *et al.*, 2012) e também é substrato para diversas bactérias, responsáveis pela produção de propionato e butirato (MOENS *et al.*, 2019). Os produtos finais da fermentação são derivados da quebra de proteínas e carboidratos, ou seja, a composição da dieta influenciara diretamente na produção de metabólicos no intestino. Estes nutrientes são considerados uma das principais fontes de alimento para as bactérias intestinais, caso em que a redução na disponibilidade deste substrato afetará a quantidade e nos tipos de produtos finais da fermentação, bem como o tempo que o substrato passará no cólon (CUMMINGS *et al.*, 1992).

2.4 Aminas biogênicas

As aminas biogênicas, ou bioaminas, são compostos nitrogenados denominados assim devido a sua origem biológica, pois ocorrem naturalmente em microrganismos, plantas e animais, atuando nos seus processos metabólicos com diferentes funções fisiológicas (LADERO *et al.*, 2010). No geral, elas possuem baixo peso molecular e sua formação é essencialmente resultado da descarboxilação enzimática de aminoácidos livres e da transaminação de aldeídos e cetonas (SANTOS, 1996). Segundo Shalaby (1996), as aminas biogênicas são fatores antinutricionais naturais e possuem a habilidade de iniciar várias reações farmacológicas.

As aminas (Figura 1) podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina presentes e da estrutura química. Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, elas se classificam em (CABALLERO; TRUGO; FINGIAS, 2003):

- **Monoaminas:** tiramina (1) e feniletilamina (2);
- **Diaminas:** histamina (3), triptamina (4), serotonina (5), putrescina (6) e cadaverina (7);
- **Poliaminas:** espermidina (8), espermina (9), e agmatina (10).

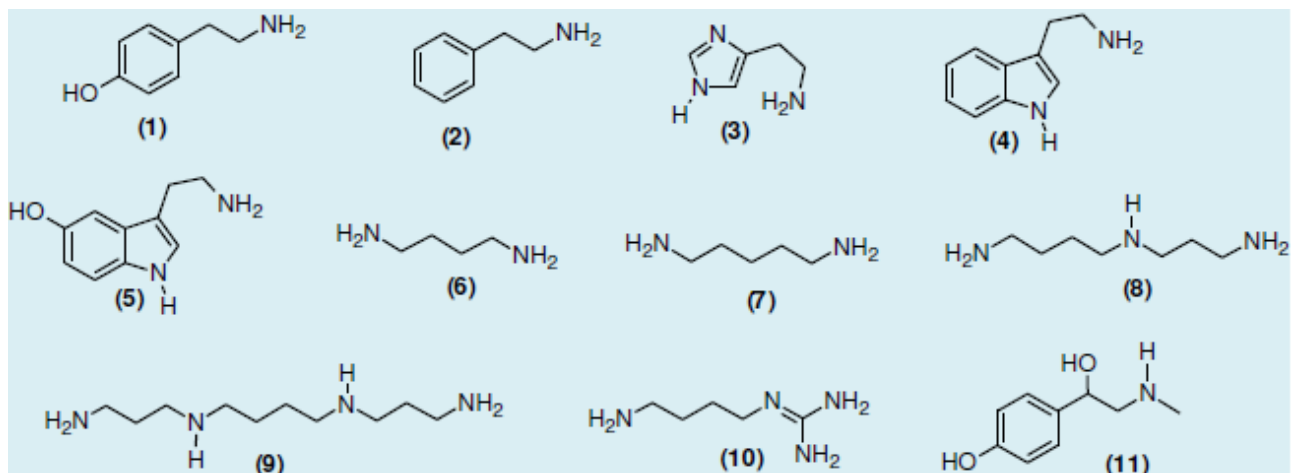
Quanto à estrutura química, são ilustradas na Figura 1 e podem ser classificadas em (CABALLERO; TRUGO; FINGIAS, 2003):

- **Alifáticas:** putrescina (6), cadaverina (7), espermidina (8), espermina (9) e agmatina (10);
- **Aromáticas:** tiramina (1), feniletilamina (2) e sinefrina (11);
- **Heterocíclicas:** histamina (3) e triptamina (4).

Com base no modo de ação, as aminas podem ser classificadas como compostos vasoativos ou psicoativos (SELLERS; STAGGS; BOGLE, 2006). Compostos psicoativos, como a histamina, a putrescina e a cadaverina, atuam nos transmissores nervosos do sistema nervoso central, enquanto que compostos vasoativos, como por exemplo a tiramina, a triptamina e a feniletilamina, atuam direta ou indiretamente sobre o sistema vascular.

São moléculas biologicamente ativas amplamente distribuídas na natureza, estando presentes nas células e nos tecidos como compostos essenciais ao crescimento, renovação e metabolismo. Elas podem desempenhar diversas funções celulares, como por exemplo as poliaminas que auxiliam no aumento da síntese do RNA, do DNA e de proteínas, ou as monoaminas que estão presentes na neurotransmissão, na regulação da pressão sanguínea e temperatura corporal (WHITE e TABOR, 1984).

Figura 1: Estruturas das aminas biogênicas: tiramina (1); feniletilamina (2), histamina (3), triptamina (4), serotonina (5), putrescina (6), cadaverina (7), espermidina (8), espermina (9), agmatina (10) e sinefrina (11)



Fonte: Cardozo, *et al.* (2013)

A descarboxilação microbiana de aminoácidos livres específicos é o mais comum modo de formação de aminas biogênicas em alimentos e bebidas (Silla-Santos, 1996; LAPA GUIMARÃES E PICKOVA, 2004; LAPA-GUIMARÃES, 2005; AWAN; FLEET; THOMAS,

2008). Sintetizadas por animais, plantas, microrganismos e em mamíferos podem ser sintetizadas endogenamente por rotas metabólicas que usualmente envolvem descarboxilação de aminoácidos precursores, ou ainda, similarmente, elas podem ser geradas exogenamente no trato intestinal por descarboxilação bacteriana de aminoácidos liberados por hidrólise enzimática de proteínas da dieta (SMITH, 1981; PINEDAA *et al.*, 2012). As estruturas químicas, seus aminoácidos precursores e os efeitos que causam no organismo são apresentadas na Tabela 1.

A quantidade e o tipo de aminas biogênicas formadas é fortemente influenciada pela composição bioquímica dos alimentos – viabilidade dos aminoácidos presentes, da microbiota e por outros parâmetros que permitem a multiplicação bacteriana durante o processamento e armazenamento dos alimentos (DRAISCI *et al.*, 1998; CARELLI *et al.*, 2007).

Embora aminas sejam usualmente formadas durante a decomposição e deterioração, processos envolvendo a formação de aminoácidos livres até completa proteólise juntamente com a produção bacteriana e ação dos aminoácidos descarboxilases podem produzir altos níveis de histamina até mesmo antes que o alimento apresente outras características típicas de deterioração ou apresentar-se sensorialmente inaceitável (SHALABY, 1996).

Portando, as aminas biogênicas servem como indicativos de qualidade do alimento, já que grandes quantidades desses compostos podem ser encontradas antes mesmo do alimento ter suas propriedades sensoriais alteradas. Essa presença nos alimentos também indica que houve condições favoráveis para a proliferação de micro-organismos e para a produção de enzimas, como nos processos de deterioração ou decomposição de alimentos. Em particular, oxidases como a monoaminoxidase (MAO), diaminoxidase (DAO) e poliaminoxidase (PAO) participam na degradação de mono-, di- e poliaminas, respectivamente (WHITE e TABOR, 1984; SILLA-SANTOS, 1996).

Um aspecto diferente das aminas na dieta é a sua influência nas propriedades organolépticas dos alimentos, como por exemplo, a putrescina pode estar associada ao ranço, aromas ruins e a putrefação, já a cadaverina confere odores a carne e cheiro de vinagre aos alimentos. Recentemente, alguns autores abriram uma nova tendência de pesquisa de grande impacto científico que diz respeito ao papel das aminas biogênicas como descritores de características alimentares.

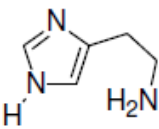
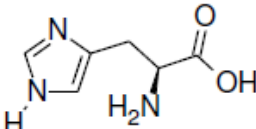
São encontradas naturalmente em frutas e hortaliças, uma vez que participam da floração, do desenvolvimento do fruto (surgimento à senescência) e da síntese de metabólitos secundários. Já nos alimentos de origem animal, por serem naturalmente ricos em aminoácidos livres, são suscetíveis à contaminação por aminas biogênicas. O teor de aminas aumenta no

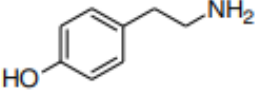
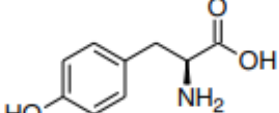
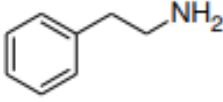
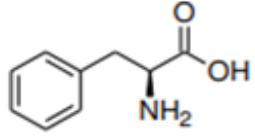
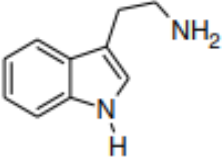
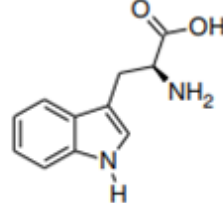
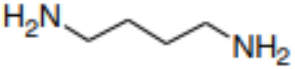
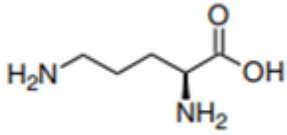

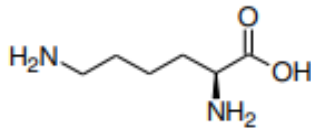
postmortem, devido à elevada quantidade de enzimas proteolíticas presentes no trato intestinal, combinada com o rápido processo autolítico (DABROWSKI e SIKORSKI, 2005).

Especialmente abundantes em produtos submetidos à ação de microrganismos, como alimentos fermentados, incluindo laticínios, cerveja e vinho (BODMER, IMARK e KNEUBÜHL, 1999; SIMON-SARKADI e GELENCSEK, 2003). Além disso, alimentos estragados e produtos fabricados sob condições precárias de higiene geralmente apresentam altas quantidades de aminas biogênicas, especialmente histamina, tiramina, putrescina e cadaverina (BULUSHI *et al.*, 2009).

A ingestão de produtos que contêm altas quantidades de aminas biogênicas pode causar episódios de toxicidade, especialmente em indivíduos sensíveis. De longe, a histamina é a amina biogênica mais estudada, pois é considerada a mais problemática, por provocar psicoatividades (dor de cabeça, palpitações e prurido), ter ação vasoativa (hipotensão), erupção cutânea e, efeitos gastrointestinais (náusea, vômito e diarreia) (JANSEN *et al.*, 2003; Peatfield *et al.*, 2003) e a sua toxicidade pode ser aumentada se combinada a componentes da dieta, como outras aminas ou álcool (DIEL *et al.*, 1997). Outra monoamina relevante é a tiramina, que está relacionada à liberação de neurotransmissores de catecolamina que podem aumentar a pressão sanguínea e a frequência cardíaca, além de ser descrita como desencadeadora de episódios de enxaqueca (FORYTHER e REDMOND, 1974). Quando se refere aos efeitos adversos de outras aminas biogênicas, a feniletilamina pode agir como um poderoso indutor de enxaqueca e espermina e espermidina parecem participar de mecanismos do câncer (BARDÓCZ, 1995).

Tabela 1. Aminas biogênicas, seus aminoácidos precursores e principais efeitos no organismo.

Aminas biogênicas	Aminoácidos Precursores	Efeitos
 <p data-bbox="359 1848 518 1881">Histamina (3)</p>	 <p data-bbox="774 1848 949 1881">Histidina (12)</p>	<p data-bbox="1077 1556 1428 2027">Vasodilatação, liberação de adrenalina e noradrenalina, excitação da musculatura lisa do útero, intestino e do trato respiratório, estimulação dos neurônios sensoriais e motores, controle da secreção ácida gástrica,</p>

		mediação primária da resposta alérgica imediata.
		Vasoconstrição, aumento do pulso cardíaco, da pressão sanguínea, da taxa respiratória e do nível de glicose no sangue, liberação da noradrenalina no sistema nervoso simpático, lacrimação, salivação excessiva e derrames.
		
Tiramina (1)	Tirosina (13)	
		Liberação da noradrenalina no sistema nervoso simpático, aumento da pressão arterial, vasoconstrição e derrames.
Feniletilamina (2)	Fenilalanina (14)	
		Aumento da pressão arterial e vasoconstrição.
Triptamina (4)	Triptofano (15)	
		Diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca, tetania, paralisia nas extremidades, potencialização da toxidez das outras aminas.
Putrescina (6)	Ornitina (16)	
		
Cadaverina (7)	Lisina (17)	

Fonte: Cardozo, *et al.* (2013).

Em alimentos frescos, a presença de aminas biogênicas é ausente ou encontram-se em concentrações baixas (<10 ppm). Já, em alimentos sujeitos a presença de aminas biogênicas

(Tabela 2), como pescado, queijos, carnes, ovos e fermentados (SHALABY, 1996), apresentam-se em concentrações significativas (>50 ppm), desta forma são capazes de induzir envenenamento escombroides, ou seja, uma intoxicação química, devido a sua associação com a ingestão de pescado (principalmente tunídeos e sardinhas). Apesar de serem necessárias em diversas funções fisiológicas de seres humanos e animais, possuem diversos efeitos tóxicos. Contudo, esses efeitos só são observados quando elas são ingeridas em excesso (alimentos muito contaminados) ou quando os mecanismos naturais de seu catabolismo são inibidos ou geneticamente deficientes (SHALABY, 1996).

A contaminação por aminas biogênicas pode ser impedida a partir da inibição do crescimento microbiano e/ou a redução da atividade da enzima descarboxilase. Para tanto, são necessários controle de temperatura, matérias-primas de qualidade, boas práticas de manuseio do material, uso de culturas não formadoras de aminas em produtos fermentados (DAPKEVICIUS *et al.*, 2000) e o uso de embalagens e aditivos (EMBORG e DALGAARD, 2008). Quanto à temperatura, o resfriamento inibe o crescimento e a ação bacteriana, enquanto que temperaturas elevadas eliminam microrganismos (DU *et al.*, 2002). Contudo, uma vez formadas as aminas biogênicas no alimento, reduzir seu conteúdo é bastante difícil já que elas são termicamente estáveis mesmo em exposições prolongadas (KALAC, 2009).

2.3.1 Microrganismos produtores

A descarboxilação bacteriana dos aminoácidos é descrita em diferentes gêneros e espécies de bactérias, tanto Gram positivas como negativas, como por exemplo as bactérias dos gêneros *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e espécies do gênero *Pseudomonas*. A produção de aminas por bactérias pode ser associada tanto a uma estratégia microbiana para sobreviver em ambientes ácidos quanto ao fornecimento alternativo de energia para as funções metabólicas de células expostas a condições e substratos não ideais (COTTER e HILL, 2003). A ação combinada das descarboxilases e uma troca funcional substrato/produto transmembranar, resulta numa força motriz de prótons que leva à alcalinização do citoplasma (WOLKEN *et al.*, 2006). Existe uma hipótese que sugere que as bactérias usem a descarboxilação dos aminoácidos como um sistema para extração de maior quantidade de energia metabólica quanto possível dos substratos presentes no meio, permitindo sua sobrevivência (LONVAUD-FUNEL, 2001). Outras ações, como na regulação do DNA e na eliminação de radicais livres, também foram sugeridas (WORTHAM; OLVEIRA; PATEL, 2007).

A presença de aminas biogênicas em alimentos, em especial a histamina, é um típico indicador de deterioração e seus limites são bem estabelecidos em vários regulamentos para diferentes tipos de alimentos (PINEDA *et al.*, 2012).

Peixes e derivados, como farinha de pescado, estão entre os alimentos com as maiores concentrações de aminas principalmente histamina, devido ao número de bactérias entéricas, bem como *Pseudomonas*, propensas a sintetizar aminas nesse substrato. Segundo a FDA (*Food and Drug Administration*) um nível máximo de 500 mg por kg de alimento e recomenda a utilização dos seguintes níveis de segurança: <50 mg/kg seguro para consumo, 50-200 mg/kg possivelmente tóxico, 200-1000 mg/kg provavelmente tóxico e >1000 mg/kg tóxico e impróprio para o consumo humano (DABROWSKI e SIKORSKI, 2005).

Em segundo lugar estão os produtos fermentados, onde as bactérias produtoras de ácido láctico são as principais produtoras de aminas biogênicas. Em queijos e produtos cárneos fermentados, a tiramina é a mais abundante e cepas de *Enterococcus* e *Lactobacillus* são os principais produtores. A Tabela 2 resume alguns dos principais alimentos sujeitos a contaminação por aminas e as bactérias produtoras encontradas em suas matrizes conforme reportado por Shalaby (1996). O conhecimento atual sobre os microrganismos produtores de aminas biogênicas varia de acordo com a espécie ou estirpe em questão.

2.4.2 Principais alimentos sujeitos a contaminação por aminas biogênicas

As aminas biogênicas podem ser sintetizadas endógena e exogenamente. Esta ocorre por hidrólise enzimática de proteínas da dieta, sendo assim, a principal fonte de aminas biogênicas é proveniente dos alimentos que compõem essa dieta. O tipo e quantidade de aminas dependem da natureza, origem, etapas de processamento e microrganismos presentes nos alimentos. Estudos vem sendo realizados para identificar estes compostos em diferentes alimentos, levando em consideração o impacto a saúde e a economia:

Tabela 2. Principais alimentos sujeitos a contaminação por aminas biogênicas e seus microrganismos produtores.

Alimento	Bactérias isoladas	Aminas encontradas
Peixes	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus</i>	tiramina (1), histamina (3), putrescina (6), cadaverina (7), espermidina (8)

	<i>vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringenes</i> , <i>Enterobacteria erogenes</i> , <i>Vibro</i> <i>alginolytiens</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>	espermina (9), agmatina (10).
Queijos	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>30a</i> , <i>L.</i> <i>bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L.</i> <i>acidophilus</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>S.</i> <i>mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>propionibacterium</i>	tiramina (1), feniletilamina (2), histamina (3), triptamina (4), putrescina (6), cadaverina (7).
Carnes e derivados	<i>Pediococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i>	tiramina (1), feniletilamina (2), histamina (3), triptamina (4), putrescina (6), cadaverina (7).
Vegetais fermentados	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococci sp.</i> , <i>Leuconostocmes enteroides</i>	tiramina (1), histamina (3), triptamina (4), putrescina (6), cadaverina (7).
Produtos fermentados de Soja	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon</i> <i>beiglli</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	tiramina (1), histamina (3), triptamina (4), putrescina (6), cadaverina (7).

Fonte: Shalaby (1996).

2.3.2.1 Peixes

Os peixes são considerados alimento saudável e nutritivo, mas também um dos alimentos com maior pré-disposição para a formação das aminas biogênicas. A presença de aminas foi inicialmente estudada nos peixes da família *Scombridae*, uma vez que apresentam alta concentração de histidina livre nos músculos (LEITÃO; BALDINI; SALES, 1983; FADHLAOU-ZIKA *et al.*, 2012), tornando-os mais susceptíveis ao acúmulo de teores tóxicos.

A farinha de peixe, utilizada na alimentação de peixes e animais de companhia, de alta qualidade é considerada baixa em aminas biogênicas e leva a uma alta digestibilidade de proteínas (AKSNES e MUNDHEIM, 1997 ; Mundheim *et al.*, 2004). Farinhas produzidas a partir de matérias-primas que apresentam alto teor de aminas biogênicas, demonstrou reduzir a taxa de crescimento específico e a sobrevivência do salmão do Atlântico (*Salmo salar*),

consumo de ração e biomassa final do camarão azul (*Litopenaeus stylirostris*) em comparação com uma farinha de peixe produzida com matérias-primas frescas (OPSTVEDT *et al.*, 2000 ; TAPIA-SALAZAR *et al.*, 2004)

Nos peixes, as aminas biogênicas formam-se a partir da descarboxilação de aminoácidos, por enzimas exógenas liberadas pelos microrganismos associados a frutos do mar (An *et al.*, 1998). A histamina, por exemplo, quando consumida manifesta o conhecido como “envenenamento escombroides” (HERNANDEZ-JOVER *et al.*, 1997; YONGMEI *et al.*, 2009). Devido a isso a FDA (*Food and Drug Administration*) americana estabeleceu um nível máximo de 500 mg por kg de alimento e recomenda níveis de segurança para utilização: <50 mg/kg seguro para consumo, 50-200 mg/kg possivelmente tóxico, 200-1000 mg/kg provavelmente tóxico e >1000 mg/kg tóxico e impróprio para o consumo humano (DABROWSKI e SIKORSKI, 2005). Já a legislação brasileira estabelece limites de até 100 mg de histamina para cada quilo de peixe, de acordo com os níveis estabelecidos internacionalmente. Quanto as demais aminas biogênicas, ainda não se tem limites estabelecidos.

Estudos realizados por Muñoz-Altienza *et al.* (2011), mostraram o teste de PCR apresentou resultados mais precisos, quando comparado com o teste em placa e a cromatografia líquida. Já Fu *et al.* (2016) utilizou o método de cromatografia líquida de alta performance integrada – triplo espectrometria de massa quadripolar (UCLAE – TQMS) e derivação de cloreto de benzoílo para analisar as aminas biogênicas em diferentes peixes e relatou que este processo simplificou o pré-tratamento amostra e melhorou a sensibilidade de detecção.

2.3.2.2 Produtos cárneos

Em alimentos fermentados, são encontrados microrganismos produtores de enzimas, as quais são responsáveis por hidrolisar inúmeros compostos nos alimentos tornando-os seguros para o consumo. Toda via, alguns destes microrganismos podem produzir substâncias indesejáveis, que é o caso das aminas biogênicas. Nos alimentos de origem animal, por serem naturalmente ricos em aminoácidos livres, são suscetíveis à contaminação por estes compostos. O teor de aminas biogênicas aumenta *postmortem*, devido à elevada quantidade de enzimas proteolíticas presentes no trato intestinal, combinada com o rápido processo autolítico (DABROWSKI e SIKORSKI, 2005).

De acordo com Suzzi & Gardini (2003), a grande concentração de proteínas presentes nos alimentos cárneos e a atividade proteolítica durante a maturação favorecem a ação das enzimas descarboxilase. Os microrganismos amina-positivos podem ser naturalmente

encontrados em produtos à base de carne ou também introduzidos por contaminação antes, durante ou após o processamento (ROKKA *et al.*, 2014). Em carnes frescas e processadas são encontradas principalmente putrescina, cadaverina, histamina e tiramina, enquanto espermidina e espermina, apresentam mudança nos seus níveis naturais ligeiramente durante o armazenamento e processamento (FAVARO *et al.* 2007)

A determinação de amins biogênicas presente em produtos cárneos é importante para a detecção do processo de deterioração e putrefação, ou seja, está estritamente relacionada com o frescor dos produtos. Para isso, vários métodos são utilizados para a determinação de amins biogênicas, como os métodos moleculares, a PCR ou hibridização são as mais utilizadas na rotina de identificação de potenciais produtores de compostos aminados (LANDETE *et al.*, 2007; BIÖRNSDÓTTIR-BUTLER *et al.*, 2010) e também a alta cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ABDEL- MONEM e OHNO, 1975; DESIDERIO, DAVALLI e PERIN, 1987; MIETZ e KARMAS, 1977; SUZUKI *et al.*, 1990)

2.3.2.3 Vegetais

Os vegetais fazem parte da composição da dieta de humanos e animais, por serem fontes de minerais, vitaminas, antioxidantes, fitoesteróis e fibras (WENNBERG *et al.*, 2006). Alimentos vegetais podem naturalmente conter amins biogênicas, já que estas são requeridas no metabolismo celular e no crescimento dos tecidos, entretanto nos vegetais, elas podem também ser produzidas por microrganismos (SILLA SANTOS, 1996; MATILLA, 1996; GLÓRIA *et al.*, 2005). Quando cozidos, geralmente ocorre transferências de amins para água do cozimento, porém, algumas espécies de vegetais, como as crucíferas, demonstram apenas redução da concentração de amins biogênicas. Segundo Tapingkae *et al.* (2010), as amins são termoestáveis, ou seja, o cozimento é incapaz de eliminar a toxina. Embora poucos estudos tenham abordado a atividade biológica das amins em produtos vegetais, putrescina e espermidina são as mais comumente presentes.

Nos vegetais as amins biogênicas podem ser introduzidas durante a produção e/ou processamento devido a descargas na atividade da descarboxilase por microrganismos. Desta forma utiliza-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na determinação das amins biogênicas.

2.4.2.4 Métodos analíticos

A análise das aminas biogênicas tem enfoque no seu uso como indicador de qualidade nos alimentos, ou seja, decréscimo no frescor ou deterioração de alimentos, assim como em sua toxicidade. A aplicação da análise de aminas biogênicas se apresenta como importante ferramenta no controle de qualidade de matéria prima, produtos intermediários e produtos finais, e ainda no controle de processos (PARK *et al.*, 2010).

Cada vez mais métodos rápidos, simples, baratos e confiáveis são necessários para satisfazer a crescente demanda de determinações de aminas biogênicas em matrizes alimentares. Nos últimos anos, diversos métodos têm sido propostos na literatura científica para atender essa demanda, respondendo à necessidade de resolver novos desafios criados na análise de alimentos. Os métodos vêm focados em melhorar a precisão, a exatidão, os limites de sensibilidade e a detecção, além de questões como custo e velocidade da análise.

Um grande número de métodos de separação tem sido descritos para determinação de aminas biogênicas (Vitali *et al.*, 2013). Dentre eles estão, principalmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (Moret e Conte, 1996; Frattini e Lionetti, 1998; TASSONI; GERMANÁ; BAGNI, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004), a cromatografia gasosa (AWAN *et al.*, 2008; AVELAR; FRANÇA; FERRAZ, 2005; Hwang; Wang; Chong, 2003) e a eletroforese capilar (Paproski *et al.*, 2002; KOVÁCS; SIMON-SARKADI; GANZLER 1999; VITALI *et al.*, 2013).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais comumente utilizada para determinação de aminas biogênicas. A razão para essa popularidade do método é a sensibilidade, adaptabilidade para determinações quantitativas, adequação para separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e acima de tudo, sua aplicabilidade generalizada para substâncias que são de interesse primordial para a indústria e para muitos campos da ciência (SKOOG, 1998). Tem como principal objetivo a separação de determinadas misturas, utilizando duas fases, uma móvel (constituída por substância líquida ou um gás) e outra estacionária (constituída por líquido ou sólido). O uso de CLAE é muito comum, porém apresenta um alto custo e maior tempo de análise (AVELAR *et al.*, 2005).

A cromatografia gasosa é a técnica utilizada para separação e determinação de compostos voláteis e/ou volatilizáveis, podendo ser aplicada em amostras gasosas, líquidas ou sólidas. É classificada de acordo com a natureza da fase estacionária em cromatografia gás-sólido (CGS) e cromatografia gás-líquido (CGL) (PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008). O poder de resolução excelente alcançado permite a determinação de dezenas de compostos diferentes em matrizes complexas (FOCANT *et al.*, 2004). Outro diferencial da técnica vem a ser sua grande sensibilidade e elevada detectabilidade. Por exemplo, o limite de

detecção para o pesticida halogenado Lindane pode atingir valores tão baixos quanto 10-16 mol mL⁻¹ empregando-se o detector de captura de elétrons (GROB & KAISER, 2004).

A década de 90, foi marcada pela implementação da terceira grande técnica instrumental de separação, a eletroforese capilar. Atualmente, os métodos de eletroforese capilar podem ser divididos nos seguintes: eletroforese em zona capilar (CZE), eletroforese em gel capilar (CGE), isotacoforese capilar (CITP), isoeletrico capilar de focalização (CIEF) e cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) (GUO *et al.*, 2015). Esse rápido avanço se dá pela simplicidade da técnica, mas principalmente pela variedade dos modos de separação que podem ser efetuados em uma única coluna capilar e da diversidade dos compostos passíveis de análise em cada modo. Além de rápida e eficiente, é barata em termos de consumo de reagentes, e mostra uma menor reprodutibilidade dos tempos de migração que a cromatografia líquida (GINTEROVÁ, 2012). A separação ocorre em tubos com dimensões de 15 a 100 µm de diâmetro interno e 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico. Outras vantagens da eletroforese capilar são: pequena demanda de amostra, com volumes tipicamente da ordem de 1 a 10 nL, e a possibilidade de injeção e detecção em fluxo (TAVARES, 1997).

Outras técnicas vêm sendo utilizadas como alternativa à cromatografia, como por exemplo sensores, ELISA e análise de injeção de fluxo. Os sensores são interessantes devido a simplicidade e baixo custo, geralmente são utilizados como alternativa aos métodos de cromatografia líquida, já que não necessitam de instrumentação especial. Uma vantagem dessa técnica é que ela pode ser usada em análises *in situ* (ÖNAL, 2007). Um sensor enzimático duplo foi desenvolvido para determinar simultaneamente histamina e treacina (HENAO-ESCOBAR, 2016). Porém, existe uma grande variedade de elementos de reconhecimento (JUSTINO, 2015), sendo os biosensores enzimáticos os prevalentes para a determinação de amins biogênicas.

O teste de ELISA é uma técnica com alta precisão, sensibilidade, boa qualidade e com potencial de padronização (ALVES, 2015). É considerado um teste demorado e caro, principalmente quando o número de amostras é pequeno (ALVES, 2015). Outro método alternativo é a análise de injeção de fluxo, que consiste na ingestão de uma amostra em um transportador de solução que está em um fluxo constante, onde ambas as soluções são misturadas passando por um detector (HERNANDEZ-CASSOU e SAURINA, 2013). No entanto, esse método foi otimizado apenas para análise de histamina.

2.4.3 Toxicologia

Embora as amins biogênicas sejam necessárias para funções do organismo do homem e dos animais, como proliferação e a diferenciação celular, regulação das funções do núcleo, síntese de proteínas, desenvolvimento cerebral, regulação e manutenção do sistema nervoso (SAAID *et al.*, 2009), o consumo em altas quantidades pode ter efeitos toxicológicos provocando sintomas digestivos, circulatórios e respiratórios. Este efeito toxicológico varia de acordo com o tipo de amina ingerida, a atividade da enzima descarboxilase e também da fisiologia do indivíduo. A histamina é a amina mais tóxica detectada nos alimentos, como peixe, queijo, vinho e carne produtos (BRINK *et al.*, 1990; HUIS IN'T VELD *et al.*, 1990). Compostos nitrogenados não proteicos, como amins e peptídeos, contribuem para a odor e sabor dos alimentos (MAGA, 1978).

O nível de toxidade das amins ainda não é bem estabelecido, pois depende de características individuais de cada amina ou quando há presença de mais de uma ao mesmo tempo. Os efeitos variam entre envenenamento, reações de intolerância e intoxicação, sendo este último caracterizado por vômitos, diarreia, rubor facial, erupção na pele, broncoespasmo, taquicardia, queimação oral, hipo ou hipertensão e enxaqueca. Em casos de envenenamento pelas amins biogênicas, os maiores riscos envolvem uma crise hipertensiva (pressão arterial > 180/120 mmHg) que pode levar a lesões do coração ou do sistema nervoso central (LADERO *et al.*, 2010).

Existe um sistema de desintoxicação bastante eficiente no trato intestinal dos mamíferos, capaz de metabolizar a ingestão alimentar normal de amins biogênicas (HUIS IN'T VELD *et al.*, 1990). Em animais saudáveis, as enzimas descarboxilases agem rapidamente sob as amins exógenas para a desintoxicação. Já em animais com hipersensibilidade alimentar ou que estão em ambiente de maior controle a ação das enzimas é mais restrita e muitas vezes leva a intoxicações mais graves, necessitando da aplicação de inibidores de amins. A oxidação é a principal via de detoxificação de amins após a ingestão, embora processos de metilação e acetilação também estejam implicados na detoxificação da histamina (LEHANE e OLLEY, 2000). Em condições normais de saúde, a ação de aminoxidases é rápida, convertendo as amins em produtos de degradação fisiologicamente inativos. Estas enzimas são classificadas como monoaminoxidase (MAO), diaminoxidase (DAO) e poliaminoxidase (PAO) participam na degradação de mono-, di- e poliaminas, respectivamente (WHITE e TABOR, 1984; SILLA-SANTOS, 1996). A monoaminoxidase se subdivide de acordo com seus inibidores em MAO-A, a qual age na regulação de serotonina no sistema nervoso central e também é responsável, no sistema gastrointestinal, pela detoxificação das monoaminas ingeridas, como a tiramina e a triptamina. A MAO-B é encontrada principalmente no fígado e músculos atuando na

desaminação da dopamina e da feniletilamina (CARDOZO; FRANÇA; e LIMA, 2013). Histamina e putrescina são desaminadas pela DAO no intestino, oferecendo proteção contra as concentrações normalmente presentes nos alimentos (MCCABE-SELLERS *et al.*, 2006).

3. OBJETIVOS

- Neste estudo avaliou-se os efeitos do hidrolisado de fígado de frango e das concentrações crescentes de proteína bruta sobre a palatabilidade, digestibilidade e produtos de fermentação fecais de gatos adultos, comparando-se com dietas formuladas a base de farinha de vísceras de aves.

4. HIPÓTESES

- A proteína hidrolisada melhora a palatabilidade, digestibilidade e aumenta produtos de fermentação;
- As concentrações crescentes de proteína bruta torna as dietas mais palatáveis, aumentam a digestibilidade de nutrientes e energia das dietas, e promovem maior formação de produtos de fermentação fecal em gatos.

CAPÍTULO II

Effects of increasing levels of spray dried hydrolysed chicken liver powder on palatability, digestibility, and the impact on intestinal fermentation of cats

Este capítulo é apresentado de acordo com as normas de publicação da
Journal of animal physiology and animal nutrition

Effects of increasing levels of spray dried hydrolysed chicken liver powder on palatability, digestibility, and the impact on intestinal fermentation of cats

Short Running Title

Spray dried hydrolysed chicken liver powder in diets for cats

Pamela Prestes Sezerotto¹, Caroline Fredrich Dourado Pinto¹, Ariane Miranda da Silva¹, Joyce Cristina Payva², Marcelino Bortolo³, Fábio Ritter Marx⁴, Ricardo de Souza Vasconcellos², Luciano Trevizan¹

¹Animal Science Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

²Animal Science Department, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

³Nutrisurance Division, Kemin Industries, Inc., Indaiatuba, Brazil

⁴Nutrisurance Division, Kemin Industries, Inc., Des Moines, IA, USA

Correspondence

Email: pamsezerotto@outlook.com

Acknowledgments

The authors are thankful for the financial support given by Brazilian governmental research support institution Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq and Nutribarrasul, Brazil, for making exclusively experimental diets.

Animal Welfare Statement

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to and the appropriate ethical review committee approval has been received. The authors confirm that they have followed EU standards for the protection of animals used for scientific purposes.

ABSTRACT – Protein hydrolysates, especially *spray dried* chicken liver powder hydrolysate (HCLP), is an alternative protein source to be used in diets for dogs and cats, as they have functional properties and are auxiliary in the treatment of pathologies. The objective of this study was to evaluate the effect of replacing traditional source of protein poultry byproduct meal (PBM) by HCLP added in increasing levels replacing the carbohydrate. Diets presented final concentrations of 24%, 32% and 40% of crude protein. Apparent total tract digestibility (ATTD), fermentation and palatability were evaluated in adult cats. Thirty-six 4-year-old adult cats, body weight 3.5 ± 4.0 kg, were assigned in a complete randomized block design to obtain 6 repetitions per treatment. The ATTD of fat was lower in HCLP 32% and control 32% protein treatments. The carbohydrate ATTD was lower in the 24% HCLP and 32% control treatments. There was a trend towards an increase in urinary pH in the HCLP 40% diet. The stools maintained adequate fecal score characteristics. Fecal DM was lower for cats that consumed hydrolyzed diets, containing higher water content, but without interfering with the fecal score. There were linear increases in fecal acetate, butyrate, isovalerate, valerate, 4-methyl valerate, SCFA and BCFA with hydrolyzed diets. Total isobutyrate, ammonia and BCFA increased with higher protein concentrations. For the collection periods, days 0 and 30, there were linear decreases for fecal pH, propionate and isobutyrate, and increases for butyrate, valerate, total BCFA and lactate. When the palatability of the diets was tested, the animal's preference was significant for the HCLP 40% diet, both in the first choice and in the intake ratio. The diet with 40% protein hydrolyzate was preferred by cats. The *spray dried* protein hydrolyzate was

preferred by cats and they were sensitive to inclusion levels, preferring higher levels. There was no change in fecal characteristics, but an increase in the levels of fatty acids important for the health and maintenance of the intestinal bacterial population, such as butyrate and valerate, was observed.

Key Words: protein; fecal characteristics; products of fermentation; butyric acid; valeric acid

INTRODUCTION

Most protein used in the diet comes from two sources: vegetable, grains and their by-products; and animal sources: meat industry by-products. Both sources can be used in their entirety or undergo a hydrolysis process.

Protein hydrolysates are essential for therapeutic diets for dogs and cats. The main use of hydrolysed protein is related to the management of food hypersensitivity or gastrointestinal disorders. Also, hydrolysed ingredients have been reported to be effective and well tolerated when administered as an ingredient in elimination diet for diagnosis of adverse food reactions in dogs (Loeffler *et al.*, 2004).

Low molecular weight protein is required in cats previously sensitive protein or with limited digestive capacity. Recently, HCLP is a novel source of protein and has been reported to be safe for inclusion in diets for dog, representing another source of hydrolysed protein evaluable (Pinto *et al.*, 2021).

Chicken by-product and poultry liver are edible sources of protein, and account for almost 4% of chicken body weight (Bowes & Julian, 1988) and are excellent sources of protein, fat minerals, vitamins, and energy (Kim, 2011).

According to the FEDIAF Guidelines (2021), adult cats require minimum dietary levels of 25% protein DM in practical diets. Thus, protein ingredients must present some important

characteristics such as: palatability, digestibility and amino acid composition, which refer to their biological value (Pond *et al.*, 1995). Liver as ingredient has several contributions regarding nutritional content. Also, additional benefits are present in hydrolysed ingredients sources that contains a favorable ratio of protein: ash, not common in animal protein sources (Cowell *et al.*, 2000). Therefore, the aim of this study was 1) to investigate the effect of replacing low ash poultry byproduct meal (PBM) with hydrolysed chicken liver powder spray dried (HCLP) included in increasing levels replacing carbohydrates to reach protein concentration of (24%, 32%, and 40%) and its effects on apparent total tract digestibility, fecal and urinary characteristics, fecal fermentation end products and palatability in adult cats.

MATERIAL AND METHODS

All procedures used in this study were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Universidade Estadual de Maringá, protocol number 1110190121.

Dietary treatments

Six experimental diets were formulated and extruded (model 2000, TNL Tecnal, Ourinhos, Brazil), replacing PBM by HCLP with three levels of inclusion of protein: 24, 32, and 40% of crude protein (CP) in the final diet. All the diets attended the minimal amount of essential nutrients on FEDIAF (2021), in spite of one level of CP which contains only 24%, viewing hypoallergenic diets, minimal amino acid needs were met. The experimental diets were characterized by source and level of CP included: Control 24%; Control 32%; Control 40% and HCLP 24%; HCLP 32%; HCLP 40% (Table 1). Diets submitted to palatability assay were coated with poultry fat only. No commercial palatability enhancer was added. Other evaluation was performed with diet coated with palatant enhancer and poultry fat after extrusion.

Digestibility assay

Animals. Thirty-six healthy adult cats, aged between 3 and 4 years old, body weight of 3.5 ± 4.0 kg, were distributed in a completely randomized block design, using 12 cats in each block. Cats were weekly weighed, until the end of the experimental period. Cats were washed in for fourteen days prior the experimental assay with a commercial diet (Special Dog Ultralife). Cats were socialized collectively with access to a solarium. During de digestibility assay, 10 days, they were housed in individual stainless steel metabolic cages (0.80 x 0.70 x 0.90 m), equipped with feeders, and drinking fountains, and feces, and urine collectors. Water was provided *ad libitum*. Except during digestibility cats in a colletive group and during the day each every 2 hours, cats were stimulated to interact with other housed cats, scratches, toys, brushing. Walk in the solarium were available all time long.

Digestibility protocol. Digestibility was carried out as a total fecal collection method. The assay was conducted as a completely randomized assay, with six diets and six cats per treatment. Cats were adapted to the diets for five days, then seven days for total collection of urine and faeces, then they remained in the same diets to complete 30 days. Feces were scored by a single trained person using the following system: 0 = watery liquid that can be poured, 1 = soft, unformed, 2 = soft, malformed stool that assumes the shape of its container, 3 = soft, formed, and moist stool that retains its shape, 4 = well-formed and consistent stool that does not adhere to the floor, and 5 = hard, dry pellets, which are small and hard masses (Carciofi *et al.*, 2008). After daily collection, feces were weighed and stored in a freezer at -20°C until analysis. Total urine collection was performed for three days and then stored in plastic bottles containing 1 g of thimol/100 mL of urine (Synth, Diadema, Brazil). Urinary total volume and pH (pH meter PH 0-14-Kasvi K39-2014, cidade e país) was measured daily.

Stools were thawed, homogenized, and dried in a forced-air oven at 55°C for 72h, according to the recommendations of the AOAC (1995). Feces and diets were ground through a 1 mm screen in a Wiley hammer mill and analyzed for dry matter (DM—AOAC 934.01), crude protein (CP—AOAC 954.01; model TE 036/2, Tecnal, Piracicaba, Brazil), acid hydrolysed fat (AOAC 954.02; model 170/3, Fanem, São Paulo, Brazil), crude fiber (CF—AOAC 962.10; model MA 450/8, Marconi, Piracicaba, Brazil), and ash (MM). Fecal and dietary gross energy (GE) were determined using isoperibolic bomb calorimetry (Calorimeter 6200 Isoperibol; Parr Instrument Company, Moline, United States). All analyses were performed in duplicate, assuming a coefficient of variation <0.01 for energy and <0.05 for the other analyses. Diets were analyzed for starch, according to Karkalas (1985), and gelatinization index of starch was calculated as:

$$\text{Gelatinization index} = \frac{(\text{total starch} - \text{resistant starch})}{(\text{total starch})} * 100$$

End products fermentation

Fermentation products. Samples were collected immediately after defecation on day 0 and 30. Ammonia concentration was determined in 5 g of feces, homogenized, and mixed with 15 mL of formic acid solution 16% (vo/vol). The extracts were thawed at room temperature, and 3 mL of each extract was diluted in 9 mL of distilled water and subjected to distillation in a nitrogen system (TECNAL TE-036/1 nitrogen still). The concentration of volatile fatty acids (VFA) was assessed in the same extracts prepared for ammonia. The extracts were centrifuged (9500RI refrigerated touch screen centrifuge) three times at 3.500 rpm for 15 min at ambient temperature, and one time at 14.000 rpm for 5 min at 4°C, then the supernatant was retained, and the pellet was discarded. The short-chain fatty acids (SCFA) and branched-chain fatty acids (BCFA) of the supernatant were determined by gas chromatography, performed on a Shimadzu chromatograph equipped with an FID detector, Split/splitless sample injection system, and fused silica capillary column (Select FAME, 30 m long, 0.32 mm internal diameter e 0.50 µm

thin filmo cyanopropyl aas stationary phase). Lactic acid was measured by mixing 3 g of feces with 9 mL of distilled water. Then, the samples were centrifuged 3 times at 4.000 rpm for 15 min. The supernatant was retained, and the pellet discarded. The extract was analyzed by spectrophotometry (SoftMax Pro 5 spectrophotometer, serial number: SMP500-15036-OQJR, California, United States of America), samples were quantified by comparing them with a standard curve for lactic acid. Fecal pH was determined with the same extracts prepared for lactic acid, using a pH meter (pH meter PH 0-14-Kasvi K39-2014, Piracicaba – SP, Brazil).

Statistical Analyses. Digestibility of nutrients and energy data, fecal and urinary results were tested for homogeneity of variances and normality of errors, and then analyzed using ANOVA and means compared by Tukey test ($P < 0.001$). Also, MANOVA was applied to the fermentation end products using R Core Team software (2021). Some variables underwent square root transformations and standardization $(x - \mu)/\sigma$, and outliers were removed to achieve the necessary assumptions. Means were submitted to canonical correlations to verify possible correlations between animal protein source and protein levels of dietary treatments.

Palatability assay

Animals. Twenty healthy adult cats, males and females, aged between 3 and 4 years, weighing 3.5 ± 4 kg, with a body condition score of 6 out of 9 points (Laflamme, 1997) were used in this assay. Cats were housed in a group, in a controlled room at 22°C, with access to a solarium during the day. They were challenged four times a day. For palatability assessment, cats were kept individually in to a stainless steel metabolic cages (0.80 x 0.70 x 0.90 m) while food was offered, so that the observations foods consumptions could occur. Water was provided *ad libitum*.

Palatability assessment. Palatability was determined using the preference (two-pan method) according to the methodology described by Griffin (2003). The diets were subjected to a

peroxide index analysis previously to the test. To ensure that there was no bias in the development of the test. The treatments assumed safe had up to 10 mEq/g peroxide index, as follows: HCLP 32%; HCLP 40%; Control 32%; Control 40%. The assay was conducted as an experimental completely randomized design, relying on the four experimental diets with six combinations, two by two, applied to 20 cats, resulting in 80 observations for each combination, once diets were tested four times to each cat a day. The palatability assay lasted eight days. During the test phase, 70 g of each two diets, were offered side by side, simultaneously, in identical feeders for 20 minutes. The feeders were alternated for every meal to eliminate any bias effect related to laterality. During this trial, first choice and intake ratio were observed. The first choice, when the cat just smelled the diet, was observed as the number of times that one of the diets was chosen first out of the total observations multiplied by 100. While the intake ratio is indicative of olfactory attractiveness, it was calculated by dividing the grams of a consumed diet by the total grams consumed from both diets, and is an indication of preference of taste, texture or both. At the end of the test, the leftovers were collected and weighted to determine the amount of each diet consumed.

Statistical analyses. The data underwent analysis of mean and standard deviation in Excel 2013 software and power test was applied using Jamovi software. Mean food intake ratio values greater than 0.7000 were considered significant, according to the statistical procedures of Pires *et al.* (2000).

RESULTS

Prior to formulation, ingredients were evaluated for macronutrients. After extrusion diets were re-evaluated and all nutrients were within the expected values (Table 1). In addition, all diets showed acceptable granulometry and a starch gelatinization index greater than 90%. Cats accepted well the experimental diets and all the offers were consumed without refusal.

DM consumption showed no significant difference for both source and level, A difference was noticed in CP according to the test ingredients replacement ($P = 0.0202$). The consumption of CP increased with increasing levels in the diets ($P = 0.0001$), however looking at the source, the control presented a higher consumption compared to the hydrolysed ($P = 0.0001$). As for fat, the most consumed was in the control diet ($P = 0.0001$) and as there was an increase in the inclusion of protein, its consumption was reduced ($P = 0.0001$). The non-nitrogen extractive had its highest consumption in the hydrolysed diet ($P = 0.0002$) and as the inclusion level was increased, its consumption was reduced ($P = 0.0001$). Ash consumption had a slight tendency to increase when higher levels of protein were included ($P = 0.0001$) (Table 2).

The apparent total tract digestibility coefficient (ATTD) of CP improved as protein was increased in the diet, thus, the highest digestibility was observed in diets containing 40% protein inclusion ($P = 0.0405$). The opposite was noticed with ATTD of non-nitrogen extract wich was replacing the protein content in the diet ($P = 0.0142$). Digestible energy, improved at higher protein levels inclusion ($P = 0.0262$) (Table 2).

The ATTD of CP, DM, OM and ash did not show interaction effect ($P < 0.05$). The HCLP diet showed lower ATTD of fat with increasing levels of protein ($P = 0.0458$) (Table 3). Non-nitrogen extractive and energy showed reduced digestibility in HCLP 32% diet, wich was in agreement with ME.

Protein sources and protein concentrations did not affect the number of defecations, urinary volume and weight gain ($P > 0.05$) (Table 4). However, the interaction between source and concentration influenced the fecal score ($P = 0.0518$), mainly due to the low value of the fecal score obtained by the HCLP 32% (Table 5), although it is still within acceptable characteristics. Urinary pH was influenced by source, protein concentration and the interaction between them, there was an increase in protein-rich diets and the HCLP diet acquired the highest pH (Table 5).

Cats that consumed the hydrolysed diets had a lower fecal DM when compared to the cats that consumed the control diets ($P = 0.0004$). There was a linear increase in fecal acetate, butyrate, isovalerate, valerate, 4-methyl valerate, heptanoic total VFA, SCFA and BCFA in cats fed the hydrolysed diets. Butyrate showed a decrease with protein inclusion ($P \leq 0.01$). The opposite happened with isobutyrate ($P = 0.007$), total BCFA ($P = 0.03$) and ammonia ($P = 0.0003$) were increased by protein inclusion (Table 6).

There was no significant difference in the interaction between source and level for fecal pH, fecal DM and fermentation end products (Table 7). But when observing the pre-experimental values compared to 30 days after treatments, there was a linear decrease on fecal pH, propionate and isobutyrate, and increases on butyrate, valerate, total BCFA and lactate (Table 8).

To carry out the palatability test, an analysis of the peroxide index was carried out in the experimental beds. The control diet containing final concentrations of 24% of crude protein presented more than 10 meq/kg of peroxide, therefore, as two experimental diets had final concentrations of 24% of crude protein, HCLP 24% and Control 24%, both were excluded from the study. palatability test. Prior to the palatability test cats were tested for handedness with a blank diet, which showed that the cats were well trained ($P = 0.0688$), which was considered the power of the test. Among all the contrasts performed, the power of the test was greater than 0.7000. HLCP diet was preferred to control diets, regardless of the level of protein added. Higher protein inclusions (40%) were more attractive and consumed by cats. The highest level of hydrolysed protein was the most preferred diet by cats as well (Table 9).

DISCUSSION

Ingredients that exhibit functional properties are being highly sought after in dog and cat nutrition. The replacement of proteins commonly used by hydrolysed proteins in the formulation of diets for cats has been increasing, since they have properties of clinical interest and also for general use. Diets containing protein hydrolysate have been reported to be effective

and well tolerated when administered as an elimination diet for the diagnosis of adverse food reactions in dogs (Loeffler *et al.*, 2004) as well for intestinal disorders in cats which compromises exocrine pancreas. In this study, we aimed to replace the protein source in the formulation and investigate increasing levels of protein in the diets over digestion and fermentation. We tested two protein sources, one of the most common sources of protein used in cat diet, PBM that was replaced by HCLP to increase the levels of CP (24%; 32%; 40%) in the diet, aiming at evaluate the effects on digestibility, palatability and fermentative end products in the gastrointestinal tract of cats.

Then palatability tested the inclusion of HCLP in diets containing 32 and 40% CP. The hydrolysed ingredient was noticeable superior in palatability than PBM used. The higher intake ratio for HCLP diets can be explained by the sensory properties that the hydrolysate has, which can also be considered as an additive, once improves palatability significantly (Chotikachinda *et al.*, 2013). Also, cats responded to the concentration of inclusion, that contributes to our conclusion. In a study with 63 dogs, fed a diet based on chicken hydrolysate, it was shown that palatability was reported as good or excellent for 48 dogs, poor for 10 dogs and reduced by only four dogs (Loeffler *et al.*, 2004). The presence of peptides and free amino acids is recognized as a way to increase food palatability. Furthermore, the pressure used to cook protein hydrolysates with carbohydrates favors caramelization reactions that add flavor to the ingredient.

The inclusion of a hydrolysed protein can not just improve the palatability of diets, but also interfere with consumption and digestibility. The digestibility of a protein hydrolysate is expected to be superior to a conventional protein source, once the amount of short peptides and free amino acids are greater in hydrolysates. According to Grimble (1987), peptides are more easily absorbed when compared to amino acids. Thus, hydrolysed protein is believed to be an ideal source of peptides and thus achieve maximum protein digestibility. What increased

protein consumption increased and the extractive was not added to nitrogen, in both protective sources, increasing the level of increase as the increase. Thus, as the hydrolysed diets showed greater palatability, but there was no interference of the protein source in consumption.

The hydrolysis of animal protein did not change the digestibility and there was no improvement in the fecal odor of cats. Additionally, protein hydrolysates generally have good palatability, promote the balance of the intestinal microbiota, modulate the activity of the immune system and have antioxidant characteristics (Gomes, 2020). After 8 months stored diets with 24% protein were less stable to oxidation, diets with 32% and 40% protein maintained peroxide under 10 mEq/kg, which was tolerated by cats during palatability assay, with no refusals.

The protein added in diets for cats can interfere with the fecal and urinary characteristics. There was a proportional increase in pH by increasing levels of protein in the diets. Also, HCLP is one of the factors involving the increase in urinary pH. Aware about it, we considered that healthy cats must have a urinary pH between 6.0 and 6.5, except after meals. Cats with urinary pH of 7.0 or higher are more likely to form struvite stones. Some dietary factors can determine urinary pH, mainly the mineral composition of the diets consumed by cats (Zentek & Schulz, 2004). These factors lead to the oxidation of sulfur amino acids and changes in the balance of anions and cations also occur (Allen & Kruger, 2000). Cats are considered restricted carnivores and thus the diets are predominantly composed of meat or products of animal origin, due to this they may present more acidic urine because the elimination of sulfate and phosphate salts is greater, on the other hand, those who have a diet rich in vegetables tend to present alkaline urine (Lanevski & Kramer, 1994). The analysis of the mineral balance, cations and anions, would lead to understand the effect on the urinary pH of cats, making it acidic or basic according to their inclusions in the diets.

For cats, future studies to analyze neutral diets may be beneficial, as based on the findings of Jeremias (2009), there are differences in excess base metabolism in diets between dogs and

cats. Cats that consumed diets with excess neutral base had urinary pH close to 6.47. As for dogs, it would be in the range of 5.85 (Gevaert *et al.* 1991).

Cats that consumed the hydrolysed diets presented episodes of softer faeces, however, this fact was linked to the stress of the experimental period and also individual characteristics of the selected animal. In a study of 46 dogs with suspected food hypersensitivity, fed for six to eight weeks, four dogs had soft stools that were already recurrent, 21 had gastrointestinal signs, and with the consumption of hydrolysed diet, improved fecal appearance (Loeffler *et al.*, 2004).

In addition, products of intestinal fermentation present in faeces were evaluated in cats. These compounds are investigated in animal nutrition in order to understand the functionalities of a particular ingredient and are strictly linked to the intestinal bacterial population. Short-chain fatty acids (SCFA), acetic, propionic and butyric acids, play an important role in animal nutrition and are produced in the intestine. In cats, volatile fatty acids important for the nutrition of intestinal cells, but they also act on the basal energy requirement (Brosey *et al.*, 2000). The use of hydrolyzate in diets for cats plays an important role in intestinal fermentation, resulting in higher levels of SCFA.

Bacterial fermentation of carbohydrates is considered an important part of intestinal nutrition, as some types of fiber, resistant starch, non-starch polysaccharides, stachyose and raffinose, as well as unabsorbed sugars become susceptible to this fermentation in the colon. (Drochner & Meyer, 1991). Bacterial fermentation is related to the intestinal health of cats and from these compounds results in the production of SCFA (NRC, 2006) and lactic acid, which can lead to a reduction in pH and modify the intestinal microbial composition and activity (Campbell & Fahey, 1997). SCFA stimulate the intestinal mucosa from the production and secretion of glucagon, thus improving the protective barrier of the intestine and exerting beneficial physiological effects.

Butyrate performs several important functions for the health of humans and animals, namely: supplying energy to intestinal cells, stimulating cell differentiation and multiplication, increasing the contact surface of intestinal microvilli, calcium absorption and pancreatic activity and secretions of digestive enzymes (Klurfeld, 1992; Howe *et al.*, 1992; Ausman, 1993; Neves, 2002; Slavin, 2004). The absorption of butyrate can thus provide an antidiarrheal effect, as its absorption is coupled with the reabsorption of sodium and water. In this study, there was a replacement of carbohydrate by protein, resulting in higher concentrations of this nutrient. The use of HCLP in diets for cats provided an increase in butyrate levels, but when added in higher concentrations led to a reduction in butyric acid. This can be a result of the substitution of nutrients, carbohydrate for protein, since the acid comes from the fermentation of carbohydrates. Another explanation for this fact is the tendency of lactic acid to increase with the use of HCLP, which is involved with intestinal bacteria, is also a result of carbohydrate fermentation in the colon (Fischer *et al.*, 2012) and also serves as a substrate for several bacteria, responsible for the production of propionate and butyrate (Moens *et al.*, 2019).

That is, as the protein ingredients are fermented, they result in products that are beneficial for the health of cats. The end products of fermentation are derived from the breakdown of proteins and carbohydrates. The latter are one of the main sources of food for intestinal bacteria, in which case the reduced availability of this substrate will affect the amount and types of fermentation end products, as well as the time the substrate will spend in the colon (Cummings *et al.*, 1992).

In addition to SCFA, other products are formed in intestinal fermentation, such as branched-chain fatty acids (BCFA), which involves valeric, isovaleric and isobutyric acid, as well as lactate, ammonia and biogenic amines. Ammonia and BCFAs are produced from undigestible amino acids that became free and evaluable for bacterial fermentation in the colon. BCFAs are derived from amino acids, isobutyric acid from valine (Nakae & Elliot, 1965). In one study,

where cats were fed raw meat, they had higher levels of fecal ammonia and BCFA due to reduced CP digestibility (Kerr *et al.* 2012). And these data are similar in wild cats fed high protein, noted by Vester (2010). In this study, the hydrolysate did not show an increase in ammonia concentrations, but showed a tendency to increase valerate and isovalerate.

Valeric acid originates from the amino acid leucine and isoleucine (Nakae & Elliot, 1965), is produced from carboxylic chain elongations (ACC), by acetate and propane, which are responsible for the donation of electrons from propanol, ethanol and lactic acid, respectively (Andersen *et al.*, 2015; Grootcholten *et al.*, 2013; Spirito *et al.*, 2014). In β reverse oxidation (BOR), propanol, ethanol and lactic acid serve as substrates for the process. At this time, the substrates are converted into acetic acid, producing energy in the form of adenosine triphosphate (ATP) and the other part is transformed into acetyl-CoA, responsible for promoting the elongation of propionic and valeric acid (Cavalcante *et al.*, 2016; Grootcholten *et al.*, 2013).

In this study, a tendency of increase in the concentrations of acetic and propionic acid was observed with the use of HCLP, these acids are entirely linked with the production of valeric acid. Even though the increase in acid concentrations was not statistically significant, it could explain the significant increase in valerate in cats that consumed HCLP diets. The levels of CP inclusion had the greatest influence on ammonia levels. The protein hydrolysate is more digestible, has a lower molecular weight, so its metabolism is less complex when compared to a conventional protein. Due to its structural characteristics, it remains less time in the gastrointestinal tract and does not suffer as much from the action of intestinal fermentation, but these characteristics do not prevent its fermentation and that this results in higher percentages of fermentative products, such as BCFA.

CONCLUSION

The HCLP proved to be more palatable than the PBM and cats are sensitive to inclusion concentration. Hydrolysed protein is well digestible as conventional protein. Protein digestibility improved as much protein concentration in diets, the opposite occurs with non-nitrogen extractive probably na effect of the endogenous contente that is less relevant when consumption of protein in increased. Hydrolysate protein increase the concentrations of short and branched chain fatty acids, the level of inclusion also influences fermentation. Diets promoted a greater production of branched-chain fatty acids after 30 days.

DISCLOSURE STATEMENT

Pamela Prestes Sezerotto, Caroline Fredrich Dourado Pinto, Ariane Miranda da Silva, Joyce Cristina Payva, Marcelino Bortolo, Fábio Ritter Marx, Ricardo de Souza Vasconcellos and Luciano Trevizan had no conflicts of interest.

FUNDING

This study was supported by the Brazilian governmental research support institution Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (grant no. 127071) and Kemin Nutrisurance, the pet food and rendering technologies division of Kemin Industries

RREFERENCES

Andersen, S. J. *et al.* (2015). Biotechnology for Biofuels Electrolytic extraction drives volatile fatty acid chain elongation through lactic acid and replaces chemical pH control in thin stillage fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, p. 1–14. doi: 10.1186/s13068-015-0396-7

Allen, T. A.; Kruger, J. M. (2000). Enfermedad felina de las vias urinarias. *Nutrición clinica en pequeños animales*, v. 4, p. 811-845.

AOAC. (1995). Official methods of analysis. 15th ed. Arlington VA: Association of Official Analytical Chemist.

Ausman, L. M. (1993). Fiber and colon cancer: does the current evidence justify a preventive policy?. **Nutrition Reviews Washington**, v. 51, p. 57-57.

Bhaskar, N. *et al.* (2007). Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource technology**, 98, 2, 388-394. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.017>

Brosey, B. P., *et al.* (2000). Gastrointestinal volatile fatty acid concentrations and pH in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 61, 359-361. doi:

<https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.359>

Bowes, V. A., Julian, R. J. (1988). Organ weights of normal broiler chickens and those dying of sudden death syndrome. *Can Vet J* 29:153–156.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1680696/>

Campbell, J. M., *et al.* (1997). Psyllium and methylcellulose fermentation properties in relation to insoluble and soluble fiber standards. **Nutrition Research**, v. 17, p. 619-629. doi:

[https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(97\)00034-1](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(97)00034-1)

Carciofi, A. C., *et al.* (2008). Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and postprandial glucose and insulin response. *Journal of Animal Physiology and Animal*

Nutrition. v. 98, p. 326–336. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00794.x>

Cavalcante, W. DE A. *et al.* (2017). Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 106-119. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.024>

Chotikachinda, R. *et al* (2013). *Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (Katsuwonus pelamis) viscera as feeding attractants for Asian seabass (Lates niloticus)*. *Aquaculture Nutrition*, 19, 773-784. doi: <https://doi.org/10.1111/anu.12024>

Chung, W. S. F. *et al* (2017). Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. *FEMS microbiology ecology*, 93, fix127. doi: <https://doi.org/10.1093/femsec/fix127>

Cowell, C.S., *et al*. (2000). Making commercial pet foods. *In*: Hand, M.S.; Thatcher, C.D.; Remillard, R.L. *et al*. (Eds.). *Small animal clinical nutrition*. Kansas: Mark Morris Institute, p.127-146.

Cummings, J. H. *et al* (1992). Fecal weight, colon cancer risk, and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber). *Gastroenterology*, 103, 1783-1789. doi: [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)91435-7](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)91435-7)

Drochner, W.; Meyer, H. (1991). Digestion of organic matter in the large intestine of ruminants, horses, pigs and dogs. *Advances in Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 22, p. 18-40. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DE91A0553>

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. doi: <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4334>

Gevaert, D. M., *et al* (1991). Effect of macromineral composition of diets on blood acid-base equilibrium and urinary acidity in dogs. *The Journal of Nutrition*, 121, S93-S94. doi:

https://doi.org/10.1093/jn/121.suppl_11.S93

Gomes, J. R. (2020). Hidrolisado proteico de fígado de aves como aditivo em dietas para tilápia do Nilo. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

Recovered from:

<https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/28222/1/texto%20completo.pdf>.

Griffin, R. (2003). *Palatability testing methods: parameters and analyses that influence test conditions*. In: Kvamme JL, Phillips TD, editors. *Petfood technology*. Mt. Morris, Illinois: Wyatt Publishing Co.; p. 187–193.

Grimble, G. K., *et al* (1987). Effect of peptide chain length on absorption of egg protein hydrolysates in the normal human jejunum. *Gastroenterology*, 92, 136-142. doi:

[https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)90850-X](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)90850-X)

Grootscholten, T. I. M. *et al*. (2013). High rate heptanoate production from propionate and ethanol using chain elongation. *Bioresource Technology*, v. 136, p. 715–718. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.085>

Holscher, H. D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut microbes*, 8, 172-184. doi: <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>

Howe, G. R. et al. (1992). Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, v. 84, n. 24, p. 1887-1896. doi:

<https://doi.org/10.1093/jnci/84.24.1887>

Jeremias, J. T. (2009). Relação entre o excesso de bases do alimento e o PH urinário de gatos. 2009. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP. Recovered from:

https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/89229/jeremias_jt_me_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Kerr, K. R., et al (2012). Apparent total tract energy and macronutrient digestibility and fecal fermentative end-product concentrations of domestic cats fed extruded, raw beef-based, and cooked beef-based diets. *Journal of animal science*, 90, 515-522. doi:

<https://doi.org/10.2527/jas.2010-3266>

Kim, Y. N. *Vitamins*. (2011). In: LEO M. L. N., FIDEL T. (eds) Handbook of analysis of edible animal by-products. Boca Raton: CRC Press. p. 161–182.

Klurfeld, D.M. (1992). Dietary Fiber-Mediated Mechanisms in Carcinogenesis. **Cancer Research**. v. 52, p. 2055s-2059s.

Laflamme, D. (1997). Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. *Canine Pract*. 22:10–15.

Lanevski, A., Kramer, J. W. (1994). Los componentes del análisis de orina. *Whaltam Focus*, 4, 21-29.

Loefler, A., *et al.* (2004). Dietary trials with a commercial chicken hydrolysate diet in 63 pruritic dogs. *Veterinary Record*, 154, 519-522. doi: <https://doi.org/10.1136/vr.154.17.519>

Moens, F. *et al.* (2019) A four-strain probiotic exerts positive immunomodulatory effects by enhancing colonic butyrate production in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, 555, 1-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.020>

Nakae, T.; Elliott, J. A. (1965). Production of volatile fatty acids by some lactic acid bacteria. II. Selective formation of volatile fattyacids by degradation of amino acids. *Journal of Dairy Science*, 48, 293-299. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(65\)88219-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(65)88219-4)

National Research Council (NRC). (2006). *Nutrient requirements of dogs and cats*. Washington, D.C: National Academy of Science, National Academy Press, p. 398.

Neves, F. J. (2002). *Mortalidade por câncer de colon e reto e perfil de consumo alimentar em capitais brasileiras*. 2002. Dissertação (Mestrado). Recovered from: [https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/4985/2/ve_Fabr%
c3%adcia_Junqueira_ENSP_2002pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/4985/2/ve_Fabr%c3%adcia_Junqueira_ENSP_2002pdf) (Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, São Paulo).

Pinto, C. F. D., *et al.* (2021). Characterisation of spray dried hydrolysed chicken liver powder: effects on palatability and digestibility when included as single source of animal protein in

dog diets. *Italian Journal of Animal Science*. 20:1, 2086-2094. doi:

<https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1993091>

Pond, W.G. *et al.* *Basic animal nutrition and feeding*. (1995). 4 ed., John Wiley, New York, p. 531.

Rivière, A. *et al* (2016). Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in microbiology*, 7, 979. doi:

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>

Slavin, J. (2004). Whole grains and human health. *Nutrition research reviews*, v. 17, n. 1, p. 99-110. doi: 10.1079/NRR200374

Spirito, C. M. *et al.* (2014). Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 27, p. 115–122. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.003>

The European Pet Food Industry Federation (FEDIAF). (2021). *Diretrizes Nutricionais para alimentos completos e complementares para cães e gatos*. p. 92. Recovered from:

http://cbna.com.br/arquivos/FEDIAF_PT-ok-v4.pdf

Vester, B. M., *et al.* (2010). Influence of feeding raw or extruded feline diets on nutrient digestibility and nitrogen metabolism of African wildcats (*Felis lybica*). *Zoo biology*, 29, 676-

686. doi: <https://doi.org/10.1002/zoo.20305>

Zentek, J., & Schulz, A. (2004). Urinary composition of cats is affected by the source of dietary protein. *The Journal of nutrition*, 134, 2162S-2165S. doi:

<https://doi.org/10.1093/jn/134.8.2162S>

TABLES

Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets.

Ingredients, g/kg	Treatments ¹					
	Control 24%	Control 33%	Control 40%	HCLP 24%	HCLP 32%	HCLP 40%
Brewers rice	54.36	44.39	34.12	52.0	41.73	29.95
HCLP ²	-	-	-	14.43	21.89	30.99
Poultry byproduct meal	12.5	20.33	28.73	-	-	-
Maize gluten meal	11.64	15.87	19.99	11.64	15.87	19.99
Blood plasma	1.95	2.66	3.38	1.95	2.66	3.38
Sugarcane fiber	3.2	3.11	3.0	3.65	3.80	4.0
Salt	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Premix mineral/vitamin ³	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Indicator ⁴	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
Limestone	0.08	-	-	1.53	2.11	2.41
Dicalcium phosphate	2.05	1.14	0.08	1.56	0.65	0.16
Choline chloride	0.32	0.25	0.16	0.47	0.48	0.5

Potassium chloride	0.65	0.55	0.46	0.55	0.42	0.27
Phosphoric acid	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Added by coating after extrusion, g/kg						
Poultry fat	9.87	8.33	6.69	8.85	7.02	4.98
Palatant enhancer ⁵	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Analyzed chemical composition, % DM basis						
Dry matter	93.6	92.6	93.6	92.5	93.3	93.5
Crude protein	24.2	32.6	41.1	25.2	31.5	39.3
Acid-Hydrolysed fat	13.4	13.8	12.3	13.0	11.9	13.2
Crude fiber	10.2	7.83	9.04	5.80	9.88	6.15
Nitrogen-free extract	55.9	47.7	39.8	55.3	50.6	40.8
Ash	6.50	5.91	6.85	6.45	6.05	6.79
Starch	47.7	37.9	31.0	44.5	39.2	30.4
Gelatinization index of starch	92.7	99.0	90.7	97.6	93.3	91.7
Gross energy, kcal/kg	4243	3914	3529	4255	4359	4074

DGM, μm	339	399	378	348	324	300
--------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

¹HCLP 22%—diet based on HCLP with 22% of protein; HCLP 30%—diet based on HCLP with 30% of protein; HCLP 38%—diet based on HCLP with 38% of protein; Control 22%—diet based on PBM with 22% of protein; Control 30%—diet based on PBM with 30% of protein; Control 38%—diet based on PBM with 38% of protein.

²HCLP, *Spray dried* chicken liver powder hydrolysate.

³Premix mineral/vitamin (supplied per kilogram of diet): vitamin A (10,800U), vitamin D3 (980 U), vitamin E (60 mg), vitamin K3 (4.8 mg), vitamin B1 (8.1 mg), vitamin B2 (6.0 mg), vitamin B6 (6.0 mg), 12 vitamin (30 mcg), pantothenic acid (12 mg), niacin (60 mg), folic acid (0.8 mg), biotin (0.084 mg), manganese (7.5 mg), zinc (100 mg), iron (35 mg), copper (7.0 mg), cobalt (10 mg), iodine (1.5 mg), selenium (0.36 mg), choline (2.400 mg), taurine (100 mg), and, antioxidant BHT (150 mg).

⁴Titanium and chromium oxide mixed as 0.25% and 0.23%, respectively.

⁵DTECH 8L, S.P.F. Argentina S.A., Argentina.

Table 2. Difference between source protein and levels under nutrient intake, total tract apparent digestibility coefficient and metabolizable energy of cats fed diets containing different protein sources and levels (mean \pm mean standard error).

Item	Source of protein ¹			Levels ²			
	Control	HCLP	<i>p</i> -value	24%	32%	40%	<i>p</i> -value
Nutrient intake, g/kg BW ^{0.67} /day							
Dry matter	17.7 \pm 0.15 ^a	17.6 \pm 0.15 ^b	0.0333	17.6 \pm 0.17 ^{ab}	17.6 \pm 0.12 ^b	17.7 \pm 0.12 ^a	0.0202
Crude protein	5.78 \pm 1.28 ^a	5.64 \pm 1.11 ^b	0.0001	4.35 \pm 0.08 ^c	5.66 \pm 0.09 ^b	7.12 \pm 0.21 ^a	0.0001
Acid-hydrolysed fat	2.33 \pm 0.09 ^a	2.25 \pm 0.09 ^b	0.0001	2.33 \pm 0.05 ^a	2.29 \pm 0.16 ^b	2.26 \pm 0.07 ^c	0.0001
Nitrogen-free extract	8.46 \pm 1.17 ^b	8.57 \pm 1.15 ^a	0.0002	9.80 \pm 0.12 ^a	8.61 \pm 0.29 ^b	7.14 \pm 0.04 ^c	0.0001
Ash	1.13 \pm 0.07	1.14 \pm 0.05	0.1203	1.14 \pm 0.01 ^b	1.05 \pm 0.01 ^c	1.21 \pm 0.01 ^a	0.0001
Apparent total tract digestibility, %							
Natural matter	62.1 \pm 9.96	56.6 \pm 12.5	0.1051	60.9 \pm 10.8	61.7 \pm 11.7	56.3 \pm 12.0	0.4756
Dry matter	84.3 \pm 2.93	83.6 \pm 4.01	0.4838	84.3 \pm 3.57	84.3 \pm 3.45	83.3 \pm 3.52	0.7477
Organic matter	87.2 \pm 2.72	86.7 \pm 3.56	0.5381	87.3 \pm 3.30	87.4 \pm 3.11	86.3 \pm 3.06	0.6648
Crude protein	85.4 \pm 3.89	85.9 \pm 3.93	0.7236	83.7 \pm 4.37 ^b	86.0 \pm 3.21 ^{ab}	87.4 \pm 3.11 ^a	0.0405

Acid-hydrolysed fat	93.3±1.48	93.7±2.48	0.5704	94.1±1.64	93.9±1.27	92.5±2.50	0.0693
Crude fiber	-8.51±37.8 ^b	14.0±25.8 ^a	0.0387	18.9±33.1 ^a	3.76±36.9 ^{ab}	-16.1±25.0 ^b	0.0215
Nitrogen-free extract	86.4±3.31	85.0±4.42	0.1900	87.3±3.42 ^a	86.6±3.71 ^{ab}	83.4±3.56 ^b	0.0142
Ash	40.8±9.12	38.5±13.6	0.4775	40.2±11.0	36.1±11.3	42.2±11.7	0.3132
DE, kcal/kg	4489±199	4422±196	0.1456	4367±175 ^b	4478±210 ^{ab}	4530±190 ^a	0.0262
Metabolisable energy, kcal/kg	4248±159	4185±191	0.1428	4189±164	4240±199	4228±178	0.7207

¹HCLP - diet based on HCLP; Control - diet based on PBM.

² Levels of protein inclusion in experimental diets

^{a,b,c} Means in the same row with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3. Nutrient intake, coefficient of total tract apparent digestibility and metabolizable energy of cats fed diets containing different sources and levels of protein (mean \pm standard error of the mean).

Item	Treatments ¹						<i>p</i> -value
	Control 24%	Control 33%	Control 40%	HCLP 24%	HCLP 32%	HCLP 40%	
Nutrient intake, g/kg BW ^{0.67} /day							
Dry matter	17.7 \pm 0.06	17.6 \pm 0.13	17.9 \pm 0.05	17.0 \pm 0.22	17.5 \pm 0.43	17.6 \pm 0.04	0.0104
Crude protein	4.27 \pm 0.01 ^f	5.73 \pm 0.04 ^c	7.33 \pm 0.02 ^a	4.43 \pm 0.05 ^e	5.50 \pm 0.13 ^d	6.92 \pm 0.01 ^b	0.0001
Acid-hydrolysed fat	2.37 \pm 0.009 ^{ab}	2.41 \pm 0.01 ^a	2.19 \pm 0.006 ^d	2.28 \pm 0.02 ^c	2.08 \pm 0.05 ^e	2.33 \pm 0.006 ^b	0.0001
Nitrogen-free extract	9.89 \pm 0.03 ^a	8.38 \pm 0.06 ^c	7.10 \pm 0.02 ^d	9.71 \pm 0.12 ^a	8.85 \pm 0.21 ^b	7.18 \pm 0.01 ^d	0.0001
Ash	1.15 \pm 0.004 ^c	1.03 \pm 0.008 ^d	1.22 \pm 0.003 ^a	1.13 \pm 0.01 ^c	1.05 \pm 0.02 ^d	1.19 \pm 0.003 ^b	0.0001
Apparent total tract digestibility, %							
Natural matter	58.6 \pm 11.3 ^{ab}	67.0 \pm 8.77 ^a	60.9 \pm 9.29 ^{ab}	63.3 \pm 10.8 ^{ab}	44.0 \pm 17.9 ^b	51.9 \pm 13.5 ^{ab}	0.0892
Dry matter	83.5 \pm 3.45	85.5 \pm 3.29	83.9 \pm 1.95	85.2 \pm 3.82	81.2 \pm 3.42	82.8 \pm 4.77	0.2165
Organic matter	86.5 \pm 3.55	88.5 \pm 2.64	86.9 \pm 1.71	88.2 \pm 3.11	84.3 \pm 3.59	85.9 \pm 4.15	0.1792
Crude protein	82.2 \pm 4.45	86.8 \pm 3.00	87.5 \pm 1.59	85.3 \pm 4.03	84.2 \pm 3.01	87.3 \pm 4.34	0.1907

Acid-hydrolysed fat	93.0±1.32 ^{ab}	93.7±1.40 ^{ab}	93.3±1.87 ^{ab}	95.2±1.17 ^a	94.3±1.07 ^{ab}	91.8±2.99 ^b	0.0563
Crude fiber	3.02±37.0 ^{ab}	0.81±47.1 ^{ab}	-29.3±22.3 ^b	34.9±20.9 ^a	13.2±16.3 ^{ab}	-2.86±21.5 ^{ab}	0.5056
Nitrogen-free extract	86.9±3.83 ^{ab}	88.2±2.92 ^a	84.2±2.14 ^{ab}	87.9±3.21 ^a	82.0±4.89 ^b	82.7±4.67 ^{ab}	0.1750
Ash	40.0±3.65	38.0±14.1	44.3±6.82	40.5±15.9	33.2±4.86	40.1±15.8	0.7530
DE	4266±150 ^{bc}	4607±123 ^a	4593±93.5 ^a	4468±141 ^{ab}	4224±153 ^c	4467±247 ^{ab}	0.0004
Metabolisable energy, kcal/kg	4095±142 ^{bc}	4363±115 ^a	4284±88.7 ^{ab}	4283±133 ^{ab}	3996±145 ^c	4172±233 ^{abc}	0.0003

¹HCLP 22%—diet based on HCLP with 22% of protein; HCLP 30%—diet based on HCLP with 30% of protein; HCLP 38%—diet based on HCLP with 38% of protein; Control 22%—diet based on PBM with 22% of protein; Control 30%—diet based on PBM with 30% of protein; Control 38%—diet based on PBM with 38% of protein.

^{a,b,c,d,e,f}Means in the same row with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4. Difference between source protein and levels under fecal and urinary characteristics, and weight gain of cats fed diets containing different sources and levels of protein (mean \pm standard error of the mean).

Item	Treatments ¹			Levels ²			
	Control	HCLP	<i>p</i> -value	24%	32%	40%	<i>p</i> -value
Fecal characteristics							
Fecal score ³	3.50 \pm 0.56	3.12 \pm 0.59	0.0518	3.33 \pm 0.61	3.35 \pm 0.62	3.29 \pm 0.62	0.9817
Number of defecations ⁴	4.88 \pm 1.36	5.31 \pm 1.44	0.3837	5.00 \pm 1.41	4.80 \pm 1.47	5.41 \pm 1.37	0.6472
Urinary characteristics							
Volume, ml/d	249 \pm 115	253 \pm 121	0.9495	253 \pm 126	229 \pm 94.9	268 \pm 128	0.7601
Urine pH	6.32 \pm 0.18 ^b	6.67 \pm 0.36 ^a	0.0001	6.28 \pm 0.19 ^b	6.56 \pm 0.47 ^a	6.63 \pm 0.19 ^a	0.0010
Weight gain, kg	-0.06 \pm 0.15	-0.08 \pm 0.09	0.6659	-0.07 \pm 0.09	-0.11 \pm 0.17	-0.03 \pm 0.09	0.4522

¹HCLP - diet based on HCLP; Control - diet based on PBM.

² Levels of protein inclusion in experimental diets

³Scored as follows: 0 = watery liquid that can be poured, 1 = soft, unformed, 2 = soft, malformed stool that assumes the shape of its container, 3 = soft, formed, and moist stool that retains its shape, 4 = well-formed and consistent stool that does not adhere to the floor, and 5 = hard, dry pellets, which are small and hard masses.

⁴During 7 days.

^{a,b,c}Means in the same row with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 5. Fecal and urinary characteristics, and weight gain of cats fed diets containing different sources and levels of protein (mean \pm standard error of the mean).

Item	Treatments ¹						<i>p</i> -value
	Control 24%	Control 33%	Control 40%	HCLP 24%	HCLP 32%	HCLP 40%	
Fecal characteristics							
Fecal score ²	3.25 \pm 0.75 ^{ab}	3.66 \pm 0.40 ^a	3.58 \pm 0.49 ^a	3.41 \pm 0.49 ^{ab}	2.50 \pm 0.77 ^b	3.0 \pm 0.63 ^{ab}	0.1018
Number of defecations ³	5.16 \pm 1.47	4.66 \pm 1.36	4.83 \pm 1.47	4.83 \pm 1.47	5.50 \pm 1.60	6.00 \pm 1.10	0.4574
Urinary characteristics							
Volume, ml/d	265 \pm 111	246 \pm 87.1	236 \pm 156	240 \pm 149	193 \pm 96.0	299 \pm 95.4	0.5541
Urine pH	6.20 \pm 0.14 ^c	6.28 \pm 0.17 ^{bc}	6.48 \pm 0.12 ^{abc}	6.35 \pm 0.22 ^{abc}	6.73 \pm 0.57 ^{ab}	6.79 \pm 0.10 ^a	0.0312
Weight gain, kg	-0.05 \pm 0.06	-0.10 \pm 0.23	-0.03 \pm 0.12	-0.09 \pm 0.11	-0.11 \pm 0.05	-0.04 \pm 0.07	0.9643

¹HCLP 22%—diet based on HCLP with 22% of protein; HCLP 30%—diet based on HCLP with 30% of protein; HCLP 38%—diet based on HCLP with 38% of protein; Control 22%—diet based on PBM with 22% of protein; Control 30%—diet based on PBM with 30% of protein; Control 38%—diet based on PBM with 38% of protein.

²Scored as follows: 0 = watery liquid that can be poured, 1 = soft, unformed, 2 = soft, malformed stool that assumes the shape of its container, 3 = soft, formed, and moist stool that retains its shape, 4 = well-formed and consistent stool that does not adhere to the floor, and 5 = hard, dry pellets, which are small and hard masses.

³During 7 days.

^{a,b,c}Means in the same row with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 6. Difference between source protein and levels under fecal pH, dry matter, volatile fatty acids (mMol/g of dry matter), ammonia (mMol NH₃/kg fecal DM) and lactic acid concentration (mMol/kg of dry matter) on the feces of dogs fed diets containing different sources and levels of protein (mean \pm standard error of the mean).

Item	Treatments ¹			Levels ²			
	Control	HCLP	<i>p</i> -value	24%	32%	40%	<i>p</i> -value
Fecal pH	5.91 \pm 0.50	5.87 \pm 0.39	0.8306	5.77 \pm 0.43	5.92 \pm 0.46	5.99 \pm 0.45	0.1576
Fecal DM, %	39.6 \pm 4.99 ^a	35.7 \pm 3.96 ^b	0.0004	37.9 \pm 4.15	38.9 \pm 4.10	36.7 \pm 6.11	0.3889
Acetic acid, mMol/g DM	651 \pm 225 ^b	804 \pm 386 ^a	0.0501	715 \pm 249	673 \pm 288	774 \pm 399	0.5099
Propionic acid, mMol/g DM	155 \pm 70.5	190 \pm 130	0.1314	158 \pm 87.5	156 \pm 78.8	198 \pm 132	0.1944
Butyric acid, mMol/g DM	169 \pm 136 ^b	277 \pm 225 ^a	0.0011	279 \pm 232 ^a	207 \pm 168 ^{ab}	170 \pm 146 ^b	0.0169
Isobutyric acid, mMol/g DM	34.9 \pm 12.3	36.8 \pm 16.6	0.6112	33.1 \pm 14.9 ^b	31.8 \pm 8.88 ^b	41.9 \pm 16.0 ^a	0.0079
Isovaleric acid, mMol/g DM	28.7 \pm 7.68 ^b	38.6 \pm 29.9 ^a	0.0472	28.1 \pm 5.76	30.0 \pm 8.06	28.1 \pm 5.76	0.0657
Valeric acid, mMol/g DM	58.6 \pm 25.1 ^b	84.1 \pm 50.6 ^a	0.0020	62.4 \pm 29.0	73.3 \pm 43.5	76.5 \pm 48.7	0.2584

4 methyl valeric, mMol/g DM	2.93±0.66 ^b	4.16±2.92 ^a	0.0103	3.26±0.77	3.01±0.67	4.17±3.40	0.1614
Heptanoic, mMol/g DM	14.1±1.90 ^b	16.0±2.36 ^a	0.0004	15.0±1.61	14.3±2.17	15.6±2.86	0.1940
Total VFA ³	1125±345 ^b	1468±595 ^a	0.0035	1312±405	1200±457	1332±631	0.6340
Total SCFA ⁴	976±326 ^b	1272±556 ^a	0.0083	1153±383	1036±424	1143±583	0.6461
Total BCFA ⁵	125±32.6 ^b	163±75.0 ^a	0.0023	126±33.5 ^b	138±52.2 ^{ab}	164±78.5 ^a	0.0336
Ammonia, mMol NH ₃ /kg fecal DM	125±43.2	131±48.6	0.5521	103±34.1 ^b	126±32.6 ^{ab}	154±51.4 ^a	0.0003
Lactic acid, mMol/kg DM	0.66±0.80	0.72±0.66	0.6651	0.79±0.87	0.60±0.74	0.66±0.59	0.6685

¹HCLP - diet based on HCLP; Control - diet based on PBM.

² Levels of protein inclusion in experimental diets

³VFA, volatile fatty acids.

⁴SCFA, short-chain fatty acids.

⁵BCFA, branched-chain fatty acids.

^{a,b,c}Means in the same row with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 7. Fecal pH, dry matter, volatile fatty acids (mMol/g of dry matter), ammonia (mMol NH₃/kg dry matter) and lactic acid concentration (mMol/kg of dry matter) on the feces of dogs fed diets containing different sources and levels of protein (mean ± standard error of the mean).

Item	Treatments ¹						Protein source*level
	Control 24%	Control 33%	Control 40%	HCLP 24%	HCLP 32%	HCLP 40%	
Fecal pH							
Day 0	5.98±0.14	6.20±0.40	5.86±0.52	6.19±0.43	6.03±0.36	5.86±0.29	0.2637
Day 30	5.38±0.33	5.76±0.47	6.31±0.59	5.56±0.25	5.66±0.51	5.96±0.30	
Fecal DM, %							
Day 0	38.2±5.60	41.3±3.07	39.6±6.37	37.7±2.86	35.4±3.05	33.9±5.15	0.0668
Day 30	38.2±5.60	41.3±3.07	39.6±6.37	37.7±2.86	35.4±3.05	33.9±5.15	
Acetic acid, mMol/g DM							
Day 0	733±233	622±223	652±250	718±240	821±543	997±556	0.2053
Day 30	716±249	581±103	608±305	696±334	739±273	841±394	
Propionic acid, mMol/g DM							
Day 0	194±50.1	169±63.8	164±60.5	217±70.8	231±119	286±194	0.1557

Day 30	134±111	124±42.4	147±81.6	88.0±56.1	111±52.9	197±140	
Butyric acid, mMol/g DM							
Day 0	94.8±26.5	76.2±24.9	88.1±35.1	88.4±24.0	120±98.5	128±41.7	0.5447
Day 30	405±155	222±64.5	129±52.9	531±207	469±162	338±217	
Isobutyric acid, mMol/g DM							
Day 0	41.8±13.3	33.7±6.84	45.6±20.8	38.6	35.3±17.5	52.1±17.6	0.4498
Day 30	27.5±6.72	28.7±2.74	32.7±6.64	24.7±5.77	30.1±7.48	37.5±11.8	
Isovaleric acid, mMol/g DM							
Day 0	28.2±4.39	24.7±6.13	27.4±8.56	28.8±4.02	28.3±7.72	34.5±8.64	0.3451
Day 30	25.6±7.57	30.3±6.15	36.5±8.86	30.0±6.92	39.5±6.76	67.6±63.5	
Valeric acid, mMol/g DM							
Day 0	48.7±12.4	37.9±14.6	46.3±15.3	46.2±11.7	52.9±23.4	66.6±20.0	0.0840
Day 30	73.3±31.2	82.9±27.7	62.9±16.6	81.6±38.7	133±43.4	130±71.3	
Total VFA ²							
Day 0	1161±309	981±292	1042±370	1157±347	1310±810	1591±802	0.1162

Day 30	1424±360	1101±172	1040±456	1507±543	1571±403	1656±663	
Total SCFA ³							
Day 0	1022±299	867±290	904±338	1024±321	1172±759	1410±780	0.1709
Day 30	1254±337	928±165	883±434	1315±534	1319±412	1376±594	
Total BCFA ⁴							
Day 0	122±25.8	98.7±21.2	122±39.3	116±35.7	120±48.5	159±44.0	0.0568
Day 30	130±37.0	145±32.3	135±30.4	140±38.7	206±51.5	240±118	
Ammonia, mMol NH ₃ /kg DM							
Day 0	114±15.2	127±43.9	131±47.6	138±35.1	134±36.3	142±48.9	0.8435
Day 30	78.8±24.3	124±21.4	177±39.6	81.3±20.2	124±36.8	166±65.9	
Lactic acid, mMol/kg DM							
Day 0	0.30±0.15	0.89±1.32	0.25±0.10	0.48±0.36	0.14±0.17	0.51±0.49	0.1571
Day 30	1.35±1.28	0.58±0.21	0.60±0.36	1.06±0.95	0.65±0.25	1.31±0.71	

¹HCLP 22%—diet based on HCLP with 22% of protein; HCLP 30%—diet based on HCLP with 30% of protein; HCLP 38%—diet based on HCLP with 38% of protein; Control 22%—diet based on PBM with 22% of protein; Control 30%—diet based on PBM with 30% of protein; Control 38%—diet based on PBM with 38% of protein.

²VFA, volatile fatty acids.

³SCFA, short-chain fatty acids.

⁴BCFA, branched-chain fatty acids.

^{a,b,c}Means in the same row with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 8. Difference between day 0 and day 30 under fecal pH, dry matter, volatile fatty acids (mMol/g of dry matter), ammonia (mMol NH₃/kg fecal DM) and lactic acid concentration (mMol/kg of dry matter) on the feces of dogs fed diets containing different sources and levels of protein (mean ± standard error of the mean).

Item	Period ¹		
	Day 0	Day 30	<i>p</i> -value
Fecal pH	6.01±0.37 ^a	5.77±0.49 ^b	0.0168
Fecal DM, %	37.8±4.96	37.8±4.96	1.0000
Acetic acid, mMol/g DM	753±352	694±283	0.4103
Propionic acid, mMol/g DM	208±105 ^a	134±89.6 ^b	0.0010
Butyric acid, mMol/g DM	98.0±44.2 ^b	342±201 ^a	0.0001
Isobutyric acid, mMol/g DM	41.5±17.1 ^a	30.2±7.99 ^b	0.0002
Isovaleric acid, mMol/g DM	28.6±6.93	38.1±29.3	0.0569
Valeric acid, mMol/g DM	49.5±17.4 ^b	91.6±46.8 ^a	0.0001

4 methyl valeric, mMol/g DM	3.42±2.79	3.59±1.20	0.7305
Heptanoic, mMol/g DM	14.6±2.22	15.4±2.35	0.1160
Total VFA ²	1200±516	1372±488	0.1181
Total SCFA ³	1060±489	1171±450	0.2869
Total BCFA ⁴	123±38.1 ^b	163±69.8 ^a	0.0010
Ammonia, mMol NH ₃ /kg fecal DM	130±37.8	125±52.7	0.5757
Lactic acid, mMol/kg DM	0.44±0.62 ^b	0.94±0.77 ^a	0.0046

¹Period, day 0 - period leading up to the start of the study where the animals were receiving a commercial diet; day 30 - end of the experimental period where the animals consumed the experimental diets.

²VFA, volatile fatty acids.

³SCFA, short-chain fatty acids.

⁴BCFA, branched-chain fatty acids.

^{a,b,c}Means in the same row with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 9. Test power according to the intake ratio of the diets used in the palatability test.

Challenge	Number of animals	Feed A	Feed B	Smell	Taste	RI - A	Power test ³	SD
1	20	Control ¹ 32%	HCLP ² 32%	45	30	0.03	1.0000	0.06
2	19	Control 32%	Control 40%	42	10	0.45	1.0000	0.10
3	19	Control 32%	HCLP 40%	21	10	0.00	1.0000	0.00
4	19	HCLP 32%	HCLP 40%	21	16	0.33	0.9990	0.22
5	19	Control 40%	HCLP 32%	26	16	0.01	1.0000	0.02
6	19	Control 40%	HCLP 40%	26	16	0.02	1.0000	0.03
7	19	Blank diet*	Blank diet*	45	45	0.51	0.0688	0.21

¹Control, diet based on PBM

²HCLP, *Spray dried* chicken liver powder hydrolysate.

³Power test, result considered significant above 0.7000.

*Commercial diets of daily consumption of cats kept in the collective cattery.

APPENDICES



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Impacto do nível de proteína na dieta e seu efeito sobre a marcadores fermentativos fecais e formação de aminas biogênicas em gatos", protocolada sob o CEUA nº 1110190121 (01/2022), sob a responsabilidade de **Ricardo Souza Vasconcellos** e equipe; Pamela Prestes Sezerotto - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 28/01/2021.

We certify that the proposal "impact of the dietary crude protein level and its effect on the fecal fermentation products and formation of biogenic amines in cats", utilizing 36 Cats (males and females), protocol number CEUA 1110190121 (01/2022), under the responsibility of **Ricardo Souza Vasconcellos** and team; Pamela Prestes Sezerotto - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 01/28/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)Vigência da Proposta: de 04/2021 a 04/2022 Área: [Dzo-Zootecnia](#)Origem: [Fazenda Experimental de Iguaçu](#)Espécie: [Gatos](#)sexo: [Machos e Fêmeas](#)idade: [1 a 7 anos](#)N: [36](#)Linhagem: [SRD](#)Peso: [3 a 6 kg](#)

Local do experimento: As instalações estão localizadas a pelo menos 200 m de outros setores da fazenda e somente pessoas autorizadas podem adentrar o recinto. Existe controle de pragas, as janelas possuem telas para evitar a entrada de animais e insetos. Todos os animais são vermifugados, vacinados e avaliados periodicamente quanto ao seu estado de saúde por um médico veterinário. As pessoas que trabalham com os animais são treinadas quanto aos procedimentos higiênicos e de desinfecção pré e pós-manejo dos animais.

Maringá, 14 de maio de 2022

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez
Coordenador Adjunto da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Capítulo III

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de proteínas hidrolisadas vem sendo visada pela indústria *pet food* afim de melhorar a qualidade dos produtos e ao mesmo tempo proporcionar propriedades funcionais. As dietas comerciais são formuladas com o objetivo de atender todas as exigências nutricionais de cães e gatos. Entretanto, alguns animais apresentam intolerâncias, seja pela fonte do ingrediente, quantidade ou qualidade do mesmo. O hidrolisado surge como uma proposta na utilização em dietas terapêuticas ou para fins de tratamento de patologias, essas dietas são conhecidas como dietas coadjuvantes.

O consumo de dietas contendo proteína hidrolisada trás melhorias a saúde de cães e gatos, principalmente para animais com dermatites causadas pela alergia alimentar. E além da sua funcionalidade terapêutica, é uma fonte proteica utilizada na produção animal, para aves, suínos e peixes, e apresenta melhorias nos índices zootécnicos destes animias, tendo melhores resultados de produção.

Neste estudo foi observado que o hidrolisado proteico foi considerado mais palatável e preferido por gatos, conseqüentemente não houve problemas com o seu consumo. O nível de inclusão também tem interferência na palatabilidade e na fermentação no cólon e seus produtos finais. O consumo de proteína hidrolisada por 30 dias aumentou os níveis de ácidos graxos essenciais para a manutenção da saúde intestinal destes animais, como o butirato. A proteína hidrolisada seria uma substituição interessante em dietas para gatos, uma vez que esses animais são bastante exigentes no consumo de alimentos, levando em consideração o sabor como uma prioridade. Além disso, trata-se de um ingrediente funcional, com baixo peso molecular e que por esse motivo é mais rapidamente absorvido, não ficando tão susceptível a fermentação intestinal e a geração de produtos maléficos para saúde.

Além do estudo de análise de palatabilidade, digestibilidade e produtos finais de fermentação, realizou-se estudos avaliando a produção de aminas biogênicas, a ação de enzimas responsáveis pela degradação das mesmas, monoaminoxidase e diaminoxidase, e a microbiota fecal dos gatos, os quais estão sob análise estatística e seus resultados serão publicados em breve. Os dados de microbiota fecal, resultaram em um estudo integrado e comparativo entre espécies, cães e gatos. Adicionalmente, pesquisas futuras avaliando o balanço de cátions e ânios das dietas com a utilização de hidrolisado, afim de compreender se o ingrediente ou o desbalanço mineral influênciam no pH urinário dos animais.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEM, M. M.; OHNO, K. Separation of the Dns derivatives of polyamines and related compounds by thin-layer and high-pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 416-419, 1975.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier, 1986.
- AFFCO - ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIAL. **Official publication 2003**. Champaign: Association of American Feed Control Official, 2003.
- ALBINO, L. F. T. **Sistemas de avaliação nutricional de alimentos e suas aplicações na formulação de rações para frangos de corte**. 1991. Tese (Doutorado) – Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1991.
- ALLEN, T. A.; KRUGER, J. M. Enfermedad felina de las vias urinarias. *In*: HAND, M. S. *et al.* **Nutrición clínica en pequeños animales**. 4. ed. Santa Fé de Bogota: Mark Morris Institute, 2000. v. 4, p. 811-845.
- ALVES, R. C. *et al.* New trends in food allergens detection: toward biosensing strategies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 56, n. 14, p. 2304-2319, 2016.
- ANDERSEN, S. J. *et al.* Electrolytic Extraction drives volatile fatty acid chain elongation through lactic acid and replaces chemical pH control in thin stillage fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 8, [art.] 221, [p. 1–14], 2015.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemist, 1995.
- AUSMAN, L. M. Fiber and colon cancer: does the current evidence justify a preventive policy? **Nutrition Reviews**, Washington, DC, v. 51, n. 2, p. 57-57, 1993.
- AVELAR, E. C.; FRANÇA, A. S.; FERRAZ, V. P. Desenvolvimento e otimização de metodologia de cromatografia gasosa para identificação e quantificação de aminas bioativas em alimentos. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6. 2005, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: Unicamp, 2005. [6 p.].
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 6, n. 10, p. 341-346, 1995.
- BHASKAR, N. *et al.* Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource Technology**, Barking, v. 98, n. 2, p. 388-394, 2007.
- BELLAVER, C.; ZANOTTO, D. L. Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos protéicos de origem animal. *In*: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Santos. [**Anais ...**]. Campinas: FACTA, 2004. p. 1-14.

- BENÍTEZ, R.; IBARZ, A.; PAGAN, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, Buenos Aires, v. 42, n. 2, p. 227-236, 2008.
- BIOURGE, V. C.; FONTAINE, J.; VROOM, M. W. Diagnosis of adverse reactions to food in dogs: efficacy of a soy-isolate hydrolyzate-based diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 134, n. 8, p. 2062S-2064S, 2004.
- BJÖRNSDÓTTIR-BUTLER, K. *et al.* Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 139, n. 3, p. 161-167, 2010.
- BODMER, S.; IMARK, C. H.; KNEUBÜHL, M. Biogenic amines in foods: histamine and food processing. **Inflammation Research**, Basel, v. 48, n. 6, p. 296-300, 1999.
- BOWES, V. A.; JULIAN, R. J. Organ weights of normal broiler chickens and those dying of sudden death syndrome. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 29, n. 2, p. 153-156, 1988.
- BROSEY, B. P.; HILL, R. C.; SCOTT, K. C. Gastrointestinal volatile fatty acid concentrations and pH in cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 61, n. 4, p. 359-361, 2000.
- BULUSHI, I. A. *et al.* Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation—a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 49, n. 4, p. 369-377, 2009.
- BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Campinas: Colégio Brasileiro de Alimentação Animal, 2002. 430 p.
- CABALLERO, B.; TRUGO, L.; FINGIAS, P. **Encyclopedia of food science and nutrition**. London: Academic Press, 2003.
- CAMPBELL, J. M.; FAHEY, G. C. Jr. Psyllium and methylcellulose fermentation properties in relation to insoluble and soluble fiber standards. **Nutrition Research**, Los Angeles, v. 17, n. 4, p. 619-629, 1997.
- CAMPESTRINI, E. Farinha de carne e ossos. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, MG, v. 2, n. 4, [art.] 24, p. 221-234, jul./ago. 2005.
- CAPPELLI, S.; MANICA, E.; HASHIMOTO, J. H. A importância dos aditivos na alimentação de cães e gatos: revisão da literatura. **PUBVET**, Maringá, v. 10, n. 3, p. 190-270, 2015.
- CARCIOFI, A. C. *et al.* Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and postprandial glucose and insulin response. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 98, p. 326-336, 2008.
- CARDOZO, M. *et al.* Aminas biogênicas: um problema de saúde pública. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 149-168, 2013.

- CAVALCANTE, W. A. *et al.* Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: a review. **Process Biochemistry**, Watford, v. 54, p. 106-119, 2017.
- CHOTIKACHINDA, R. *et al.* Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera as feeding attractants for Asian seabass (*Lates calcarifer*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 773-784, 2013.
- CHUNG, W. S. F. *et al.* Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 93, n. 11, [art.] fix127, [p. 1-9], 2017.
- COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 512-518, 1997.
- COLVILLE, T. **Anatomia e fisiologia clínica para medicina veterinária**. London: Elsevier Health Sciences Brazil, 2011.
- COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 67, n. 3, p. 429-453, 2003.
- COWELL, C. S. *et al.* Making commercial pet foods. In: HAND, M. S. *et al.* (ed.). **Small animal clinical nutrition**. Topeka, Kansas: Mark Morris Institute, 2000. p. 127-146.
- CUMMINGS, J. H. *et al.* Fecal weight, colon câncer risk, and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber). **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 103, p. 1783-1789, 1992.
- DABROWSKI, W. M.; SIKORSKI, Z. E. **Toxins in food**. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- DAPKEVICIUS, M. L. N. E. *et al.* Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 57, n. 1/2, p. 107-114, 2000.
- DESIDERIO, M. A.; DAVALLI, P.; PERIN, A. Simultaneous determination of γ -aminobutyric acid and polyamines by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 419, p. 285-290, 1987.
- DIEL, E. *et al.* Histamine containing food: establishment of a german food intolerance databank (NFID). **Inflammation Research**, Basel, v. 46, p. 87-88, 1997.
- DROCHNER, W.; MEYER, H. Digestion of organic matter in the large intestine of ruminants, horses, pigs and dogs. **Advances in Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 22, p. 18-40, 1991.
- DU, W. X. *et al.* Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. **Journal of Food Science**, Malden, v. 67, n. 1, p. 292-301, 2002.

EL-SAYED, A. F. M. Alternative dietary protein sources for farmed tilápia, *Oreochromis ssp.* **Aquaculture**, Amsterdam, v.179, p.146- 168, 1999.

EMBORG, J.; DALGAARD, P. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by *Morganella psychrotolerans*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 226-233, 2008.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.

FADHLAOUI-ZIDA, K. *et al.* Biogenic amine production by bacteria isolated from ice-preserved sardine and mackerel. **Food Control**, Kidlington, v. 25, n. 1, p. 89-95, 2012.

FARIA, A. C. E. A.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M. Farinha de vísceras de aves em rações para alevinos de Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 812-822, 2002.

FAVARO, G. *et al.* Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode. **Food Chemistry**, London, v. 105, n. 4, p. 1652-1658, 2007.

FEDIAF - THE EUROPEAN PET FOOD INDUSTRY FEDERATION. *Diretrizes Nutricionais para alimentos completos e complementares para cães e gatos*. [Brussels], 2021. 92 p.

FERNANDES, V. A. G. **Avaliação da qualidade da farinha de vísceras de aves de diferentes indústrias e épocas do ano**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

FISCHER, M. M. *et al.* Fiber fermentability effects on energy and macronutrient digestibility, fecal traits, postprandial metabolite responses, and colon histology of overweight cats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 7, p. 2233-2245, 2012.

FOCANT, J. F. *et al.* Improved separation of the 209 polychlorinated biphenyl congeners using comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1040, n. 2, p. 227-238, 2004.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, Watford, v. 31, n. 6, p. 605-616, 1996.

FORSYTHE, W. I.; REDMOND, A. Two controlled trials of tyramine in children with migraine. **Developmental Medicine & Child Neurology**, London, v. 16, n. 6, p. 794-799, 1974.

FRØKJAER, S. Use of hydrosylates for protein supplementation. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 86-88, 1994.

GEVAERT, D. M. *et al.* Effect of macromineral composition of diets on blood acid-base equilibrium and urinary acidity in dogs. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 121, p. S93-S94, 1991. Supl. 11.

GINTEROVÁ, P. *et al.* Determination of selected biogenic amines in red wines by automated on-line combination of capillary isotachopheresis–capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 904, p. 135-139, 2012.

GLÓRIA, M. B. A. *et al.* Influence of cultivar and germination on bioactive amines in soybeans (*Glycine max* L. Merrill). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 53, n. 19, p. 7480-7485, 2005.

GOMES, J. R. **Hidrolisado proteico de fígado de aves como aditivo em dietas para Tilápia do Nilo**. 2020. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2020.

GRIFFIN, R. Palatability testing methods: parameters and analyses that influence test conditions. *In*: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. (ed.). **Petfood technology**. Mt. Morris, Illinois: Wyatt Publishing, 2003. p. 187–193.

GRIMBLE, G. K. *et al.* Effect of peptide chain length on absorption of egg protein hydrolysates in the normal human jejunum. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 92, n. 1, p. 136-142, 1987.

GROB, R. L.; KAISER, M. A. Qualitative and quantitative analysis by gas chromatography. *In*: GROB, R. L.; BARRY, E. F. (ed.). **Modern practice of gas chromatography**. 4th ed. Hoboken: John Wiley, 2004. cap. 8, p. 403-460.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M. *et al.* High rate heptanoate production from propionate and ethanol using chain elongation. **Bioresource Technology**, Barking, v. 136, p. 715–718, 2013.

GUILFORD, W. G. *et al.* Food sensitivity in cats with chronic idiopathic gastrointestinal problems. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 15, n. 1, p. 7-13, 2001.

GUO, Y-Y. *et al.* Biogenic amines in wine: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 50, n. 7, p. 1523-1532, 2015.

HALÁSZ, A. *et al.* Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 5, n. 2, p. 42-49, 1994.

HARDY, R. W. Alternate protein sources for salmon and trout diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 59, n. 1/3, p. 71-80, 1996.

HENAO-ESCOBAR, W. *et al.* Dual enzymatic biosensor for simultaneous amperometric determination of histamine and putrescine. **Food Chemistry**, London, v. 190, p. 818-823, 2016.

HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Determination of histamine in wine samples by flow-injection analysis and multivariate calibration. **Analytical Letters**, Philadelphia, v. 46, n. 11, p. 1758-1768, 2013.

- HERNÁNDEZ-JOVER, T. *et al.* Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, Washington, DC, v. 45, n. 6, p. 2098-2102, 1997.
- HERTRAMPF, J. W.; PIEDAD-PASCUAL, F. **Handbook on ingredients for aquaculture feeds**. Dordrecht: Springer, 2000. 615 p.
- HOLSCHER, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. **Gut Microbes**, Philadelphia, v. 8, n. 2, p. 172-184, 2017.
- HOWE, G. R. *et al.* Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 84, n. 24, p. 1887-1896, 1992.
- IWAMURA, H. Structure-sweetness relationship of L-aspartyl dipeptide analogs. A receptor site topology. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, DC, v. 24, n. 5, p. 572-583, 1981.
- JANSEN, S. C. *et al.* Intolerance to dietary biogenic amines: a review. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, McLean, VA, v. 91, n. 3, p. 233-241, 2003.
- JEREMIAS, J. T. **Relação entre o excesso de bases do alimento e o pH urinário de gatos**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- JUSTINO, C. I. L. *et al.* Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. **TrAC: Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 68, p. 2-17, 2015.
- KALAC, P. Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. **Journal of Applied Biomedicine**, České Budějovice, v. 7, n. 2, p. 65-74, 2009.
- KARKALAS, J. An improved enzymic method for the determination of native and modified starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 36, n. 10, p. 1019-1027, 1985.
- KERR, K. R. *et al.* Apparent total tract energy and macronutrient digestibility and fecal fermentative end-product concentrations of domestic cats fed extruded, raw beef-based, and cooked beef-based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 2, p. 515-522, 2012.
- KILLEEN, M. J. Spray drying and spray congealing of pharmaceuticals. *In*: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. (ed.). **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. New York: M. Dekker, 2000. p. 201-221.
- KIM, S. H. *et al.* Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore. **Journal of Food Protection**, Des Moines, IA, v. 64, n. 7, p. 1035-1044, 2001.

- KIM, Y. N. Vitamins. In: LEO, M. L. N.; FIDEL, T. (ed.). **Handbook of analysis of edible animal by-products**. Boca Raton: CRC Press, 2011. p. 161–182.
- KLURFELD, D. M. Dietary fiber-mediated mechanisms in carcinogenesis. **Cancer Research**, Baltimore, v. 52, p. 2055s-2059s, 1992.
- KUZMUK, K. N. *et al.* Diet and age affect intestinal morphology and large bowel fermentative end-product concentrations in senior and young adult dogs. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 135, p. 1940-1945, 2005.
- LADERO, V. *et al.* Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutrition & Food Science**, Bhopal, v. 6, n. 2, p. 145-156, 2010.
- LAFLAMME, D. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. **Canine Practice**, Santa Barbara, Calif., v. 22, n. 4, p. 10–15, 1997.
- LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 68-71, 1994.
- LANDETE, J. M. *et al.* Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 258-269, 2007.
- LANEVSKI, A.; KRAMER, J. W. Los componentes del análisis de orina. **Whaltam Focus**, Waltham on the Wolds, v. 4, n. 3, p. 21-29, 1994.
- LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 58, n. 1/2, p. 1-37, 2000.
- LEITÃO, M. F. F.; BALDINI, V. L. S.; SALES, A. M. Histamina em pescado e alimentos industrializados. **Coletanea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 13, p. 123-130, 1983.
- LESSON, S.; SUMMERS, D. J. **Commercial poultry nutrition**. Guelph: University Books, 1997.
- LOEFFLER, A. *et al.* Dietary trials with a commercial chicken hydrolysate diet in 63 pruritic dogs. **Veterinary Record**, Oxford, v. 154, n. 17, p. 519-522, 2004.
- LONVAUD-FUNEL, A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 199, n. 1, p. 9-13, 2001.
- MAIA, G. V. C. *et al.* Zeólitas e *Yucca schidigera* em rações para cães: palatabilidade, digestibilidade e redução de odores fecais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 11, p. 2442-2446, 2010.
- MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n.10, p.89-95, 1994.

- MAHMOUD, M. I.; MALONE, W. T.; CORDLE, C. T. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **Journal of Food Science**, Malden, v. 57, n. 5, p. 1223-1229, 1992.
- MALDONADO, J. G. A. *et al.* Special formulas in infant nutrition: a review. **Early Human Development**, Amsterdam, v. 53, p. S23-S32, 1998.
- MCCABE-SELLERS, B. J.; STAGGS, C. G.; BOGLE, M. L. Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: a crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v. 19, p. S58-S65, 2006.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Digestibilidade aparente de alguns alimentos protéicos pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, p. 1801-1809, 2003.
- MIETZ, J. L.; KARMAS, E. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. **Journal of Food Science**, Malden, v. 42, n. 1, p. 155-158, 1977.
- MILLAMENA, O. M. Replacement of fish meal by animal by-product meals in a practical diet for grow-out culture of grouper *Epinephelus coioides*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 204, n. 1/2, p. 75-84, 2002.
- MOENS, F. *et al.* A four-strain probiotic exerts positive immunomodulatory effects by enhancing colonic butyrate production *in vitro*. **International Journal of Pharmaceutics**, Oxford, v. 555, p. 1-10, 2019.
- MUÑOZ-ATIENZA, E. *et al.* Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 212-216, 2011.
- NAKAE, T.; ELLIOT, J. A. Production of volatile fatty acids by some lactic acid bacteria. II. Selective formation of volatile fatty acids by degradation of amino acids. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 48, n. 3, p. 293-299, 1965.
- NELSON, R. W.; DIMPERIO, M. E.; LONG, G. G. Lymphocytic-plasmacytic colitis in the cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 184, n. 9, p. 1133-1135, 1984.
- NENGAS, I.; ALEXIS, M. N.; DAVIES, S. J. High inclusion levels of poultry meals and related byproducts in diets for gilthead seabream *Sparus aurata* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 179, n. 1/4, p. 13-23, 1999.
- NEVES, F. J. **Mortalidade por câncer de colon e reto e perfil de consumo alimentar em capitais brasileiras**. 2002. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, São Paulo, 2002.
- NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, DC: National Academy of Science, National Academy Press, 2006. 398 p.

OKAMOTO, A. *et al.* Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 9, p. 1582-1584, 1997.

ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, London, v. 103, n. 4, p. 1475-1486, 2007.

PANTOJA, J. C. *et al.* Alimentação de cães e gatos cardiopatas. **PUBVET**, Maringá, v. 12, n. 11, p. 1-8, 2018.

PEATFIELD, Richard C. *et al.* Pharmacological analysis of red-wine-induced migrainous headaches. **The Journal of Headache and Pain**, Milano, v. 4, n. 1, p. 18-23, 2003.

PEZZATO, L. E. *et al.* Digestibilidade aparente de ingredientes pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, p. 1595-1604, 2002.

PINTO, C. F. D. *et al.* Characterisation of spray dried hydrolysed chicken liver powder: effects on palatability and digestibility when included as single source of animal protein in dog diets. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v. 20, n. 1, p. 2086-2094, 2021.

POND, W. G. *et al.* **Basic animal nutrition and feeding**. 4th ed. New York: John Wiley, 1995. 531 p.

POULLAIN, M. G. *et al.* Effect of whey proteins, their oligopeptide hydrolysates and free amino acid mixtures on growth and nitrogen retention in fed and starved rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Baltimore, v. 13, n. 4, p. 382-386, 1989.

PUPA, J. M. R. **Rações para frangos de corte formuladas com valores de aminoácidos digestíveis verdadeiros, determinados com galos cecectomizados**. 1995. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

RIGHETTI, P. G. (ed.). **Capillary electrophoresis in analytical biotechnology: a balance of theory and practice**. Boca Raton: CRC Press, 1995.

RIVIÈRE, A. *et al.* Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, [art.] 979, [p. 1-21], 2016.

ROKKA, M. *et al.* Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions: B. Biogenic amines as quality-indicating metabolites. **Food Control**, Kidlington, v. 15, n. 8, p. 601-607, 2004.

SAAID, M. *et al.* Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 4, p. 1356-1362, 2009.

SANTOS, M. H. S. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 29, n. 2/3, p. 213-231, 1996.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, New York, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SHIRLEY, R. B.; PARSONS, C. M. Effect of pressure processing on amino acid digestibility of meat and bone meal for poultry. **Poultry Science**, Oxford, v. 79, n. 12, p. 1775-1781, 2000.

SILVA, E. P. **Avaliação nutricional de farinhas de vísceras de aves e a utilização em rações de frangos de corte**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Não Ruminantes) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

SINDIRAÇÕES – SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal**. Campinas: Sindirações, 2009. 77 p.

SLAVIN, Joanne. Whole grains and human health. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 17, n. 1, p. 99-110, 2004.

SMIT, A. Y.; DU TOIT, W. J.; DU TOIT, M. Biogenic amines in wine: understanding the headache. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 29, n. 2, p. 109-127, 2008.

SPIRITO, C. M. *et al.* Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 27, p. 115–122, 2014.

STEIFF, E. L.; BAUER, J. E. Nutritional adequacy of diets formulated for companion animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 219, n. 5, p. 601-604, 2001.

SUZUKI, S. *et al.* Simultaneous determination of biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 508, n. 1, p. 225-228, 1990.

SUZZI, G.; GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 41-54, 2003.

TABOR, C. W.; TABOR, H. Polyamines. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 749-790, 1984.

TAPINGKAE, W. *et al.* Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. **Enzyme and Microbial Technology**, London, v. 46, n. 2, p. 92-99, 2010.

TEICHBERG, Saul *et al.* Response of rat intestine to a hyperosmotic feeding. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 12, n. 6, p. 720-725, 1978.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**. 7th ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2001. 887 p.

TSAI, Y. H. *et al.* Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 5, p. 461-467, 2005.

VALE, S. R.; GLÓRIA, M.; BEATRIZ A. Determination of biogenic amines in cheese. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 80, n. 5, p. 1006-1012, 1997.

VESTER, B. M. *et al.* Influence of feeding raw or extruded feline diets on nutrient digestibility and nitrogen metabolism of African wildcats (*Felis lybica*). **Zoo Biology**, New York, v. 29, n. 6, p. 676-686, 2010.

VIEITES, F. M. *et al.* Valores de aminoácidos digestíveis verdadeiros da farinha de carne e ossos para aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, n. 6, p. 2300-2307, 2000.

VITALI, L. *et al.* Development of a fast and selective separation method to determine histamine in tuna fish samples using capillary zone electrophoresis. **Talanta**, Amsterdam, v. 106, p. 181-185, 2013.

WAHN, U. Role of hydrolysates in prophylactic and therapeutic diets for food allergy. *In*: WECK, A. L.; SAMPSON, H. A. (ed.). **NNIW34 - intestinal immunology and food allergy**. New York: Rowen Press, 1995. (Nestle Nutrition Workshop Series, 34). p. 289-289.

WENNERBERG, M. *et al.* Changes in carbohydrate and glucosinolate composition in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) during blanching and treatment with acetic acid. **Food Chemistry**, London, v. 95, n. 2, p. 226-236, 2006.

WILSON, R. P. Fish feed formulation and processing. *In*: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS, 1995, Piracicaba. **Anais [...]**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1995. p. 171.

WOLKEN, W. A. M. *et al.* The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 188, n. 6, p. 2198-2206, 2006.

WORTHAM, B. W.; OLIVEIRA, M. A.; PATEL, C. N. Polyamines in bacteria: pleiotropic effects yet specific mechanisms. *In*: PERRY, R. D.; FETHERSTON, J. D. (ed.). **The genus Yersinia: from genomics to function**. New York: Springer, 2007. (AEMB, v. 603). p. 106-115.

YONGMEI, L. *et al.* Biogenic amines in Chinese soy sauce. **Food Control**, Kidlington, v. 20, n. 6, p. 593-597, 2009.

ZARRABIAN, S. *et al.* Effects of alimentary intact proteins and their oligopeptide hydrolysate on growth, nitrogen retention, and small bowel adaptation in inflammatory turpentine rat. **Nutrition**, Tarrytown, v. 15, n. 6, p. 474-480, 1999.

ZENTEK, J.; SCHULZ, A. Urinary composition of cats is affected by the source of dietary protein. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 134, n. 8, p. 2162S-2165S, 2004.

ZICKER, S. C. Evaluating pet foods: how confident are you when you recommend a commercial pet food? **Topics in Companion Animal Medicine**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 121-126, 2008.

APÊNDICES

Apêndice A – Carta de aprovação do Comitê de ética no uso de animais



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Impacto do nível de proteína na dieta e seu efeito sobre a marcadores fermentativos fecais e formação de aminas biogênicas em gatos", protocolada sob o CEUA nº 1110190121 (01/02/2021), sob a responsabilidade de **Ricardo Souza Vasconcellos** e equipe; Pamela Prestes Sezerotto - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 28/01/2021.

We certify that the proposal "Impact of the dietary crude protein level and its effect on the fecal fermentation products and formation of biogenic amines in cats", utilizing 36 Cats (males and females), protocol number CEUA 1110190121 (01/02/2021), under the responsibility of **Ricardo Souza Vasconcellos** and team; Pamela Prestes Sezerotto - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 01/28/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 04/2021 a 04/2022 Área: [Dzo-Zootecnia](#)

Origem: [Fazenda Experimental de Iguatemi](#)

Espécie: [Gatos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 7 anos](#)

N: [36](#)

Linhagem: [SRD](#)

Peso: [3 a 6 kg](#)

Local do experimento: As instalações estão localizadas a pelo menos 200 m de outros setores da fazenda e somente pessoas autorizadas podem adentrar o recinto. Existe controle de pragas, as janelas possuem telas para evitar a entrada de animais e insetos. Todos os animais são vermifugados, vacinados e avaliados periodicamente quanto ao seu estado de saúde por um médico veterinário. As pessoas que trabalham com os animais são treinadas quanto aos procedimentos higiênicos e de desinfecção pré e pós-manejo dos animais.

Maringá, 14 de maio de 2022

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez
Coordenador Adjunto da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Apêndice B – Análise canônica dos dados experimentais

Figure 1: Canonical correlation for source protein of the other variables of fermentation products.

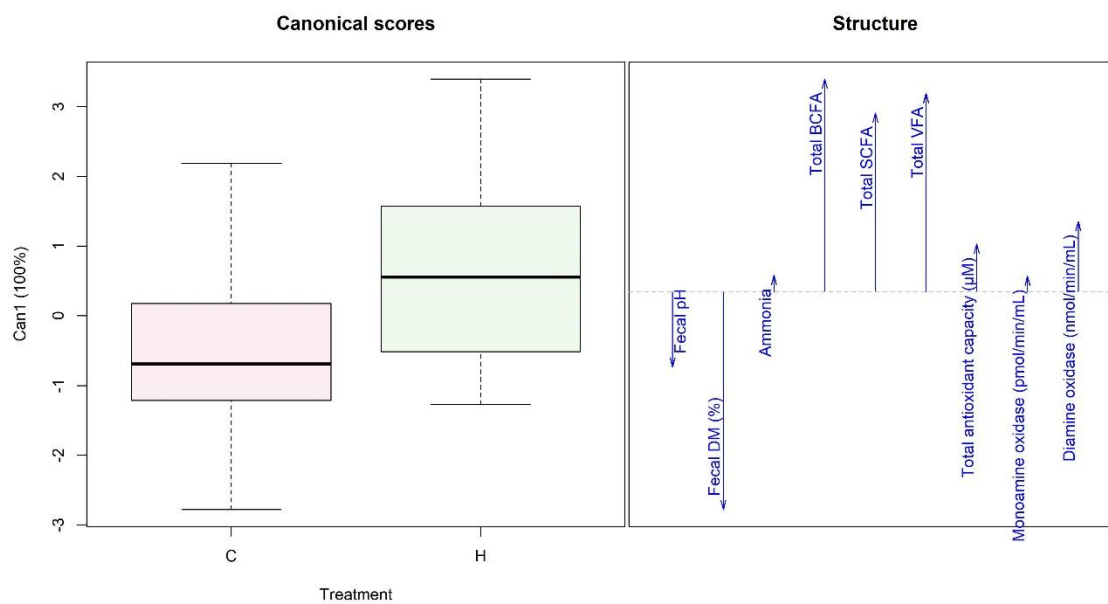
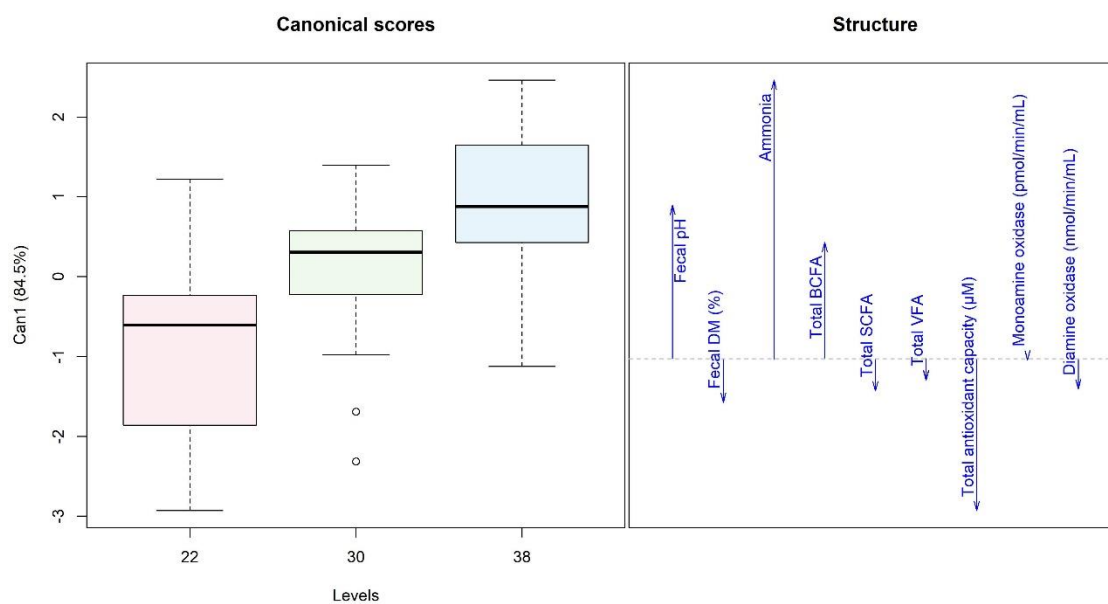


Figure 2: Canonical correlation for levels of the other variables of fermentation products



Apêndice C - Normas para redigir o artigo I – Publicação no periódico Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition

4. PREPARANDO SUA SUBMISSÃO

Partes do Manuscrito

O manuscrito deve ser submetido em arquivos separados: página de rosto; arquivo de texto principal; figuras.

Arquivo de texto principal

O arquivo de texto deve ser apresentado na seguinte ordem:

i. Título

ii. Um título curto com menos de 60 caracteres

iii. Os nomes completos dos autores

iv. Afiliações institucionais do autor onde o trabalho foi realizado, com nota de rodapé para o endereço atual do autor se for diferente de onde o trabalho foi realizado

v. Agradecimentos

vi. Resumo e palavras-chave

vii. Texto principal

viii. Referências

ix. Tabelas (cada tabela completa com título e notas de rodapé)

x. Legendas das figuras

xi. Anexos (se relevante). Figuras e informações de suporte devem ser fornecidas como arquivos separados.

Título. O título deve ser curto e informativo, contendo as principais palavras-chave relacionadas ao conteúdo. O título não deve conter abreviações (veja [as dicas de SEO de melhores práticas da Wiley](#)).

Autoria. Para obter detalhes sobre a elegibilidade para listagem de autores, consulte a [política de autoria](#) da revista descrita na seção [Políticas Editoriais e Considerações Éticas](#).

Reconhecimentos. Contribuições de indivíduos que não atendem aos critérios de autoria devem ser listadas, com permissão do colaborador, em uma seção de Agradecimentos. O apoio financeiro e material também deve ser mencionado. Graças a revisores anônimos não são apropriados.

Declaração de conflito de interesse. Os autores serão solicitados a fornecer uma declaração de conflito de interesse durante o processo de submissão. Consulte [a seção 'Conflito de Interesse'](#) em

Declaração de bem-estar animal

Os autores deverão confirmar sua adesão às políticas éticas do *JAPAN durante o processo de submissão*. Para verificar a conformidade com as políticas éticas da revista, os autores devem fornecer uma 'Declaração de Bem-Estar Animal' em seu manuscrito que confirme que os padrões da UE para a proteção de animais e/ou legislação alimentar foram atendidos. Esta declaração também deve observar o histórico ético relevante e o processo de aprovação ética e o número de aprovação, se disponível. Se nenhuma aprovação ética for necessária, por exemplo, se o artigo for uma revisão que não inclui dados de pesquisa originais – isso deve ser declarado na Declaração de Bem-Estar Animal. Exemplos de como essas declarações podem aparecer estão abaixo:

Exemplo de uma Declaração de Bem-Estar Animal onde **foi** necessária a aprovação ética: '*Os autores confirmam que as políticas éticas da revista, conforme observado na página de diretrizes do autor da revista, foram cumpridas e a aprovação do comitê de revisão ética apropriada foi recebida. Os autores confirmam que seguiram as normas da UE para a proteção de animais usados para fins científicos [e legislação alimentar, se apropriado].*'

Exemplo de uma Declaração de Bem-Estar Animal em que a aprovação ética **não foi** necessária: '*Os autores confirmam que as políticas éticas da revista, conforme observado na página de diretrizes do autor da revista, foram cumpridas. Nenhuma aprovação ética foi necessária, pois este é um artigo de revisão sem dados de pesquisa originais.*'

Resumo

O resumo não deve exceder 300 palavras, fornecendo os principais objetivos, métodos, resultados, conclusões e aplicações práticas da pesquisa.

Palavras-chave

Forneça até seis palavras-chave.

Referências

As referências devem ser preparadas de acordo com o *Manual de Publicação da American Psychological Association* (6ª edição). Isso significa que no texto as citações devem seguir o método autor-data em que o sobrenome do autor e o ano de publicação da fonte devem aparecer no texto, por exemplo (Jones, 1998). A lista completa de referências deve aparecer em ordem alfabética por nome no final do

uma lista completa de referências deve aparecer em ordem alfabética por nome no final do artigo.

Uma amostra das entradas mais comuns nas listas de referência aparece abaixo. Observe que um DOI deve ser fornecido para todas as referências disponíveis. Para obter mais informações sobre o estilo de referência da APA, consulte as [Perguntas frequentes](#) da APA. Observe que, para artigos de periódicos, os números das edições não são incluídos, a menos que cada edição do volume comece com a primeira página.

Em geral, o JAPÃO não encoraja a citação de material inédito. Nos casos em que material inédito for essencial para o seu artigo, entre em contato com o Escritório Editorial em JAPANedoffice@wiley.com, que encaminhará seu caso para análise dos Co-Editores antes da submissão.

artigo de jornal

Cervejas, SR, & De Bellis, MD (2002). Função neuropsicológica em crianças com transtorno de estresse pós-traumático relacionado a maus-tratos. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483-486. doi : [10.1176/appi.ajp.159.3.483](https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.3.483)

Livro

Bradley-Johnson, S. (1994). *Avaliação psicoeducacional de alunos com deficiência visual ou cegos: da infância ao ensino médio* (2ª ed.). Austin, TX: Pro-ed.

Documento da Internet

Norton, R. (2006, 4 de novembro). Como treinar um gato para operar um interruptor de luz [arquivo de vídeo]. Recuperado de <http://www.youtube.com/watch?v=Vja83KLQXZs>

Formatação das referências por número de autores

Um ou dois autores *Primeira citação de texto* - Palmer & Roy, 2008 *Citações de texto subsequentes* - Palmer & Roy, 2008

Três, quatro ou cinco autores *Primeira citação de texto* - Sharp, Aarons, wittenberg, & Gittens, 2007 *Citações de texto subsequentes* - Sharp et al., 2007

Seis ou mais autores *Primeira citação no texto* - Mendelsohn et al., 2010 *Citações no texto subsequente* - Mendelsohn et al., 2010

Tabelas

As tabelas devem ser autocontidas e complementar, não duplicar, as informações contidas no texto. Eles devem ser fornecidos como arquivos editáveis, não colados como imagens. As legendas devem ser concisas, mas abrangentes – a tabela, a legenda e as notas de rodapé devem ser compreensíveis sem referência ao texto. Todas as abreviaturas devem ser definidas em notas de rodapé. Símbolos de nota de rodapé: †, ‡, §, ¶, devem ser usados (nessa ordem) e *, **, *** devem ser reservados para valores P. Medidas estatísticas como SD ou SEM devem ser identificadas nos títulos.

Legendas das Figuras

As legendas devem ser concisas, mas abrangentes – a figura e sua legenda devem ser compreensíveis sem referência ao texto. Incluir definições de quaisquer símbolos usados e definir/explicar todas as abreviações e unidades de medida.

Figuras

Embora os autores sejam incentivados a enviar figuras da mais alta qualidade possível, para fins de revisão por pares, uma ampla variedade de formatos, tamanhos e resoluções são aceitas. [Clique aqui](#) para obter os requisitos básicos de figuras enviadas com manuscritos para revisão inicial por pares, bem como os requisitos de figuras pós-aceitação mais detalhados.

As figuras submetidas a cores podem ser reproduzidas a cores online gratuitamente. Observe, no entanto, que é preferível que as figuras de linha (por exemplo, gráficos e tabelas) sejam fornecidas em preto e branco para que sejam legíveis se impressas por um leitor em preto e branco. Se um autor preferir ter figuras impressas em cores em cópias impressas da revista, uma taxa será cobrada pela Editora. Por favor, use o link para baixar o formulário de acordo de trabalho de cores

https://onlinelibrary.wiley.com/443/pb-assets/JPN/JPN_CWA_Form_2015%20%281%29.pdf

Envios de imagens de capa

Esta revista aceita submissões de arte para imagens de capa. Este é um serviço opcional que você pode usar para ajudar a aumentar a exposição do artigo e mostrar sua pesquisa. Para obter mais informações, incluindo diretrizes de arte, preços e detalhes de envio, visite a página Imagem de capa do jornal. Visite <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/Promotion/journal-cover-image.html?>

Arquivos Adicionais

Apêndices

Os apêndices serão publicados após as referências. Para submissão, devem ser fornecidos como arquivos separados, mas mencionados no texto.

Informações de Apoio

Informações de suporte são informações que não são essenciais para o artigo, mas fornecem maior profundidade e fundo. Está hospedado online e aparece sem edição ou composição. Pode incluir tabelas, figuras, vídeos, conjuntos de dados, etc. [Clique aqui](#) para as perguntas frequentes da Wiley sobre informações de suporte.

Observação: se dados, scripts ou outros artefatos usados para gerar as análises apresentadas no artigo estiverem disponíveis em um repositório de dados disponível publicamente, os autores devem incluir uma referência à localização do material em seu artigo.

Pontos Gerais de Estilo

Os pontos a seguir fornecem conselhos gerais sobre formatação e estilo.

- **Abreviaturas** : As abreviaturas de termos biológicos, médicos, químicos e outros só devem ser utilizadas quando tais abreviaturas são reconhecidas internacionalmente e não são ambíguas. O primeiro uso de uma abreviatura deve ser explicado fornecendo também o termo não abreviado. Todos os nomes biológicos, médicos, químicos e outros devem ser dados de acordo com a nomenclatura internacional mais recente. Se um animal está sendo mencionado no texto pela primeira vez, o nome binomial deve ser dado, por exemplo, carpa (*Cyprinus carpio* L.). Posteriormente, isso pode ser abreviado para *C. carpio*.

- **Unidades de medida** : As medidas devem ser dadas em unidades SI ou derivadas do SI. Visite o site do Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) em www.bipm.fr para obter mais informações sobre unidades SI. As concentrações das soluções devem ser dadas como concentrações molares. Todas as outras concentrações devem ser expressas em porcentagem.

- **Estatísticas** : As descrições da avaliação estatística dos resultados devem ser acompanhadas do nome do software de computador e dos procedimentos aplicados (ANOVA um-dois fatorial, teste de Tukey etc.). Os valores médios dados nas tabelas devem ser acompanhados dos valores do desvio padrão (DP), ou em experimentos onde foi considerado o maior número de amostras (animais, unidades etc.), o valor SEM e a probabilidade P devem ser fornecidos.

- **Números**: números abaixo de 10 são soletrados, exceto: medidas com uma unidade (8mmol/l); idade (6 semanas), ou listas com outros números (11 cães, 9 gatos, 4 gerbos).

- **Nomes Comerciais** : As substâncias químicas devem ser referidas apenas pelo nome genérico. Nomes comerciais não devem ser usados. Os medicamentos devem ser referidos pelos seus nomes genéricos. Se medicamentos patenteados foram usados no estudo, refira-se a eles pelo nome genérico, mencionando o nome patentado e o nome e localização do fabricante entre parênteses.

Suporte para preparação de artigos

[Os serviços de edição da Wiley](#) oferecem ajuda especializada com edição do idioma inglês, bem como tradução, formatação de manuscritos, ilustração de figuras, formatação de figuras e design gráfico de resumos - para que você possa enviar seu manuscrito com confiança.

Além disso, confira nossos recursos para [Preparar seu artigo](#) para obter orientações gerais sobre como escrever e preparar seu manuscrito.

VITA

Pamela Prestes Sezerotto, filha de Marlei Prestes Sezerotto e Gerson Luiz Pinheiro Sezerotto, nasceu em 25 de maio de 1997, Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul.

Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), *campus* Palmeira das Missões – RS, no primeiro semestre de 2015. Ao longo da graduação foi monitora da disciplina de matemática aplicada à Biologia no ano de 08/2015 a 12/2015. Foi bolsista como pesquisadora em comportamento e bem-estar animal de 03/2016 a 08/2016 e bolsista voluntária na mesma área no período de 04/2018 a 07/2018. Foi também, bolsista voluntária no Laboratório de Ensino Zootécnico (LEZO) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como pesquisadora na área de produção animal de 03/2019 a 06/2019. Em abril de 2020 deu início ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na área de Produção Animal, com ênfase em Nutrição de Cães e Gatos, sob orientação o professor Dr. Luciano Trevizan.