

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

Aplicação de energia termomecânica na formação dos kibbles, palatabilidade, digestibilidade e retenção de nutrientes em alimentos extrusados para cães e gatos.

Mayara Aline Baller

Médica Veterinária

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

Aplicação de energia termomecânica na formação dos kibbles, palatabilidade, digestibilidade e retenção de nutrientes em alimentos extrusados para cães e gatos.

Mayara Aline Baller

Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

Tese de Doutorado apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias–UNESP, Campus Jaboticabal, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

2020

B191a Baller, Mayara Aline

Aplicação de energia termomecânica na formação dos kibbles, palatabilidade, digestibilidade e retenção de nutrientes em alimentos extrusados para cães e gatos. / Mayara Aline Baller. -- Jaboticabal, 2020

127 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Aulus Cavalieri Carciofi

1. Nutrição animal. 2. Processo de extrusão. 3. Vitaminas na nutrição animal. 4. Selênio na nutrição animal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: APLICAÇÃO DE ENERGIA TERMOMECÂNICA NA FORMAÇÃO DOS KIBBLES, PALATABILIDADE, DIGESTIBILIDADE E RETENÇÃO DE NUTRIENTES EM ALIMENTOS EXTRUSADOS PARA CÃES E GATOS

AUTORA: MAYARA ALINE BALLER

ORIENTADOR: AULUS CAVALIERI CARCIOFI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. LUCIANO HAUSCHILD (Participação Virtual) p/
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. RICARDO SOUZA VASCONCELLOS (Participação Virtual) p/
Universidade Estadual de Maringá / UEM - Maringá/PR

Prof. Dr. EDNEY PEREIRA DA SILVA (Participação Virtual) p/
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pesquisador Dr. FABIANO CESAR SÁ (Participação Virtual)
Companion Animal Nutritionist, Wenger Service Team / Valinhos/SP p/

Jaboticabal, 05 de outubro de 2020

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MAYARA ALINE BALLER – Nascida em 27 de janeiro de 1993, em Concórdia – SC. Formada em Técnica em Agropecuária pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – Campus Concórdia, em dezembro de 2009. Graduada em Medicina Veterinária pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – Campus Concórdia, em dezembro de 2014. Foi bolsista de extensão do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – Campus Concórdia (2013-2014) na área de nutrição de cães e gatos sob a supervisão da Prof^a Dra. Amanda D'Ávila Carvalho. Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária), sob orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Jaboticabal. Atualmente é aluna de doutorado em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Jaboticabal na área de nutrição de cães e gatos, com ênfase em processamento de rações extrusadas secas para cães e gatos, pelo programa de Zootecnia, e bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo: 2018/23864-4, sob orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi.

Somos assim:
Sonhamos o voo, mas tememos as alturas.
Para voar é preciso amar o vazio.
Porque o voo só acontece se houver o vazio.
O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas.
Os homens querem voar, mas temem o vazio.
Não podem viver sem certezas.
Por isso trocam o voo por gaiolas.
As gaiolas são o local onde as certezas moram.
Os homens preferem as gaiolas ao voo.
São eles mesmos que constroem as gaiolas onde passarão as suas vidas.
(Dostoiévski)

Dedico

Aos meus pais Marisa e Almiro Baller, e irmã Aihanna Carolina Baller.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por mais essa oportunidade. À Nossa Senhora das Graças que segue comigo sempre e ilumina meus caminhos.

Aos meus amados pais e irmã, pelo amor, compreensão e estímulos. Agradeço a confiança depositada em mim todos esses anos, não existem palavras para demonstrar quanto sou grata por tudo. Amo vocês!

À toda minha família, avós, madrinha, Maria, tios, tias, primos e primas mesmo distante, estão no meu coração e sempre presentes em minha vida, agradeço imensamente por todo o apoio e carinho recebidos.

Aos meus queridos amigos que mesmo distantes, e com muita saudade, contribuíram, incentivaram e acreditaram, dando todo o apoio ao longo desses anos.

Ao meu querido orientador, Professor Aulus, pelo qual tenho grande e sincera admiração pessoal e profissional. Agradeço em especial pela oportunidade, paciência e ensinamento. Por sempre me incentivar e por acreditar em mim. Por toda a amizade e cuidado ao longo desses anos.

A todos os colegas e amigos do laboratório, em especial aos meus grandes amigos Érico, Peterson, Camila, Letícia Pacheco e Francine. Aos demais colegas, muito obrigada pela grande ajuda, pela paciência e aprendizagem. Tenho muito orgulho de fazer parte dessa incrível equipe.

Um agradecimento especial aos estagiários do Lab. Nutri, que se tornaram meus amigos. Um muito obrigado por todo o carinho e responsabilidade que vocês têm com os animais. Por permitirem uma troca de informação constante e de aprendizado.

Aos funcionários do laboratório de nutrição Diego, Elaine e Kelly pelo cuidado especial com os animais e comigo, e Cláudia por toda a ajuda com as análises. Aos funcionários da Fábrica de Rações da FCAV/UNESP, Lucas e Hélio, obrigada pelos ensinamentos e pela amizade.

Agradeço de coração ao pessoal de Maringá, em especial minha amiga Tânia, e ao Prof. Ricardo, muito obrigada pelo acolhimento e pelo carinho.

Um agradecimento as empresas parceiras do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos da FCAV/UNESP. Em especial a

Affinity PetCare e a Manfrim pelo apoio ao Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos da FCAV/UNESP. A Manzoni Industrial pela doação da extrusora, na qual esta pesquisa foi realizada. A DSM pelo suporte financeiro para a realização do experimento do Capítulo 3. A Alltech pelo suporte financeiro para a realização do experimento do Capítulo 4.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo: 2018/23864-4, pela bolsa de estudo concedida para o desenvolvimento deste projeto. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro para desenvolvimento do Capítulo 2.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão dessa fase, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

Resumo –	xii
Palavras-chaves:	xiv
Summary	xv
Keywords:.....	xvi
LISTA DE TABELAS	xvii
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	2
1. Introdução.....	2
2. Revisão bibliográfica	4
2.1 Mistura	4
2.2 Moagem	5
2.3 Pré-condicionamento	7
2.4 Extrusora de rosca simples	10
2.5 Secador	16
2.6 Efeito da extrusão nos nutrientes e na palatabilidade	16
4. Referência bibliográfica	34
CAPÍTULO 2 – Application of thermal energy on extrusion characteristics, digestibility and palatability of a diet for cats	39
1. Introduction.....	42
2. Material and methods	43
2.1. Experimental design and food formulation	43
2.2. Extrusion processing	46
2.3. Calculations of specific mechanical energy, specific thermal energy and residence time at preconditioner	48
2.4. Starch gelatinization, in vitro digestibility of the organic matter and kibble macrostructure	48
2.5. Digestibility protocol and chemical analysis	49
2.6. Fermentation products on feces in the experiment 1.....	50
2.7. Food palatability test	51
2.8. Statistical analysis	51
3. Results	52
3.1. Extrusion parameters, kibble macrostructure, starch gelatinization and in vitro digestibility in experiment 1.....	52
3.2. Total tract apparent digestibility of nutrients and feces characteristics on experiment 1	56
3.3. Food preferences on experiment 1.....	59
3.4. Experiment 2: extrusion traits, kibble macrostructure, starch gelatinization and in vitro digestibility after mass adjusted motor amperage	59
4. Discussion	61
5. Conclusions.....	67
References	68
CAPÍTULO 3 – Particle reduction, mechanical energy transference and drying on vitamins A, B2 and B6 retention in extruded dog foods.....	74
1. Introduction.....	77
2. Material and methods	78
2.1 Experimental design, comparisons, and treatments	79
2.2. Diet formulation, extrusion processing, and sample collection	80
2.2 Nutrient Analysis	84

2.3 Statistical Analysis.....	85
3. Results	85
4. Discussion	89
5. Conclusion.....	92
References	93
CAPÍTULO 4 - Influence of process food production extruded for dogs with different sources of selenium	95
1. Introduction	98
2. Material and Methods	99
2.1 Experimental design and treatments	100
2.2 Chemical analysis	103
2.3 Analysis of selenium content.....	103
2.4 Statistical Analysis.....	104
3. Results	104
4. Discussion	105
5. Conclusion.....	107
References	107



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos de diferentes quantidades de energia térmica adicionadas no condicionador sobre o cozimento do amido, macroestrutura dos kibbles, digestibilidade e palatabilidade de rações extrusadas para gatos", protocolada sob o CEUA nº 3823050218 (ID 001767), sob a responsabilidade de **Ricardo Souza Vasconcellos e equipe; Mayara Aline Baller** - 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 18/06/2018.

We certify that the proposal "Effects of different amounts of thermal energy added conditioner on the cooking of the starch, macrostructure of the kibbles, digestibility and palatability of pet food", utilizing 12 Cats (males and females), protocol number CEUA 3823050218 (ID 001767), under the responsibility of **Ricardo Souza Vasconcellos and team; Mayara Aline Baller** - 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 06/18/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **09/2018** a **12/2018**

Área: **Dzo-Zootecnia**

Origem: **Fazenda Experimental de Iguatemi**

Espécie: **Gatos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **4 a 5 anos**

N: **12**

Linhagem: **SRD (Sem Raça Definida)**

Peso: **3 a 6 kg**

Local do experimento: O trabalho será realizado no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Felinos Domésticos, localizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá. Este projeto foi inicialmente previsto para ser realizado na Instituição de origem da aluna, mas em virtude da agenda comprometida do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos [Prof. Dr. Flávio Prada] da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal, disponibilizamos nossa estrutura para a realização do experimento, em virtude da parceria existente entre os pesquisadores em outros projetos. Sendo assim, existiram algumas divergências de localização e dimensões das gaiolas entre o protocolo que está sendo submetido e o projeto anexo, que originalmente foi aprovado na FCAV/UNESP. As instalações estão localizadas a pelo menos 300m de outras criações e somente pessoas autorizadas adentram 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, 08 de junho de 2020

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

Profa. Dra. Erika Seki Kioshima Cótica
Coordenadora Adjunta da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Aplicação de energia termomecânica na formação dos kibbles, palatabilidade, digestibilidade e retenção de nutrientes em alimentos extrusados para cães e gatos.

RESUMO – A extrusão termoplástica de alimentos é uma operação versátil que pode ser aplicada em alimentos para cães e gatos. Os equipamentos usados para cozinhar, formatar, sanitizar, texturizar e moldar uma mistura homogênea de ingredientes, através da aplicação de umidade, pressão, temperatura e fricção mecânica em curto espaço de tempo. Estas condições melhoram a qualidade nutricional do alimento, com elevada produtividade e reduzido custo de produção. A extrusão promove mudanças físicas e químicas nos ingredientes, alterando sua digestibilidade, valor energético, forma de apreensão e palatabilidade. O processo de extrusão pode causar possíveis efeitos indesejáveis como destruição de vitaminas, oxidação de lipídeos e redução na disponibilidade de aminoácidos. Neste contexto, no escopo da nossa revisão não foi evidenciado aspectos relacionados as melhores condições de processamento para se otimizar a digestibilidade, palatabilidade e estabilidade dos nutrientes em formulações para cães e gatos. O objetivo geral foi estudar a influência da aplicação de energia térmica e energia mecânica na produção de alimentos extrusados para cães e gatos, influenciando avaliações de sua implicação na macroestrutura dos *kibbles*, digestibilidade, palatabilidade dos alimentos e retenção de nutrientes específicos. CAPÍTULO 1: Apresenta revisão de literatura sobre os temas propostos. CAPÍTULO 2: Foi avaliada a influência da aplicação de diferentes quantidades de energia térmica específica (ETE) durante a extrusão, sobre os parâmetros de processamento, macroestrutura dos kibbles, digestibilidade *in vitro*, gelatinização do amido, coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes, produtos de fermentação nas fezes e palatabilidade de formulação para gatos. Uma dieta padrão foi formulada e desdobrada em seis tratamentos pela modulação da adição de vapor, resultando em seis aplicações de ETE no pré-condicionador. Seis gatos por dieta foram empregados no estudo de digestibilidade e 30 nas comparações de palatabilidade. O aumento da aplicação de ETE resultou em redução linear da aplicação de energia mecânica específica (EME), aumento quadrático da aplicação de energia específica total (EET), melhora da macroestrutura com redução da densidade e aumento da expansão e aumento linear da gelatinização do amido ($P < 0,05$). O CDA dos nutrientes das rações não diferiu ($P > 0,05$), mas houve redução linear da concentração de ácidos graxos voláteis nas fezes dos gatos ($P < 0,05$), sugerindo melhor digestibilidade ileal e menor fermentação do colón. CAPÍTULO 3: Destinou-se à caracterização dos efeitos da moagem, da extrusão com três aplicações de EME (respectivamente 10, 20 e 30 kWh/t) e da secagem sobre a retenção das vitaminas A, B2 e B6 em formulação para cães. Foi verificado que para a vitamina A as etapas de moagem e secagem resultaram em perdas significativas do nutriente ($P < 0,05$), mas este não se reduziu na etapa de extrusão, independente da aplicação de EME ($P > 0,05$). A retenção final média de vitamina A foi de $40 \pm 5,51\%$. A forma comercial estudada de vitamina B2 mostrou-se estável, sem perdas significativas em nenhuma das etapas de processamento ($P > 0,05$). Já a vitamina B6 apresentou perda após extrusão ($P < 0,05$), sem efeito de moagem, secagem ou das diferentes aplicações de EME ($P > 0,05$). Foi verificada retenção média de $65 \pm 7,57\%$ da vitamina B6. CAPÍTULO 4: Foram avaliados os efeitos do processo de extrusão sobre a retenção de três fontes de selênio em formulação para cães: selênio levedura; selenito

de sódio para alimentação animal; selenito de sódio anidro purificado para análise. Para isto cada fonte de selênio foi adicionada nas concentrações de 0 µg/kg (controle), 400 µg/kg e 800 µg/kg. O selênio na dieta controle teve origem apenas nas matérias primas e não foi afetado pelo processamento ($P < 0,05$). Observou-se pequena redução do selênio total ($7 \pm 0,30\%$; $P < 0,05$) na dieta com 800 µg/kg de selênio levedura, mas não na dieta com 400 µg/kg de selênio levedura, com taxas de recuperação variando de 93% a 104% (comparando-se com os valores da mistura antes da extrusão). Nas dietas suplementadas com as duas fontes de selenito de sódio observou-se menor concentração de selênio total após extrusão, com taxas de recuperação variando de 62% a 86% e perda média de $23,4 \pm 3,04\%$ ($P < 0,01$). A forma comercial estudada de selênio levedura mostrou-se estável, sem perdas significativas durante a produção de alimentos extrusados para cães. Perdas significativas de selênio podem ser observadas no selenito de sódio, o que deve ser considerado nas formulações. Como conclusão geral desta tese, verificou-se efeito relevante da aplicação de ETE na formação e palatabilidade dos kibbles, com aumento significativo da produtividade e eficiência de extrusão. A vitamina A apresentou perda significativa na moagem e secagem, etapas que expuseram o composto ao oxigênio. Vitamina B2 foi estável durante o processo, mas vitamina B6 se degradou na etapa de extrusão propriamente dita. O selenito de sódio demonstrou perda significativa com a extrusão, fato não verificado com o selênio levedura.

Palavras-chaves: extrusão, retinol, piridoxina, riboflavina, pet food, energia mecânica, energia térmica, selênio.

Application of thermomechanical energy in the formation of kibbles, palatability, digestibility and nutrient retention in extruded food for dogs and cats.

SUMMARY - Extrusion is a versatile operation that can be applied to a variety of food processing. Extruders are used to cook, shape, sanitize, texturize and mold a homogeneous mixture of ingredients, by applying moisture, pressure, temperature and mechanical friction in a short time. These conditions increase the nutritional quality, with elevated productivity and relatively small production costs. Extrusion promotes physical and chemical changes in ingredients, altering their digestibility, energy value, the mechanic of apprehension and palatability. Undesirable effects, such as destruction of vitamins, oxidation of lipids and reduced availability of amino acids need also to be considered. The best processing conditions to optimize digestibility, palatability and nutrients stability in dog and cat formulations are not known. CHAPTER 1: Addresses a literature review on the proposed topics. CHAPTER 2: The influence of the application of different amounts of specific thermal energy (STE) on processing parameters, kibbles macrostructure, starch gelatinization, coefficients of apparent total tract digestibility (CDA), fermentation products on feces, and palatability of cat food was evaluated. A standard diet was formulated and divided into six treatments, consisted by six STE applications in the preconditioner by modulating steam input. Six cats per diet were used for the digestibility study, and 30 for palatability comparisons. The increase in STE application resulted in linear reduction on specific mechanical energy (SME) application, quadratic increase in total specific energy (TSE) implementation, improvement of kibble macrostructure with reduced density and increased expansion, and in linear increase on starch gelatinization ($P < 0.05$). The CDA of nutrients did not differ ($P > 0.05$), but a linear reduction on volatile fatty acids on cat feces was observed ($P < 0.05$), suggesting higher ileal digestibility and lower fermentation on colon. CHAPTER 3: The effects of grinding, extrusion with three SME applications (respectively 10, 20 and 30 kWh/t), and drying were evaluated on the retention of vitamins A, B2 and B6 in a formulation for dogs. To vitamin A was observed that the grinding and drying steps resulted in significant losses ($P < 0.05$), but this vitamin did not decrease at the extrusion step, regardless of the SME application amount ($P > 0.05$). An average final retention of $40 \pm 5.51\%$ of vitamin A was observed. The commercial form of vitamin B2 studied proved be stable, without significant losses in any processing steps ($P > 0.05$). The vitamin B6, on the other hand, showed loss after extrusion, without effect of grinding, drying or the different applications of SME ($P > 0.05$). The average retention of vitamin B6 was $65 \pm 7.57\%$. CHAPTER 4: The effects of the extrusion process on the retention of three selenium sources were evaluated: selenium-yeast, commercial sodium selenite for animal feed, purified anhydrous sodium selenite. The three selenium sources were added at 0 $\mu\text{g/kg}$ (control), 400 $\mu\text{g/kg}$ and 800 $\mu\text{g/kg}$. Selenium in the control diet was derived only from ingredients and was not affected by processing ($P < 0.05$). A small reduction in total selenium was observed for the 800 $\mu\text{g/kg}$ selenium-yeast treatment ($7 \pm 0.30\%$ reduction; $P < 0.05$), but no alteration was observed for the 400 $\mu\text{g/kg}$ selenium yeast diet ($P > 0.05$), with recovery rates ranging from 93% to 104% (comparing with the values of the ingredient mixture before extrusion). Lower total selenium concentration

was observed after the extrusion of the diets supplemented with both sodium selenite sources, with recovery rates ranging from 62% to 86% and an average loss of $23.4 \pm 3.04\%$ ($P < 0.01$). The commercial selenium-yeast presentation studied proved be stable, without significant losses along the processing steps evaluated. Significant selenium losses can be observed for sodium selenite, what should be considered during formulation. As a general conclusion of this thesis, there was a relevant effect of the application of STE on the formation and palatability of the kibbles, with a significant increase in productivity and efficiency of extrusion. Vitamin A showed significant loss in grinding and drying, steps that exposed the compound to oxygen. Vitamin B2 was stable during the process, but vitamin B6 was degraded in the extrusion step itself. Sodium selenite showed significant loss with extrusion, a fact not verified with yeast selenium.

Keywords: extrusion, retinol, pyridoxine, riboflavin, pet food, mechanical energy, thermal energy, selenium.

LISTA DE TABELAS

<u>Capítulo 1</u>	Página
Tabela 1. Retenção de vitaminas e minerais em alimentos extrusados.	27
<u>Capítulo 2</u>	
Table 1. Ingredients and analyzed chemical composition (values before coating with poultry fat and palatant) of the experimental diet for cats used in Experiments 1 and 2.	44
Table 2. Analyzed chemical composition of a cat food formulation extruded with different specific thermal energy applications (Experiment 1). Values are as fed to cats, after coating with poultry fat and palatant enhancer.	50
Table 3. Processing characteristics and starch gelatinization for a cat food formulation extruded using different specific thermal energy applications on preconditioner (Experiment 1).	53
Table 4. Kibble macrostructure, starch gelatinization, and in vitro digestibility of a cat food formulation extruded with different temperatures of preconditioner (Experiment 1). The reported values are of the kibbles after the drier step.	55
Table 5. Nutrient intake and total tract apparent digestibility of nutrients and energy of a cat food formulation extruded with different temperatures of preconditioner (Experiment 1).	57
Table 6. Fecal characteristics and fermentation products content for cats fed a food formulation extruded with different temperatures of preconditioner (Experiment 1).	58
Table 7. Results of the preference comparisons on cats fed a food formulation extruded with different specific thermal energy applications on preconditioner (Experiment 1).	59
Table 8. Processing characteristics, kibble macrostructure, starch gelatinization, and in vitro digestibility of the OM of a cat food formulation extruded with different temperatures of preconditioner and product flow rates (Experiment 2).	61
<u>Capítulo 3</u>	
Table 1. Ingredients and analyzed chemical composition of the experimental diet for dogs.	81
Table 2. Processing parameters of a dog food recipe to obtain three different specific mechanical energy applications to raw material (n = 4 replicates treatment).	82

Table 3. Vitamin A (retinol acetate) concentration along the production of a dog formulation extruded with different applications of specific mechanical energy.	87
Table 4. Vitamin B2 (riboflavin) contents of a dog formulation processed with different applications of specific mechanical energy in the extruder.	88
Table 5. Vitamin B6 (pyridoxine hydrochloride) contents of a dog formulation processed with different applications of specific mechanical energy in the extruder.	89

Capítulo 4

Table 1. Ingredients and analyzed chemical composition of the experimental diet for dogs.	101
Table 2. Analyzed selenium concentration (DM-basis) along the diet processing.	105

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui aproximadamente 54,2 milhões de cães e 23,9 milhões de gatos, números que posicionam o país em quarto lugar no “ranking” mundial quanto ao faturamento do mercado de alimentos para animais de estimação (Abinpet, 2019). Este mercado evoluiu consideravelmente, diversificando e sofisticando formulações, ingredientes e processamentos para atender a demanda de consumidores cada vez mais exigentes. Cerca de 95% dos alimentos secos para cães e gatos são produzidos com tecnologia de extrusão *high-temperature-short-time* (HTST) (Spears and Fahey, 2004). O processo de extrusão surgiu nos anos 40 e atualmente é usado nos mais diversos tipos de indústrias, como a de polímeros orgânicos (alimentos) e inorgânicos, metais, cerâmicas, tintas, entre outras. O processo de extrusão é comumente utilizado pela indústria pois permite o processamento de vários ingredientes, de interesse nutricional para várias espécies animais e inclusive para seres humanos.

A extrusão termoplástica de alimentos consiste na cocção da mistura de ingredientes, promovendo sanitização, texturização e formatação da massa a partir da presença de umidade, pressão, temperatura e fricção mecânica em curto espaço de tempo (Riaz, 2000; Tran, 2008). A extrusão termoplástica pode incluir as etapas de condicionamento, extrusão propriamente dita, corte e secagem, com funções específicas no cozimento e na qualidade do produto final. Essa combinação permite a modificação estrutural, funcional e nutricional dos ingredientes utilizados, melhorando suas características alimentares (Moscicki, 2011).

Para atingir as características específicas do produto, combinações suficientes de energia mecânica e térmica devem ser aplicadas durante o processo de extrusão. Esta combinação, juntamente com umidade e tempo suficiente de retenção da massa no processo induz mudanças químicas e físicas nos ingredientes (Moscicki, 2011). A implementação de energia mecânica no processo de fabricação de ração para cães e gatos é feita por meio da energia elétrica, consumida para impulsionar o movimento de rotação da rosca extrusora, que comprime a massa de encontro ao revestimento do tubo extrusor e junto à matriz extrusora no final do equipamento. O consumo

elétrico é geralmente expresso em kWh por tonelada de alimento produzido (kWh/t). A energia térmica na extrusão é oriunda principalmente da adição de vapor de água no pré-condicionador e no canhão extrusor (Riaz, 2000).

Foram encontrados poucos trabalhos com informações sobre as melhores condições de processamento de formulações para cães e gatos. Não se conhece, também, as implicações dos diferentes parâmetros de processo sobre as características nutricionais, digestibilidade dos nutrientes e palatabilidade dos alimentos para estes animais. Infelizmente, por vezes, a indústria limita-se a observar a aparência e a densidade aparente dos produtos para o estabelecimento dos parâmetros de produção, deixando de considerar aspectos importantes relativos ao seu valor nutricional, retenção de nutrientes, respostas metabólicas e digestibilidade.

Estudos avaliando aspectos digestivos e metabólicos são de suma importância devido ao fato da extrusão poder promover efeitos indesejáveis, incluindo destruição de vitaminas, oxidação de lipídeos e redução na disponibilidade de aminoácidos, principalmente da lisina, envolvida na reação de Maillard (Lankhorst et al., 2007). Desta forma, a presente Tese de Doutorado teve como objetivo geral estudar a influência da aplicação de energia térmica e energia mecânica na produção de alimentos extrusados para cães e gatos, incluindo avaliações de sua implicação na macroestrutura dos *kibbles*, digestibilidade, palatabilidade dos alimentos e retenção de nutrientes específicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mistura

O ponto inicial do processo de fabricação de alimentos para cães e gatos é a mistura, que tem por objetivo fornecer ao animal ração completa e balanceada, favorecendo o consumo regular de todos os nutrientes (Paiano et al., 2014). A correta mistura é ainda necessária para homogeneizar a massa e permitir, assim, processamento regular, uniforme e estável. O sucesso desta etapa está relacionado com vários fatores, incluindo: tamanho de partícula, formato da partícula, carga estática da partícula, capacidade hidrocópica, composição de ingredientes, desenho construtivo e condições de operação do equipamento e tempo de mistura. Estes fatores irão afetar diretamente a homogeneidade da mistura, consumo de energia elétrica e rendimento da moagem (kg/h). É possível avaliar a qualidade da mistura utilizando-se o coeficiente de variação (CV). Atualmente as indústrias aceitam como parâmetro técnico de dispersão dos ingredientes um CV igual ou menor a 10% (Johnston and Southern, 2000). As implicações práticas de uma mistura apresentar alta variação do tamanho de partícula são: desmistura, diminuição da fluidez do material durante o transporte, redução da hidratação dos grânulos, diminuição do cozimento, redução da digestibilidade aparente, irregularidade de aparência e formatação (Riaz, 2000).

A mistura é conduzida primeiramente pela adição dos macro ingredientes, ou seja, os ingredientes de maior inclusão na fórmula como cereais (milho, arroz, etc), fontes de proteína (farinha de vísceras de frango, farelo de soja, etc...), fontes de fibra, etc., que são dosados em sistemas automatizados ou de forma manual. Em seguida adiciona-se os micros ingredientes, com pesagem e inclusão manual ou automatizada. Todas as inclusões de matérias primas são baseadas em uma formulação pré-estabelecida. Posteriormente esse conjunto de matérias primas é encaminhado para um misturador horizontal de pás ou de fitas e em seguida para a moagem. Detalhes das características, vantagens e desvantagens dos diferentes sistemas de mistura podem ser encontradas nas publicações: Riaz, (2000); Frame, (2004); Moscicki, (2011); Riaz, (2012).

2.2 Moagem

A redução do tamanho das partículas, comumente chamada de moagem, tem como principais funções proporcionar mistura homogênea dos ingredientes e melhorar o processamento de alimentos extrusados (Fraiha et al., 2005). Atualmente em *pet food* o método de redução de tamanho de partículas mais utilizado é o moinho de martelos (Cowell et al., 2000). O sistema de moagem utilizando-se moinhos de martelo permite processamento de grande variedade de ingredientes e redução no tamanho da partículas a um menor custo relativo (Pozza et al., 2005).

A redução do tamanho de partículas é feita através de um processo elementar, a quebra ou fratura das partículas. O resultado é a formação de fragmentos de diferentes tamanhos e formas (Wellenhkamp, 1999). Os moinhos de martelo podem ser divididos em três elementos principais: bandeja de alimentação, rotor de martelos e câmara de moagem. A bandeja de alimentação consiste no espaço onde a mistura de ingredientes é depositada para ser moída. O rotor de martelos consiste em um eixo com rotação de 1800 ou 3600 rpm onde estão fixados os martelos, responsável pela moagem. Ao redor desse sistema é fixada uma peneira. Os diâmetros dos furos das peneiras variam, dependendo da característica final desejada para o produto. O impacto da mistura de ingredientes com os martelos, que a direciona com velocidade contra as paredes da câmara de moagem resulta na redução do tamanho das partículas, que quando pequenas o suficiente, passam pelos furos da peneira e são removidas da câmara de moagem. O atrito causado pelo contato da mistura de ingredientes com a movimentação dos martelos causa a liberação de energia e, consequentemente, aumento da temperatura na câmara de moagem e diminuição da produtividade. Para que não ocorra perdas de produtividade provenientes do aumento da temperatura são utilizados sistemas de exaustão, com a instalação de ventiladores centrífugos responsáveis por fluxo de ar contínuo, aumento da vazão e diminuição da pressão estática dentro da câmara de moagem (Alles, 2003). Aumentos excessivos de temperatura associados podem ocasionar danos ao alimento processado (Tran, 2008).

Estima-se que 3% de toda a energia consumida no mundo seja gasta para a redução do tamanho de partículas, incluindo minérios e insumos para as indústrias química, farmacêutica e alimentícia (Tavares, 2001). Desse modo, apesar da moagem proporcionar mistura homogênea dos ingredientes, facilitar o processo de extrusão e melhorar a qualidade final dos produtos, ela é também responsável por parcela relevante do custo de produção das rações.

Healy et al., (1994) estudaram a influência da redução do tamanho da partícula na produtividade e consumo de energia. Os resultados demonstraram que a energia elétrica gasta para a moagem do grão de milho a 900 μm foi de 5,3 kWh/t, com uma produção de 1,76 t/h. Com a redução do tamanho da partícula para 300 μm , o que corresponde ao normalmente empregado em pet food, ocorreu aumento no consumo de energia elétrica para 24,5 kWh/t e redução na produção de ração para 0,65 t/h. Em estudo realizado por Pozza et al., (2005) foi demonstrado gasto de 6,13 a 20,03 kWh-t para redução de partícula ao tamanho geométrico médio de 912 a 464 μm , respectivamente. Esses resultados demonstraram que o tamanho da partícula desejado e as configurações dos martelos do moinho influenciam na eficiência na moagem e relação gasto de energia por tonelada/hora. Quanto maior a velocidade periférica transmitida ao equipamento, maior será o impacto do martelo com o ingrediente e menor vai ser o tamanho das partículas. Outro fator determinante na produtividade do sistema de moagem é a relação entre a área aberta da peneira e a potência do motor (Alles, 2003). Portanto, existe a necessidade de pesquisas que busquem aperfeiçoar a moagem de forma a maximizar o aproveitamento do alimento pelo animal e diminuir o uso da energia elétrica.

Apesar da operação de moagem ser normalmente a mesma para diferentes formulações, o ideal seria variá-la em função das matérias primas da formulação. Bazolli et al., (2015) demonstrou interação entre moagem e ingredientes; em formulações à base de quirera de arroz, milho e sorgo, com peneiras de 0,8mm, 1,5 mm e 3,0 mm obtiveram, respectivamente, diâmetro geométrico médio (DGM) para a formulação à base de quirera de arroz de $277 \pm 2,6$, $311 \pm 2,6$ e $521 \pm 2,5 \mu\text{m}$, para a formulação a base de sorgo $314 \pm 2,4$, $439 \pm 2,4$ e $594 \pm 2,3 \mu\text{m}$, e para a formulação com milho $360 \pm 2,2$, $451 \pm 2,1$ e $619 \pm 2,2 \mu\text{m}$. Assim, foi verificado que o arroz é menos

resistente e fragmenta-se em partículas menores, o sorgo de maneira intermediária e o milho demonstrou ser cereal mais rígido, que resultou em maiores DGM da matéria prima.

2.3 Pré-condicionamento

Para chegar ao pré-condicionador, a mistura de ingredientes passa pelo sistema de alimentação. O alimentador influencia diretamente na produtividade do sistema. O sistema de alimentação é determinante para a entrada constante e uniforme da quantidade de ração (Alles, 2003). Existem dois sistemas de alimentação: a dosagem volumétrica e a gravimétrica. A dosagem volumétrica é dependente das propriedades físico-químicas da mistura de ingredientes, como densidade, viscosidade e granulometria. A alimentação gravimétrica utiliza balança para acionar a saída da mistura de ingredientes, este sistema elimina qualquer variação proveniente da mudança ou da alteração das características físico-químicas da mistura. Pelo alimentador a mistura previamente moída e homogeneizada chega ao pré-condicionador. O pré-condicionador é formado por câmara atmosférica ou pressurizada. Os pré-condicionadores pressurizados podem atingir temperaturas de descarga mais altas que 100°C, mas têm o potencial de maior destruição de nutrientes e custos operacionais mais elevados (Rokey et al., 2010). Desta forma, a indústria emprega de rotina pré-condicionadores atmosféricos.

No pré-condicionador a mistura de ingredientes será misturada primeiramente com a água e o vapor, permitindo a penetração da água e hidratação dos grânulos de amido (Riaz, 2000). A água é introduzida a partir do início e da superfície do pré-condicionador, utilizando bicos de pulverização para atomizar a corrente de água, reduzindo assim a carga de mistura no pré-condicionador. O vapor é adicionado a partir do fundo do pré-condicionador e a tubulação de suprimento deve ser projetada para fornecer fluxo contínuo de vapor, sem infusão de água condensada (Rokey et al., 2010). Água, vapor e ração são homogeneizados e transformados em massa uniforme mediante a ação de sistema de barras cilíndricas com pás dispostas radialmente, girando a velocidade variável (Bazolli et al., 2015).

A adição de água e vapor representam adição de energia térmica específica (ETE), e tem como objetivo aumentar a umidade e a temperatura da massa, iniciando o cozimento do amido e com isto favorecendo a hidratação interna dos grânulos, plasticização, sanitização, estabilidade e produtividade da extrusora, com ganhos também em qualidade do produto (Pacheco, et al., 2018). O aumento da umidade e temperatura causados pela injeção de vapor (energia térmica) são vantajoso em termos econômicos, pois diminuem a fricção da massa e aumentam a produtividade, reduzindo o consumo de energia mecânica (energia elétrica) e o desgaste das peças (Riaz, 2000). As taxas de fluxo de vapor e água são geralmente balanceadas para se alcançar temperatura da mistura na descarga do pré-condicionador de 70 a 90 ° C, com teores de umidade entre 25 e 26%, podendo-se observar no máximo até 40% de cozimento do amido (Rokey et al., 2010). Além da temperatura, fator importante para o cozimento do amido é o tempo de residência. O tempo de retenção ou residência é dependente da taxa de alimentação do sistema, de seus caracteres construtivos e volume e da velocidade de rotação das pás (Riaz, 2000). Aumentar o tempo de residência no pré-condicionador e a quantidade de vapor adicionada ao produto aumentará a transferência de ETE e o cozimento, com ganhos na etapa de extrusão e na qualidade final dos kibbles. O ajuste do tempo de permanência no pré-condicionador, a depender das características e necessidades de cada formulação, pode ser modulado alterando-se a configuração de suas pás e da velocidade de rotação das mesmas (Rokey et al., 2010).

As condições de processamento do pré-condicionador que podem ser controladas ao longo da operação são adição total de umidade, temperatura do produto, adição de mistura farelada e o tempo de retenção por meio da velocidade de rotação das pás (Rokey et al., 2010). Em estudo realizado por Pacheco et al., (2018) com formulação para cães, o aumento da aplicação de ETE por injeção direta de vapor no pré-condicionador diminuiu a energia mecânica específica (EME) necessária para gelatinizar o amido. Aplicação mais elevada de ETE resultou em aumento da aplicação de energia específica total, maior gelatinização de amido, maior expansão dos kibbles e digestibilidade in vitro da matéria orgânica. A digestibilidade aparente dos nutrientes e a palatabilidade para cães, no entanto, não foram afetadas. Estudos semelhantes, no entanto, não foram encontrados com formulação para gatos.

Alguns ingredientes líquidos como carne fresca, óleo, aromas, corantes e outros aditivos podem ser também introduzidos no pré-condicionador. Para garantir mistura completa e contínua de todos os ingredientes que entram no canhão ou tubo da extrusora, é preciso observar o local da adição e o tempo de retenção desses ingredientes no pré-condicionador, para que ocorra mistura adequada dos mesmos. Ingredientes líquidos são adicionados mais precocemente e lipídicos mais caudalmente no pré-condicionador, pois a gordura tende a revestir partículas de matéria prima, dificultando a absorção de umidade e a transferência de energia térmica para a gelatinização do amido, motivo pelo qual normalmente é adicionada depois da adição de água, mais para o final do pré-condicionador (Rokey et al., 2010).

A umidade de processo e a necessidade de aplicação de ETE são muito dependentes da formulação em processamento. Alimentos à base de amido, como cereais matinais para seres humanos são processados com baixa umidade e mediante emprego apenas de energia mecânica, não recebem vapor no pré-condicionador. Fórmulas pet food, muito mais complexas por serem matriz completa e balanceada de nutrientes, com elevada proteína, gordura e fibra, e proporcionalmente menos amido requerem maior umidade e expressiva quantidade de ETE, que se torna em realidade a principal energia aplicada, quantitativamente maior que a EME (Pacheco, et al., 2018). Desta forma, a produção de alimentos completos e balanceados para cães e gatos foi repensada nas últimas décadas em relação à implementação de energia, com aumento da tecnologia de pré-condicionamento. Os pré-condicionadores tornaram-se mais eficiente, maiores, com maior tempo de retenção da mistura, tornando mais eficientes as funções de mistura, capacidade de incorporação e homogeneização de diferentes ingredientes líquidos, hidratação das partículas, aplicação de ETE e cozimento. Muito deste desenvolvimento nos conceitos de processamento se baseou em aspectos de engenharia e necessidade de cozimento e formatação adequada dos extrusados. Este desenvolvimento também ocorreu no sentido de tornar possível o emprego de ingredientes líquidos como as carnes e os óleos. No entanto, permanece ainda não elucidado como o cozimento por EME ou ETE influencia as transformações e digestibilidade dos nutrientes, a retenção de nutrientes termolábeis, as respostas metabólicas, a palatabilidade e a cinética de consumo das rações.

2.4 Extrusora de rosca simples

Em seguida ao pré-condicionador, a massa em processamento é conduzida para o canhão da extrusora, um tubo com sistema de rosca sem fim girando a velocidade que pode ser variável em seu interior. Extrusoras de rosca simples são as mais utilizadas para a produção de alimentos extrusados secos para cães e gatos (Riaz, 2007). Existe grande variedade de marcas e modelos de equipamentos, configurados para que promovam implementação média de 10 a 35 kWh/ton de EME para adequado processamento. A necessidade de aplicação de EME pode ser bastante variável entre as diversas formulações de ingredientes e modelos constitutivos de marcas e modelos de extrusor (Moscicki, 2011).

Este sistema irá comprimir a mistura promovendo a implementação de EME pela rotação da rosca da extrusora, que promove cisalhamento da massa contra seu revestimento, ou camisa, e comprime a massa contra a matriz, na extremidade do cilindro, criando pressão, fricção e temperatura (Riaz, 2000). O atrito criado pela ação da rosca sobre as partículas dissipará a EME, resultando em elevação da temperatura e pressão que em combinação com a umidade resultará na gelatinização do amido e desnaturação e reorganização das proteínas, induzindo a transição de fases da massa e sua plasticização, obtendo-se assim novas formas e texturas características. As pressões e temperaturas no final do canhão podem atingir, respectivamente, mais de 60 bars e 160°C, embora usualmente se trabalhe com pressões de 20 a 40 bars e temperaturas de 120 a 140°C. Toda esta energia e compressão em um fluxo laminar modificam profundamente os amidos e proteínas, o que será discutido mais adiante. O processo de extrusão permite o cozimento completo do amido em poucos segundos e a baixa umidade (Gibson and Alavi, 2013). Na saída da extrusora existe, por fim, o sistema de corte, composto por facas em disposição perpendicular e rotação variável, que cortam a massa no tamanho desejado (Riaz, 2000).

O uso generalizado da extrusão termoplástica de médio cisalhamento na indústria *pet food* deve-se ao fato dela promover mudanças físicas e químicas nos ingredientes, alterando sua qualidade e propriedades físicas, aumentando seu valor nutricional e palatabilidade com eficiência e baixo custo relativo (Griffin, 2003; Tran,

2008). A aplicação de energia termomecânica no processo induz alterações vantajosas e desejáveis em alimentos para cães e gatos, como: aumento da digestibilidade dos cereais, melhora da palatabilidade do alimento, modificações de atributos texturais favorecendo a apreensão e mastigação, inativação de fatores antinutricionais termolábeis, destruição de microrganismos, aumento da vida de prateleira, ampliação das possibilidades de uso de matérias primas, desnaturação de proteínas com melhora de sua digestibilidade (Lankhorst et al., 2007). Os ganhos em digestibilidade e palatabilidade em cereais talvez sejam os efeitos mais notórios, promovidos pela gelatinização e plasticização do amido e desnaturação da proteína, que se tornam mais digeríveis pelas enzimas digestivas em cães e gatos (Koppel, 2014; Pekel et al., 2020).

Estudo realizado por Roberti-Filho (2013) avaliou dietas para cães à base de milho e farinha de vísceras de frango, utilizando para isto arranjo fatorial de tratamentos com 4 diferentes moagens (moinho de martelos com peneiras de 0,5 milímetros, 0,8 milímetros, 1,4 milímetros e 2,0 milímetros) e duas configurações de extrusão (área aberta da matriz de 63,9mm² e 23,7mm²). Foi verificado que a configuração da extrusora afetou a gelatinização do amido, mas não alterou a digestibilidade dos nutrientes. Por outro lado, a digestibilidade dos nutrientes reduziu linearmente quando o tamanho das partículas da matéria prima aumentou. A redução da digestibilidade verificada foi atribuída à redução na gelatinização do amido (redução de 86% para 69% de gelatinização) e à indisponibilidade dos grânulos inteiros, grosseiramente moídos com o aumento do tamanho de partículas. Nestas condições existe limitação do contato entre as enzimas e o substratos no trato digestivo, com menor aproveitamento da dieta (Amerah et al., 2008).

Outro aspecto relativo ao tamanho de partículas da matéria-prima é o consumo de energia para a extrusão do alimento. No experimento de Roberti-Filho (2013), a implementação de EME diminuiu linearmente com o aumento no tamanho de partículas de milho. Isto pode ser explicado pela redução da viscosidade consequente à menor gelatinização do milho grosseiramente moído, reduzindo a resistência da massa ao fluxo no interior da extrusora. Esta limitação de aplicação de energia pode parecer vantajosa, por reduzir os custos de produção, mas na realidade representa a

ocorrência de processamento inadequado, pois as partículas grosseiramente moídas não hidratam e seu amido permanece cru e com digestibilidade menor. Em estudo que avaliou formulação para felinos, Gonçalves (2016) verificou que o tamanho das partículas da matéria-prima e a área aberta da extrusora têm influência importante nos parâmetros de extrusão, transferência de EME e formação de kibbles. O menor DGM (moagem mais fina dos ingredientes) e área aberta mais restritiva induziram maior expansão dos kibbles e gelatinização de amido. No entanto, a digestibilidade dos nutrientes pelos gatos não melhorou quando o DGM for menor que 254 μm , não demonstrando vantagem para uma moagem demasiadamente fina.

No entanto, a extrusão também pode promover efeitos indesejáveis, incluindo destruição de vitaminas, oxidação de lipídeos, destruição e redução na disponibilidade de aminoácidos, principalmente da lisina envolvida na reação de Maillard (Lankhorst et al., 2007). Devido a isto, e também de modo a se evitar gastos adicionais oriundos da aplicação desnecessária de energia nos processos de moagem e extrusão, o balanço entre os efeitos desejáveis e indesejáveis deve sempre ser buscado com a aplicação necessária e suficiente de energia térmica e mecânica.

2.4.1 Balanço de energia, energia mecânica específica e energia térmica específica

A ETE é implementada pela injeção de vapor, que ocorre principalmente no pré-condicionador, mas também pode ocorrer no interior do canhão extrusor (Riaz, 200). Já a EME corresponde a quantidade de energia necessária para transportar para fora do canhão extrusor o material em processamento, sendo depende diretamente da potência do motor, características intrínsecas da massa, umidade de processamento, quantidade total de material processado por determinado período de tempo (μ) e da resistência ao fluxo laminar, imposta por características como área aberta para saída do material na matriz extrusora, geometria da rosca extrusora e da camisa e presença de elementos de restrição como anéis de retenção. Para extrusar rações secas para gatos utiliza-se EME entre 20 a 35 kWh de EME por tonelada de produto produzido, alimentos para cães, geralmente requerem apenas 10 a 25 kWh por tonelada (Dunsford et al., 2002).

A relação inversa entre a implementação de ETE e EME, comentada no item 2.3 Pré-condicionamento, é conhecida (Riaz, 2000). Esta está associada à redução potencialmente relevante no custo de processamento devido a diminuição direta no consumo de energia elétrica e do desgaste do equipamento, ocasionado pelo menor cisalhamento da massa contra a superfície da rosca e da matriz extrusora (Riaz, 2007). Uma Tese de Doutorado de nosso grupo de pesquisa foi pioneira em avaliar os efeitos de diferentes aplicações de EME e ETE na produção de alimentos para cães e gatos (Sá, 2015). Vantagens foram verificadas quando mais ETE foi implementada, com redução proporcional da implementação de EME, estas incluíram: ganho em palatabilidade, tanto para cães como para gatos; menor custo de processamento, somando o menor custo relativo do vapor em relação à energia elétrica e o menor custo com desgaste de equipamentos, que é maior à medida que mais EME é implementada; menor perda de nutrientes, pois aminoácidos e selênio tiveram maiores perdas e a formação de lisina reativa (que indica dano à proteína) foi maior no tratamento com mais EME. Como a menor aplicação de EME foi compensada com maior ETE, o cozimento do amido foi igual entre rações, bem como a digestibilidade dos nutrientes.

Outra publicação de nosso grupo de pesquisa demonstrou a importância da ETE ao avaliar diferentes implementações de vapor no pré-condicionador, durante a produção de ração para cães (Pacheco, et al., 2018). Verificou-se com o aumento da ETE redução importante da EME, no entanto, constatou-se aumento da implementação de energia específica total (EET) no sistema, com melhor formação dos kibbles e maior cozimento do amido. Suficiente implementação de ETE no pré-condicionador também propiciou aumento expressivo de produtividade do sistema de extrusão; mantendo-se a mesma aplicação de EME, a ETE suplementar permitiu elevação da produtividade horária em 51%, representando ganho relevante de produtividade e eficiência.

Outra forma de se adicionar energia térmica e se controlar a aplicação de EME é por meio da umidade de processamento. Em outra publicação de nosso grupo (Baller, et al., 2018), foi demonstrado que a elevação de umidade de processamento pela adição de água à massa no tubo extrusor resultou em redução da aplicação de

EME, da temperatura e da pressão da massa na extrusora, da gelatinização do amido e da digestibilidade in vitro da matéria orgânica. Desta forma existe limite para a adição de água e vapor no processamento, pois elevação da umidade acima de um valor adequado resulta em excessiva lubrificação da massa, limitação do cozimento e plasticização com menor formação de viscosidade e insuficiente aplicação de EME impedindo adequada formatação dos kibbles.

A EME pode ser calculada considerando-se a potência do motor, consumo de energia elétrica e a produtividade horária, utilizando-se a seguinte equação (Riaz, 2007):

$$EME = (\sqrt{3} \times \text{voltagem} \times (A_t - A_v) \times \cos\phi) / 1000 \times 1000 / \text{Produção horária}$$

Onde:

Voltagem do motor (220V);

A_t = Amperagem de trabalho do motor;

A_v = Amperagem do motor ligado vazio;

$\cos\phi$ = cosseno de ϕ .

A ETE pode ser calculada pelo balanço de massas e energia do pré-condicionador e da extrusora. Em linhas gerais são registrados ou estimados as entradas e saídas de água, de ração e de vapor, bem como as temperaturas e calor específico de cada material (Riaz; 2000):

Equação do balanço de energia no condicionador:

$$Q_m + Q_{ag} + Q_v = Q_{vp} + Q_{mp} + \sum \Delta h_{reação}$$

Equação do balanço de energia na extrusora:

$$Q_{mp} + Q_{ag} + Q_{sme} + Q_{te} = Q_{mf} + Q_{vp} + \sum \Delta h_{reação}$$

Onde:

Q_m = quantidade de calor da massa inicial;

Q_{mp} = quantidade de calor da massa no condicionador;

Q_{ag} = quantidade de calor da água adicionada ao sistema;

Q_{sme} = quantidade de energia mecânica específica;

Q_v = quantidade de energia de vapor adicionado ao sistema;

Q_{te} = quantidade de energia térmica;

Q_{mf} = quantidade de calor da massa final;

Q_{vp} = quantidade de calor da perda de vapor;

$\Sigma \Delta h$ = entalpia da reação.

A quantidade de calor (Q) é obtida a partir da fórmula:

$$Q = m.c.T$$

Onde:

m = massa;

c = calor específico;

T = temperatura do sistema.

Equação do balanço de massas no condicionador:

$$M_{rf} + M_{ag} + M_v = M_{vp} + M_p$$

Equação do balanço de massas na extrusora:

$$M_p + M_{ag} = M_{vp} + M_f$$

Onde:

M_{rf} = massa ração farelada;

M_{ag} = massa da água;

M_v = massa do vapor;

M_{vp} = massa do vapor perdido;

M_p = massa do condicionador;

M_f = massa final.

Por fim, pode-se obter a EET pela soma da EME com a ETE (Riaz, 2000).

2.5 Secador

Na etapa posterior ao corte, o produto é direcionado ao secador para redução de sua umidade para valores entre 5 e 10% e atividade de água a valores normalmente abaixo de 0,6. Como água e vapor são adicionados à formulação do produto durante o pré-condicionamento e a extrusão, para permitir o cozimento e a formação do produto final, esta deve ser removida antes do ensaque para estabilidade do alimento. Embora a água e o vapor sejam necessários para a extrusão, o excesso de água livre no produto acarretará problemas de qualidade com vida útil reduzida devido ao crescimento de microrganismos e ocorrência de reações químicas e enzimáticas.

O secador remove água do produto por evaporação, usando a menor quantidade de energia possível, preservando assim as características desejadas do produto final. Os fatores básicos que controlam a secagem são temperatura, fluxo de ar, tempo de retenção, mistura/espalhamento, condições do ar do processo e características físicas e químicas do produto (Hill, 2003).

2.6 Efeito da extrusão nos nutrientes e na palatabilidade

2.6.1 Amido

O amido encontrado nos grãos de cereais (arroz, milho, trigo e sorgo) é a fonte nutricional de energia em maior proporção nas rações extrusadas para cães. Cereais apresentam de 50% a 80% de amido em sua composição química. Este é classificado como polissacarídeo com ligações alfa glicosídicas, susceptíveis a ação enzimática. Suas características nutricionais dependem das características de ligações químicas, forma de cristalização, geometria dos grânulos, interação do grânulo com proteínas, além de fatores físico-químico da digestão (Carciofi et al., 2008). Estruturalmente, o amido dos cereais se encontra como partículas semi-esféricas altamente ordenadas, denominadas grânulos, formados por cadeias de amilose e amilopectina (Ratnayake e Jackson, 2003).

O amido é o principal componente para que a extrusão ocorra de forma apropriada (Crane et al., 2000). O processamento do amido, desde a moagem até o

cozimento, é necessário para melhorar sua digestibilidade. Durante a extrusão, os grânulos de amido são umedecidos e recebem calor, atrito mecânico, corte e pressão, sofrendo o fenômeno de gelatinização: incham, derretem e perdem sua estrutura cristalina (Zeng et al., 1997; Ratnayake e Jackson, 2003). No processo de formação do amido gelatinizado ocorre perda da sua ordenação e estrutura, tornando-o solúvel em água e mais suscetível à ação enzimática do que o amido cru (Dona et al., 2010). Dados de nosso grupo de pesquisa demonstraram que quando extrusados adequadamente, o amido dos cereais apresenta digestibilidade aparente em trato digestório total superior a 95% para gatos (De-Oliveira et al., 2008) e 98% para cães (Carciofi et al., 2008).

O processo de gelatinização do amido tem, também, consequências sobre os lipídeos do alimento. No canhão do extrusor o amido gelatinizado, especificamente as cadeias de amilose, formam complexos com a gordura naturalmente presente nos ingredientes (Gibson and Alavi, 2013). Os complexos amilose-lipídeos são formados pela encapsulação de triglicérides no interior da molécula de amilose. Suas consequências para o animal e aproveitamento do alimento não foram ainda elucidadas adequadamente para cães e gatos. Stroucken and Poel (1996) não verificaram efeitos desse processo sobre a digestibilidade da gordura, sugerindo que estes complexos seriam facilmente digeridos, o que estaria de acordo com a elevada digestibilidade de lipídeos comumente verificada em dietas para cães e gatos (Hullar et al., 1998). Adicionalmente, a formação de complexos amilose-lipídeos altera a textura e expansão dos kibbles. Quanto maior a quantidade de gordura interna na ração, menor será a eficiência de transferência de energia mecânica e da extrusão em si, reduzindo o cozimento, promovendo formação de kibbles pouco expandidos e duros e aumentando o tempo de retenção do material no tubo extrusor (Tran et al., 2011). Por fim, a formação deste complexo impede a remoção dos lipídeos pelo éter na análise de extrato etéreo, tornando necessária uma pré-hidrólise ácida da amostra para posterior extração pelo éter (AOAC, 2002).

2.6.2 Lipídeo

Alimentos contendo lipídios são susceptíveis a presença de calor e quando aquecidos na presença de oxigênio sofrem oxidação, devido à degradação dos ácidos

graxos insaturados. Rações secas para cães e gatos, diferente de outras espécies, são armazenadas por longos períodos e com isso a oxidação lipídica torna-se um desafio para a conservação destes produtos. A taxa de oxidação lipídica é afetada por diversos fatores, como: tipo de gordura, teor de gordura, teor de umidade e grau de expansão dos kibbles (Lin et al., 1998; Riaz, 2007). Os radicais livres que resultam dessa oxidação podem reagir com proteínas, vitaminas ou outros constituintes e reduzir drasticamente a qualidade nutricional do alimento. Além disso, ocorre perda pronunciada de sabor e alteração da cor do alimento (Lillard, 1983).

É reconhecido que a extrusão induz oxidação de lipídeos, sendo este potencial efeito negativo deste processo. A oxidação de lipídeos é um dos principais fatores responsáveis pela diminuição da qualidade das gorduras durante o processamento e armazenamento de produtos extrusados para cães e gatos. A reação é dependente de um iniciador, como calor, metais traço ou enzimas catalizadoras, e envolve a geração de um radical livre a partir de um ácido graxo insaturado (Fogaça et al., 2009). O radical livre liga-se rapidamente a uma molécula de oxigênio, formando um radical peróxido. Essas reações podem ser removidas pela adição de antioxidantes nas rações, estes são responsáveis pela formação de produtos inativos. Caso não tenha antioxidante na dieta, ou ele já tenha sido completamente utilizado, o radical peróxido remove o hidrogênio presente no ácido graxo insaturado, formando um hidroperóxido e conseqüentemente mais um radical livre (FAO, 2003). Em estudo realizado por Ribeiro, (2018), avaliando as reações oxidativas ocorridas em alimentos extrusados para gatos contendo gordura de aves como fonte de lipídeos, utilizando diferentes aplicações de EME (9, 21 e 35 kWh/t) e dietas com diferentes antioxidantes (500 mg/kg BHT+BHA; 750 mg/kg TBHQ; 1200 mg/kg antioxidante natural), mostrou que o processo de extrusão é agressivo para o ácido linoléico, de forma que as doses de antioxidantes empregadas utilizadas em função da quantidade de gordura empregada não foram suficientes para proteger os alimentos, especialmente nas dietas que foram processadas utilizando-se maior EME.

2.6.3 Proteínas

Acredita-se que os efeitos da extrusão sobre os componentes proteicos podem ser benéficos ou prejudiciais para as características físicas e nutricionais da mistura

alimentar, a depender de sua intensidade (Van Der Poel et al., 1990; Alonso et al., 2000). A extrusão pode inativar fatores antinutricionais à base de proteínas, destruindo a integridade de sua estrutura e, conseqüentemente, evitando sua ação antinutricional (Alonso et al., 2000; van der Poel et al., 1990). A desnaturação das proteínas pode torná-las mais suscetíveis a enzimas digestivas e, portanto, melhorar a sua digestibilidade (Lankhorst et al., 2007). As enzimas presentes nos ingredientes podem causar efeitos deteriorantes durante a sua armazenagem, sua inativação pela extrusão contribui para estabilizar o armazenamento e aumentar a vida de prateleira de alimentos secos para animais (Cheftel, 1986).

Os efeitos indesejáveis do tratamento termomecânico incluem a destruição de aminoácidos, a perda de aminoácidos, as ligações inter e extrapeptídicas e uma série de reações químicas, tais como as de Maillard, de reticulação proteína-proteína e formação de complexos proteína-lipídeo e proteína-carboidrato (Björck and Asp, 1983). Estas reações podem danificar estas estruturas com perda de seu valor nutricional. A umidade, temperatura e tempo de retenção parecem ser os parâmetros mais importantes para a reação de Maillard, a taxa desta reação aumenta com a redução da umidade, aumento da temperatura e do tempo de processamento (Rooijen, 2013).

O aminoácido lisina é particularmente sensível às condições de processamento, pois contém dois grupos amino reativos sendo, assim, frequentemente usado para se avaliar os efeitos do processamento nas proteínas (Tran, 2008). Baller et al., (2018) estudaram o efeito da umidade de processamento e aplicação de EME sobre a proporção de lisina reativa (com grupo amino livre, ou não complexado). Foi verificado que em baixas umidades de processamento ocorre elevação da aplicação de EME, com tendência à redução de lisina reativa indicando maior dano potencial à proteína do alimento. Não se conhece, no entanto, as implicações destes fatores à qualidade da proteína alimentar para os animais.

2.6.4 Vitaminas

O substantivo vitamina, criado por Casimir Funk, em 1912, em ocasião do isolamento da vitamina B1 do arroz, resulta da união das palavras vital e amina, o que já evidencia a relevância dessa categoria de nutrientes para a saúde dos seres vivos.

As vitaminas são moléculas orgânicas que atuam principalmente como catalizadores de reações químicas do metabolismo. Esses nutrientes podem ser classificados em lipossolúveis, os quais podem ser armazenados no organismo, ou hidrossolúveis, que não podem ser armazenados, exigindo consumo diário. Na primeira categoria enquadram-se as vitaminas A, D, E e K; na segunda, enquadram-se as vitaminas do complexo B e a vitamina C.

Dentre os potenciais efeitos negativos do processo de extrusão se inclui possível comprometimento da taxa de retenção final de vitaminas. As vitaminas são, usualmente, adicionadas a ração na forma de premix (formulação específica de minerais e/ou vitaminas). A formulação da mistura vitamínica precisa levar em consideração a estrutura química da molécula, sua fluidez, higroscopicidade e carga elétrica (Correia et al., 2008). Apresentações comerciais disponíveis de vitaminas incluem sua forma cristalina, a mais fácil de se encontrar e produzir, seguida pelas formas comerciais mais elaboradas que incluem adsorção em sílicato, revestimento de etilcelulose, revestimento de gordura, *drum drying*, *spray drying* e *spray congealing* (Coelho, 2003).

De forma geral, vitaminas são substâncias sensíveis a vários fatores ligados ao processo produtivo de alimentos, como temperatura, pH, umidade, luminosidade, tempo de tratamento, presença de oxigênio e tempo de armazenamento (Coelho, 2003). A estabilidade das vitaminas no processo de extrusão é dependente de sua estrutura química e também da matriz do alimento (Suknark et al., 2001). Segundo Riaz et al., (2009), os fatores que influenciam a retenção de vitaminas no processo de extrusão são: o tipo de matéria-prima, o uso de extrusão seca vs. extrusão úmida, a temperatura de cozimento, o grau de fluidez do material, tipo de rosca da extrusora (simples vs. dupla), propriedades eletrostáticas, pH, tempo, aplicação de energia pelo sistema, diâmetro da matriz e umidade da massa. De acordo com Killeit (1994), as diferentes composições dos produtos extrusados podem influenciar a retenção de vitaminas pois variando-se a composição, varia-se concomitantemente a EME aplicada no processo. No estudo foi utilizado baixo tempo de retenção (5 segundos) e se analisou o efeito de diferentes temperaturas de extrusão sobre a retenção das vitaminas; os resultados obtidos demonstraram que esse fator não alterou

significativamente a retenção de algumas vitaminas, como por exemplo a tiamina dos alimentos, contrariando ao que geralmente ocorre em tempos maiores de retenção. Além disso, deve-se ter em mente que a extrusão é composta por reações complexas, dificultando a verificação do grau de influência de cada fator na perda ou retenção de nutrientes.

Foram encontrados na literatura poucos trabalhos que avaliaram a estabilidade das vitaminas durante o armazenamento na forma de pré-misturas (premix), fabricação utilizando a tecnologia de extrusão e durante o armazenamento do produto acabado (Riaz et al, 2009). As recomendações mais recentes são estabelecidas por revisão de literatura feita por Riaz et al. (2009). Neste artigo Riaz et al., (2009) abordam as principais características do processo de extrusão de alimentos para cães e gatos e seus efeitos na estabilidade das vitaminas. As vitaminas mais sensíveis ao processo de extrusão são, dentre as lipossolúveis a vitamina A e a vitamina E e dentre as hidrossolúveis a vitamina C, B1 e ácido fólico. As outras vitaminas do grupo B, incluindo B2, B6, B12, niacina, pantotenato de Ca e biotina são mais estáveis. As vitaminas A, C e D também são sensíveis à oxidação, o que pode ocasionar baixas taxas de recuperação ao final da produção de alimentos extrusados.

As empresas fabricantes de vitaminas, no entanto, fizeram avanços na tecnologia de produção de formulações comerciais para aumentar sua estabilização ao longo do processamento e armazenamento (Coelho, 2003). Existem hoje apresentações que podem ter redução significativa de perdas, melhorando assim sua eficiência de uso como nutriente. De qualquer modo, os nutricionistas das empresas devem formular as dietas com inclusão adicional de vitaminas, compensando assim as perdas estimadas destes compostos, de modo ao alimento apresentar, durante todo seu período de validade comercial, os teores necessários para manutenção de cães e gatos. Estimativas das perdas em processamento e armazenamento podem ser conseguidas com base na consulta de estudos científicos publicados, ou de avaliações conduzidas na própria empresa por meio da análise de retenção e estabilidade após processamento e armazenamento. As perdas estimadas, por qualquer dos métodos, devem ser adicionadas à formulação, assim, garantindo-se

com melhor precisão o fornecimento e consumo satisfatório destes nutrientes importantes.

2.6.4.1 Vitamina A

A vitamina A, ou retinol, tem como precursores os carotenoides. Na forma de carotenoides pode ser encontrada em alimentos de origem vegetal, como frutas amarelas e verduras. Cães ao ingerirem vegetais conseguem converter carotenoides em retinol, mas os gatos não, dependendo do consumo desta já biotransformada, presente em tecidos animais como fígado e ovos (Case, 2000). Esse nutriente é estocado no fígado em sua forma retinil éster; para circular pelo organismo é convertido em retinol e necessita de proteína transportadora específica. Dentre as funções da vitamina A destacam-se as seguintes: manutenção da visão, por atuar na formação da rodopsina, manutenção da qualidade epitelial de revestimento, boa saúde reprodutiva, crescimento e remodelamento ósseo (McDowell, 2000). A hipovitaminose A apresenta como consequências ao organismo: cegueira noturna, xeroftalmia, opacidade de córnea, aumento da pressão do fluido cerebroespinal, depressão do sistema imune, metaplasia de mucosa respiratória, anormalidades de estro, atrofia testicular, polineurite, ataxia, entre outras (Coelho, 2003). Sua toxicidade dá-se pela baixa taxa de excreção do organismo, somada a uma ingestão exagerada, podendo em casos graves de intoxicação culminar em óbito.

A vitamina A, quando sofre esterificação por ácido acético gera retinil acetato, que possui ligações susceptíveis à oxidação; logo, todo óleo de retinilacetato puro precisa ser emulsificado em gelatina ou açúcar e processado juntamente a um antioxidante, evitando sua reação com oxigênio (Coelho, 2003). Avanços tecnológicos permitiram que a estabilidade das vitaminas A e D3 fossem aprimoradas a partir de um processo de *cross-linking*, tal qual a reação de escurecimento entre gelatina e um açúcar, ampliando sua tolerância a altas pressões, temperatura, umidade e fricção (Coelho, 2003). Com isto, é possível que novas formas químicas de vitamina A tenham estabilidade superior durante o processamento, favorecendo sua retenção e, por consequência seu efetivo consumo pelos animais. O armazenamento simples na forma de pré-misturas (premix) de vitaminas pode reduzir os níveis de vitamina A entre

3,9% e 20% ao mês. Na extrusão pode ocorrer outros 25% a 40% de redução vitamínica, dependendo dos parâmetros de processamento. Além disso, outros 8% a 30% podem ser perdidos durante o tempo de armazenagem (Coelho, 2003). Considerando-se tudo isto vê-se que sobredosagem cuidadosa, baseada em parâmetros técnicos estabelecidos com dados confiáveis de perda em processamento e armazenamento são fundamentais para se assegurar consumo adequado, nem insuficiente nem excessivo deste nutriente.

Com relação à sua estabilidade no processamento, aumento de temperatura e luminosidade diminuem a retenção de vitamina A em suco de cenoura estocado (Chen et al., 1996), porém, segundo Harper (1988), a perda dessa vitamina é maior na estocagem do que na extrusão devido à maior presença de oxigênio no ambiente. A umidade também tem impacto negativo na retenção dessa vitamina em premix (Raileanu and Diosady, 2006).

2.6.4.2 Vitamina B2

A riboflavina, ou vitamina B2 existe em três formas na natureza: riboflavina de dinucleotídeo livre e os dois derivados da coenzima, o mononucleotídeo de flavina (FMN) e o dinucleotídeo de flavina adenina (FAD). A riboflavina é um composto amarelo-alaranjado inodoro e amargo com ponto de fusão a cerca de 280 °C. Tem baixa solubilidade em água, mas facilmente solúvel em soluções ácidas ou básicas fortes diluídas. Os animais não têm capacidade de armazenar quantidades apreciáveis de B2. A ingestão de riboflavina acima das necessidades é rapidamente excretada na urina, principalmente como riboflavina livre. Sua função está relacionada como integrante de muitas enzimas necessárias ao metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas (Christensen, 1983).

A riboflavina é uma das vitaminas mais estáveis. Sua instabilidade é aumentada pelo calor, pela alcalinidade e sobre a luz visível e ultravioleta. A riboflavina desempenha papel fundamental em problemas relacionados à sensibilidade à luz e à fotodegradação de leite e produtos lácteos. Verificou-se que luz e oxigênio induzem a degradação da riboflavina (Riaz, 2009). Quando seca, a riboflavina é

consideravelmente menos afetada pela luz. A vitamina B2 é estável em premix sob estresse ambiental (Coelho, 2003).

A vitamina B2 está disponível comercialmente como composto cristalino produzido por síntese química ou fermentação. O sal de sódio de riboflavina 5'-fosfato está disponível para aplicações que exigem fonte de riboflavina solúvel em água. Os pós de alta potência ou cristalino de alimentação são eletrostáticos e higroscópicos, portanto, não fluem livremente e podem apresentar má distribuição nos alimentos. Por outro lado, diluições de riboflavina, como pós secos por spray ou outros produtos de diluição seca concentrada ou inclusão em pré-mistura reduzem a eletrostaticidade e a higroscopicidade, melhorando assim a fluidez e distribuição nas rações (Coelho, 2003).

2.6.4.3 Vitamina B6

A vitamina B6 refere-se a um grupo de três compostos: piridoxol (piridoxina), piridoxal e piridoxamina. O piridoxol é a forma predominante nas plantas, enquanto o piridoxal e a piridoxamina são formas vitamínicas geralmente encontradas em produtos de origem animal (Coelho, 2003). Estas três formas têm atividade igual quando administradas a animais, mas não são equivalentes quando administradas a vários microorganismos. Desempenham papel essencial no metabolismo de aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos e na produção de energia. A vitamina B6 demonstrou ser estável ao calor, ácido e álcalis; no entanto, a exposição à luz, especialmente em meios neutros ou alcalinos, é altamente sensível. A vitamina B6 pode ser rapidamente inativada no premix quando em contato com cloreto de colina ou minerais traço e altos teores de umidade (Coelho, 2003). O composto é mais estável em pH ácido. Perdas predominantes da atividade da vitamina B6 nos alimentos ocorrem nas formas piridoxal e piridoxamina, sendo a piridoxina a forma mais estável. A recuperação da vitamina B6, como cloridrato de piridoxina, em uma pré-mistura multivitamínica que não contém vestígios minerais, foi de 100%, mesmo após três meses de armazenamento a 37°C. No entanto, a estabilidade em uma pré-mistura contendo minerais foi baixa, com recuperação de apenas 45% após três meses a 37°C (Adams, 1982). Coelho (2003) constatou que a vitamina B6 era estável em pré-misturas com minerais como sulfatos. No entanto, se forem usados minerais

na forma de carbonatos e óxidos, 25% da vitamina poderá ser perdida durante um período de três meses. Agentes de estresse, como o cloreto de colina, ajudam a catalisar essa destruição. Gadiant (1986) considera a piridoxina muito sensível ao calor, levemente sensível à umidade e à luz e insensível ao oxigênio. A retenção da atividade de B6 em alimentos granulados após três meses à temperatura ambiente deve ser de 80% a 100% como regra geral.

2.6.5 Selênio

Apesar dos minerais serem estáveis durante a extrusão, perdas de selênio na forma do gás dióxido de selênio são demonstradas em vários tipos de tratamentos térmicos (Hakansson, et al., 1987; Dumont et al., 2006; Sager, 2006; Oehm, et al., 2012; Desai, et al., 2018; Kieliszek, 2019). O Selênio (Se) é um não-metal pertencente à família VIA da tabela periódica, seu número atômico é 34, com massa atômica igual a 78,971. Seus pontos de fusão e ebulição são, respectivamente, 221° C e 685° C. Foi descoberto em 1817 pelo químico sueco J.J. Berzelius. Esse elemento pode apresentar-se nos estados de oxidação seleneto (Se^{-2}), selênio elementar (Se^0), selenito (Se^{+4}) e selenato (Se^{+6}) (Eisler, 1985). Nos solos, a concentração de selênio varia entre 0,1 ppm e 2 ppm (Lyons et al., 2007), sendo proveniente da degradação de rochas, vulcanismo e queima de combustíveis fósseis (Frankenberger e Benson, 1994). Na natureza é encontrado em suas formas orgânica e inorgânica. O selênio orgânico é principalmente encontrado como selenoaminoácidos, em especial selenometionina e selenocisteína, sendo estas as formas mais comumente ingeridas desse elemento pelos animais na natureza (Combs e Combs, 1986). Dos microelementos, o selênio é um dos mais controversos, pois em altas concentrações podem ser tóxico, mas sua deficiência tem impactos negativos na imunidade e na reprodução dos animais (Lyons et al., 2007). Rações comerciais para cães e gatos geralmente são suplementadas em Se, motivo pelo qual sua deficiência não é verificada com frequência (Simcock et al., 2005).

Por razões econômicas, a suplementação de selênio em rações para cães e gatos é realizada, em sua maioria, com fontes de origem inorgânica (selenito de sódio; Na_2SeO_3). Uma baixa porcentagem das indústrias opta pelo uso do selênio orgânico

em suas formulações. Em relação às fontes orgânicas, estas podem vir de síntese química, representado pela selenometionina ou por fermentação natural com leveduras, dando origem a misturas de selenometionina e selenocistina (Payne and Southern, 2005). Já foi comprovado que tanto o selenito de sódio como o selênio levedura são eficientemente utilizados pelo organismo dos cães (Putarov, 2014).

A absorção do selênio ocorre predominantemente no duodeno, seu transporte pelo organismo ocorre associado a proteínas e o estoque desse elemento no organismo dos animais acontece nas formas de selenometionina e selenocistina, em diversos tecidos. Sua excreção se dá pelas fezes, pela urina e pela respiração. O selênio, principalmente por participar de enzimas envolvidas na proteção antioxidante, tem importância no crescimento dos animais, na prevenção de doenças, na manutenção da integridade tecidual e na saúde do trato reprodutivo (McDowell, 1999). Esse ametal compõe a enzima glutathione peroxidase, que catalisa a degradação de peróxidos e está presente em todos os tecidos, em especial no tecido hepático e nos eritrócitos. A deficiência desse micronutriente pode acarretar degeneração de músculos cardíacos e esqueléticos, fraqueza muscular, depressão, anorexia, mineralização renal, edema subcutâneo e necrose de miocárdio, além dos danos à membranas celulares com miríade de sintomas quando em associação ao déficit de vitamina E (Hussein, 2003).

Dados preliminares de nosso grupo de pesquisa indicaram diferenças entre a retenção pós-extrusão de selênio levedura e selenito de sódio, quando incluídos em rações para cães. Em ração à base de milho, farelo de soja, glúten de milho e gordura de aves, com 0,11 ppm de selênio natural dos ingredientes, foi adicionado 0,33 ppm de selenito de sódio (Na_2SeO_3) ou 0,33 ppm de selênio levedura. Antes da extrusão as concentrações de selênio analisadas nas rações eram: controle – 0,11 ppm de Se; com adição de selênio orgânico – 0,44 ppm de Se; com adição de selenito de sódio 0,44 ppm de Se. Após a extrusão, a ração controle permaneceu com 0,11 ppm de selênio, sugerindo que o Se dos ingredientes é estável, não se alterando durante o processamento. O mesmo se verificou com a ração suplementada com selênio levedura, cuja concentração após extrusão foi a mesma que a inicial (0,44ppm de Se). A ração suplementada com selenito de sódio, no entanto, demonstrou perda de

aproximadamente 50% da concentração inicial de Se, com apenas 0,24 ppm do microelemento ao final do processamento (dados não publicados). Em estudo subsequente de nosso grupo de pesquisa, baixa recuperação de Se foi novamente verificada. Uma ração suplementada com selenito de sódio que apresentava 0,277 ppm do microelemento na mistura farelada demonstrou, após processamento, 0,144 ppm, 0,123 ppm e 0,106 ppm de selênio ao ser extrusada com aplicação de 8, 20 e 30 kWh/t de EME ($p < 0,05$), respectivamente (Sá, 2015). Isso é reforçado por dados publicados pela empresa de equipamentos para extrusão Wenger, que também apontam retenção incompleta de selenito de sódio no alimento após extrusão, com retenção de 52% de selênio em alimento processado com 8 kWh/t e de apenas 38% no processado com 30 kWh/t de EME (Tabela 1).

Tabela 1 - Retenção de Vitaminas e Minerais em Alimentos Extrusados

Nutriente	EME 30 kWh/t	EME 8 kWh/t
Vitamina A	67%	88%
Vitamina D3	61%	75%
Vitamina E	57%	58%
Betacaroteno	61%	95%
Selênio	38%	52%
Lisina	81%	85%

Adaptado de Wenger Manufacturing Inc. – 2015

A literatura já demonstra que o tratamento térmico pode acarretar perdas de selênio nos materiais (Weyl, 1978), mas este processo não foi ainda estudado convenientemente em alimentos para cães. Esta perda de selenito de sódio no produto extrusado refere-se a perda real do elemento atômico, que não se encontra mais presente na ração. Não se trata de alterações em sua estrutura nem de complexação do elemento com outras substâncias, mas do desaparecimento real deste da massa extrusada. Este fato é evidenciado pela técnica de análise de selênio empregada, a espectrometria atômica com atomização em forno de grafite (Moraes et al., 2009; Silva et al., 2007). Pelo método, primeiro coloca-se a amostra em um forno de grafite (atomizador) hermeticamente fechado, que atinge temperatura interna em

torno de 3000 °C. O equipamento não permite o escape de gases. Dentro do atomizador ocorrem os seguintes processos: fusão, vaporização, dessolvatação, dissociação e ionização (Shimadzu do Brasil, 2008). Como resultado obtêm-se os átomos livres dos elementos que se quer analisar, dentre eles, o selênio. Em seguida, um espectrofotômetro faz a medição dos gases ali presentes avaliando os respectivos comprimentos de onda absorvidos, sendo cada comprimento específico para um determinado elemento químico (Shimadzu do Brasil, 2008). Disso depreende-se que, como a quantidade de selênio encontrada no atomizador e medida pelo espectrofotômetro é inferior àquela inicialmente colocada na mistura, antes da extrusão, durante o processo extrusivo houve perda de selênio da massa extrusada. Em outras palavras, nem todo o selênio presente na massa de ração que entrou na extrusora saiu da mesma. Este fenômeno só parece ocorrer quando a fonte de selênio é selenito de sódio. Dentre as possíveis hipóteses para esta perda especula-se que o selenito de sódio, ao reagir com a umidade presente na massa, frente a combinação de elevada temperatura e pressão no canhão extrusor seja convertido em dióxido de selênio, posteriormente perdido na forma de gás. Descrição desta perda de selênio na forma de compostos voláteis (gás dióxido de selênio) são descritas à partir de 1929 nos processos fabricação de vidros coloridos (Krak, 1929). A coloração rosa obtida a partir do Se era de baixa reprodutibilidade e alta tendência a volatilizar. Com o tempo e a associação de outros compostos minerais, foram desenvolvidas outras tonalidades, aumentando o interesse das indústrias pelo Se.

A moagem do trigo integral em farinha branca resulta em 16-86% de perda de ferro, zinco, cobre, magnésio e selênio (Miller, 1996). O selênio (Se) é perdido durante o processo de moagem do arroz integral para o arroz branco (Liu et al., 2009) O cozimento por extrusão reduziu 10% a concentração de selênio, mas perdas de aproximadamente 25% foram observadas na secagem em tambor. Não houve diferença estatística entre as condições de processamento moderado e intenso (Hakansson et al., 1987).

2.6.6 Palatabilidade e macroestrutura

Alimentos extrusados adquirem diferentes densidades, crocâncias e formatos, favorecendo a apreensão, mastigação e interesse de consumo por parte dos animais. Para os animais, a palatabilidade de um alimento engloba fatores como sabor, aroma, apreensão e sensação de mastigação, dependentes da textura, forma, dureza e tamanho dos extrusados. Esta é normalmente referida como valor de preferências alimentares ou apetibilidade (Griffin, 2003). Como fator crucial na escolha da dieta pelos cães e gatos, está estreitamente relacionada com o sucesso comercial do alimento. Atualmente, os fatores mais estudados para determinar a palatabilidade estão relacionados com a composição nutricional dos alimentos (teores de umidade, gordura, proteína, carboidratos e fibra) e tipo de ingredientes utilizados (proteínas e gorduras de origem animal, ingredientes de origem vegetal, ingredientes fibrosos) (Hullar et al., 1998; Case et al., 2000). No entanto, o processamento por extrusão é igualmente importante, pois determina vários aspectos fortemente ligados à palatabilidade e preferência alimentar, como crocância, dureza, forma, tamanho, odor e sabor da ração. Como anteriormente citado, todas estas características são estreitamente influenciadas pela formulação, matérias primas e condições de processamento incluindo moagem, aplicação de EME e ETE na extrusão e secagem (Carciofi et al., 2012). Até o momento, dados sobre sua influência destes fatores na preferência alimentar são escassos em publicações científicas para cães e gatos.

As características macroestruturais dos kibbles extrusados serão o resultado da formulação (teor de amido, proteína, gordura e fibra), tipo de ingredientes (proteína vegetal ou de origem animal) e condições de processamento, incluindo a granulometria das matérias primas, umidade no canhão extrusor, tempo de residência no pré-condicionador e no canhão da extrusora, transferência de energias mecânica e térmica, velocidade de rotação e configuração da rosca, relação entre área aberta da trafilha e produção horária de alimentos, temperatura do cilindro ou camisa, temperatura e pressão da massa em processamento e tipo e velocidade de corte das facas (Riaz, 2007). Juntos, todos esses parâmetros determinarão a expansão radial e longitudinal do kibble, sua densidade aparente e específica, comprimento específico, estrutura celular, dureza e crocância (Trivedi e Benning, 2003). Infelizmente, existem

poucas publicações científicas que identificaram as características macroestruturais que resultam em melhor aceitação pelos animais, bem como poucas informações sobre as melhores disposições e configurações de processamento para que estas características sejam alcançadas. Estes dados seriam importantes para fabricantes, possibilitando estes ajustarem formulações, desenhos e configurações de equipamentos e condições de operação que resultassem em melhor aceitação e palatabilidade das rações.

Trivedi e Benning (2003) demonstraram ganho em palatabilidade por elevar a temperatura da mistura no pré-condicionador a 95 °C antes de conduzi-la para a extrusora, isso reduziu a EME mas melhorou a textura e a palatabilidade. Baller et al., (2018) avaliou diferentes umidades da massa em dietas extrusadas para gatos, embora os níveis de umidade na massa induzam alterações na macroestrutura da ração, os gatos não apresentaram diferenças nas preferências alimentares. Pacheco et al., (2018) estudou diferentes aplicações de energia térmica para rações extrusadas para cães, os cães não mostraram preferências entre os alimentos com diferentes proporções de aplicação de ETE/EME. Em estudo realizado pela Wenger Technical Center, utilizando diferentes quantidades de EME para gatos, os dados parecem indicar que a implementação de EME é de considerável importância para os felinos. À medida que a aplicação de EME aumentou, a palatabilidade aumentou proporcionalmente. Em estudo posterior realizado por Sá, (2015) observou-se que cães preferiram alimentos processados com 20 kWh/t de EME em comparação a alimentos processados com 8 ou 30 kWh/t, enquanto gatos preferiram os alimentos processados com 8 e 20 kWh/t de EME em relação ao processado com 30 kWh/t. Nota-se que os resultados de Sá (2015) para gatos estão em oposição aos apresentados pela empresa Wenger. É possível assim que outros fatores associados podem não ter sido considerados adequadamente, como a implementação de EET que no estudo da Wenger pode ter sido menor quando pouca EME foi aplicada. Isto tendo ocorrido pode significar processamento inadequado decorrente de insuficiente aplicação de energia, enquanto no estudo de Sá (2015) houve compensação da redução da aplicação de EME com maior aplicação de ETE, resultando em suficiente aplicação de EET e kibbles com mesma densidade e macroestrutura. Frame (1994), apresenta em seu livro um estudo de caso avaliando o efeito do pré-condicionamento

em uma ração seca extrusada para cães (30% PB, 7% EE). As quantidades totais de água e vapor injetadas no produto foram as mesmas nos dois testes. A ração que passou pela etapa de pré-condicionamento foi preferida por uma proporção de 1,51:1 sobre a ração que não passou pelo pré-condicionamento, reforçando a importância da aplicação de ETE.

Assim, vê-se claramente que existe muita contradição nos poucos dados publicados sobre os efeitos das condições de processamento na palatabilidade das rações. É necessária também melhor padronização da observação com descrição suficiente do processo. Faltam em muitos estudos dados da aplicação de ETE, EET, umidade de processamento e tempo de residência da massa. Não há uniformidade no tamanho e características dos kibbles e principalmente na formulação avaliada, na umidade dos kibbles e no recobrimento dos extrusados com óleos e palatilizantes, fatores relevantes que colabaram para esta significativa variabilidade de resultados. Todas estas diferenças tornam os experimentos particulares e os resultados aplicáveis apenas na situação específica que foi comparada, não sendo ainda possível uma generalização destas informações.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Considerando o capítulo 1 tratar-se de revisão de literatura, estão apresentadas a seguir as hipóteses e objetivos definidos para os demais capítulos da presente Tese de Doutorado. Os capítulos de 2 a 4 foram desenvolvidos em formato de artigo, seguindo as normas dos periódicos escolhidos para publicação. O capítulo 2, intitulado “Application of thermal energy on extrusion characteristics, digestibility and palatability of a diet for cats” foi escrito de acordo com as normas da revista “Archives of Animal Nutrition”. O capítulo 3, intitulado “Particle reduction and mechanical energy transference on vitamins A, B2 and B6 retention in dog foods” seguiu as normas da revista “Animal Feed Science and Technology”. O capítulo 4, intitulado “Selenium retention in dog food during extrusion processing” foi escrito de acordo com as normas da revista “Animal Feed Science and Technology”.

Capítulo 2 – Application of thermal energy on extrusion characteristics, digestibility and palatability of a diet for cats

Hipótese: Este estudo teve como hipótese que a transferência inadequada de ETE no pré-condicionador limita a eficiência da extrusão, afetando a formação dos kibbles, o cozimento do amido, a digestibilidade e a palatabilidade de alimentos para gatos. Correta e suficiente aplicação de ETE no pré-condicionador resulta em melhor cozimento do amido, promovendo-se, assim, adequada digestibilidade da dieta. Esta vantagem nutricional será acompanhada de ganhos em palatabilidade, provavelmente decorrentes da formação de compostos de odor (reação de Maillard) e da indução de aspectos desejáveis na macroestrutura dos extrusados. Haverá também redução da aplicação de EME e aumento da eficiência e produtividade da extrusora.

Objetivo geral: Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da adição de seis quantidades de energia térmica no pré-condicionador sobre os parâmetros de extrusão, índice de gelatinização do amido, macroestrutura dos kibbles, digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia, concentração de produtos da fermentação microbiana nas fezes e palatabilidade de uma formulação para gatos.

Capítulo 3 - Particle reduction and mechanical energy transference on vitamins A, B2 and B6 retention in dog foods

Hipótese: São hipóteses deste estudo que as diferentes etapas de processamento de rações para cães, especificamente a moagem, extrusão e secagem, interferem na estabilidade das vitaminas A e B6, sendo a retenção destas vitaminas menor em elevadas aplicações de EME. A vitamina A, por ser susceptível à oxidação deverá ter redução de sua concentração nas três etapas de processamento em estudo. A vitamina B6, por ser sensível à temperatura deverá ter perda mais relevante durante a extrusão, sendo sua destruição mais elevada com maior aplicação de EME. Já a vitamina B2, por ser molécula estável deverá apresentar elevada taxa de recuperação, independente das condições de processamento sendo empregada como controle negativo.

Objetivo geral: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do processo de produção de alimentos extrusados, incluindo as etapas de moagem, extrusão com três aplicações de EME (10, 20 e 30 kWh/ton, respectivamente) e secagem na retenção de vitaminas A, B2 e B6 de uma formulação para cães.

Capítulo 4 - Selenium retention in dog food during extrusion processing

Hipótese: Durante a extrusão de formulação para cães o selênio adicionado na forma de selenito de sódio sofrerá oxiredução com formação de dióxido de selênio, processo resultante da presença de temperatura e pressão elevadas, na presença de umidade e oxigênio. O dióxido de selênio formado será perdido na forma de gás resultando em recuperação incompleta de selênio após extrusão. O selênio levedura, presente na forma de mistura de selenocistina e selenometionina será estável, não sofrendo alteração química de modo que a extrusão não resultará em perdas do elemento.

Objetivo geral: O objetivo deste estudo foi avaliar a retenção de selênio proveniente do selenito de sódio ou de selênio-levedura após extrusão de formulação para cães.

4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABINPET. (2019) Manual Pet Food do Brasil. 9 ed. p.162-163.
- Alonso, R., Aguirre, A., Marzo, F., 2000. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chem.* 68, 159–165.
- Adams, C.R. 1982. Folic acid, thiamin and pyridoxine. In “Vitamins-The Life Essentials.” National Feed Ingredient Association (NFIA), Des Moines, Iowa.
- Alles, G. Particle reduction technology. In: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. *Petfood technology*. Illinois: Mt. Morris, 2003, p. 327-335.
- Amerah, A.M., Ravindran, V., Lentle, R.G., Thomas, D.G., 2008. Influence of feed particle size on the performance, energy utilization, digestive tract development, and digesta parameters of broiler starters fed wheat- and corn-based diets. *Poult. Sci.* 87, 2320–2328. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00149>
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. Official Publication, 2010. Association of American Feed Control Officials, 2010.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. AAFCO. Official publication, 2009. Washington. 2009.
- ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official and tentative methods of Analysis. 18. ed. Arlington. AOAC International. 2002.
- ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official and tentative methods of analysis. 16. ed. Arlington. AOAC International. 1995.
- Baller, M.A., Pacheco, P., Monti, M., Pacheco, P.D.G., Peres, F.M., Carciofi, A.C., 2018. The effects of in-barrel moisture on extrusion parameters, kibble macrostructure, starch gelatinization, and palatability of a cat food. *Anim. Feed Sci. Technol.* 246, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.10.003>
- Bazolli, R.S., Vasconcellos, R.S., de-Oliveira, L.D., Sá, F.C., Pereira, G.T., Carciofi, A.C., 2015. Effect of the particle size of maize, rice, and sorghum in extruded diets for dogs on starch gelatinization, digestibility, and the fecal concentration of fermentation products. *J. Anim. Sci.* 93, 2956–2966. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8409>
- Björck, I., Asp, N.G., 1983. The effects of extrusion cooking on nutritional value - A literature review. *J. Food Eng.* 2, 281–308. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(83\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0260-8774(83)90016-X)
- Carciofi, A.C., Palagiano, C., Sá, F.C., Martins, M.S., Gonçalves, K.N.V., Bazolli, R.S., Souza, D.F., Vasconcellos, R.S., 2012. Amylase utilization for the extrusion of dog diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 177, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.08.017>
- Carciofi, A. C., Takakura, F.S., De-Oliveira, L.D., Teshima, E., Jeremias, J.T., Brunetto, M.A., Prada, F., 2008. Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post-prandial glucose and insulin response. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 92, 326–336. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00794.x>
- Case, L.P.; Carey, D.P.; Hirakawa, D.A.; Daristotle, L. Canine and feline nutrition:

- A resource for companion animal professionals. Mosby, Inc., St. Louis, Missouri, USA, 2000.
- Chen, H.E., Peng, H.Y., Chen, B.H., 1996. Stability of carotenoids and vitamin A during storage of carrot juice 57, 497–503. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00008-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00008-8).
- Cheftel J.C. Nutritional effects of extrusion cooking. Food Chemical. 20, 263-283, 1986.
- Christensen, S. 1973. The biological fate of riboflavin in mammals. A survey of literature and own investigations. (Suppl.) Acta Pharmacol. Toxicol. 32:1.
- Coelho, M. Vitamins and carotenoids in pet care. 2003. In: Kvamme, J. L.; Phillips, T.D. (Eds.). Pet Food Technology. Mt. Morris, IL: Watt Publishing Company
- Cowell, C. S.; Stout, N. P.; Brinkman, M. F.; Moser, E. A.; Crane, S. W. Making commercial pet food. In: HAND, M. et al. Small animal clinical nutrition, 4ed Kansas: Mark Morris Institute, 2000. p. 127-146.
- Crane, S.W.; Griffin, R.W.; Messent, P.R. Introduction to commercial pet foods. In: HAND. M. et al. Small animal clinical nutrition. 4 ed. Kansas: Mark Morris Institute. 2000, p.111-126.
- de-Oliveira, L.D., de Carvalho Picinato, M.A., Kawauchi, I.M., Sakomura, N.K., Carciofi, A.C., 2012. Digestibility for dogs and cats of meat and bone meal processed at two different temperature and pressure levels. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). 96, 1136–1146. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01232.x>
- Dona, A.C., Pages, G., Gilbert, R.G., Kuchel, P.W., 2010. Digestion of starch : In vivo and in vitro kinetic models used to characterise oligosaccharide or glucose release. Carbohydr. Polym. 80, 599–617. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.002>
- Dunsford, B., Plattner, B., Greenbury, D., Rokey, G., 2002. The Influence of Extrusion Processing on Petfood Palatability. Proceedings of Petfood Forum, Chicago, Illinois, USA. Watt Publishing, Inc., Mt. Morris, Illinois, USA.
- FAO. Quality and quality changes in fresh fish: post mortem changes in fish. Roma: FAO, 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/v7180e/v7180e06.htm>. Acesso em 01 de janeiro de 2018.
- Fogaça, F.H.S.; Sant'ana, L.S. Oxidação lipídica em peixes: mecanismo de ação e prevenção. Archives of Veterinary Science, v.14, n.2, p.117-127, 2009.
- Fraiha, M., Biagi, J.D., Queiroz, M., Benedetti, B.C., 2005. Benefício do investimento energético na redução do tamanho de partículas na alimentação animal. Simpósio Eng. Produção 9, 1–9.
- Frame, M.D., 1994. The Technology of Extrusion Cooking, London, U.K. Chapman and Hall Inc., New York, NY.
- Gadient, M. 1986. Effect of pelleting on nutritional quality of feed. In "Proc. 1986 Maryland Nutrition Conference Feed Manufacturers," College Park, Maryland.
- Gibson, M., Alavi, S., 2013. Pet Food Processing — Understanding Transformations in Starch during Extrusion and Baking 58, 232–236.
- Gonçalves, K.N.V., 2016. Granulometria da matéria prima e configuração da

- extrusora sobre os parâmetros de processo, características do extrusado e digestibilidade de rações para gatos. Universidade Estadual Paulista - Unesp Câmpus De Jaboticabal.
- Griffin, R. W. Palatability testing: Parameters and analyses that influence test conclusions. In: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. Petfood technology. Illinois Mt Morris, p.187-193, 2003.
- Hakansson, B., Jagerstad, M., Oste, R., Akesson, B., Jonsson, L., 1987. The Effects of Various Thermal Processes on Protein Quality , Vitamins and Selenium Content in Whole-grain Wheat and White Flour. J. of Cereal Sci. 6, 269–282. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(87\)80064-4](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(87)80064-4)
- Harper, J. M. (1988). Effects of extrusion processing on nutrients. In: Nutritional Evaluation of Food Processing. Third ed. pp. 365–391. Karmas, E. and Harris, R.S. Eds., Van Nostrand Reinhold Company, New York, USA.
- Healy, B.J., Hancock, J.D., Kennedy, G.A., Bamel-Cox, P.J., Behnke, K.C., Hines, R.H., 1994. Optimum Particle Size of Corn and Hard and Soft Sorghum for Nursery Pigs¹ \$. J. Anim. Sci. 72, 2227–2236.
- Hullar, I., Fekete, S., Szocs, Z., 1998. Effect of extrusion on the quality of soybean-based catfood. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). 80, 201–206.
- Hussein, H. S. Basic nutrient requirements for healthy adult dogs. In: : KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. (Eds.). Pet Food Technology. Mt. Morris, IL: Watt Publishing Co., 2003. p.2-13. Journal of Nutrition, v.112, p.1682-1687, 1982.
- Johnston, S.L., Southern, L.L., 2000. The effect of varying mix uniformity (simulated) of phytase on growth performance, mineral retention, and bone mineralization in chicks 1 , 2 , 3. Poult. Sci. 79, 1485–1490.
- Krak, J.B., 1929. Volatility of selenium and its compounds in the manufacture, in: American Ceramic Society. pp. 530–537.
- Killeit, U., 1994. Vitamin retention in extrusion cooking. Food Chem. 49, 149–155. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90151-1](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90151-1)
- Lankhorst, C., Tran, Q.. D., Havenaar, R., Hendriks, W.H., Van der Poel, A.F.B., 2007. The effect of extrusion on the nutritional value of canine diets as assessed by in vitro indicators. Anim. Feed Sci. Technol. 138, 285–297. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.11.015>
- Lillard, D.A., 1983. Effect of Processing on Chemical and Nutritional Changes in Food Lipids 46, 61–67.
- Lin, S., Hsieh, F., Heymann, H., Huff, H.E., 1998. Effects of lipids and processing conditions on the sensory characteristics of extruded dry pet food '. J. Food Qual. 21, 265–284.
- Liu, K., Cao, X., Bai, Q., Wen, H., Gu, Z., 2009. Relationships between physical properties of brown rice and degree of milling and loss of selenium. J. Food Eng. 94, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.03.001>
- McDOWELL, L.R. Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais, enfatizando o Brasil. 3 ed., University of Florida, 92p., 1999.
- Miller, D. In *Food Chemistry*; Fennema, O.R., Ed.: Marcel Dekker, Inc: New York, NY, 1996.
- Moraes, P.M., Milantônio, R.B., Cagnani, G.S., Santos, F.A., Federici, C., Padilha, C.C.F., Lima, P.M., Padilha, P.M., 2009. Analytical procedure based on slurry sampling for determining selenium in organic vegetable samples by

- graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* 229, 409–414. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1068-2>
- Moscicki, L., 2011. Extrusion-Cooking Techniques, Techniques. <https://doi.org/10.1002/9783527634088>
- Pacheco, P.D.G., Putarov, T.C., Baller, M.A., Peres, F.M., Loureiro, B.A., Carciofi, A.C., 2018. Thermal energy application on extrusion and nutritional characteristics of dog foods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 243. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.07.003>
- Paiano, D., Biazzi, H.M., Trevisan, C., 2014. Macro ingredientes como indicadores da qualidade de mistura de. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n3p1463>
- Payne, R.L., Southern, L.L., 2005. Comparison of Inorganic and Organic Selenium Sources for Broilers 1, 2. *Poult. Sci.* 84, 898–902.
- Pozza, P.C., Pozza, M.S. dos S., Richart, S., Oliveira, F.G. de, Gasparotto, E.S., Schlickmann, F., 2005. Avaliação da moagem e granulometria do milho e consumo de energia no processamento em moinhos de martelos 35, 235–238.
- Putarov, T.C., 2014. Ações antioxidantes e imunológicas do Selênio para cães. Universidade Estadual Paulista Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia Câmpus De Botucatu.
- Ratnayake, W. S.; Jackson. D. S. Starch: sources and processing. In: *Encyclopedia of Food Science. Food Technology and Nutrition*. 2nd ed. Rev. New York: John Wiley & Sons, p.5567-5572, 2003.
- Raileanu, I., Diosady, L.L., 2006. Vitamin A stability in salt triple fortified with iodine, iron, and vitamin A 27, 252–259. <https://doi.org/10.1177/156482650602700308>
- Riaz, M., 2000. Extruders in food applications. Lancaster.
- Riaz, M.N., 2007. Extruders and Expanders in Pet Food, Aquatic and Livestock Feeds. Agrimedia, Clenze, USA.
- Riaz, M.N., Asif, M., Ali, R., 2009. Stability of vitamins during extrusion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 361–368. <https://doi.org/10.1080/10408390802067290>
- Ribeiro, É.D.M., Peixoto, M.C., Putarov, T.C., Monti, M., Dante, P., Pacheco, G., Loureiro, B.A., 2019. Archives of Animal Nutrition The effects of age and dietary resistant starch on digestibility, fermentation end products in faeces and postprandial glucose and insulin responses of dogs. *Arch. Anim. Nutr.* 00, 1–20. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2019.1652516>
- Roberti-Filho, F. de O., 2013. Influência da granulometria da matéria prima e da configuração da extrusora no conteúdo de amido resistente, digestibilidade, formação de produtos de fermentação e parâmetros metabólicos de cães. Universidade Estadual Paulista Faculdade De Ciências Agrárias E Veterinárias Campus De Jaboticabal.
- Rokey, G.J., Plattner, B., Souza, E.M. de, 2010. Feed extrusion process description. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 510–518. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300055>
- Rooijen, C. Van, Bosch, G., Poel, A.F.B. Van Der, Wierenga, P.A., Alexander, L., Hendriks, W.H., 2013. The Maillard reaction and pet food processing: effects on nutritive value and pet health *Nutrition Research Reviews* *Nutrition Research Reviews*. *Nutr. Res. Rev.* 26, 130–148.

<https://doi.org/10.1017/S0954422413000103>

- Sá, F.C., 2015. Energia mecânica, energia térmica e moagem na extrusão de alimentos para cães e gatos. Universidade Estadual Paulista - Unesp Câmpus De Jaboticabal.
- Silva, A., Neves, R.C.F., Quintero-pinto, L.G., Padilha, C.C.F., 2007. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. *Chemosphere* 68, 1542–1547. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.03.003>
- Spears, J.K., Fahey, G.C., 2004. Resistant starch as related to companion animal nutrition. *J. AOAC Int.* 87, 787–791.
- Stroucken, W.P.J., Poel, A.F.B. Van Der, 1996. Extruding vs Pelleting of a Feed Mixture Lowers Apparent Nitrogen Digestibility in Dogs. *J. Sci. Food Agric.* 71, 520–522.
- Suknark, K., Lee, J., Eitenmiller, R.R., Phillips, R.D., 2001. Stability of Tocopherols and Retinyl Palmitate in Snack Extrudates. *J. Food Sci.* 66, 897–902.
- TAVARES, L.M. Um método para o cálculo da eficiência energética de moinhos industriais. *Revista Matéria. Periódico científico virtual da área de materiais.* 2001. Disponível em :<www.materia.coppe.ufrj.br>. Acesso em 4 de agosto de 2020.
- Tran, Q., 2008. Extrusion processing: Effects on Dry Canine Diets.
- Tran, Q.D., Hendriks, W.H., Van der Poel, A.F.B., 2011. Effects of drying temperature and time of a canine diet extruded with a 4 or 8mm die on physical and nutritional quality indicators. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165, 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.03.009>
- Trivedi, N.; Benning, J. Palatability Keys. In: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. *Petfood technology.* Illinois Mt Morris, p.178-179, 2003.
- Van der Poel, T.F.B., Zuilichem, D.J. Van, van Oort, M.G., 1990. Thermal Inactivation of Lectins and Trypsin Inhibitor Activity during Steam Processing of Dry Beans (*Phaseolus vulgaris*) and Effects on Protein Quality. *J. Sci. Food Agric.* 53, 215–228.
- Wellenhkamp, F.-J., 1999. Moagem fina e ultrafina de minerais industriais: uma revisão.
- Weyl, W. A., 1978. Coloured Glasses. Society of Glass Technology, Sheffield.
- Zanotto, D.D.L., Bellaver, C., 1996. Método de determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves 1–5.
- Zeng, M., Morris, C.F., Batey, I.A.N.L., Wrigley, C.W., 1997. Sources of Variation for Starch Gelatinization , Pasting , and Gelation Properties in Wheat. *Am. Assoc. Cereal Chem.* 74, 63–71.

CAPÍTULO 2 – APPLICATION OF THERMAL ENERGY ON EXTRUSION CHARACTERISTICS, DIGESTIBILITY AND PALATABILITY OF A DIET FOR CATS

¹Artigo redigido conforme as normas de publicação do “Archives of Animal Nutrition”.

Application of thermal energy on extrusion characteristics, digestibility and palatability of a diet for cats

Mayara Aline Baller^a, Peterson Dante Gavasso Pacheco^a, Amanda Vitta-Takahashi^a, Thaila Cristina Putarov^a, Ricardo Souza Vasconcellos^b & Aulus Cavalieri Carciofi^{a*}

^a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, Brazil

^b Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil.

* Corresponding author:

E-mail address: aulus.carciofi@gmail.com (A.C. Carciofi).

Abstract: Two studies were conducted to evaluate the influence of specific thermal energy (STE) application on extruder preconditioner during the processing of a cat food recipe, evaluating if effects on processing parameters, extrudate formation and macrostructure, starch gelatinization, coefficient of total tract apparent digestibility (CTTAD) of nutrients, fermentation products in feces and food palatability. The same diet for cats was used in both experiments. The first consisted of 6 amounts of STE implementation by direct steam infusion to the preconditioner, adjusting water addition to similar in-barrel moisture. The following mass temperature out preconditioner was target: 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C and 95 °C. For the *in vivo* evaluation, thirty-six cats with 3.0 ± 0.5 years and 3.84 ± 0.65 kg were used. The animals were distributed in a randomized block design with 3 blocks of 12 animals each, totaling six cats per diet. The CTTAD was estimated after 10 days of adaptation and 7 days of total collection of feces. Fresh feces were collected to determine pH and fermentation products. Data were submitted to analysis of variance and means evaluated by polynomial contrasts according to STE application ($P < 0.05$). Food preference was determined in 20 cats by the two-pan test. In the second experiment 3 treatments were produced: low STE application- preconditioner temperature of 45°C (L_{STE}); high STE- preconditioner temperature of 95°C (H_{STE}); high STE application (preconditioner temperature of 95°C) combined with a correction on motor working amperage to be similar to the L_{STE} treatment, obtained by an increase on mass flow rate ($H_{STE_{flow}}$). The data were analyzed by analysis of variance and means compared by the Tukey's test ($P < 0.05$). On both experiments treatments were processed in a single screw extruder; after stabilization (45 min), extrusion parameters were recorded at each 15 min, with four samplings per treatment (experimental units). In the first experiment, the increase on preconditioner mass temperature and STE application reduced motor amperage, mass pressure and specific mechanical energy (SME) implementation ($P < 0.001$), increasing total specific energy (TSE) application and mass temperature ($P < 0.01$). It also induced better kibble formation, with reductions on bulk and piece density, and kibble hardness, with a linear increase on starch gelatinization ($P < 0.001$). No changes on CTTAD of DM, CP, fat, and GE and on feces formation were observed ($P > 0.05$). Starch CTTAD increased ($P < 0.001$) but starch disappearance was almost complete on the gastrointestinal tract of cats. Lower STE and starch gelatinization induced higher butyrate, and total volatile fatty acids on feces of cats ($P < 0.01$). Higher preferences were verified for the diet with greater STE application (95 °C; $P < 0.01$). In the second experiment, high STE application also reduced electric energy consumption and SME application ($P < 0.01$). When motor amperage was increase on treatment $H_{STE_{flow}}$ to a value similar to L_{STE} , mass flow rate and extruder productivity increased 40% with the same electric energy consumption, with gains in efficiency and cost. In conclusion, adequate and high STE application in the preconditioner is important to achieve sufficient implementation of total specific energy, improving kibble expansion and formation, starch gelatinization, and the preference of the cats by the food. Higher STE also reduce SME application, allowing increases on mass flow rate and the productivity of the extrusion system. The intake of foods with lower starch gelatinization increased butyrate and volatile fatty acids on feces, with possible implications to gut health.

Keywords: Fermentation products, kibble macrostructure, mechanical energy, starch gelatinization.

1. Introduction

Extrusion is a food processing that promotes cooking, sanitization, texturization and shaping by applying in a short time to a raw material mixture moisture, thermal and mechanical energy, generating shear, high temperature and pressure (Riaz, 2007; Tran, 2008). The process includes the basic steps of preconditioning, extrusion, cutting and drying (Riaz, 2000). Each step performs a specific role on food production to ensure adequate shapes, textures, sanitization and cooking, increasing product shelf life, palatability and nutrient digestibility (Alonso et al., 2000; Guy, 2001; Gibson and Alavi, 2013). However, despite the importance of the extrusion to pet food production, only few studies have been found that evaluated energy application and processing conditions to optimize the extrusion of dog foods (Pacheco et al., 2018), and none publication was found on energy application to formulations to cats. In addition, unfortunately most publications do not reported the raw material particle size, specific mechanical energy (SME), specific thermal energy (STE), residence time, mass in-barrel moisture or kibble formation and macrostructure to allow a proper interpretation of results (Baller et al., 2018; Bazolli et al., 2015; Monti et al., 2016; Pacheco et al., 2018; Venturini et al., 2018).

The thermal energy is added to the mixture of ingredients by steam and water through their direct injection into preconditioner or extruder barrel (Riaz, 2000). The thermal energy added in the form of steam is advantageous in economic terms because it induces a reduction on SME implementation with two main consequences; steam cost is usually cheaper than the electricity cost required to SME application, and the decrease on mechanical energy reduces equipment wear, increasing the lifespan of the equipment parts with lower maintenance cost (Huber and Rokey, 1990; Riaz, 2000; Levine, 2014).

At the beginning of the medium shear thermoplastic extrusion used to produce pet food, much emphasis was given to SME transference. This continues being fundamental, but nowadays it is recognized that STE is quantitatively the main energy transferred, corresponding from 65% to 85% of the total specific energy (TSE) implemented during the processing of formulations to dogs (Monti et al., 2016; Pacheco et al., 2018). This is may be explained because foods based

on starch, as human breakfast cereals, is preferred cooked and shaped by high SME and low moisture (Ajita and Jha, 2017), but pet food is a complex ingredient matrix with proportionally elevated protein, minerals, fat and sometimes fiber, requiring more energy for raw material transformation than in a single screw extrusion system will depend on adequate preconditioning (Guy, 2001; Rokey et al., 2010; Gibson and Alavi, 2013). Another potential advantages observed for a good preconditioning and adequate STE transference is higher expansion and better kibble formation, higher starch cooking, better extruder stability (Guy, 2001) and a substantial increase on the productivity of the system, as evaluated by Pacheco et al (2018).

Taking this into consideration, it was hypothesized that increases on STE application to the mass at preconditioner will reduce SME application on extruder barrel but will increase TSE implementation, improving kibble formation, nutrient digestibility and palatability of a cat food. To evaluate this, the objectives of the present study were to evaluate six implementations of STE at the preconditioner on the extrusion parameters, starch gelatinization, in vitro digestibility of OM, kibble macrostructure, total tract apparent nutrient digestibility, fermentation products in feces, and palatability of a formulation to cat maintenance.

2. Material and methods

The extrusion experiment were conducted in Sao Paulo State University (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Brazil, the digestibility and palatability study were conducted at the Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Felinos Domésticos, Maringá, Brazil. All procedures with animals followed the ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and were previously approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (protocol number 3823050218).

2.1. Experimental design and food formulation

A food was formulated to cat maintenance based on corn, chicken by-product meal and maize gluten meal (Table 1), following the recommendations of FEDIAF (2018). The ingredients were mixed and ground in a hammer mill fitted

with a 0.9 mm size screen sieve (Sistema Tigre de Mistura e Moagem, Tigre, Sao Paulo, Brazil), and a single production lot was used. The raw material mean geometric diameter was determined according to sieve method (Zanotto and Bellaver, 1996), with a $203 \pm 1.5 \mu\text{m}$. Sieves from $840 \mu\text{m}$ (0%), $710 \mu\text{m}$ (0%), $595 \mu\text{m}$ (0%), $500 \mu\text{m}$ (1%), $420 \mu\text{m}$ (1,9%), $350 \mu\text{m}$ (4,8%), $297 \mu\text{m}$ (12,4%), $250 \mu\text{m}$ (18,1%), $177 \mu\text{m}$ (26,7%), $125 \mu\text{m}$ (23,8%), $62 \mu\text{m}$ (10,5%), $53 \mu\text{m}$ (0%), $37 \mu\text{m}$ (0%).

Table 1. Ingredients and analyzed chemical composition (values before coating with poultry fat and palatant) of the experimental diet for cats used in Experiments 1 and 2.

Item	g/kg
Ingredient composition (as-fed basis)	
Corn, grain	427.7
Chicken by-product meal	338.8
Maize gluten meal	104.5
Sugarcane fiber ^a	30.0
Common salt	5.0
Vitamin-mineral premix ^b	4.0
Potassium chloride	4.0
Choline chloride	3.5
L-lysine	2.5
DL-Methionionine	2.0
Taurine	2.0
Mold inhibitor ^c	1.0
Antioxidant ^d	0.5
Added by coating	
Poultry fat	75.0
Palatant enhancer ^e	30.0
Chemical composition, before coating (g/kg, DM-basis)	
Moisture	50.6
Ash	74.9
Crude Protein	349.3
Crude fat	83.4
Crude fiber	30.3
Starch	314.6

^a Dilumix Industrial Ltda., Leme, Brazil.

^b Rovimix, DSM Produtos Nutricionais Brasil S/A, Jaguare, Brazil. Added per kg of food: iron, 120 mg; copper, 15 mg; magnesium, 75 mg; zinc, 150 mg; iodine, 2 mg; selenium, 0.3 mg; vitamin A, 18,000 IU; vitamin D3, 1000 IU; vitamin E, 100 IU; vitamin K, 2 mg; biotin, 0.6 mg; thiamine, 20 mg; riboflavin, 10 mg; pantothenic acid, 50 mg; niacin, 75 mg; vitamin B6, 6 mg; folic acid, 4 mg; vitamin B12, 0.1 mg.

^c Mold Zap Citrus: Ammonium dipropionate, acetic acid, sorbic acid and benzoic acid. Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda.d Liquid Palatant, SPF do Brazil, Descalvado, Brazil.

^d Banox: Butylated hydroxy anisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and calcium carbonate. Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda.

^e Liquid Palatant, SPF do Brazil, Descalvado, Brazil.

Using this mash feed two experiments were conducted. In the first one six extruder preconditioner temperatures were evaluated, represented by different steam infusion and mass temperatures. In the second experiment was compared the extruder mass throughput, processing characteristics, and kibble macrostructure when the raw material was processed at the lowest and highest preconditioner temperatures evaluated in the first experiment, however adjusting the extruder feed rate to obtain the same motor amperage for both treatments (similar motor work).

In the first experiment, the study followed a completely randomized design with six different amounts of STE application, by changing the steam infusion at the preconditioner. The steam infusion was maintained to obtain the following discharge mass temperatures at preconditioner: 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C, and 95 °C. After achieving a stable production 45 min had been awaited and the processing data and food samples were taken at approximately each 15 min. For statistical comparisons, each recorded parameter and sample were considered the experimental unit, with at least four replications per treatment. After processing, the diets produced with different amounts of STE application in experiment one were evaluated in 36 cats. A randomized complete block design with six diets, three blocks of 12 cats each, and two cats per diet in each block, totaling six cats per diet were used to determined nutrient digestibility and feces formation.

In the second experiment, foods were not fed to cats and only processing parameters were evaluated. A total of three treatments were produced: the extruder was operated with preconditioner discharge mass temperature of 45°C, and the motor amperage documented (similar to treatment one of experiment one), called treatment low STE (_LSTE). After that, the preconditioner discharge mass temperature was increased by direct steam infusion close to 95°C, and the reduction on amperage was recorded, called treatment high STE (_HSTE). The third treatment consisted in the increase in the extruder feed rate until restore the motor work (amperage) observed for the treatment at 45°C, but the preconditioner

temperature was kept constant at 95°C adjusting steam infusion, called high STE with adjusted mass flow rate ($_{HSTE_{flow}}$). The experimental unit (repetition) was considered the processing data and food samples that were taken every 15 minutes starting after 45 min of a stable production.

2.2. Extrusion processing

A single-screw extruder (MEX-250, Manzoni Industrial Ltda., Campinas, Sao Paulo, Brazil), with a 250 kg/h production capacity was used. The extruder was configured with two circular dies with 5.0 mm opening in diameter each. The extruder screw profile had five sections:

- (i) single flight screw and no steam lock;
- (ii) single flight screw and small steam lock;
- (iii) double flight uncut screw and small steam lock;
- (iv) double flight uncut screw and medium steam lock;
- (v) double flight cut cone screw.

All extrusion runs, on experiment one and two were set as follows: 46.2 rpm preconditioner shaft speed, 643 rpm extruder shaft speed, 1656 rpm cutting knife speed.

To achieve the goals of experiment 1, the STE was added only on the preconditioner through direct steam injection. A central line conducted the steam that was cleaned of residual water by a separation valve, and steam pressure was reduced from 8 to 2 bars. The injection on preconditioner was controlled by a manual valve system, with the infused amounts indicated by an automatic flow meter. The following experimental treatments were obtained, adjusting the amount of infused steam: T45, mass temperature of 45°C; T55, mass temperature of 55°C; T65, mass temperature of 65°C; T75 mass temperature of 75°C; T85, mass temperature of 85°C; and T95, mass temperature of 95°C. Considering the critical importance of mass in-barrel moisture on processing parameters (Baller, et al., 2018), efforts was kept to maintain similar mass moisture out preconditioner. To this, water infusion was adjusted to compensate the moisture estimated from

steam condensation to the mass. A constant water addition at extruder barrel of approximately 4.0% of the raw material feed rate was settled.

The same conditions of operation were used in experiment two. After system stabilization at 45 °C preconditioner mass temperature, parameters were recorder and samples collected. In sequence, steam infusion was increased until de mass out preconditioner temperature reaches 95 °C. The observed reduction in extruder motor amperage was recorded, and after 45 min of stable production the parameters was documented, and samples collected. The third treatment consisted in restoring the motor amperage observed on treatment 45 °C, achieved by increasing the extruder feed rate, keeping constant preconditioner temperature (close to 95 °C). The three experimental treatments evaluated in experiment 2 were named: low STE application - preconditioner temperature of 45°C ($LSTE$); high STE application - preconditioner temperature of 95°C ($HSTE$); high STE application (preconditioner temperature of 95°C) combined with a correction on motor amperage increasing the feed mass flow rate ($HSTE_{mfr}$). Water addition at the extruder barrel was kept constant (3.0% of the raw material feed rate).

The treatments were conducted in sequence on the two experiments, with no stop-start cycle. A minimum of 45 min of stable processing condition was awaited, and all the parameters recorded at each 15 min interval: feed screw speed (rpm); preconditioner shaft speed (rpm); preconditioner water flow (kg/h); preconditioner water temperature (°C); preconditioner steam flow (kg/h); steam pressure (psig); ambient temperature (°C); air moisture (%); preconditioner discharge mass temperature (°C); extruder water flow (kg/h); extruder water temperature (°C); extruder shaft speed (rpm); motor load (A); mass temperature before the extruder die (°C); mass pressure before the extruder die (MPa); cutting knife speed (rpm). At each sampling time the kibble bulk density after extrusion and after drying (g/L) was recorded (measured as the weight of food corresponding to a 1 L volume). The mass flow rate from the extruder was directly measured in a bucket. Food samples were collected at each sampling time from the preconditioner, extruder and dryer and stored at -20 °C for later analysis. After extrusion, the kibbles were dried in a forced air dryer at 105 °C for approximately 18 min.

2.3. Calculations of specific mechanical energy, specific thermal energy and residence time at preconditioner

For each treatment repetition the SME (kW-h/ton) application was calculated using the following equation (Riaz, 2000):

$$\text{SME: } ((3 \times \text{Voltage} \times (\text{At} \times \text{Av}) \times \cos \text{Fi}) / 1000) \times 1000 / \text{M}$$

Where: Voltage = 220 V; At = torque load working amperage (A); Av = no torque load working amperage (A); cosFi = power factor; M = mass flow rate from extruder (kg/h).

The STE (kW-h/ton) application in the preconditioner and the extruder was also calculated for each treatment repetition, combining equations of mass and energy balance (Riaz, 2000). Details of how the procedure was conducted are detailed elsewhere (Pacheco et al., 2018). Finally, the TSE (kW-h/ton) application was obtained by the summation of SME and STE.

Before the extrusion tests, the residence time of the mass on preconditioner was evaluated. Preconditioner was operated at the conditions observed during the extrusion of the treatments for 30 min, when the system was stopped, and all material inside the preconditioner cylinder was quantitatively collected and weighed. The residence time (seconds) was determined as the preconditioner product flow rate (kg/s) divided by the total amount of product (kg) retained in the preconditioner.

2.4. Starch gelatinization, in vitro digestibility of the organic matter and kibble macrostructure

To evaluate extrusion efficiency, in the samples collected at 15 min interval out preconditioner and drier the starch gelatinization degree was determined by the amyloglucosidase method (Sá et al., 2013). In samples collected after the dryer the in vitro digestibility of organic matter (OM) was accessed as described by Hervera et al., (2007), incubating the samples with pepsin and pancreatin. Kibble hardness was analyzed in 20 extrudates using a texture analyzer (TAX/T21, Stable Micro Systems, Godalming, UK) equipped with a load cell of 50 kgf, and a

guillotine probe. The kibbles were first stabilized at the same moisture in an oven (Quimis, Diadema, Brazil) at 35 °C during 24 h. To evaluate macrostructure 40 extrudates of each experimental treatment were collected and their length, diameter and mass were measured using a caliper and scale, and the data used to obtain the radial expansion ratio, specific length and piece density, as described by Karkle et al., (2012).

2.5. Digestibility protocol and chemical analysis

Thirty-six mixed breed cats aged 3.0 ± 0.5 years old and weighing 3.84 ± 0.65 kg were used in experiment 1 to obtain the coefficients of apparent total tract digestibility (CATTD) of nutrients and energy, through the quantitative collection of feces without urine collection method (FEDIAF, 2019). The health of the cats was confirmed prior to the start of the study. Cats were submitted to a 10-d diet adaptation phase, after which a 7-d total feces collection was conducted. During the adaptation period, cats were restrained to individual metabolic cages (0.9 x 0.8 x 0.9 m) from 04h00 p.m. to 10h00 a.m., were presented with their experimental foods, and were allowed to roam free in a collective cattery of 50 m² to exercise and socialize from 10h00 a.m. to 04h00 p.m. the cats, where water was available but not food. During the fecal collection period, cats were permanently restricted to their metabolic cages. Animals were fed twice daily (10h00 a.m. and 04h00 p.m.) in amounts sufficient to satisfy their metabolizable energy requirements ($ME, \text{kcal/d} = 100 \times \text{Body Weight}^{0.67}$; NRC, 2006). Offered and refused amounts was weighted and recorded. Feces were quantitatively collected, weighed at each feeding time, and immediately frozen at -20 °C. The fecal score was evaluated using the system described by Carciofi et al. (2008): 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.

After collection feces were thawed, homogenized and pooled by cat, and dried using a forced-air oven (MA035, Marconi, Piracicaba, Brazil) at 55 °C for 72 h. Diets and dried feces were ground (MA680, Marconi, Piracicaba, Brazil) with a

1 mm screen sieve and analyzed (AOAC, 1995) for dry matter (DM) (method 934.01), total fat using the acid-hydrolyzed fat assay (method 954.02), and ash by muffle furnace incineration (method 942.05). Organic matter (OM) was calculated as DM minus ash. Crude protein (CP) was determined in a LECO nitrogen/protein analyzer (FP-528, LECO Corporation, Saint Joseph, USA) (method 990.03). Gross energy (GE) was determined in a bomb calorimeter (IKA C2000 Basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany). Starch content was determined according to Hendrix (1993). All analyses were conducted in duplicate and repeated when the coefficient of variation was higher than 5%. The chemical composition of the experimental diets after coating with poultry fat and palatant enhancer was similar among treatments (Table 2).

Table 2. Analyzed chemical composition of a cat food formulation extruded with different specific thermal energy applications (Experiment 1). Values are as fed to cats, after coating with poultry fat and palatant enhancer.

Item	Treatments ^a					
	T45	T55	T65	T75	T85	T95
<i>Analyzed chemical composition (g/kg, DM-basis)</i>						
Moisture	65.5	65.8	62.8	60.7	60.5	57.2
Ash	70.0	73.1	70.2	70.6	70.9	68.7
Crude protein	313.0	321.0	315.0	311.0	317.0	315.0
Crude fat	127.4	140.6	141.7	145.9	148.0	152.2
Starch	290.3	277.8	278.2	289.8	281.8	266.1

^a T45 = preconditioner mass temperature of 45 °C; T55 = preconditioner mass temperature of 55 °C; T65 = preconditioner mass temperature of 65 °C; T75 = preconditioner mass temperature of 75 °C; T85 = preconditioner mass temperature of 85 °C; T95 = preconditioner mass temperature

2.6. Fermentation products on feces in the experiment 1.

Fresh feces were collected during three consecutive days of each cat. Cages were continuously monitored, and feces collected and processed at most 15 minutes after elimination. The pH was determined in a precision pH-meter (DM20, Digicrom Analítica Ltda, Brazil) after mixing 2 grams feces in 6 ml of milliQ water. A sample of 10g of feces was mixed in 30ml of 4.2 N formic acid solution, precipitated at 4°C for 72h, and the supernatant centrifuged three times (5000 G at 15°C for 15min) to analyze fermentation products. Short-chain fatty acids

(SCFA) and branched-chain fatty acids (BCFA) were determined by gas chromatography (GC-2014, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) according to a method adapted from Erwin et al. (1961). Ammonia concentration was assessed in these same extracts according to Vieira (1980): the extracts were diluted with ultrapure water (2:13 v/v), and then ammonia distilled in a nitrogen system (Tecnal TE-036/1, Tecnal, Piracicaba, Brazil). Lactic acid was measured by a colorimetric method, according to Pryce (1969) by mixing 3 g of feces with 9 ml of ultrapure water and reading in a spectrophotometer (Spectrophotometer Quick-Lab, Drake, Sao José do Rio Preto, Brazil).

2.7. Food palatability test

Comparisons of food preferences were performed only in the first experiment: T45 versus T75, T45 versus T95, and T75 versus T95. This evaluation was conducted at the Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Felinos Domésticos (Maringá, Parana, Brazil) using a panel of 20 qualified cats. The first choice (first food eaten) and the preferred product (higher food intake ratio) were determined using the two-pan method (Griffin, 2003). Cats were individually housed and tested in two consecutive meals. In the morning, after 12 h of fasting, the animals received the first meal in two pans, each containing one of the experimental foods. The position of the food bowls was changed at the evening meal. Foods was provided ad libitum. After 30 min, the bowls were removed, the remains weighed, and the consumption calculated. Due to the differences in body weight, the results were calculated as the relative consumption of each diet, and the mean intake of the two meals was used for statistical comparisons.

2.8. Statistical analysis

In Experiment 1 the results of the extrusion parameters were analyzed in a complete randomized design with six treatments and four replications per treatment (sampling time). Data were submitted to ANOVA, and when differences were found by F test polynomial contrasts were used to compare means according to the preconditioner mass temperature. The study in cats followed a completely randomized block design with three blocks (period) and two repetitions (cats) per

block, totaling six cats per treatment. The blocking factor was period, due to the impossibility to test the 36 cats simultaneously. Data on apparent digestibility and feces parameters were submitted to ANOVA considering the effects of diet and block, when differences were found by F test means were compared by polynomial contrasts according to preconditioner mass temperature. In Experiment 2 only processing parameters were evaluated, data were submitted to ANOVA and when at the F test diet effects were verified means were compared by the Tukey's test. All data were analyzed using the PROC MIXED procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) and was in accordance with the assumptions of the analysis of variance principles. To analyze the preference study the food intake ratio by the Student's T-test. In all evaluations, values of $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Extrusion parameters, kibble macrostructure, starch gelatinization and in vitro digestibility in experiment 1.

The mean preconditioner discharge mass temperatures obtained was close to planned for the experimental treatments (Table 3), only T95 presented a little lower temperature due to the equipment limitation on steam condensation to increase mass temperature. The mean mass residence time on preconditioner was 174.8 ± 0.5 s. Even with the procedures adopted to control the product flow rate out preconditioner, it varied between treatments ($P = 0.043$). There was no change in the moisture content of the mass out preconditioner, indicating that the balance among steam and water infusion was adequate. A linear increase on starch gelatinization was observed in the mass out preconditioner, with more than 5 points of percentage increase after higher STE application (Starch gelatinization after preconditioner, $\% = 1,638 \text{ Temp} + 23,241$; $r^2 = 0.86$; $P < 0.001$).

Table 3. Processing characteristics and starch gelatinization for a cat food formulation extruded using temperatures of preconditioner (Experiment 1).

Item	Treatments ^a						SEM ^b	P-value	Contrast ^c	
	T45	T55	T65	T75	T85	T95			Linear	Quad
<i>Preconditioner</i>										
Discharge mass temperature (°C)	45.0	55.0	65.0	75.0	85.0	93.0	3.56	-	-	-
Discharge mass moisture (%)	22.7	22.7	23.5	24.1	23.0	21.0	0.28	0.053	-	-
Product flow rate (kg/h)	208.4	205.1	210.8	212.2	202.9	203.6	1.10	0.043	0.137	0.072
Starch gelatinization (%)	25.23	25.53	27.39	31.84	31.92	31.97	2.14	0.001	<.001	0.416
<i>Extruder</i>										
Motor amperage (A)	45.1	42.5	40.1	38.4	37.7	37.5	0.95	<.001	<.001	0.320
Mass pressure before die (MPa)	2.2	2.2	2.0	1.8	1.6	1.7	0.89	<.001	<.001	0.257
Mass temperature before die (°C)	115.3	120.0	124.8	127.0	132.0	132.4	0.97	<.001	<.001	<.001
Product flow rate (kg/h)	213.0	214.0	210.3	215.8	209.0	205.8	0.46	0.032	0.016	0.095
In-barrel moisture (%)	25.1	25.2	26.1	24.2	24.0	22.6	0.83	<.001	<.001	<.001
<i>Energy balance (kW-h/ton)</i>										
Specific mechanical energy (SME)	17.9	14.9	11.9	9.2	8.6	8.3	0.26	<.001	<.001	<.001
Specific thermal energy (STE)	16.0	30.3	47.5	54.8	63.6	69.0	2.99	<.001	<.001	<.001
Total specific energy (TSE)	33.8	45.2	59.2	64.0	73.8	77.4	3.22	<.001	<.001	<.001
STE/SME ratio	0.9	2.0	4.1	6.0	7.7	8.1	0.58	<.001	<.001	0.153

^a T45 = preconditioner mass temperature of 45 °C; T55 = preconditioner mass temperature of 55 °C; T65 = preconditioner mass temperature of 65 °C; T75 = preconditioner mass temperature of 75 °C; T85 = preconditioner mass temperature of 85 °C; T95 = preconditioner mass temperature

^b SEM= standard error mean (n=24).

^c Linear or quadratic effect of preconditioner discharge mass temperature.

Several alterations on extruder parameters were verified, the extruder motor amperage (Motor, A = $23.08 - (0.33 * \text{Temp})$; $r^2 = 0.90$; $P < 0.001$) and the mass pressure before the die (Mass pressure, MPa = $44.45 + (0.38 * \text{Temp})$; $r^2 = 0.90$; $P < 0.001$) reduced linearly with the increase in preconditioner temperature. The temperature of the mass before extruder die increased quadratically (mass temperature, °C = $11.1 + 4.59 * \text{Temp} - (0.09 * \text{Temp}^2)$; $r^2 = 0.99$; $P < 0.001$), derivation of this equation resulted in a maximum extrusion temperature in a preconditioning temperature of 114°C, however, as the preconditioner used in the study was atmospheric, this maximum temperature is not achievable on the operating conditions of the equipment. The product flow rate out extruder varied ($P = 0.032$), according to the variations observed on the mass out preconditioner. Mass moisture inside extruder barrel reduced quadratically ($P < 0.001$), this was not expected and may represented a potential limitation on water addition at the extruder barrel on the treatment T95. This reduction, however, was small and lower than 10% in comparison with T45.

The SME application reduced quadratically (SME, kWh/ton = $19.28 - (1.098 * \text{Temp}) + (0.027 * \text{Temp}^2)$; $r^2 = 0.99$; $P < 0.001$) in approximately 47% with the increase in preconditioner temperature. The STE application increased quadratically (STE, kWh/ton = $-88.16 + (2.879 * \text{Temp}) - (0.0128 * \text{Temp}^2)$; $r^2 = 0.98$; $P < 0.001$) in more than 4 times, resulting in a quadratic increase on TSE ($P < 0.001$). The STE:SME ratio increased linearly ($P < 0.001$).

On kibble characteristics, significant linear reductions were observed for bulk density (reduced in more than 80g/L; $P < 0.001$) and specific density (decrease in approximately 15%; $P < 0.001$) with the increase on preconditioner mass temperature (Table 4). The radial expansion and specific length increased quadratically ($P < 0.02$) and kibble hardness decreased quadratically ($P < 0.003$) with increasing preconditioner temperature. The starch gelatinization after drier (SG, % = $572.82 + (0.41 * \text{Temp})$; $r^2 = 0.980$; $P < 0.001$) increased linearly with the increase in the preconditioner temperature. The in vitro digestibility of the OM was similar among treatments ($P > 0.05$).

Table 4. Kibble macrostructure, starch gelatinization, and in vitro digestibility of a cat food formulation extruded with different temperatures of preconditioner (Experiment 1). The reported values are of the kibbles after the drier step.

Item	Treatments ^a						SEM ^b	P-value	Contrast ^c	
	T45	T55	T65	T75	T85	T95			Linear	Quad
Bulk density (g/L)	445.0	427.0	418.0	397.3	385.0	364.0	0.98	<.001	<.001	0.171
Hardness (N)	111.9	97.9	85.8	77.6	77.8	66.6	10.03	<.0001	<.0001	0.003
Expansion rate	9.0	9.4	9.8	10.4	10.3	10.6	0.62	<.001	<.001	0.029
Piece density (g/cm ³)	0.51	0.50	0.47	0.45	0.43	0.42	0.03	<.001	<.001	0.680
Specific length (cm/g)	44.4	43.6	44.1	43.7	45.7	46.7	1.48	0.003	<.001	0.005
Starch gelatinization (%)	75.3	73.1	75.2	77.9	81.5	81.5	3.91	0.013	<.001	0.467
In vitro digestibility of the OM (%)	82.6	82.6	82.2	82.2	81.9	82.1	0.61	0.862		

^a T45 = preconditioner mass temperature of 45 °C; T55 = preconditioner mass temperature of 55 °C; T65 = preconditioner mass temperature of 65 °C; T75 = preconditioner mass temperature of 75 °C; T85 = preconditioner mass temperature of 85 °C; T95 = preconditioner mass temperature

^b SEM= standard error mean ($n=40$ kibbles for each treatment).

^c Linear or quadratic effect of preconditioner discharge mass temperature.

3.2. Total tract apparent digestibility of nutrients and feces characteristics on experiment 1

The chemical compositions of treatments were similar, except for a slightly lower fat content for diet T45. Cats readily consumed the diets, without episodes of refusal, diarrhea, or vomiting. Nutrient intake was similar for all treatments ($P>0.05$), as well as the apparent digestibility of nutrients and energy ($P>0.05$), as observed on Table 5. The exception was starch apparent digestibility, that increased linearly with the increase on preconditioner temperature ($P=0.013$). This increase, however, was quantitatively small and probably with no implications to cats.

Feces production, DM, and pH were similar to cats fed the experimental treatments ($P > 0.05$; Table 6), only a tendency for lower fecal score was observed on cats fed the T45 diet ($P=0.087$). Differences, however, were observed on some fermentation products, with reductions on butyrate, isovalerate, valerate, total BCFA, and the total volatile fatty acids in the feces of cats with the increase on STE application at preconditioner ($P < 0.05$). Acetate, propionate, lactate, and ammonia were similar for all treatments ($P>0.05$).

Table 5. Nutrient intake and total tract apparent digestibility of nutrients and energy of a cat food formulation extruded with different temperatures of preconditioner (Experiment 1).

Item	Treatments ^a						SEM ^b	P-value	Contrast ^c	
	T45	T55	T65	T75	T85	T95			Linear	Quad
<i>Nutrient intake (g/cat/d)</i>										
Dry matter	71.9	70.7	63.5	74.8	73.9	61.7	3.86	0.093	-	-
Organic matter	72.7	71.3	63.6	76.6	74.1	62.0	3.88	0.078	-	-
Crude fat	9.96	9.77	8.2	10.5	10.1	8.5	0.53	0.345	-	-
Crude protein	19.4	19.3	17.4	18.4	17.6	18.5	0.54	0.076	-	-
Starch	22.7	22.2	19.9	23.9	23.1	19.4	1.21	0.344	-	-
<i>Coefficient of total tract apparent digestibility</i>										
Dry matter	0.825	0.798	0.781	0.820	0.803	0.816	1.25	0.102	-	-
Organic matter	0.863	0.838	0.829	0.857	0.846	0.853	0.88	0.056	-	-
Crude fat	0.924	0.921	0.927	0.930	0.930	0.936	0.62	0.331	-	-
Crude protein	0.893	0.874	0.879	0.896	0.890	0.892	0.72	0.388	-	-
Starch	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	0.03	0.037	0.013	0.124
Gross energy	0.865	0.844	0.836	0.860	0.851	0.861	0.87	0.186	-	-

^a T45 = preconditioner mass temperature of 45 °C; T55 = preconditioner mass temperature of 55 °C; T65 = preconditioner mass temperature of 65 °C; T75 = preconditioner mass temperature of 75 °C; T85 = preconditioner mass temperature of 85 °C; T95 = preconditioner mass temperature

^b SEM = standard error of the mean (n = 36).

^c Linear or quadratic effect of preconditioner discharge mass temperature.

Table 6. Fecal characteristics and fermentation products content for cats fed a food formulation extruded with different temperatures of preconditioner (Experiment 1).

Item	Treatments ^a						SEM ^b	P-values	Contrast ^c	
	T45	T55	T65	T75	T85	T95			Linear	Quad
<i>Fecal characteristics</i>										
g/cat/day (as-is)	8.88	8.78	8.68	9.01	8.14	7.50	0.41	0.037	0.045	0.253
g/cat/day (as-fed)	3.41	3.47	3.70	3.52	3.57	2.86	0.26	0.294	-	-
DM (g/kg)	374.20	403.21	428.31	421.68	437.48	424.86	1.72	0.187	-	-
Score ^d	3.6	3.9	3.9	3.8	3.9	3.9	0.10	0.087	-	-
pH	6.4	6.5	6.6	6.6	6.7	6.8	0.11	0.274	-	-
<i>Fermentation products (mMol/kg of DM)</i>										
Acetic acid	194.2	178.7	174.9	199.6	188.7	143.8	16.6	0.1070	-	-
Propionic acid	76.4	77.4	72.0	81.7	66.8	56.9	6.97	0.175	-	-
Butyric acid	30.5	29.3	25.9	25.9	22.7	20.9	4.93	0.035	0.003	0.776
Total short-chain fatty acids	187.4	193.6	176.2	195.5	169.3	140.7	16.63	0.218	-	-
Isobutyric acid	3.5	4.0	3.7	3.7	3.5	3.4	0.22	0.442	-	-
Isovaleric acid	5.1	5.9	4.5	5.4	4.6	4.5	0.24	0.010	0.004	0.015
Valeric acid	15.1	16.7	16.0	16.8	15.5	11.6	1.09	0.036	0.054	0.009
Total branched-chain fatty acids	25.0	28.2	26.1	25.7	24.0	19.1	1.58	0.013	0.004	0.014
Total volatile fatty acids	341.5	327.5	305.8	320.5	319.1	239.2	10.9	0.048	0.014	0.247
Lactate	5.7	5.2	4.9	5.8	5.3	5.1	0.40	0.617	-	-
Ammonia	74.9	77.6	69.5	73.4	67.6	71.2	5.44	0.836	-	-

^a T45 = preconditioner mass temperature of 45 °C; T55 = preconditioner mass temperature of 55 °C; T65 = preconditioner mass temperature of 65 °C; T75 = preconditioner mass temperature of 75 °C; T85 = preconditioner mass temperature of 85 °C; T95 = preconditioner mass temperature

^b SEM = standard error of the mean (n = 36).

^c Linear or quadratic effect of preconditioner discharge mass temperature.

^d According to the following system: 0 = watery liquid, which can be poured; 1 = soft, unformed; 2 = soft, malformed stool, which assumes shape of container; 3 = soft, formed, and moist, which retains shape; 4 = well-formed and consistent stool, which does not adhere to the floor; and 5 = hard, dry pellets, which are small and a hard mass.

3.3. Food preferences on experiment 1

The results correspond to kibbles after dryer coated with poultry fat and liquid palatant enhancer, as described in Table 1. In the comparison of T45 versus T75 no differences on first choice or intake ratio was observed ($P>0.05$), as shown on Table 7. However, when T45 was challenge against T95, preferences for higher STE application was verified on both, the cat's first choice and intake ratio ($P<0.01$). Comparing T75 versus T95, although similar first choice, cats presented a higher intake ratio of the T95 treatment ($P<0.001$).

Table 7. Results of the preference comparisons on cats fed a food formulation extruded with different specific thermal energy applications on preconditioner (Experiment 1)

Challenges	First choice (%)		Intake ratio ^a			
	A	B	IR-A	IR-B	SEM	P value
T45 <i>versus</i> T75	40.0	60.0	0.55	0.45	0.62	0.332
T45 <i>versus</i> T95	24.3	75.7	0.29	0.71	0.44	<.0001
T75 <i>versus</i> T95	43.6	56.4	0.32	0.68	0.43	<.0001

^a Intake ratio: food intake/(food A + food B) intake

^b SEM = standard error of the mean (n = 20 cats).

3.4. Experiment 2: extrusion traits, kibble macrostructure, starch gelatinization and in vitro digestibility after mass adjusted motor amperage

Steam infusion was adjusted to produce the $_L$ STE treatment, obtaining a discharge mass temperature out preconditioner of 45 °C. Motor amperage was recorded, and the steam infusion increased on preconditioner to produce the $_H$ STE treatment, achieving a discharge mass temperature of 93 °C. On the sequence the reduction on motor amperage was recorded and the mass flow rate on the system was increased until the motor amperage observed on $_L$ STE was obtained aging, and the treatment $_H$ STE_{flow} was produced keeping the preconditioner discharge mass temperature close to 95 °C. The obtained results are presented on Table 8.

The observed preconditioner mass temperature was close to stipulated. Discharge mass moisture was similar between $_L$ STE and $_H$ STE_{flow}, but lower for $_H$ STE in comparison to $_H$ STE_{flow} ($P<0.05$). The difference among treatments,

however, was of only 9%. The mean residence time of the mass in the preconditioner was 175.6 ± 0.5 s for treatments $_L$ STE and $_H$ STE and reduced to 149.8 ± 0.9 s in treatment $_H$ STE_{flow}, due to the higher mass flow rate. After the increase on STE application, the motor amperage reduced approximately 17% comparing $_L$ STE and $_H$ STE ($P < 0.05$). This allowed an increase on extruder product flow rate of more than 40%, from a mean of approximately 210 kg/h on treatments $_L$ STE and $_H$ STE to 300 kg/h verified for the treatment $_H$ STE_{flow} ($P < 0.05$).

The mass pressure before the extruder die was higher for $_L$ STE, intermediary for $_H$ STE_{flow}, and lower for $_H$ STE ($P < 0.05$). The temperature of extrusion was higher for $_H$ STE, intermediary for $_H$ STE_{flow}, and lower for $_L$ STE ($P < 0.05$). Extruder in-barrel moisture were close, although statistically different for $_L$ STE and $_H$ STE_{flow}, but was unintentionally 10% lower for $_H$ STE ($P < 0.05$). This was probably a result of the lower mass moisture after preconditioner and a not planned smaller water infusion on extruder barrel. On energy balance, the SME application was higher for $_L$ STE, reduced almost 50% for $_H$ STE, and was intermediary on treatment $_H$ STE_{flow} ($P < 0.05$). Although both the $_L$ STE and $_H$ STE_{flow} presented elevated motor amperage, the higher product flow rate on $_H$ STE_{flow} explained the smaller SME application on the last treatment ($P < 0.05$). Higher STE ($P < 0.05$) and TSE implementation were observed for treatments $_H$ STE_{flow} and $_H$ STE that presented a mean value approximately 4.5 times and 2.4 times greater, respectively, than the verified for the treatment $_L$ STE ($P < 0.05$).

With the elevated STE and TSE on treatments $_H$ STE_{flow} and $_H$ STE, higher kibble expansion was verified, with lower bulk and piece densities, and higher expansion rate than the observed in kibbles of the treatment $_L$ STE ($P < 0.05$). The starch gelatinization was also higher after more STE transference, been higher for $_H$ STE_{flow}, intermediary for $_H$ STE and lower for $_L$ STE ($P < 0.05$). However, the higher in-barrel moisture of the treatment $_H$ STE_{flow} might also favored better starch gelatinization in comparison to $_H$ STE ($P < 0.05$). No treatments effects was observed in the in vitro digestibility of the OM ($P > 0.05$).

Table 8. Processing characteristics, kibble macrostructure, starch gelatinization, and in vitro digestibility of the OM of a cat food formulation extruded with different temperatures of preconditioner and product flow rates (Experiment 2).

Experiment 2).

Item	Treatments ^a			SEM ^b	P-value
	LSTE	HSTE	HSTE _{flow}		
<i>Preconditioner</i>					
Discharge mass temperature (°C)	45	93	95	-	-
Discharge mass moisture (%)	22.7 ^{cd}	21.1 ^d	23.1 ^c	0.34	0.015
Product flow rate (kg/h)	208.4 ^d	203.6 ^d	310.5 ^c	14.93	<.001
<i>Extruder</i>					
Motor amperage (A)	45.1 ^c	37.5 ^e	42.1 ^d	0.97	<.001
Mass pressure before die (MPa)	2.2 ^c	1.7 ^e	2.1 ^d	0.71	<.001
Mass temperature before die (°C)	115.2 ^e	132.2 ^c	126.2 ^d	2.16	<.001
Product flow rate (kg/h)	213.0 ^d	205.7 ^d	300.2 ^c	13.01	<.001
In-barrel moisture (%)	25.1 ^d	22.5 ^e	26.2 ^c	0.48	<.001
<i>Energy Balance (kW-h/ton)</i>					
Specific mechanical energy	18.0 ^c	8.5 ^e	10.2 ^d	1.27	<.001
Specific thermal energy	16.2 ^e	68.0 ^d	76.0 ^c	8.11	<.001
Total specific energy	34.0 ^e	77.4 ^d	86.1 ^c	6.93	<.001
STE/SME ratio	0.9 ^d	8.1 ^c	7.5 ^c	1.0	<.001
<i>Kibble macrostructure (after dryer)</i>					
Bulk density (g/L)	444.0 ^c	364.7 ^d	369.0 ^d	11.93	<.001
Expansion rate	9.0 ^e	10.6 ^d	11.9 ^c	0.36	<.001
Piece density (g/cm ³)	0.51 ^c	0.41 ^d	0.41 ^d	0.01	<.001
Specific length (cm/g)	44.4 ^d	46.7 ^c	42.3 ^d	0.62	<.001
Starch gelatinization (%)	75.0 ^d	81.5 ^d	94.1 ^c	3.11	0.006
In vitro digestibility of the OM (%)	82.6	81.1	82.0	0.34	0.193

^a LSTE = low specific thermal energy, preconditioner mass temperature of 45 °C; HSTE = high specific thermal energy, preconditioner mass temperature of 95 °C; HSTE_{flow} = high specific thermal energy, preconditioner mass temperature of 95 °C adjusted the mass flow rate to obtain similar extruder motor amperage of the treatment LSTE.

^b SEM= standard error mean (n=12).

^{c, d, e} Mean values in the same row not sharing a common superscript differ (P < 0.05).

4. Discussion

The importance of STE application on preconditioner in a single screw extrusion was clearly observed on the processing of this cat food recipe. The SME transference, extrusion system productivity, raw material transformation (starch gelatinization), kibble formation, food effects on fermentation products on feces and diet palatability were all impacted by the preconditioner temperature.

The STE application increased from 16 to 69 kW-h/ton in experiment 1 and from 16.2 to 88 kW-h/ton in experiment 1, a parameter not always described on

the studies about pet food processing (Monti et al., 2016). This resulted in approximately 54% and 53% reduction on SME implementation, on experiment 1 and 2, respectively. When STE is low, the mass resistance to flow is high requiring greater motor work increasing amperage to overcome the resistance and promote mass expulsion from the barrel (Moscicki, 2011; Pansawat et al., 2008; Riaz, 2007). The increase on mass fluidity can be also observed by the reduction on the pressure before the die, that reduced linearly on experiment 1. This same pattern of response was observed on a study about STE application to a dog food formulation (Pacheco et al., 2018). This inverse ratio among STE and SME application, consequent to a reduction on mass resistance to flow and mass pressure is known and decreases equipment wear and electric energy consumption, potentially increasing efficiency due to a lower production cost (Streit, 2015; Levine, 2014; M. N. Riaz, 2000; Huber and Rokey, 1990).

Even with the reduction on pressure, the temperature of extrusion increased on both experiments. As the SME also reduced, the shear force transference also reduced so this increase on temperature might be assigned to the greater TSE transference, that increased approximately 2.3 times in experiment 1 and 2.4 times in experiment 2. Cat food recipes are high in protein, may have considerable amounts of internal fat and fiber, with proportionally less starch. This raw material composition is more difficult to process, requiring higher energy to cook, melt and transit to a liquid phase to pass the die plate and form adequate structured kibbles (Gibson and Alavi, 2013; Rokey et al., 2010; Guy, 2001). Due to this, especially in a single screw extruder system that processes more limited capacity in SME transference, adequate preconditioning shown be relevant.

A possible confounding factor in interpreting these changes, however, is the moisture of the mass under processing (Frame, 2013; Riaz, 2007). Water is a fluidizing agent, so in-barrel moisture modulates mass resistance to flow, viscosity development, and SME transference (Onwulata et al., 2001; Ding et al., 2005; Baller et al., 2018). Thermal energy was applied by steam condensation on preconditioner, so if the increase on mass moisture was not properly compensated on the study, the water effects might interfere on STE implications on processing parameters. In experiment 1 in-barrel moisture was close, only a little lower for treatment T95, and on experiment 2 in-barrel moisture was a little

higher for $HSTE_{flow}$, but all differences were lower than 10% and probably did not interfere on results interpretation (Baller, et al., 2018).

On the current study, bulk density reduced in 81 g/L on experiment 1 and 75 g/L on experiment 2. This is an important change on macrostructure, explained by the higher expansion rate and specific length, and lower piece density. Hardness was also reduced in 41% on experiment 1. Most published studies about kibble formation observed the effects of SME application, extruder screw speed, or die open area (Iwe et al., 2001; Pansawat et al., 2008). Other factors to consider is residence time and raw material feed rate, that may also change energy application and kibble formation (Riaz, 2000). Apart of SME transference (and residence time on experiment 2), none of these parameters was altered, remaining constant along the study so the changes on macrostructure can be attribute to STE implementation. It is interesting to consider that starch gelatinization was also increased on both experiment 1 and 2, showing that even with the smaller SME and pressure before the die, better raw material transformation was achieved with more appropriate cellular formation in the molten mass of starch out extruder, that presented greater deformation in the vapor flash-off (Onwulata et al., 2001; Guy, 2001). This effect also illustrate that pressure of the mass and the SME application cannot be used individually or separate form TSE transference to understand and predict processing efficiency, as on the current study the higher expansion was determined by the higher TSE implementation, even though the SME and mass pressure was lower. Similar results were observed in a study for dog foods (Pacheco et al., 2018).

Starch gelatinization after dryer increased 10% on experiment 1 and 25% on experiment 2. On experiment 1 was also possible to see an 25% increase on starch gelatinization after preconditioner. All these effects can be attributed to the higher STE, and consequently higher TSE application (Pacheco, et al., 2018). Even with this increase on starch gelatinization, apparent total tract nutrient digestibility did not increase on cats, a result that was not expected. Only starch apparent digestibility increased, but this increase was numerically low and starch disappearance along the gastrointestinal tract was almost complete. Elevated starch total tract apparent digestibility for extruded cat food based on corn was already described (de-Oliveira et al., 2008). Unfortunately, most published

studies for cats did not report starch gelatinization to evaluate the results verified on the current study. In a publication with dogs, Bazolli et al (2015) found that in a recipe based on corn, a starch gelatinization of approximately 75% and a raw material mixture of 451 μm was enough to achieve adequate digestibility. Considering that in the current study the treatment T45 promoted 75.3% of starch gelatinization and the raw material mixture presented a mean particle size of only $203 \pm 1.5 \mu\text{m}$, these two conditions associated was apparently enough to cats present adequate apparent nutrient digestibility, that was no further increased with the elevation on starch gelatinization. This is may be reinforced by the elevated digestibility of the cat food recipe used on the present study, as the DM, GE, CP, and fat digestibility can be considered high (Fischer et al., 2012; Loureiro et al. 2017). Another point to consider is that kibble bulk density also did not correspond to apparent digestibility of nutrients, and may not be used, at least isolated and not considering other factors such as raw material particle size (Bazolli et al, 2015) and TSE transference when stablishing processing conditions of pet food to obtain adequate digestibility by cats.

Other than a reduction in feces production in treatment T95, no alterations on feces characteristics were observed. This is in line with the lack of effects on apparent total tract digestibility. However, observing fermentation products on feces was possible to observe differences between diets. In studies with dogs, lower starch gelatinization was related to increased SCFA and specially butyrate concentration on feces (Bazolli et al., 2015; Peixoto et al., 2018, Ribeiro et al., 2019). The same was observed with cats on the current study, as a linear decrease on butyrate, some BCFA, and total volatile fatty acids were observed after increase the STE application and starch gelatinization. This type of study is scarce to cats in comparison to dogs but was possible to observed also for this specie that the starch not digested and absorbed on small intestine can be fermented by colon microbiota.

Especially considering that apparent digestibility and feces formation was adequate and did not change, the greater butyrate and SCFA on feces of cats promoted by the intake of the less cooked treatment could be interesting and deserve future studies to evaluate their implications to health. It is interesting to note that in a study with dogs, lower STE and starch gelatinization in a recipe with

corn as a carbohydrate source did not altered fermentation products on feces (Pacheco et al., 2018). This is more relevant in the context that not all substrates when fermented on colon increases butyrate concentration on feces (Fischer et al., 2012; Minamoto et al., 2012; Hesta et al., 2001). The supply of organic matter to saccharolytic microbiota on colon is generally considered relevant to gut health, due to the modifications on microbiota composition and metabolic activity (Cui et al., 2019; Minamoto et al., 2012; Swanson et al., 2011). Higher butyrate may result in better nutrient and energy supply to colonocytes, allowing better development of the intestinal mucosa barrier and histological structure (Topping and Clifton, 2001, Peixoto et al., 2018). Butyrate may also reduce inflammation and increase local and systemic immunity on animals (Ashwar et al., 2016; Bird et al., 2007; Birt et al., 2013; Theodoro et al., 2019; Maria et al., 2017; Zaman & Sarbini et al., 2015) 2016), aspects that may also be explored to cats. So, in terms of potential implications to gut health, a moderate starch gelatinization reducing energy application to mass might be interesting, and further investigated to better substantiate processing definitions of pet food.

Diet palatability is considered a key factor to commercial performance of cat food (Koppel, 2014; Pekel et al., 2020). In the current study cats presented preferences for diets with higher STE application. It is not possible to separate this effect from the reduction in SME transference and higher TSE implementation, as all happens combined. A modest increase on TSE (T75) did not differentiate the preference of cats, but the food with higher STE implementation (T95) was preferred among the two others. Food preferences is driven by a complex mixture of factors, including, among others, aroma, taste, texture, shape, and size (Pekel et al., 2020; Koppel, 2014; Tobie et al., 2015). In the current study when more STE was applied, kibble macrostructure changed with more expanded and bigger extrudates, presenting better cellular structure and lower hardness. Based on the limitations of the design of the preference studies, it is not possible to verify which kibble characteristic attracted the cats increasing the intake of the T95 diets, as cats might had preferred the taste, aroma, texture or chewing sensation induced by the higher STE application. Few studies evaluate the implications of processing parameters on cat preferences.

For dogs, controversial results were verified, with animals preferring higher SME (Trivedi and Benning, 2003) or higher STE application (Dunsford et al. 2002).

Experiment 2 was mainly designed to study thermal energy implications on extruder productivity and the efficiency of electric energy utilization. It was possible to observe an increase of 80 kg/h on product flow rate with the same (in fact a little lower) extruder motor amperage. This corresponded to a 42% increase on productivity, relevant in terms of processing efficiency and cost (Huber and Rokey, 1990; Rokey et al., 2010; Riaz, 2000; Levine, 2014). The SME transference reduced in 43%, but STE increased 4.7 times and TSE implementation 2.5 time, what explained the increased expansion and starch gelatinization. Due this, a balance among lower electric energy and higher thermal energy (steam) application need to be computed for processing cost and efficiency evaluation (Pacheco et al.; 2018). Additionally, the increase on product flow rate reduced the ratio among the extruder die open area and product mass flow rate, reducing the extruder open area, and explaining the increase on mass pressure, SME transference, and starch gelatinization when treatment $HSTE_{flow}$ was comped with the treatment $HSTE$ (Moscicki e Wójtowicz, 2011). Equipment wear is also responsible for significant cost of maintenance and reposition of equipment parts (Rokey et al., 2010; Levine, 2014). The reduction on shear due to the lower SME probably also reduced this cost, been advantageous toward more thermal energy application (Streit, 2015).

Some considerations are necessary when interpreting the data of the present study. The results of extrusion are dependent on the manufacturer and model of the equipment used. The recipe, including the raw material used and its chemical composition, as well as the hardware and software parameters configuration may also interfere on results (Guy, 2001; Monti et al., 2016). The tested recipe was simple, based on corn and chicken by-product meal and caution is needed to extrapolate results to different formulations, as fiber (Monti et al., 2016), fat (Guy, 2001), protein content and type (Venturini, et al., 2018), among others, also interfere on extrusion traits and kibble formation. Raw material particle size is another parameter that may alter extrusion characteristics and kibble formation (Peixoto et al., 2018, Ribeiro et al., 2019), and is necessary to consider that the raw material processed on the current study was reduced to small particle size

and coarse ground ingredients may require more energy or residence time to cook (Bazolli et al., 2015). It is important to recognize, however, that the results described on the present study allows to build a database to better understand processing requirements of cat food recipes processed on single screw extruders, serving as a base for further studies with different formulations, equipment types and designs, and software operation conditions.

5. Conclusions

Adequate application of STE in the preconditioner is important to achieve the implementation of sufficient TSE to the mass, with the advantages of lower electric energy consumption, improved kibble expansion and formation, greater starch gelatinization, and higher preference of the kibbles by the cats. Substantial increase on mass flow rate and the productivity of the extrusion system was also verified, improving the efficiency of the electric energy usage on the extrusion system. Even with the differences in starch gelatinization, apparent total tract digestibility and feces characteristics were not altered. The intake of a food with lower starch gelatinization promoted an increase of butyrate and short-chain fatty acids on feces, with potential health benefits that might be explored to cats.

Acknowledgments

This study was made possible by funding from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (grant number 447751/2014-0) and by a fellowship for the first author from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (grant number 2018/ 23864-4) and by fellowship for the first author from the CAPES - Brazil - Finance Code 001. The authors would like to thank Guabi PetCare (Campinas, Brazil) for the financial and technical support to Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Flávio Prada”. and Manzoni Industrial Ltda. (Campinas, Brazil) for the donation of the extruder used in the study. The authors would like to thank the Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Felinos Domésticos, Maringá, Brazil.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [2018/ 23864-4]; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (BR) [Finance Code 001].

ORCID

Mayara Aline Baller <https://orcid.org/0000-0001-5728-6570>

Peterson Dante Gavasso Pacheco <https://orcid.org/0000-0002-8900-6470>

Amanda Vitta-Takahashi <https://orcid.org/0000-0001-7293-7722>

Ricardo Souza Vasconcellos <https://orcid.org/0000-0002-0333-4300>

Aulus Cavalieri Carciofi <http://orcid.org/0000-0003-3859-3983>

References

- ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 2002. Official and tentative methods of Analysis. 18. ed. Arlington. AOAC International.
- ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1995. Official and tentative methods of analysis. 16. ed. Arlington. AOAC International.
- Ashwar, B. A., Gani, A., Shah, A., Wani, I. A., & Masoodi, F. A. (2016). Preparation, health benefits and applications of resistant starch — A review. *Starch/Stärke*, 68, 287—301.
- Athar N, Hardacre A., Taylor G, Clarck S, Harding R, McLaughlin. 2006. Vitamin retention in extruded food products. *J. Food Comp. Anal.* 19: 379-383. doi:10.1016/j.jfca.2005.03.004.
- Ajita, T., Jha, S.K., 2017. Extrusion Cooking Technology : Principal Mechanism and Effect on Direct Expanded Snacks – An Overview. *Int. J. Food Stud.* 6, 113–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.7455/ijfs/6.1.2017.a10>
- Baller, M.A., Pacheco, P., Peres, F.M., Monti, M., Carciofi, A.C., 2018. The effects of in-barrel moisture on extrusion parameters, kibble macrostructure, starch gelatinization, and palatability of a cat food. *Anim. Feed Sci. Technol.* 246, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.10.003>
- Bazolli, R.S., Vasconcellos, R.S., de-Oliveira, L.D., Sá, F.C., Pereira, G.T., Carciofi, A.C., 2015. Effect of the particle size of maize, rice, and sorghum in extruded diets for dogs on starch gelatinization, digestibility, and the fecal concentration of fermentation products. *J. Anim. Sci.* 93, 2956–2966. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8409>.

- Bird, A. R., Vuaran, M., Brown, I., & Topping, D. L. (2007). *Two high-amylose maize starches with different amounts of resistant starch vary in their effects on fermentation, tissue and digesta mass accretion, and bacterial populations in the large bowel of pigs. British Journal of Nutrition*, 97(01), 134. doi:10.1017/s0007114507250433
- Birt, D. F., Boylston, T., Hendrich, S., Jane, J.-L., Hollis, J., Li, L., McClelland J., Moore S., Gregory J. Phillips, Rowling M., Schalinske K., Scott M. P., Whitley, E. M. (2013). *Resistant Starch: Promise for Improving Human Health. Advances in Nutrition*, 4(6), 587–601. doi:10.3945/an.113.004325
- Carciofi, A.C., Takakura, F.S., De-Oliveira, L.D., Teshima, E., Jeremias, J.T., Brunetto, M.A., Prada, F., 2008. Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post-prandial glucose and insulin response. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92, 326–336. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00794.x>.
- Cui, J., Lian, Y., Zhao, C., Du, H., Han, Y., Gao, W., Xiao, H., Zheng, J., 2019. Dietary fibers from fruits and vegetables and their health benefits via modulation of gut microbiota. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18, 1514-1532. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12489>.
- de-Oliveira, L. D., Carciofi, A. C., Oliveira, M. C. C., Vasconcellos, R. S., Bazolli, R. S., Pereira, G. T., & Prada, F. (2008). Effects of six carbohydrate sources on diet digestibility and postprandial glucose and insulin responses in cats¹. *Journal of Animal Science*, 86(9), 2237–2246. doi:10.2527/jas.2007-0354
- Ding, Q.B., Ainsworth, P., Tucker, G., Marson, H., 2005. The effect of extrusion conditions on the physicochemical properties and sensory characteristics of rice expanded snacks. *J. Food Eng.* 66, 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.019>
- Dunsford, B., Plattner, B., Greenbury, D., Rokey, G., 2002. The influence of extrusion processing on petfood palatability. In: *Proceedings of Pet Food Forum*. Chicago, Illinois. Watt Publishing, Inc. Mt. Morris, Illinois, USA.
- Erwin, E.S., Marco, G.J., Emery, E.M., 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44, 1768–1771. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(61\)89956-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(61)89956-6).
- FEDIAF, 2018. Nutritional Guidelines For Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs- FEDIAF, FEDIAF. Nutritional Guidelines.
- FEDIAF, 2019. Nutritional Guidelines For Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs- FEDIAF, FEDIAF. Nutritional Guidelines.
- Fischer, M. M.; Kessler, A. M.; De Sç, L. R. M.; Vasconcellos, R. S.; Filho, F. R.; Nogueira, S. P.; Oliveira, M. C. C.; Carciofi, A. C. Fiber fermentability effects on energy and macronutrient digestibility, fecal traits, postprandial metabolite responses, and colon histology of overweight cats. *Journal of animal science*, v. 90, n. 7, p. 2233-2245, 2012. DOI: 10.2527/jas.2011-4334

- Frame, N.D., 2013. The Technology of Extrusion Cooking, Journal of Chemical Information and Modeling. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Griffin, R.W., 2003. Section IV: Palatability, in: Petfood Technology.
- Guy, R., 2001. Extrusion Cooking: Technologies and Applications. Cambridge, United Kingdom.
- Hesta, M., Janssens, G. P. J., Debraekeleer, J., & De Wilde, R. (2001). The effect of oligofructose and inulin on faecal characteristics and nutrient digestibility in healthy cats. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 85(5-6), 135–141. doi:10.1046/j.1439-0396.2001.00308.x
- Hervera, M., Baucells, M.D., Blanch, F., Castrillo, C., 2007. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by in vitro analyses 91, 205–209.
- Huber, G.R., Rokey, G.J., 1990. Extruded snacks. In: Booth, R.G. (Ed.), Snack Food. Van Nostrand Reinhold, New York, USA, pp. 107–138.
- Iwe, M.O., Van zuilichem, D.J., Ngoddy, P.O., Lammers, W., 2001. Amino acid and protein digestibility index of mixtures of extruded soy and sweet potato flours. Leb. Wiss. und Technol. 34, 71–75.
- Karkle, E.L., Alavi, S., Dogan, H., 2012. Cellular architecture and its relationship with mechanical properties in expanded extrudates containing apple pomace. Food Res. Int. 46, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.003>
- Koppel, K., Gibson, M., Alavi, S., Aldrich, G., 2014. The effects of cooking process and meat inclusion on pet food flavor and texture characteristics. Animals 4, 254–271. <https://doi.org/10.3390/ani4020254>.
- Levine, L., 2014. Engineering: Heat and Mass Balances Around Extruder Preconditioners II 59, 2014.
- Loureiro, B. A.; Sakomura, N. K.; Vasconcellos, R. S.; Sembenelli, G.; Gomes, M. D. O. S.; Monti, M.; Malheiros, E.B; Kawauchi, I.M.; Carciofi, A. C. Insoluble fibres, satiety and food intake in cats fed kibble diets. Journal of animal physiology and animal nutrition, 101(5), 824-834. 2017
- Maria, A. P. J., Ayane, L., Putarov, T. C., Loureiro, B. A., Neto, B. P., Casagrande, M. F., Gomes, M. O. S., Glória, M. B. A, Carciofi, A. C. (2017). *The effect of age and carbohydrate and protein sources on digestibility, fecal microbiota, fermentation products, fecal IgA, and immunological blood parameters in dogs*1,2. Journal of Animal Science, 95(6), 2452–2466. doi:10.2527/jas.2016.1302 DOI: 10.1111/jpn.12711
- Minamoto, Y., Hooda, S., Swanson, K. S., & Suchodolski, J. S. (2012). Feline gastrointestinal microbiota. Animal Health Research Reviews, 13(01), 64–77. doi:10.1017/s1466252312000060
- Monti, M., Gibson, M., Loureiro, B.A., Sá, F.C., Putarov, T.C., Villaverde, C., Alavi, S., Carciofi, A.C., 2016. Influence of dietary fiber on macrostructure and processing traits of extruded dog foods. Anim. Feed Sci. Technol. 220,

- 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.07.009>
- Moscicki, L., 2011. Extrusion-Cooking Techniques, Techniques. <https://doi.org/10.1002/9783527634088>
- NRC, 2006. Nutrient Requirements of Dogs and Cats, 2nd ed. National. Academy Press, Washington, DC, USA.
- Onwulata, C.I., Smith, P.W., Konstance, R.P., Holsinger, V.H., 2001. Incorporation of whey products in extruded corn, potato or rice snacks. *Food Res. Int.* 34, 679–687. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00088-6).
- NRC, 2006. Nutrient Requirements of Dogs and Cats, 2nd ed. National. Academy Press, Washington, DC, USA.
- Pacheco, P.D.G., Putarov, T.C., Baller, M.A., Peres, F.M., Loureiro, B.A., Carciofi, A.C., 2018. Thermal energy application on extrusion and nutritional characteristics of dog foods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 243. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.07.003>
- Pansawat, N., Jangchud, K., Jangchud, A., Wuttijumnong, P., Saalia, F.K., Eitenmiller, R.R., Phillips, R.D., 2008. Effects of extrusion conditions on secondary extrusion variables and physical properties of fish, rice-based snacks. *LWT - Food Sci. Technol.* 41, 632–641. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.05.010>
- Pekel, A. Y., Mülazımoğlu, S. B., & Acar, N. (2020). Taste preferences and diet palatability in cats. *Journal of Applied Animal Research*, 48(1), 281–292. doi:10.1080/09712119.2020.1786391
- Peixoto M.C., Ribeiro E.M., Maria A.P.J., Loureiro B.A., di Santo L.G., Putarov T.C., F N Yoshitoshi, G T Pereira, L R M Sá, A C Carciofi. Effect of resistant starch on the intestinal health of old dogs: fermentation products and histological features of the intestinal mucosa. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2018; 102: 111–121.
- Pryce, J.D., 1969. A modification of the barker-summerson method for the determination of latic acid. *Analyst* 94, 1151–1152. <https://doi.org/10.1039/an9699401151>.
- Riaz, M., 2000. Extruders in food applications. Lancaster.
- Riaz, M.N., 2007. Extruders and Expanders in Pet Food, Aquatic and Livestock Feeds. Agrimedia, Clenze, USA.
- Riaz, M.N., 2000. Extruders in Food Industry. *Extruders Food Appl.* <https://doi.org/10.15713/ins.mmj.3>
- Ribeiro, É.D.M., Peixoto, M.C., Putarov, T.C., Monti, M., Dante, P., Pacheco, G., Loureiro, B.A., 2019. Archives of Animal Nutrition The effects of age and dietary resistant starch on digestibility , fermentation end products in faeces and postprandial glucose and insulin responses of dogs. *Arch. Anim. Nutr.* 00, 1–20. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2019.1652516>
- Rokey, G.J., Plattner, B., Souza, E.M. De, 2010. *Revista Brasileira de Zootecnia*

Feed extrusion process description Descrição do processo de extrusão do alimento 2010, 510–518.

- Sá, F.C., Vasconcellos, R.S., Brunetto, M.A., Filho, F.O.R., Gomes, M.O.S., Carciofi, A.C., 2013. Enzyme use in kibble diets formulated with wheat bran for dogs: Effects on processing and digestibility. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 97, 51–59. <https://doi.org/10.1111/jpn.12047>.
- Streit, B., 2015. Thermal versus Mechanical Energy in Pet Food Extrusion Coking. (Accessed August 2017). <http://www.petfoodindustry.com/articles/5364-thermalversus-mechanical-energy-in-pet-food-extrusion-cooking?v=preview>.
- Swanson KS, Dowd SE, Suchodolski JS, Middelbos IS, Vester BM, Barry KA and Fahey Jr GC (2011). Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME Journal* 5: 639–649
- Theodoro, S. de S., Putarov, T. C., Tiemi, C., Volpe, L. M., de Oliveira, C. A. F., Glória, M. B. de A., & Carciofi, A. C. (2019). *Effects of the solubility of yeast cell wall preparations on their potential prebiotic properties in dogs*. *PLOS ONE*, 14(11), e0225659. doi:10.1371/journal.pone.0225659
- Tran, Q.D., Hendriks, W.H., Van Der Poel, A.F., 2008. Effects of extrusion processing on nutrients in dry pet food. *J. Sci. Food Agric*. 88, 1487–1493. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3247>.
- Tobie, C., Péron, F., & Larose, C. (2015). Assessing Food Preferences in Dogs and Cats: A Review of the Current Methods. *Animals*, 5(1), 126–137. doi:10.3390/ani5010126
- Topping, D.L., Clifton, P.M., 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev*. 81, 1031–1064. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1031>
- Trivedi, N., Benning, J., 2003. Palatability keys. In: Kvamme, J.L., Phillips, T.D. (Eds.), *Petfood Technology*. Mt Morris, IL, USA, pp. 178–179.
- Venturini, K.S., Sarcinelli, M.F., Baller, M.A., Putarov, T.C., Malheiros, E.B., Carciofi, A.C., 2018. Processing traits and digestibility of extruded dog foods with soy protein concentrate. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 102. <https://doi.org/10.1111/jpn.12894>
- Vieira, P.F., 1980. Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminantes. Viçosa, MG:98. PhD Thesis. Universidade Federal de Viçosa, Brazil.
- Zaman, S. A., & Sarbini, S. R. (2015). The potential of resistant starch as a prebiotic. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17. doi:10.3109/07388551.2014.993590

Zanotto, D.L., Belaver, C., 1996. Método de determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves. Comunicado Técnico EMBRAPA –Suíno e Aves. CT 215, 1–5.

CAPÍTULO 3 – PARTICLE REDUCTION, MECHANICAL ENERGY TRANSFERENCE AND DRYING ON VITAMINS A, B2 AND B6 RETENTION IN EXTRUDED DOG FOODS

¹Artigo redigido conforme as normas de publicação do “Archives of Animal Nutrition”.

Running head: Vitamin stability on pet food production.

Running head: Vitamin stability on pet food production.

**Particle reduction, mechanical energy transference and drying on
vitamins A, B2 and B6 retention in extruded dog foods**

Mayara A. Baller, Luana Márcico, Thaila C. Putarov, Aulus C. Carciofi.

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Campus de Jaboticabal,
UNESP - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil.

* Corresponding author: Tel.: +55 16 3209-2631; fax: +55 16 3203-1226.
E-mail address: aulus.carciofi@gmail.com (A.C. Carciofi).

Abstract

The extrusion induces physical and chemical changes on raw materials, making them more adequate as animal food. The processing, however, may induce undesirable changes including vitamin loss, lipid oxidation, and reduced amino acid availability. The effects of grinding, drying, and extrusion with three specific mechanical energy (SME) application, respectively 10, 20, and 30 kWh/t were evaluated on the retention of vitamins A, B2, and B6 on a dog food formulation. The adult dog food was formulated (FEDIAF (2017)), being added to the commercial premix product for dogs (DSM Produtos Nutritional Brazil S/, Jaguaré, Brazil), in the dose suggested by the manufacturer, resulting in the expected inclusion (in addition levels of vitamins naturally present in the ingredients): 18.750 IU/kg of vitamin A, 16.25 mg/kg of vitamin B2 and 7.5 mg/kg of vitamin B6. A mixture was ground in the hammer mill (sieve with 0.9 mm sieves) and extruded in single screw extrusion (MEX-250, Manzoni Industrial Ltda, Campinas, Brazil). Changing the equipment configuration, three specific mechanical energy (SME) were implemented: 10(low SME), 20 (medium SME) and 30 (high SME) kWh/t, these being the experimental tests. The food sequence was dried at 105°C for 20 min, in a two-pass vertical dryer. The STE was calculated by the mass and energy balance of the preconditioner and extruder and the SME considering the electricity consumption and the activities of the system (RIAZ, 2000). The analyzes of vitamin A (retynil acetate), vitamin B2 (riboflavin) and vitamin B6 (pyridoxine hydrochloride) were submitted to the laboratory of the Analytical Research Center of DSM Nutritional Products AG, Basel, Switzerland. Data were submitted to analysis of variance of repeated measures over time, with two factors within each application of SME, the processing step evaluated and the sampling time (experimental unit). To vitamin A, the grinding and drying steps induced significant losses ($P < 0.05$), but not the extrusion, regardless the SME applied ($P > 0.05$), with a final retention of 40% of the nutrient. The chemical form of vitamin B2 evaluated showed be stable, without significant losses on any processing step. The vitamin B6 concentration reduced after extrusion, but without effect of the SME applied, grinding or drying steps, with a mean retention of 65% of the nutrient. In conclusion, the stages of dog food production, grinding and drying were shown to be critical for vitamin A, compromising stability. There were no losses from B2, demonstrating that the commercial product used was able to protect the nutrient. Vitamin B6 showed loss during extrusion, despite being stable during milling and drying.

Keywords: extrusion, retinol acetate, riboflavin, pyridoxine hydrochloride, pet food, mechanical energy

1. Introduction

Extrusion is the most used pet food processing method. This technology promotes physical and chemical changes in the ingredients, creating new textures and improving their quality and palatability for animal consumption (Moscicki, 2011; Riaz, 2000). The carbohydrate digestibility improvement by particle reduction and starch cooking (Bazolli et al., 2015), and the protein digestibility improvement by its denaturation and antinutritional factors inactivation (Tran, 2008; Venturini, et al., 2018) may be relevant, even though little studied by dogs. Other objectives when establish adequate extrusion parameters include obtaining adequate shapes, textures, and sanitization, increasing product shelf life and diet palatability (Alonso et al., 2000; Guy, 2001; Gibson and Alavi, 2013). However, the processing can also induce undesirable effects including vitamins destruction (Riaz et al., 2009; Yang et al., 2020), lipids oxidation (Barden & Decker 2013; Allam e Mohammed, 2002), and amino acid complexation to carbohydrates reducing their availability or concentration on the final product (Baller et al., 2018; Riaz et al., 2009; Rooijen et al., 2013). Scientific information about the extrusion process effects on vitamins retention are little and incomplete, focused mainly on the extrusion step and not always measuring the effects of particle reduction and drying (Yang et al., 2020; Harper, 1988).

Vitamins are chemical substances sensitive to several factors that are present on the food production process, including high temperature, alterations in pH, moisture, light, treatment time, presence of oxygen and storage time (Riaz et al., 2009; Coelho, 2003). Their stability in the extrusion process are dependent on their chemical structure (Combs, 2016) and the technology of production and protection against the environmental impact (Coelho, 2003; Riaz et al., 2009; Suknark et al., 2001). The ingredient matrix and the food chemical composition also influence vitamin retention, which may differ between formulations (Athar et al., 2006). Processing parameters investigated for their potential impact on vitamin retention are the use of dry versus wet extrusion, cooking temperature, processing retention time, viscosity formation, shear force application, screw configuration and rotation speed, and extruder type (single versus twin screw extruders) (Coelho, 2003; Killeit, 1994; Riaz et al., 2009).

Vitamin A are molecules susceptible to degradation, especially in the presence of oxygen (Lesková et al., 2006). Its structure is sensitive to heat (Chen et al., 1996), oxygen (Harper, 1988), and light (Coelho, 2003), but is protected by higher moisture during processing (Lesková et al., 2006). The commercial form used is the retinyl acetate beadle cross-linked, produced by the cross-link and microencapsulation technology to increase the resistance of the molecule to storage and processing conditions (Coelho, 2003). Retinyl acetate is mixed with gelatin, carbohydrates (sugar) and stabilized with antioxidants, a browning reaction is induced forming a water-insoluble beadle, more resistant to heat, shear stress, pressure, and oxygen (Coelho, 2003; Lesková et al., 2006). Riboflavin (vitamin B2) is one of the most stable vitamins during thermal processing, produced by spray dry. The chemical form most used is crystalline pyridoxine hydrochloride which usually resists to heat and oxidation (Coelho 2003; Lesková et al., 2006). This vitamin is sensitive to light, mainly to UV rays when combined with high temperatures and pH (Coelho, 2003). Pyridoxine (vitamin B6) is stable to oxygen, but unstable to moisture, UV light, heat (Gadient and Fenster, 1994), acid pH, choline chloride and trace elements (Riaz et al., 2009). The commercial form most used is crystalline pyridoxin hydrochloride, and significant losses during extrusion was described mainly due shear and temperature of processing (Killeit, 1994; Riaz et al., 2009; Yang et al., 2020).

To a better comprehension of vitamins A, B2, and B6 retention on the production of dog food, the present study investigated the effects of particle reduction in a hammer mill, extrusion with three amounts of specific mechanical energy application (SME; 10, 20 and 30 kWh/ton) and drying of kibbles after extrusion on the final concentration on food of these nutrients. Vitamin B2 was used as an internal control, as no significant losses was expected based on the literature. Vitamin A and B6 losses was expected, especially on the extrusion step, and would be higher with greater SME application as it induced elevated shear, generating higher temperatures and pressures during processing.

2. Material and methods

The experiment was conducted at the Feed Factory of the Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Jaboticabal, Brazil. The analyzes of

vitamin A (retinol acetate), vitamin B2 (riboflavin) and vitamin B6 (pyridoxine hydrochloride) were performed at the Analytical Research Center laboratory of the company DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland). The other chemical analyzes were performed at the Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”, UNESP, Jaboticabal, Brazil.

2.1 Experimental design, comparisons, and treatments

The study consisted of processing a single formulation to dog maintenance. This formulation was grind and dried after extrusion in one single condition, but was extruded with three different implementations of specific mechanical energy (EME) in the extruder barrel, respectively 10 kWh/t (low SME), 20 kWh/t (medium SME) and 30 kWh/t (high SME), obtaining three experimental treatments.

The study was conducted in a completely randomized design, and the experimental units was established as sample and data collection along a stable processing step, with at least four repetitions per treatment. For raw material mixture before extrusion, the ingredients were mixed in a horizontal single shaft mixer of paddles, and four samples collected along different batches, been each one an experimental unit. For raw material after grinding in a rammer mill, four samples were collected along the different batches of raw material (experimental unit). To evaluate the extrusion and drying steps, after system stabilization on each extruder configuration, 30 min was awaited and them samples and data was collected at each 30 min interval out preconditioner, out extruder and out dryer (experimental units).

The experiment was analyzed comparing the vitamin concentration on the sample, with the observed concentration in the previous processing step. To this, vitamin concentration on raw material mixture after grinding was compared with the vitamin concentration on raw material mixture before grinding; vitamin concentration out extruder preconditioner was compared with the concentration on raw material after grinding; the values after extrusion was compared with the observed after preconditioner; the values after drier was compared with the levels

after extrusion. Data was analyzed in a completely randomized design, considering 3 treatments (SME application) and 4 replications for each processing step under study,

2.2. Diet formulation, extrusion processing, and sample collection

A diet based on corn, poultry by-product meal, soybean meal, and poultry fat was formulated (Table 1) to adult dog (FEDIAF, 2018). The same raw material lot was used for the entire study. A commercial premix for dogs (DSM Produtos Nutricional Brasil S/A, Jaguare, Brazil) was added to the product, in the dose suggested by the manufacturer, resulting in the expected inclusion (in addition to the levels of vitamins naturally present in the ingredients) of: 18,750 IU/kg of vitamin A (Rovimix A 1000, Retinol, DSM Nutritional Products Brazil S/A, Jaguaré, Brazil), 16.25 mg/kg of vitamin B2 (Rovimix B2 80-SD, Riboflavin, DSM Nutritional Products Brazil S/A, Jaguare, Brazil) and 7.5 mg/kg of vitamin B6 (Rovimix B6, Pyridoxin hydrochloride, DSM Nutritional Products Brasil S/A, Jaguare, Brazil).

The ingredients were mixed in a paddle-type batch mixer, with a capacity of 450L. After mixing the ingredients composing the experimental ration, the mixture was sampled at four times (experimental units) to assess the initial concentration of vitamins. The mixture was subsequently ground in a hammer mill, equipped with a screen sieve size of 0.8 mm, operating at 3,600 rpm hammer shaft speed with a production capacity of 1 ton/h (Tigre Mixing and Grinding System, Tigre, São Paulo, Brazil). After particle reduction the mixture was also sampled at four points (experimental units), used to assess the vitamins concentrations after raw material grind. After grind, the raw material mean geometric diameter was determined according to sieve method (Zanotto and Bellaver, 1996), with mean value of $219 \pm 1.4 \mu\text{m}$.

Table 1. Ingredients and analyzed chemical composition of the experimental diet for dogs.

Item	g/kg
Ingredient composition (as-fed basis)	
Corn, grain	501.6
Chicken by-product meal	200.0
Soybean meal 45%	131.2
Sugarcane fiber ^a	30.0
Vitamin-mineral premix ^b	5.0
Common salt	3.5
Potassium chloride	2.5
Dicalcium phosphate	2.0
Choline chloride	1.6
DL-Methionine	0.5
Mold inhibitor ^c	0.4
Antioxidant ^d	0.1
Added by coating after dryer	
Chicken fat	75.0
Palatant enhancer ^e	30.0
Chemical composition as extruded, before coating (g/kg, DM-basis)	
Moisture	73.4
Ash	98.3
Crude Protein	245.0
Acid-hydrolyzed fat	94.5
Starch	362.8

^a Vit2be Fiber, Dilumix Industrial Ltda., Leme, Brazil.

^b Rovimix, DSM Produtos Nutricionais Brasil S/A, Jaguare, Brazil. Added per kg of food: iron, 75 mg; copper, 9.2 mg; magnesium, 75 mg; zinc, 105 mg; iodine, 1.8 mg; selenium, 0.3 mg; vitamin A, 18.750 IU; vitamin D3, 1000 IU; vitamin E, 125 mg; vitamin K, 1.5 mg; biotin, 5 mg; thiamine, 20 mg; riboflavin, 16.25 mg; pantothenic acid, 37.5 mg; niacin, 62.5 mg; vitamin B6, 7.5 mg; folic acid, 7.5 mg; vitamin B12, 0.5 mg.

^c Mold Zap Citrus: Ammonium dipropionate, acetic acid, sorbic acid and benzoic acid. Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda.d Liquid Palatant, SPF do Brazil, Descalvado, Brazil.

^d Banox: Butylated hydroxy anisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and calcium carbonate. Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda.

^e Liquid Palatant, SPF do Brazil, Descalvado, Brazil.

The ground mixture was then extruded in a single screw extruder (MEX 250, Manzoni, Campinas, Brazil), with a production capacity of 250 kg/h. The operation and configuration parameters of the preconditioner were kept unchanged (Table 2), but in order to study the application of three quantities of SME, extruder screw and die configurations varied for each treatment:

- Low SME application – sections of the extruder screw: initial - single flight and no steam lock; second - single flight and small steam lock; third - double flight uncut and small steam lock; fourth - double flight uncut and medium steam lock; fifth - conical, double flight uncut cone. Die open area of approximately 500mm²/ton/hour.
- Medium SME application - sections of the extruder screw: initial - single flight and no steam lock; second - single flight and small steam lock; third - double flight uncut and small steam lock; fourth - double flight uncut and medium steam lock; fifth - conical, double flight cut cone. Die open area of approximately 300mm²/ton/hour;
- High SME application - sections of the extruder screw: initial - single flight and no steam lock; second - single flight and small steam lock; third - double flight uncut and small steam lock; fourth - double flight cut and large steam lock; fifth - conical, double flight cut cone. Die open area of approximately 100mm²/ton/hour.

Table 2. Processing parameters of a dog food recipe to obtain three different specific mechanical energy applications to raw material (n = 4 replicates per treatment).

	Specific mechanical energy (target, kWh-t)		
	10	20	30
<i>Preconditioner</i>			
Discharge mass temperature (°C)	88.0±3.2	85.3±2.4	86.9±1.6
Mass moisture (%)	23.4±2.1	22.2±0.68	23.20±1.36
<i>Extruder</i>			
Motor amperage (A)	36.3±0.4	43.1±0.2	47.8±0.9
Mass pressure before die (MPa)	4.6±0.4	7.2±0.1	7.8±0.6
Mass temperature before die (°C)	106.0±1.2	115.1±1.7	121.5±2.2
In-barrel moisture (%)	23.4±0.3	23.0±0.4	23.4±0.2
Product flow rate (kg/h)	155.5±4.6	154.8±2.2	154.8±4.6
Specific mechanical energy (kWh-t)	9.5±0.5	21.8±0.6	30.4±1.8
Specific thermal energy (kWh-t)	32.8.8±3.8	32.5±1.5	32.7±2.6
Total specific energy (kWh-t)	42.3±3.8	54.4±1.6	64.6±1.1
<i>Kibble characteristics</i>			
Product bulk density (g/L)	554±3.5	433±6.5	277±x6.3
Starch gelatinization (%)	64.8±0.8	78.7±2.7	86.8±1.6

After achieved the target processing conditions for a specific treatment, a minimum of 30 min of a stable processing condition was observed, and the following parameters were recorded every 30 min: feed screw speed (rpm); preconditioner shaft speed (rpm); preconditioner steam flow (kg/h); preconditioner water flow (kg/h); preconditioner water temperature (°C); preconditioner discharge mass temperature (°C); extruder shaft speed (rpm); motor load (A); extruder water flow (kg/h); extruder water temperature (°C); cutting knife speed (rpm); mass temperature before the extruder die (°C); mass pressure before the extruder die (MPa); steam pressure (psig); ambient temperature (°C); air moisture (%). Kibble bulk density after extrusion and after drying (g/L) was recorded at each sampling time (measured as the weight of food corresponding to a 1 L volume). The mass flow rate from the extruder was measured directly in a bucket at each sampling time. At each observation time, food samples were collected after preconditioner, after extruder and after dryer. Food samples were stored at -20 °C for further analysis. After extrusion, the kibbles were dried in a forced air dryer at 105 °C for approximately 20 min.

The SME (kW-h/ton) was calculated for each treatment repetition (experimental unit) using the following equation (Riaz, 2000):

$$\text{SME} = (\sqrt{3} \times \text{Voltage} \times (\text{At} - \text{Av}) \times (\cos\phi \div 1000)) \times 1000 \text{ M}$$

Where: Voltage = 220 V; At = torque load working amperage (A); Av = no torque load working amperage (A); cosFi = power factor; M = mass flow rate from extruder (kg/h).

The specific thermal energy (STE; kW-h/ton) application in the preconditioner and the extruder was also calculated for each treatment repetition, combining equations of mass and energy balance (Riaz, 2000). Details of how the procedure was conducted are describe elsewhere (Pacheco et al., 2018). Finally, the total specific energy (TSE; kW-h/ton) application was obtained by the summation of SME and STE.

2.2 Nutrient Analysis

For common chemical analysis, samples collected after preconditioner and after extruder were thawed, homogenized, and pré-dried using a forced-air oven (Fanem, São Paulo, Brazil) at 55 °C for 72 h. The samples collected at all sampling points (experimental repetitions) were ground in a cutting mill (Mod MA-350, Marconi, Piracicaba, Brazil) fitted with a 1mm screen sieve size and analyzed by the following methods (AOAC, 1995): oven-drying for dry matter (DM) (method 934.01), muffle furnace incineration for ash content (method 942.05), total fat using the acid-hydrolyzed fat assay (method 954.02), and Kjeldahl method for crude protein (method 954.01). Starch content was determined according to the method of Hendrix, (1993) and the starch gelatinization degree was measured by the amyloglucosidase method as described by Sá et al., (2013). All analysis was conducted in duplicate and repeated when differences among replicates was greater than 5%.

For vitamin analysis, samples with elevated moisture content (samples collected out preconditioner and extruder) were previously dehydrated by freeze-drying. The procedure was performed at the company Sublimar Liofilização de Alimentos (Sublimar, Tatuí, São Paulo, Brazil) in a vacuum chamber stabilized with at least 0.75 Torr during the entire process. During the first 2 hours the product was kept at -22 °C, when the heating was turned on and set at a maximum temperature of 40°C for hour 24, when process was completed. This procedure was adopted to stabilize the samples microbiologically, minimizing possible damages to vitamin contents. The analyzes of vitamins A (Vitamin A by LC-DAD acc. EN 12823-1 2014), B2 and B6 (Vitamins B2 and B6 in foodstuffs HPLC-FD acc. DIN EN 14122, mod., DIN EN 14152) were performed in a Shimadzu HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) with readings at 292 nm. The samples were extracted in hexane, homogenized and centrifuged (AOAC, 2012). For quantification, the ratio between the area of the analyte and the area of the internal standard was used, in comparison with a calibration curve.

2.3 Statistical Analysis

The study was organized in a completely randomized design, with three experimental treatments (SME transference) and four replications per treatment in each processing step evaluated: raw material mixture, raw material after grind, raw material after extruder preconditioner, kibbles after extruder, kibbles after dryer. The experimental unit (replication) was considered the sampling and data collection every 30 minutes during a stable processing. The assumptions of normality of errors and homogeneity of variances were previously evaluated. Data were submitted to analysis of variance of repeated measures over time, with two factors within each application of SME, the processing step evaluated and the sampling time (experimental unit). To compared results between different SME application inside each processing step (extruder and dryer), data were submitted to analysis of variance in a completely randomized design. In both situations, when differences were detected at the F test means was compared by the Tukey Test. Data were evaluated by the Proc Mixed of the SAS Software (version 9.3, SAS Institute, Cary, NC, USA). Significant levels of difference were established at the 5% level.

3. Results

With the changes on extruder screw and die configuration an increase on SME application was observed, with values close to those established for the experiment, respectively 9.5 kWh/ton, 21.8 kWh/ton and 30.4 kWh/ton. This increase on mechanical energy induced elevations on mass temperature and pressure before the die, altering kibble formation with substantial reductions on kibble bulk density, consequent do higher expansion, and higher starch gelatinization, that increased approximately 34%. The STE application did not change, so the complementary energy to raw material transformation was originated by the greater SME application, enabling the study of the established hypotheses.

A decrease in the concentration of vitamin A (IU/kg DM) was observed during the processing ($P < 0.001$), as can be observed in Table 3. Considering that the objective of the current study was to evaluate three SME applications, the

processing steps of mixing, grind and preconditioning was common to all three experimental treatments and are presented in one single column on the tables of results. The initial concentration of vitamin A on raw material mixture was close to added externally by the premix used. An important reduction was verified after raw material grinding, with approximately 29% decrease on vitamin A initial concentration ($P < 0.05$). The preconditioning step did not alter the concentration of vitamin A, nor did the extrusion step ($P > 0.05$), with mean vitamin A concentrations similar to observed in the raw material mixture after grinding ($P > 0.05$). However, during the drying step another significant reduction of approximately 42% was observed on the concentration of vitamin A in relation to the concentration observed after extruder ($P < 0.05$). As a result, vitamin A concentration was reduced throughout the processing with an average final retention of approximately 38.5% in relation to the vitamin concentration obtained in the mixture of ingredients before grinding. This reduction was independent of the SME application as preconditioning the extrusion did not induce vitamin A losses.

No significant losses of vitamin B2 were observed during processing ($P > 0.05$), as shown in Table 4. Vitamin B2 final recoveries ranging from 93.5% to 103.1% of the initial value were verified, with no effect of SME application ($P > 0.05$) or the other processing steps. The initial value of vitamin B2 was also close to the added by the premix. In the hypothesis of the study no degradation of vitamin B2 was expected, that was used as an internal control. The consistent concentration of this vitamin along the processing, with elevated final recovery and similar values on the different processing steps evaluated might validate the study protocol and sampling procedures adopted, increasing the confidence to interpret the findings for vitamins A and B6. On the statistical comparison of vitamin B2 concentration between different SME applications, higher concentration after extruder was observed on treatment high SME but higher valued after dryer was observed for treatment medium SME ($P > 0.05$). In the comparison with the value after preconditioner, these two results are numerically higher. Due this and considering that the differences was small and of approximately 10%, this change cannot be attributed to the processing itself, and might reflect the analytical or sampling variations.

Table 3. Vitamin A (retinol acetate) concentration along the production of a dog formulation extruded with different applications of specific mechanical energy.

Item	Specific mechanical energy (kWh/ton)			SEM ¹	P-value
	9.5	21.8	30.4		
Vitamin A (IU/kg DM)					
Raw material mixture	-	18,208 ^A	-	1177.9	-
Raw material after grind	-	12,953 ^B	-	1035.7	-
Preconditioner	-	11,813 ^B	-	293.9	-
Extruder	11,132 ^{cB}	12,158 ^{bB}	13,237 ^{aB}	266.9	<.001
Dryer	6,986 ^{bC}	5,796 ^{cC}	8,253 ^{aC}	1,117.7	<.001
SEM ¹	1,095.3	1,143.0	977.1		
P-value	0.008	<.001	0.002		

¹ – SME = standard error of the mean (n = 4 per treatment)

a, b, c – Values in the same row not sharing a common superscript differ (P<0.05).

A, B, C – Values in the same column not sharing a common superscript differ (P<0.05).

Table 4. Vitamin B2 (riboflavin) concentration along the production of a dog formulation extruded with different applications of specific mechanical energy.

Item	Specific mechanical energy (kWh/ton)			SEM ¹	P-value
	9.5	21.8	30.5		
Vitamin B2 (mg/kg DM)					
Raw material mixture		18.88		0.45	-
Raw material after grind		17.04		0.31	-
Preconditioner		18.71		0.26	-
Extruder	18.55 ^b	18.32 ^b	20.29 ^a	0.31	0.003
Dryer	18.11 ^b	19.47 ^a	17.67 ^b	0.90	0.003
SEM ¹	0.254	0.332	0.365		
P-value	0.185	0.210	0.007		

¹ – SME = standard error of the mean (n = 4 per treatment)

^{a, b} – Values in the same row not sharing a common superscript differ (P<0.05).

The initial concentration of vitamin B6 on raw material mixture was higher than the expected addition by the premix. The vitamin B6 was not analyzed on individual ingredients or the premix itself, what limits to understand the obtained valued. The grinding and preconditioning steps did not result in changes in the concentration of vitamin B6 (P>0.05), with similar concentrations than on raw materials. Vitamin B6 reduction was observed after extrusion (P<0.05), but this was independent of the SME application (P>0.05) with retention values ranging from 69.5% to 76.8% of that found after the preconditioner. The drying step did not result in additional losses of this vitamin (P>0.05). The differences among SME application observed after dryer cannot be consistently attributed to the treatments itself, as higher concentration was observed for medium SME (even numerically higher than for this treatment after extrusion) with intermediary values for low SME. Additionally, comparing the values after extrusion with the obtained after dryer not differences between treatments was observed.

Table 5. Vitamin B6 (pyridoxine hydrochloride) concentration along the production of a dog formulation extruded with different applications of specific mechanical energy

Item	Specific mechanical energy (kWh/ton)			SEM ¹	P-value
	9.5	21.8	30.5		
Vitamin B6 (mg/kg DM)					
Raw material mixture		13.23 ^A		0.67	-
Raw material after grind		11.22 ^{AB}		0.40	-
Preconditioner		12.65 ^A		0.10	-
Extruder	9.06 ^B	9.72 ^B	8.77 ^{BC}	0.27	0.347
Dryer	8.88 ^{bB}	9.91 ^{aB}	7.46 ^{cC}	0.32	<0.001
SEM ¹	0.49	0.41	0.60		
P-value	<0.001	0.0026	<0.001		

¹ – SME = standard error of the mean (n = 4 per treatment)

a, b, c – Values in the same row not sharing a common superscript differ (P<0.05).

A, B, C – Values in the same column not sharing a common superscript differ (P<0.05).

4. Discussion

The high losses of vitamins found in the extrusion process, constantly lead to research to reduce the loss rates during the extrusion process (Riaz et al., 2009). There are many factors that influence the use of vitamins by the pet food market, from the production of the mixture of vitamins, the processing of rations, stability of the molecules, storage time, microbiological contamination, thinking about a final product that meets the nutritional requirements of the animals. Therefore, the industry recommends knowing the retention rates from the moment of manufacture until the consumption of the animal, according to the characteristics of the processing, using surplus calculations to compensate for losses.

For vitamin A, the lowest retention rates (35%) were found with the application of low and medium SME (9.5 and 21.8 kWh/ton). The higher retention of vitamin A in the treatment with high application of SME (30.4 kWh/ton) of 48%

is low compared to low and medium application of SME, however it is greater because the smaller open area and the greater pressurization of the mass, decrease the retention time during processing. (Riaz et al., 2009) reports that the stability of vitamins is more detrimental to the longer retention time when compared to the temperature of the extruder barrel.

Thinking about molecules, some vitamins are highly susceptible to oxidation, because they contain unsaturated carbon atoms or have double bonds (Combs, 2016). Vitamin A (retinol) has both a free hydroxy group and 5 double bonds. The esterification of retinol with acetic acid produces retinyl acetate which has the protected hydroxy group, but still has 5 double bonds susceptible to oxidation (Yang et al., 2020). For this reason, even pure retinol acetate oil must be emulsified in gelatin and sugars and processed containing an antioxidant. When added directly to the β -carotene molecule, the mixture to be extruded, approximately 75% was destroyed, however when the vitamin A source was changed to retinol acetate or retinol palmitate, the retention values ranged from 50 to 90% (Lee et al. 1978). This results is in agreement with observed from Tiwari (2009) and Yang et al., (2020). The studies found categorize losses during the extrusion process, but do not specify at which stage the sample was collected (extruder or dryer output) (Lee et al. 1978; Killeit, 1994; Riaz et al., 2009).

The greatest loss in the processing of vitamin A was during the milling (36%), Camire (2001) reported that the increase in temperature, added to the continuous flow of oxygen, leads to losses. Microencapsulation technology has further improved the stability of vitamins A, such as the reaction between gelatin and sugar, which makes the layer insoluble in water, giving it a more resistant coating that can withstand greater pressure, friction, temperature and humidity (Coelho, 2003). Vitamin A is sensitive to losses due to oxidation, light, humidity, temperature, minerals, acid and fat rancidity, being more quickly lost during storage, due to greater exposure to oxygen than during the extrusion process (Harper, 1988; Charlton and Ewing, 2007). This oxidative effect can be observed with the results found in this work, with the most significant losses of vitamin A occurring during the drying process.

The retention of vitamin B2 (riboflavin) is not directly affected by temperature or the application of SME. However, it is drastically influenced by the humidity and speed of the thread. We did not find any statistically significant losses with different energy applications, in the different processing phases. However, the increase in the speed of the screw drastically decreased the retention time of the mass in the extruder tube, and consequently increases the retention of vitamins (Riaz et al., 2009). As similar result has been previously observed from Gadiant and Fenster, (1994) in extruded fish feeds; (Bhatnagar and Hanna, 1994)(Li and Rushing, (1996) in extruded catfish feeds; Combs (2016) in human food ; Killeit, (1994) in extrusion cooking; Yang et al., (2020) extruded and pelleting in animal feed.

The molecule is stable to oxygen, but unstable to moisture, UV light, heat, acid, choline chloride and trace elements (Riaz et al., 2009). However, our results revealed that linear losses during the extrusion processing, with retention of 56% in the drying step, with the highest application of energy (30.4 Kwh/ton). A similar result has been previously observed from (Killeit, 1994) found high decrease in B6 level, using high temperature. Extrusion parameters that directly affect vitamin retention rates are increased screw speed, decreased humidity, decreased production, decreased matrix diameter and increased specific energy consumption (Killeit, 1994). Vitamin B6 it used in this study is from crystalline form. Yang et al., (2020) found decreased vitamin B6 retention during extrusion and pelletizing, but greater stability of microencapsulated vitamin B6 compared to non-microencapsulated vitamin.

The proposal of companies in the premix sales sector is to apply vitamins commonly after the drying process. However, there are some difficulties to be observed during the application process (spraying): the vitamins can be divided into water-soluble and insoluble compounds, there is a difficulty in keeping vitamins in some vitamins in solution; compounds like sugar and gelatin used to protect vitamins during the extrusion process are water-soluble compounds, leaving the vitamins exposed when in solution; the inadequate solubilization of the particles increases the coefficient of variation (cv. 15-40%), impairing the distribution of nutrients throughout the batch; this type of insertion in the process

exposes the vitamins to environmental stress much more, by decreasing the protection of the molecules, significantly decreasing the storage time (Riaz et al., 2009).

Other ways to find losses during processing, is to minimize the factors that increase, during processing, your losses, separating in mixtures only of vitamins and another containing only minerals, to remove the effect of trace minerals; reduce the time between the manufacture of this mixture, its storage and minimize the processing conditions involving the stages of mixing, grinding, conditioning, extrusion and drying; and reducing the shelf life of these products (Coelho, 2003; Riaz, 2009).

5. Conclusion

Among the stages of dog food production, milling and drying were shown to be aggressive for vitamin A, compromising the stability of this vitamin due to the high exposure of the compound to oxygen. There was no significant loss of B2, demonstrating that the commercial product employed was able to adequately stabilize and protect this nutrient. Vitamin B6 showed significant loss during extrusion of the food, although it was stable during milling and drying.

Acknowledgments

This study was made possible by funding from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (grant number 447751/2014-0) and by a fellowship for the first author from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (grant number 2018/ 23864-4) and by fellowship for the first author from the CAPES - Brazil - Finance Code 001. The authors would like to thank Guabi PetCare (Campinas, Brazil) for the financial and technical support to Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Flávio Prada”. and Manzoni Industrial Ltda. (Campinas, Brazil) for the donation of the extruder used in the study.

References

- ASSOCIATION OT THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. 2002. Official and tentative methods of Analysis. 18. ed. Arlington. AOAC International.
- ASSOCIATION OT THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. Official and tentative methods of Analysis. 18. ed. Arlington. AOAC International. 2012.
- ASSOCIATION OT THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. 1995. Official and tentative methods of analysis. 16. ed. Arlington. AOAC International
- Athar, N., Hardacre, A., Taylor, G., Clark, S., Harding, R., Mclaughlin, J., 2006. Vitamin retention in extruded food products. *J. Food Compos. Anal.* 19, 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.03.004>
- Baller, M.A., Pacheco, P., Peres, F.M., Monti, M., Carciofi, A.C., 2018. The effects of in-barrel moisture on extrusion parameters, kibble macrostructure, starch gelatinization, and palatability of a cat food. *Anim. Feed Sci. Technol.* 246, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.10.003>
- Barden, L., & Decker, E. A. 2013. *Lipid Oxidation in Low-moisture Food: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(15), 2467–2482. doi:10.1080/10408398.2013.848833
- Bazolli, R.S., Vasconcellos, R.S., de-Oliveira, L.D., Sá, F.C., Pereira, G.T., Carciofi, A.C., 2015. Effect of the particle size of maize, rice, and sorghum in extruded diets for dogs on starch gelatinization, digestibility, and the fecal concentration of fermentation products. *J. Anim. Sci.* 93, 2956–2966. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8409>
- Bhatnagar, S., Hanna, M.A., 1994. Extrusion Processing Conditions for Amylose-Lipid Complexing. *Cereal Chem.* 71, 587–593.
- Chen, H.E., Peng, H.Y., Chen, B.H., 1996. Stability of carotenoids and vitamin A during storage of carrot juice 57, 497–503. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00008-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00008-8)
- Coelho, M. Vitamins and carotenoids in pet care. 2003. In: Kvamme, J. L.; Phillips, T.D. (Eds.). *Pet Food Technology*. Mt. Morris, IL: Watt Publishing Company
- Gadient, M., Fenster, R., 1994. Stability of ascorbic acid and other vitamins in extruded fish feeds. *Aquac.* 124 124, 207–211.
- Harper, J.M., 1988. Extrusion Processing on Nutrients.
- Hendrix, D.L., 1993. Rapid Extraction and Analysis of Nonstructural Carbohydrates in Plant Tissues. *Crop Sci.* 33, 1306–1311. <https://doi.org/https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300060037x>

- Killeit, U., 1994. Vitamin retention in extrusion cooking. *Food Chem.* 49, 149–155. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90151-1](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90151-1)
- Lesková, E., Kubíková, J., Kováčiková, E., Kosická, M., Porubská, J., Holčíková, K., 2006. Vitamin losses : Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *J. Food Compos. Anal.* 19, 252–276. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.014>
- Li, M. h., Rushing, J.B., 1996. Stability of B-Complex Vitamins in Extruded Catfish Feeds. *J. Appl. Aquac.* 6, 67–71. <https://doi.org/10.1300/J028v06n02>
- Moscicki, L., 2011. Extrusion-Cooking Techniques, Techniques. <https://doi.org/10.1002/9783527634088>
- Riaz, M., 2000. Extruders in food applications. Lancaster.
- Riaz, M.N., Asif, M., Ali, R., 2009. Stability of vitamins during extrusion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 361–368. <https://doi.org/10.1080/10408390802067290>
- Rooijen, C. Van, Bosch, G., Poel, A.F.B. Van Der, Wierenga, P.A., Alexander, L., Hendriks, W.H., 2013. The Maillard reaction and pet food processing : effects on nutritive value and pet health *Nutrition Research Reviews Nutrition Research Reviews. Nutr. Res. Rev.* 26, 130–148. <https://doi.org/10.1017/S0954422413000103>
- Sá, F.C., Vasconcellos, R.S., Brunetto, M.A., Filho, F.O.R., Gomes, M.O.S., Carciofi, A.C., 2013. Enzyme use in kibble diets formulated with wheat bran for dogs: Effects on processing and digestibility. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 97, 51–59. <https://doi.org/10.1111/jpn.12047>
- Suknark, K., Lee, J., Eitenmiller, R.R., Phillips, R.D., 2001. Stability of Tocopherols and Retinyl Palmitate in Snack Extrudates. *J. Food Sci.* 66, 897–902.
- Tran, Q., 2008. Extrusion processing: Effects on Dry Canine Diets.
- Yang, P., Wang, H., Zhu, M., Ma, Y., 2020. Evaluation of Extrusion Temperatures , Pelleting Parameters, and Vitamin Forms on Vitamin Stability in Feed. *Animals* 10, 894. <https://doi.org/10.3390/ani10050894>

CAPÍTULO 4 - INFLUENCE OF PROCESS FOOD PRODUCTION EXTRUDED FOR DOGS WITH DIFFERENT SOURCES OF SELENIUM

¹Artigo redigido conforme as normas de publicação do *Animal Feed Science and Technology*.

Running head: Mineral stability.

Influence of process food production extruded for dogs with different sources of selenium

Mayara A. Baller, Luana Márcico, Thaila C. Putarov, Aulus C. Carciofi.

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Campus de Jaboticabal, UNESP -
Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil.

* Corresponding author: Tel.: +55 16 3209-2631; fax: +55 16 3203-1226.

E-mail address: aulus.carciofi@gmail.com (A.C. Carciofi).

Abstract: Selenium is an essential nutrient for dogs, and it is added in formulations as sodium selenite (Na_2SeO_3) or selenium-yeast (Se-Y). Studies from our laboratory detected selenium losses after extrusion, which is not described for pet food. The objective of the present study was to evaluate selenium retention along the extrusion process of a dog food formulation, including Na_2SeO_3 and Se-Y as selenium sources. A control diet based on corn, poultry by-product meal, soybean meal, and poultry fat was formulated to dog maintenance, and a mineral-vitamin supplement without selenium was added (CON). This diet was supplemented with 400 or 800 μg of Se/kg using Se-Y (Selplex; Alltech Agroindustrial Ltda, Brazil), purified anhydrous Na_2SeO_3 (PNaSe; Sigma-Aldrich Products, Brazil), or Na_2SeO_3 for animal feed (CNaSe; Incasa, Joinville, Santa Catarina, Brazil), totaling 7 experimental diets. After mixing, the ingredients were ground and extruded in a single-screw extruder (MEX-250, Manzoni, Campinas, Brazil). The processing conditions were not changed among diets: preconditioner mass temperature $89.8 \pm 4.2^\circ\text{C}$; mass temperature ($124.6 \pm 1.7^\circ\text{C}$), and pressure (28.8 ± 17.4 Mpa) before extruder die; in-barrel moisture: $22.7 \pm 0.7\%$; kibble apparent density: $369.7 \pm 24.3\text{g/L}$; specific mechanical energy application: $11.0 \pm 2.5\text{kWh/ton}$. Kibbles were then dried in a forced air dryer at 125°C for 25 min. After system stabilization, samples were collected at 30-min intervals from extruder and dryer, with a minimum of 4 replicates per treatment (experimental unit). Selenium was analyzed with the graphite furnace atomic absorption spectrometry technique in an atomic absorption spectrometer (model AA-6800, Shimadzu, Tokyo, Japan). All analyses were conducted in triplicate and repeated when the coefficient of variation was greater than 5%. The results were subjected to analysis of variance of repeated measures (raw materials x after extrusion and dryer) and means compared by the Tukey test ($P < 0.05$). Selenium in the CON was originated from raw materials and was not affected by processing ($P < 0.05$). A reduction of $7.0 \pm 0.4\%$ in total Se was observed to Se-Y 800 μm treatment, but not for Se-Y 400 μm , with recovery rates ranging from 93% to 104% (comparing with the values of the raw material mixture). For the two Na_2SeO_3 sources a lower concentration was observed after extrusion, with recovery rates ranging from 62% to 86% and an average loss of $22 \pm 9.0\%$ ($P < 0.01$). The studied Se-Y proved to be stable, with no significant losses, but significant Se loss was detected for both Na_2SeO_3 sources evaluated. It is suggested that the temperature, shear, pressure, and moisture during extrusion might convert part of sodium selenite into selenium dioxide, lost as a gas. In conclusion, selenium from selenium yeast was stable, whereas sodium selenite presented losses induced by the extrusion process.

Keywords: pet food, organic selenium, inorganic selenium, mineral stability

1. Introduction

The extrusion process is characterized by fast cooking, in a homogeneous and continuous way. It results from the combination of thermal energy, mechanical energy and moisture, in which high temperature, pressure and shear rates are applied to the substrate in a short time (Riaz, 2000). The process results in changes in the format and chemical composition of the final product (Moscicki, 2011). Among the beneficial effects, through high temperature and humidity, the extrusion process increases the digestibility of nutrients, palatability, allows the inactivation of antinutritional factors, such as, for example, the destruction of trypsin inhibitors (van der Poel et al., 1990; Alonso et al., 2000; Singh et al., 2007) and hemagglutinin (Neto, 2015).

Selenium (Se) is a non-metal belonging to the VIA family of the periodic table, its atomic number is 34, with an atomic mass equal to 78.971; its melting and boiling points are, respectively, 221° C and 685° C (Thomsom, 2004). In nature it is found in its organic and inorganic forms. Organic selenium is mainly found as selenoamino acids, especially selenomethionine and selenocysteine, these being the most commonly ingested forms of this element by animals in nature (Combs and Combs, 1986). Selenium has antioxidant functions, glutathione peroxidase prevents oxidative stress, animal growth, disease prevention, the immune system, maintaining tissue integrity and the health of the reproductive tract (NRC, 2006). The chemical structure is the main responsible for the bioavailability, but suffer influence by dietary factors such a fat, protein, and metals content. Organic compounds generally are most easily to absorbed. Commercial dog and cat food is often supplemented in Se, which is why its deficiency is not frequently checked (NRC, 2006).

This selenium is characterized by an easy of transition to adjacent oxidation state. The transitions forms are influenced by several factors such as pH, concentration of free oxygen, redox, potential and humidity. Under aerobic condition and at alkaline pH, higher oxidation states of this element are dominant (Kieliszek, 2019). Regarding

organic sources, these can come from chemical synthesis, represented by selenomethionine or by natural fermentation with yeasts, giving rise to mixtures of selenomethionine and selenocystine (Payne and Southern, 2005). It has been proven that both sodium selenite and yeast selenite are efficiently used by dogs' bodies (Putarov, 2014).

Although minerals are stable during extrusion, losses of selenium in the form of selenium dioxide gas are demonstrated in various types of thermal treatments (Desai et al., 2018; Dumont et al., 2006; Hakansson et al., 1987; Kieliszek, 2019; Oehm et al., 2012; Sager, 2006). Preliminary data from our research group indicated differences between the post-extrusion retention of selenium-yeast and sodium selenite, when included in dog food. This loss of sodium selenite in the extruded product refers to a real loss of the atomic element, which is no longer present in the feed. It is not about changes in its structure or complexation of the element with other substances, but about its real disappearance from the extruded mass. This fact is evidenced by the selenium analysis technique employed, atomic spectrometry with atomization in a graphite furnace (Moraes et al., 2009; Silva et al., 2007).

The objective of the present study was to evaluate selenium retention along the extrusion process of a dog food formulation, including NaSe and Se-Y as selenium sources.

2. Material and Methods

The experiment was conducted at the Feed Factory in Sao Paulo State University (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Brazil. The analyzes of selenium were performed by the Laboratório de Espectrometria Atômica Aplicada do Departamento de Química e Bioquímica, UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, São Paulo, Brazil. The bromatological analyzes were performed at the Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos "Prof. Dr. Flávio Prada".

2.1 Experimental design and treatments

A control diet based on corn, poultry by-product meal, soybean meal, and poultry fat was formulated to dog maintenance follow was formulated according to the nutritional recommendations for adult animals of FEDIAF (2017), and a special mineral-vitamin supplement without selenium added (CON) (Table 1). This diet was supplemented with 400, or 800 μg of Se/kg using Se-Y (Sel-Plex Alltech Agroindustria LTDA, São Pedro do Ivaí, Paraná, Brazil. Selenomethionine and selenocystine obtained from *Saccharomyces cerevisiae*), purified anhydrous Na_2SeO_3 (P_{NaSe} ; Sigma-Aldrich Products, Brazil) or Na_2SeO_3 for animal feed (C_{NaSe} ; Incasa, Joinville, Santa Catarina, Brazil), totaling 7 experimental diets. Each selenium source, or experimental treatment, was extruded for approximately two and a half hours. 30 minutes were waited for stabilization of the equipment, and then samples were taken every 30 minutes, this being considered the experimental unit, with 4 repetitions. The repetitions, or experimental units, were established as the data and sample collection points. These occurred at four different points after mixing the ingredients, after extruder and after dryer, in four moments during the extrusion process of the food.

Table 1. Ingredients composition and analyzed chemical composition of the experimental diet for dogs.

Item	g/kg
Ingredient composition (as-fed basis)	
Corn, grain	501.6
Chicken by-product meal	200.0
Soybean meal 45%	131.2
Sugarcane fiber ^a	30.0
Vitamin-mineral premix ^b	5.0
Common salt	3.5
Potassium chloride	2.5
Dicalcium phosphate	2.0
Choline chloride	1.6
DL-Methionine	0.5
Mold inhibitor ^c	0.4
Antioxidant ^d	0.1
Added by coating	
Chicken fat	75.0
Palatant enhancer ^e	30.0
Chemical composition, before coating (g/kg, DM-basis)	
Moisture	51,.2
Ash	98.3
Crude Protein	244.0
Crude fat	94.5
Starch	310.0

^a Vit2be Fiber, Dilumix Industrial Ltda., Leme, Brazil.

^b Rovimix, DSM Produtos Nutricionais Brasil S/A, Jaguare, Brazil. Added per kg of food: iron, 75 mg; copper, 9.2 mg; magnesium, 75 mg; zinc, 105 mg; iodine, 1.8 mg; vitamin A, 18.750 IU; vitamin D3, 1000 IU; vitamin E, 125 mg; vitamin K, 1.5 mg; biotin, 5 mg; thiamine, 20 mg; riboflavin, 16.25 mg; pantothenic acid, 37.5 mg; niacin, 62.5 mg; vitamin B6, 7.5 mg; folic acid, 7.5 mg; vitamin B12, 0.5 mg.

^c Mold Zap Citrus: Ammonium dipropionate, acetic acid, sorbic acid and benzoic acid. Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda.d Liquid Palatant, SPF do Brazil, Descalvado, Brazil.

^d Banox: Butylated hydroxy anisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and calcium carbonate. Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda.

^e Liquid Palatant, SPF do Brazil, Descalvado, Brazil.

The ingredients were mixed in a paddle-type batch mixer, with a capacity of 450L. After mixing the ingredients, composing the experimental ration, it was sampled at four different points (experimental units) to assess the initial concentration of selenium in the mixture. This was subsequently ground in a hammer mill, equipped with a sieve with 0.8 mm sieves, 3600 rpm (high speed) and with a capacity of 1 ton/h (Tigre Mixing and Grinding System, Tigre, São Paulo, Brazil).

After milling ingredients were extruded in a single-screw extruder (MEX-250, Manzoni Industrial Ltda, Campinas, Brazil). The treatments were administered sequentially with no stop-start cycle. After achieved the target processing conditions for a specific treatment, a minimum of 30 min of a stable processing condition was observed, and the following parameters were recorded every 30 min: feed screw speed (rpm); preconditioner shaft speed (rpm); preconditioner steam flow (kg/h); preconditioner water flow (kg/h); preconditioner water temperature (°C); preconditioner discharge mass temperature (°C); extruder shaft speed (rpm); motor load (A); extruder water flow (kg/h); extruder water temperature (°C); cutting knife speed (rpm); mass temperature before the extruder die (°C); mass pressure before the extruder die (MPa); steam pressure (psig); ambient temperature (°C); air moisture (%). Kibble bulk density after extrusion and after drying (g/L) was recorded at each sampling time (measured as the weight of food corresponding to a 1 L volume). The mass flow rate from the extruder was measured directly in a bucket at each sampling time. At each observation time, food samples were collected from the after extruder and after dryer. All food samples were stored at -20°C for further analysis. After extrusion, the kibbles were dried in a forced air dryer at 125°C for approximately 25 min. The SME (kW-h/ton) was calculated for each treatment repetition (experimental unit) using the following equation (Riaz, 2000):

$$\text{SME} = (\sqrt{3} \times \text{Voltage} \times (A_t - A_v) \times (\cos\phi \div 1000)) \times 1000 \text{ M}$$

Where: Voltage = 220 V; A_t = torque load working amperage (A); A_v = no torque load working amperage (A); $\cos\phi$ = power factor; M = mass flow rate from extruder (kg/h). Kibbles were then dried in a forced air dryer at 125°C for 25min. After system

stabilization, samples were collected each 30 min interval from extruder and dryer, with a minimum of 4 replicates per treatment (experimental unit).

2.2 Chemical analysis

The samples collected at all sampling points (experimental repetitions) were ground in a cutting mill (Mod MA-350, Marconi, Piracicaba, Brazil) fitted with a 1mm screen sieve size and analyzed by the following methods as described by the AOAC (1995): oven-drying for dry matter (DM) (method 934.01), muffle furnace incineration for ash content (method 942.05), and Kjeldahl method for crude protein (method 954.01). Starch content was determined according to the method of Hendrix, (1993) and the starch gelatinization degree was measured by the amyloglucosidase method as described by Sá et al., (2013). Fat content was evaluated with a Soxhlet extraction apparatus in two ways, acid-hydrolyzed ether extract (method 954.02). All analysis was conducted in duplicate and repeated when differences among replicates was greater than 5%.

2.3 Analysis of selenium content

The concentration of selenium in dog food in raw material, after extrusion and after dryer were analyzed in the Laboratório de Espectrometria Atômica Aplicada do Departamento de Química e Bioquímica, UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.. The atomic spectrometry technique and the atomization method in a graphite oven were used (Moraes et al., 2009; Silva et al., 2007). (Atomic absorption spectrometer (Shimadzu AA-6800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a background absorption corrector, deuterium lamp, auto reverse (SR) system and a pyrolytic graphite tube with an integrated platform sampler (ASC-6100, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). All analyses were conducted in triplicate and repeated when the coefficient of variation was greater than 5%.

2.4 Statistical Analysis

Treatments were evaluated in a sequential addition of selenium, with seven treatments and four replications per treatment (sampling every 30 min). The experimental unit was considered the treatment sampling. The results were subjected to analysis of variance of repeated measures and means compared by the Tukey test ($P < 0.05$). All data were found to comply with the assumptions of the analysis of variance and were analyzed using the PROC MIXED procedure of SAS (version 9.3, SAS Institute, Cary, NC, USA).

3. Results

The processing conditions were not changed among diets: preconditioner mass temperature $89.8 \pm 4.2^{\circ}\text{C}$; mass temperature ($124.6 \pm 1.7^{\circ}\text{C}$) and pressure (28.8 ± 17.4 Mpa) before extruder die; in-barrel moisture: $22.7 \pm 0.7\%$; kibble apparent density: $369.7 \pm 24.3\text{g/L}$; specific mechanical energy application: $11.0 \pm 2.5\text{kWh/ton}$. The results of the selenium contents were shown in Table 2. The feed production system, including the mixer, mill and extrusion system proved to be accurate and reliable. The final concentrations of Se were close to those established for treatments. The Se in the CON treatment came from the ingredients and was not affected by processing ($P < 0.05$; Table 1). Decreased Se concentration was found in treatments with purified and commercial Na_2SeO_3 ($P < 0.001$), with recovery rates ranging from 62% to 86% and average loss of $22.0 \pm 9.0\%$ ($P < 0.01$). $7.0 \pm 0.4\%$ reduction in Se was observed in the Se-Y 800 μm treatment ($P < 0.05$), but not in the Se-Y 400 μm treatment ($P > 0.05$), with recoveries of total Se ranged from 104 % to 92.4% ($P > 0.05$).

Table 2. Analyzed selenium concentration (DM-basis) along the diet processing

Item	Inclusion µg/kg	Raw Mixture	Extruder	Dryer	P- value
CON ^a	0	38±0.73	39±0.73	40±0.73	0.206
Se-Y ^b	400	387 ^b ±7.0	414 a ±6.1	416a±6.1	0.028
	800	829 ^a ±5.3	795b±5.2	804b±6.0	0.005
C _{NaSe} ^c	400	574 ^a ±11.4	358c±11.4	404b±11.4	<.0001
	800	879 ^a ±11.7	754b±11.7	755b±10.1	<.0001
P _{NaSe} ^d	400	559a±7.6	382b±7.6	386b±7.6	<.0001
	800	898a±4.6	760b±4.6	775b±4.6	<.0001

^a - CON: no selenium added, microelement naturally present in the ingredients.

^b – Se-Y: Selenium yeast (Sel-Plex Alltech Agroindustria LTDA, São Pedro do Ivaí, Paraná, Brazil. Selenomethionine and selenocystine obtained from *Saccharomyces cerevisiae*).

^c - Sodium selenite (Microgram TM Se 1% BPM, DSM, Italy. Micro-encapsulated sodium selenite for use in extruded foods).

^c - C_{NaSe}: Sodium selenite (45% Sodium Selenite, Incasa, Joenville, Santa Catarina, Brazil).

^d - P_{NaSe}: P.A. (Sigma-Aldrich Products, Jurubatuba, São Paulo, Brazil).

4. Discussion

Previous data from our research group had already shown that the selenium present in the raw materials is stable during the extrusion processing (Putarov, 2014). For the most part, this selenium comes in the form of selenomethionine and selenocystin (Kieliszek, 2019), thus incorporated and stored in the tissues of animal and vegetable origin used as feed raw materials. In the present study, the Se present in the ingredients was stable during the extrusion and drying steps. Ferretti and Levaner (1974), had already demonstrated Se stability during the milling process of yellow maize to corn husk in animal feed, however, it demonstrates significant losses in the milling of wheat and corn 29%, when the germ layer is separated external. Liu et al., (2009) evaluated the effect of milling time on different rice cultivars, and demonstrated that the milling process removed a significant proportion of Se from brown rice between 20% to 34%, resulting in a significant reduction of Se content in white rice.

The selenium present in yeast, added as a commercial product (Sel-Plex®, Alltech Agroindustrial Ltda, São Pedro do Ivaí, Paraná, Brazil), in the same way as the present in raw materials is found as selenomethionine and selenocystine (Combs and Combs, 1986). In its production process, the culture of *Saccharomyces cerevisiae* is incubated in a medium rich in selenium, so that

the microorganism uses this microelement instead of sulfur in the production of these two amino acids (Liou et al., 2001). Previous data from our research group had also shown that Se-yeast is stable, not changing during the extrusion processing (Putarov, 2014, 2010).

Sodium selenite, on the other hand, in three study opportunities from our research group, respectively in master's dissertation (Putarov, 2010) and doctoral thesis (Putarov, 2014) on the biological effects of selenium, and in thesis of doctorate (Sá, 2015) on the effects of processing on the nutritional characteristics of dog and cat food demonstrated a significant loss, with recovery of less than 50% of the initial selenium content, verified before the extrusion process. Data from commercial companies also point to this loss (WENGER, 2015).

The literature already demonstrates that heat treatment can cause losses of selenium in the materials (Dumont et al., 2006; Higgs et al., 1972; Kieliszek, 2019; Sager, 2006), but this process has not yet been properly studied in foods for dogs. This loss of sodium selenite in the extruded product refers to a real loss of the atomic element, which is no longer present in the feed. It is not about changes in its structure or complexation of the element with other substances, but about its real disappearance from the extruded mass. This fact is evidenced by the selenium analysis technique employed, atomic spectrometry with atomization in a graphite furnace (Moraes et al., 2009; Silva et al., 2007). By the method, the sample is first placed in a hermetically sealed graphite oven (atomizer), with an internal temperature of around 3000 °C. The equipment does not allow gases to escape. Within the atomizer the following processes occur fusion, vaporization, desolvation, dissociation and ionization (Shimadzu do Brasil, 2008). As a result, free atoms of the elements to be analyzed are obtained, among them, selenium. Then, a spectrophotometer measures the gases present there, evaluating the respective absorbed wavelengths, each length being specific to a certain chemical element (Shimadzu do Brasil, -2008). From this it appears that, as the amount of selenium found in the atomizer and measured by the spectrophotometer is less than that initially placed in the mixture, before extrusion, during the extrusive process there was loss of selenium from the extruded mass, or in other words, not all of the selenium present in the feed mass

that entered the extruder came out of it. This phenomenon only appears to occur when the source of selenium is sodium selenite. The combination of temperature, shear, pressure and humidity during extrusion is believed to have converted part of Na_2SeO_3 to selenium dioxide (SeO_2) subsequently lost with a gas (Kieliszek, 2019).

Some limitations of the present study must also be considered, only a formulation based on corn and offal flour has been tested, and the extrusion conditions may be different for different formulas. The pH of the initial and final product was not measured, to assess if there was a change, and thus to state, which reaction and volatile compound is being formed. The gases produced at the extruder outlet must be measured, to quantify and identify which volatile compounds they are produced and released at this point, since the gases produced are toxic and harmful to health and the environment.

5. Conclusion

Selenium yeast showed to be stable, but sodium selenite presented losses induced by the extrusion processing.

Acknowledgments

This study was made possible by fellowship for the first author from the CAPES - Brasil - Finance Code 001 and by a fellowship for the first author from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (grant number 2018/ 23864-4) and by a fellowship for the second author (grant number 16/22941-0). The authors would like to thank Alltech Agroindustrial Ltda. for the financial support, and Manzoni Industrial Ltda. (Campinas, Brazil) for the donation of the extruder used in the study.

References

- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington DC.
- Alonso, R., Aguirre, A., Marzo, F., 2000. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. Food Chem. 68, 159–165.

- Boekel, M. Van, Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., Somoza, V., Knorr, D., Jasti, P.R., Eisenbrand, G., 2010. A review on the beneficial aspects of food processing. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1215–1247. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900608>
- Combs, G.F., Combs, S.B., 1986. Chemical aspects of selenium, in: *The Role of Selenium in Nutrition*. pp. 41–126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-183495-1.50006-3>
- Desai, B., Tathavadkar, V., Basu, S., 2018. Mechanism of Selenium Loss in Copper Slag. *Metall. Mater. Trans. B* 49, 1213–1222. <https://doi.org/10.1007/s11663-018-1247-2>
- Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R., 2006. Selenium speciation from food source to metabolites : a critical review. *Anal Bioanal Chem.* 385, 1304–1323. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0529-8>
- Hakansson, B., Jagerstad, M., Oste, R., Akesson, B., Jonsson, L., 1987. The Effects of Various Thermal Processes on Protein Quality , Vitamins and Selenium Content in Whole-grain Wheat and White Flour. *J. of Cereal Sci.* 6, 269–282. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(87\)80064-4](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(87)80064-4)
- Hendrix, D.L., 1993. Rapid Extraction and Analysis of Nonstructural Carbohydrates in Plant Tissues. *Crop Sci.* 33, 1306–1311. <https://doi.org/https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300060037x>
- Higgs, D.J., Morris, V.C., Levander, O.A., 1972. Effect of Cooking on Selenium Content of Foods Darla. *J. Agric. Food Chem.* 20, 678–680. <https://doi.org/10.1021/jf60181a019>
- Kieliszek, M., 2019. Selenium–Fascinating Microelement, Properties and Sources in Food. *Molecules* 24, 1298. <https://doi.org/10.3390/molecules24071298>
- Liou, J., Lin, Y., Cheng, W., Yang, J.P., Wang, L., 2001. Production of selenium yeast. *Proc. - Int. Soc. Sugar Cane Technol.* 24, 315–318.
- Moraes, P.M., Milantônio, R.B., Cagnani, G.S., Santos, F.A., Federici, C., Padilha, C.C.F., Lima, P.M., Padilha, P.M., 2009. Analytical procedure based on slurry sampling for determining selenium in organic vegetable samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* 229, 409–414. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1068-2>
- Moscicki, L., 2011. Extrusion-Cooking Techniques, Techniques. <https://doi.org/10.1002/9783527634088>
- Neto, B.P., 2015. Avaliação do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) partido como ingrediente em alimentos extrusados.
- NRC, 2006. Nutrient requirements of dogs and cats, NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Whashington. DC.
- Oehm, G.J., Crisp, P.T., Ellis, J., 2012. Journal of the Air & Waste Management Association The Recovery of Selenious Acid Aerosols on Glass Fiber Filters 37–41. <https://doi.org/10.1080/10473289.1991.10466836>

- Payne, R.L., Southern, L.L., 2005. Comparison of Inorganic and Organic Selenium Sources for Broilers 1 , 2. *Poult. Sci.* 84, 898–902.
- Poel, A.T.F.B. Van Der, Stolp, W., Zuilichem, D.J. Van, 1992. Twin-screw Extrusion of Two Pea Varieties : Effects of Temperature and Moisture Level on Antinutritional Factors and Protein Dispersibility 83–87.
- Putarov, T.C., 2014. Ações antioxidantes e imunológicas do Selênio para cães. Universidade Estadual Paulista Faculdade De Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus De Botucatu.
- Putarov, T.C., 2010. Avaliação de fontes de selênio e seus efeitos no perfil metabólico e condição reprodutiva de cães. Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Campus Botucatu.
- Riaz, M.N., 2000. Extruders in Food Industry. *Extruders Food Appl.* <https://doi.org/10.15713/ins.mmj.3>
- Sá, F.C., 2015. Energia mecânica, energia térmica e moagem na extrusão de alimentos para cães e gatos. Universidade Estadual Paulista - Campus Jaboticabal.
- Sá, F.C., Vasconcellos, R.S., Brunetto, M.A., Filho, F.O.R., Gomes, M.O.S., Carciofi, A.C., 2013. Enzyme use in kibble diets formulated with wheat bran for dogs: Effects on processing and digestibility. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 97, 51–59. <https://doi.org/10.1111/jpn.12047>
- Sager, M., 2006. Selenium in agriculture , food , and nutrition *. *Pure Appl. Chem.* 78, 111–133. <https://doi.org/10.1351/pac200678010111>
- Silva, A., Neves, R.C.F., Quintero-pinto, L.G., Padilha, C.C.F., 2007. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. *Chemosphere* 68, 1542–1547. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.03.003>
- Singh, B., Sekhon, K.S., Singh, N., 2007. Effects of moisture, temperature and level of pea grits on extrusion behaviour and product characteristics of rice. *Food Chem.* 100, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.042>
- van der Poel, T.F.B., Zuilichem, D.J. Van, van Oort, M.G., 1990. Thermal Inactivation of Lectins and Trypsin Inhibitor Activity during Steam Processing of Dry Beans (*Phaseolus vulgaris*) and Effects on Protein Quality. *J. Sci. Food Agric.* 53, 215–228.
- Wenger Manufacturing Inc., Thermal versus mechanical energy in pet food extrusion cooking. *Petfood Industry.com*, 2015.