

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

**FARINHA DE VÍSCERAS DE AVES HIDROLISADA SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS, OXIDATIVOS E
INFLAMATÓRIOS DE CÃES**

Thaís de Souza Ávida

Zootecnista

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

**FARINHA DE VÍSCERAS DE AVES HIDROLISADA SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS, OXIDATIVOS E
INFLAMATÓRIOS DE CÃES**

Thaís de Souza Ávida

Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.**

2024

A957f	Ávida, Thais de Souza Farinha de vísceras de aves hidrolisada sobre parâmetros metabólicos, oxidativos e inflamatórios de cães / Thais de Souza Ávida. -- Jaboticabal, 2024 62 p. : tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi 1. Hidrólise. 2. Peptídeos bioativos. 3. Oxidação. 4. Imunidade. I. Título.
-------	---



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: FARINHA DE VISCERAS DE AVES HIDROLISADA SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS, OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS DE CÃES

AUTORA: THAIS DE SOUZA AVIDA

ORIENTADOR: AULUS CAVALIERI CARCIOFI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal, área: Nutrição Animal pela Comissão Examinadora:

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

Documento assinado digitalmente

gov.br

EDNEY PEREIRA DA SILVA

Data: 15/03/2024 10:14:38-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

Profa. Dra. MÁRCIA DE OLIVEIRA SAMPAIO GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Clínica Médica / FMVZ USP São Paulo/SP

gov.br

Documento assinado digitalmente

MÁRCIA DE OLIVEIRA SAMPAIO GOMES

Data: 15/03/2024 10:41:28-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 01 de março de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Thaís de Souza Ávida – Nascida em Campinas/SP em 06 de abril de 1994. Em 2013 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na FCAT, campus de Dracena/SP, onde se graduou em 2018. Durante os anos de graduação realizou iniciação científica pela FAPESP e outra pelo PIBIC, sob a orientação da Professora Doutora Cláudia Maria Bertan Membrive na área de reprodução animal e uma iniciação científica pela FAPESP sob a orientação do Professor Doutor Gustavo do Valle Polycarpo na área de meta-análise estatística. Ainda durante a graduação, foi Bolsista de Apoio Acadêmico e Extensão III, desenvolvendo atividades de monitoria junto à disciplina de “Histologia e Embriologia” sob a orientação da Professora Dra. Flávia Thomaz Verechia Pereira. Realizou estágio curricular na área de extensionista com frangos de corte e galinha poedeira. Após a graduação trabalhou dois anos e meio em empresa privada na área de controle de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi pela oportunidade, orientação e paciência. Sou imensamente grata à todas as oportunidades que pode me proporcionar.

Aos meus pais Rosineide e Gabriel, meu irmão Rogério, meus primos e amigos por me incentivarem e apoiarem sempre, em todas as minhas escolhas e nunca mediram esforços para que eu conseguisse realizar os meus sonhos, sem este apoio nada disso seria possível! Agradeço principalmente pelos dois últimos anos, onde enfrentei muitos obstáculos na vida pessoal. Obrigada por todo amor! Amo vocês!

Aos colaboradores do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada” Cláudia Nogueira, Diego Nogueira, Elaine Vitta e Kelly Souza por todo cuidado e dedicação com as análises laboratoriais e com os animais e com os pós-graduandos.

Aos colegas pós-graduandos e estagiários do laboratório que contribuíram para o bom convívio e realização de pesquisas, especialmente ao Msc. Lucas B. Scarpim, Dra. Camila Goloni, Dra. Sthefanie, Msc Maria Eduarda, Msc Marina Pescuma, Paloma, Carolina e Ana Paula pela colaboração intelectual e pela amizade.

Agradeço imensamente às minhas amigas de luta, Paloma, Carolina e Paulinha, que se tornaram minhas amigas além do laboratório, entramos juntas na pós e nos demos forças sempre. Sei que posso contar sempre com vocês. Amo vocês! Obrigada pela ajuda nas coletas, análises, choros e risos. Sem vocês tudo seria muito mais difícil.

Aos cães que possibilitaram a realização deste estudo: Açaí, Alice, Arthur, Amora, Antônio, Aurora, Chaves, Chokito, Laka, Léia, Lilás, Limão, Lis, Loba, Lord, Lua, Magali, Margarida, Minnie, Murph.

A CAPES, CNPq e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Unesp Jaboticabal pela bolsa de estudos.

À BRF *Ingredients* pelo suporte técnico-científico e financiamento da presente pesquisa e as empresas Adimax Pet Food e BRF Pet food apoio aos projetos do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof Dr. Flávio Prada”.

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

SUMÁRIO

TABELAS.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Justificativa	2
1.2. Hipótese	3
1.3. Objetivos gerais	3
1.4. Objetivos específicos.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Proteína na nutrição de cães e gatos.....	4
2.2. Proteína hidrolisada de frango e peptídeos bioativos.....	5
2.3. Ações dos peptídeos bioativos	6
2.3.1. Ações metabólicas	6
2.3.2. Capacidade Antioxidante.....	8
2.3.3. Capacidade imunomoduladora	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Local do estudo.....	12
3.2. Animais e manejo alimentar	13
3.3. Tratamentos experimentais	13
3.4. Delineamento experimental	18
3.5. Coletas de sangue dos animais	18
3.6. Parâmetros avaliados.....	19
3.6.1. Variáveis metabólicas.....	19
3.6.2. Variáveis imunológicas e inflamatórias	20
3.6.3. Perfil antioxidante	21
3.6.4. IgA Fecal.....	22
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
5. RESULTADOS.....	23
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Proteína hidrolisada de vísceras de frango sobre parâmetros metabólicos, oxidativos e inflamatórios de cães"**, protocolo nº 7511/22, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, 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) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de outubro de 2022.

Vigência do Projeto	01/11/2022 a 01/11/2023
Espécie / Linhagem	Canina / Beagles
Nº de animais	32
Peso / Idade	Peso médio 11kg / Idade média de 1 a 5 anos
Sexo	Fêmeas e machos
Origem	Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos "Prof. Dr. Flávio Prada"

Jaboticabal, 19 de outubro de 2022.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

FARINHA DE VÍSCERAS DE AVES HIDROLISADA SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS, OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS DE CÃES

RESUMO - Os hidrolisados proteicos apresentam peptídeos bioativos funcionais que podem alterar respostas metabólicas e fisiológicas. Objetivou-se avaliar a inclusão da farinha de vísceras de aves hidrolisada (FVH) em substituição à farinha convencional de vísceras de aves (FVA) *low ash* como fonte proteica, verificando seus efeitos sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), concentrações séricas de colesterol total e frações, pressão arterial sistêmica, parâmetros urinários, parâmetros imunológicos, inflamatórios e oxidativos de cães. Foi formulada uma ração controle contendo apenas FVA como fonte de proteína. Esta teve substituição de 25%, 50% e 100% da proteína adicionada por FVH. Trinta e dois cães foram organizados em delineamento em blocos casualizados, sendo 4 blocos com 8 cães, 2 cães por tratamento em cada bloco, totalizando 8 repetições (cães) por tratamento. Os animais consumiram as dietas por 30 dias. No dia 0 e dia 30 foram realizadas coletas de sangue para avaliar os parâmetros oxidativos e concentração sérica de citocinas (fator de necrose tumoral alfa, interleucinas-2, 6 e 10), capacidade fagocítica de neutrófilos e monócitos, e coleta de fezes frescas para quantificação de Imunoglobulina A (IgA) fecal. A atividade da ECA, colesterol e suas frações, pressão arterial sistêmica e parâmetros urinários de cães, incluindo concentrações de sódio, potássio e cloretos foram avaliados apenas no dia 30. As concentrações séricas de citocinas e concentrações séricas de colesterol LDL não atenderam às suposições da análise de variância e foram comparadas usando o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). A quantificação de IgA, índice fagocitário e capacidade antioxidante foram submetidos a análise de variância considerando efeitos de bloco e dieta, utilizando-se o tempo zero (valor basal) como covariável. Os resultados obtidos para as demais variáveis foram submetidos a análise de variância considerando apenas efeito de bloco e dieta. Quando diferiram pelo teste F, médias foram desdobradas em contrastes polinomiais segundo o nível de inclusão da FVH ($P < 0,05$). A concentração urinária e excreção renal de sódio apresentaram aumento linear com a inclusão da FVH devido à maior concentração desse macroelemento nessa matéria prima ($P < 0,001$). No entanto, esse aumento nos teores e ingestão de sódio pelos animais não influenciaram a atividade sérica da ECA e pressão arterial sistêmica ($P > 0,05$), que permaneceram dentro dos valores referenciais para cães. O pH urinário ($P < 0,001$) diminuiu de modo quadrático com a inclusão da FVH, com valores também considerados adequados para cães. O índice fagocitário e parâmetros oxidativos não diferiram entre as dietas ($P > 0,05$). Cães alimentados com 100% FVH apresentaram menores concentrações séricas de LDL ($P = 0,03$). Outras diferenças lipídicas não foram observadas ($P > 0,05$). Cães alimentados com 100% FVH tiveram menores concentrações séricas de IL-2 e TNF ($P < 0,05$). Concentrações de IL-6 e IL-10 foram menores em cães alimentados com 100% FVH do que em animais alimentados com 25% FVH e 50% FVH ($p < 0,05$), apresentando valores intermediários quando comparados com animais alimentados com a dieta controle. As concentrações de IgA foram maiores para cães que receberam a dieta 100% FVH ($P = 0,003$). A inclusão da FVH em rações para cães saudáveis demonstrou ser segura por não alterar os parâmetros metabólicos avaliados. Alterações nas concentrações séricas de citocinas e na concentração de IgA fecal sugerem efeitos fisiológicos da FVH na modulação da inflamação, pela indução à redução da inflamação sistêmica, além de sua ação imunomoduladora, com possíveis benefícios para a saúde dos cães saudáveis.

Palavras-chave: hidrólise; peptídeos bioativos; oxidação; inflamatório; imunidade.

HYDROLYSED POULTRY BYPRODUCT MEAL ON METABOLIC, INFLAMMATORY AND OXIDATIVE PARAMETERS OF DOGS

ABSTRACT – Hydrolysed proteins can have functional bioactive peptides that can alter metabolic and physiological responses. The objective was to evaluate the inclusion of hydrolysed poultry byproduct meal (HPM) in replacement of conventional low ash poultry by-product meal (PBM) as protein source, studying its effects on the activity of the angiotensin-converting enzyme (ACE), serum concentrations of total cholesterol and fractions, systemic blood pressure, urinary parameters, immunological, inflammatory, and oxidative parameters of dogs. Was formulated a control diet containing only conventional low ash poultry by-product meal (PBM) as a protein source. This had replacement of 25%, 50% and 100% of the added protein with hydrolysed poultry byproduct meal (HPM). Thirty-two dogs were organized in a randomized block design, 4 blocks with 8 dogs, 2 dogs per treatment in each block, totaling 8 replications (dogs) per treatment. The animals consumed the diets for 30 days. On day 0 and day 30, blood samples were collected to evaluate oxidative parameters and serum concentration of cytokines (tumor necrosis factor alpha, interleukins 2, 6 and 10) and phagocytic capacity of neutrophils and monocytes and fresh feces were collected for quantification of immunoglobulin A (IgA). ACE activity, cholesterol and its fractions, systemic blood pressure and urinary parameters of dogs, including sodium, potassium and chloride concentrations were evaluated only on day 30. Serum cytokine concentrations and serum LDL cholesterol concentrations did not meet the assumptions of analysis of variance and were compared using the Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$). IgA quantification, phagocytic index and antioxidant capacity were subjected to analysis of variance considering block and diet effects, using time zero (baseline value) as a covariate. The results obtained for the other variables were subjected to analysis of variance considering only the block and diet effects. When they differed by the F test, means were split into polynomial contrasts according to the level of inclusion of FVH ($P < 0.05$). Urinary sodium concentration and renal excretion showed a linear increase with the inclusion of FVH due to the higher concentration of this macroelement in this raw material ($P < 0.001$). However, this increase in sodium levels and intake by the animals did not influence serum ACE activity and systemic blood pressure ($P > 0.05$), which remained within the reference values for dogs. Urinary pH ($P < 0.001$) decreased quadratically with the inclusion of FVH, with values also considered adequate for dogs. The phagocytic index and oxidative parameters did not differ between diets ($P > 0.05$). Dogs fed 100% FVH had lower serum LDL concentrations ($P = 0.03$). No other lipid differences were observed ($P > 0.05$). Dogs fed 100% FVH had lower serum concentrations of IL-2 and TNF ($P < 0.05$). Concentrations of IL-6 and IL-10 were lower in dogs fed 100% FVH than in animals fed 25% FVH and 50% FVH ($P < 0.05$), presenting intermediate values when compared with animals fed the control diet. IgA concentrations were higher in dogs fed the 100% FVH diet ($P = 0.003$). The inclusion of FVH in diets for healthy dogs proved to be safe because it did not alter the metabolic parameters evaluated. Changes in serum cytokine concentrations and fecal IgA concentration suggest physiological effects of FVH in modulating inflammation, by inducing a reduction in systemic inflammation, in addition to its immunomodulatory action, with possible benefits for the health of healthy dogs.

Keywords: hydrolysis; bioactive peptides; oxidation; inflammatory; immunity.

TABELAS

Tabela 1. Composição química analisada da farinha convencional de vísceras de aves low ash e da farinha de vísceras de aves hidrolisadas.	15
Tabela 2. Composição de ingredientes das dietas experimentais para cães com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.	16
Tabela 3. Composição analisada, com base na matéria seca, das rações experimentais para cães com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.	17
Tabela 4. Características da urina, ingestão, concentração urinária e excreção renal de sódio, potássio e cloretos de cães alimentados com dietas com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.	25
Tabela 5. Pressão arterial sistêmica média, atividade da enzima conversora de angiotensina e concentração sérica de triglicerídeos, colesterol total e suas frações de cães alimentados com dietas com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.	26
Tabela 6. Índice fagocitário de monócitos e neutrófilos (% de células positivas) de cães alimentados com dietas com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.	27
Tabela 7. Concentração sérica de citocinas e concentração IgA fecal de cães alimentados com dietas com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.	28
Tabela 8. Parâmetros oxidativos séricos de cães alimentados com dietas com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.	29

1. INTRODUÇÃO

Os animais de companhia passaram a desempenhar papel importante na sociedade, sendo considerados por muitos proprietários como “membros da família”. Consequentemente, os proprietários demonstram-se cada vez mais preocupados com a saúde e bem-estar desses animais, principalmente em relação a alimentação, priorizando a oferta de uma dieta completa e balanceada, aliada a melhora na qualidade e expectativa de vida dos animais. Diante deste cenário, é notório o crescimento do mercado *pet* nos últimos anos, o qual faturou no ano de 2022 a quantia de 41,96 bilhões de reais, sendo o segmento alimentar (*pet food*) responsável por 80% desse valor (Abinpet, 2023). Assim, um dos focos da nutrição de cães e gatos tem sido direcionado para a busca de ingredientes que atendam à crescente exigência do mercado consumidor.

Dentre esses, os ingredientes proteicos que representam cerca de 30% da composição das rações para cães adultos, estão entre os ingredientes mais estudados e discutidos, principalmente em relação a sua qualidade, perfil de aminoácidos essenciais, digestibilidade, sustentabilidade ambiental e segurança (Peres, 2018; Carciofi *et al.*, 2006; Fortes, 2005). A farinha de vísceras de frango, dentre os ingredientes de origem animal, é a mais utilizada pela indústria *pet food* e representa boa fonte de nutrientes, com bom balanço de aminoácidos essenciais, quantidades adequadas de proteína, gordura, cálcio, fósforo e magnésio, além de apresentar boa palatabilidade, digestibilidade e disponibilidade comercial (Carciofi, 2008; Kawauchi *et al.*, 2014). Porém, pode sofrer grande variação em sua composição nutricional e digestibilidade, de acordo com método de processamento empregado e a inclusão de componentes da carcaça, resultando em ingredientes com valores nutricionais bastante diferentes (Carciofi, 2008; Carciofi *et al.*, 2009; Dozier *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2019). Dessa forma, é essencial o estudo de novos ingredientes e tecnologias com o objetivo de desenvolvê-los de forma mais estáveis e padronizados, com qualidade nutricional superior e que desempenham funções biológicas benéficas.

A farinha de vísceras de frango hidrolisada é um ingrediente obtido pelo emprego da hidrólise enzimática em vísceras, miúdos e carne de frango desossada e têm sido utilizadas frequentemente em dietas para cães e gatos. A utilização de

ingredientes hidrolisados na dieta dessas espécies, têm sido utilizadas há cerca de 20 anos principalmente como fonte de aminoácidos (Cave, 2006). Além disso, essa biotecnologia tem o intuito de melhorar as características nutricionais e funcionais do ingrediente, por meio da obtenção de grupos funcionais, como os peptídeos bioativos, durante o processo de hidrólise (Kristinsson e Rasco, 2000; Dieterich *et al.*, 2014). Esses peptídeos são considerados benéficos ao organismo, com potencial de contribuir para a melhora da saúde dos animais, apresentando possível atividade antioxidante, antimicrobiana, imunomoduladora, hipocolesterolêmica e de controle da pressão arterial (Saadi *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2017; Miltenburg *et al.*, 2020; Romero-Garay *et al.*, 2022). Um uso muito relevante atualmente dos hidrolisados proteicos é em formulações hipoalergênicas. Inúmeras empresas multinacionais e nacionais dispõem hoje de apresentações comerciais para cães com hipersensibilidade alimentar, manifestando-se está por alterações na pele e diarreia crônica (Rondelli *et al.*, 2015; Szczepanik *et al.*, 2022). O processo de hidrólise remove a antigenicidade destas fontes proteicas, que não são mais reconhecidas pelo sistema imune dos cães, mesmo dos sensibilizados para aquela fonte proteica (Olivry *et al.*, 2017). Limitação para a compreensão destes ingredientes é que a maioria das pesquisas foram realizadas com roedores ou outros modelos animais, e informações para cães baseadas em estudos são bastante escassas. Sua segurança e efeitos fisiológicos para a espécie não foi adequadamente investigada, principalmente quando relacionadas aos efeitos antioxidantes, inflamatórios, metabólicos e imunológicos da inclusão de hidrolisados proteicos.

1.1. Justificativa

Achados da literatura em modelos animais indicam possíveis efeitos biológicos benéficos do consumo de hidrolisados proteicos, o que justifica sua investigação para cães. Esse ingrediente possui excelente qualidade como fonte proteica por apresentar elevada concentração de proteína e digestibilidade, com baixa matéria mineral (Scarpim *et al.*, 2024). Desse modo, se torna ingrediente

promissor para ser utilizado em formulações de rações extrusadas para cães.

Além da sua qualidade, se esses mesmo efeitos biológicos que foram observados nos demais modelos animais forem observados em cães, a farinha de vísceras de aves hidrolisada poderá ser interessante para formulações de dietas que priorizem a saúde, bem as direcionadas a situações clínicas específicas.

1.2. Hipótese

De acordo com o identificado pela literatura científica, a utilização da farinha de vísceras de aves hidrolisada (FVH) em substituição à farinha convencional de vísceras de aves (FVA) *low ash* deverá alterar respostas metabólicas e fisiológicas em cães, inibindo a atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina (ECA), reduzindo a pressão sistêmica média e aumentando a excreção renal de sódio. O FVH estimulará, ainda, a produção de um conjunto de citocinas relacionadas a ações inflamatórias e imunológicas, com melhor atividade de parâmetros oxidativos de cães.

1.3. Objetivos gerais

Foram objetivos da presente dissertação avaliar os efeitos de inclusões crescentes de FVH, em substituição a FVA sobre parâmetros metabólicos, oxidativos, imunológicos e inflamatórios de cães.

1.4. Objetivos específicos

Comparar em cães alimentados com rações contendo quantidades crescentes de FVH os teores séricos de colesterol total e frações lipídicas, a atividade sérica da ECA, pressão arterial sistêmica média, características urinárias incluindo volume, densidade e pH, excreção renal de sódio, cloretos e potássio, concentração sérica de um painel de citocinas e parâmetros antioxidantes, quantificação das concentrações de IgA fecal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Proteína na nutrição de cães e gatos

Os ingredientes proteicos representam cerca de 30 a 40% da composição das rações formuladas para cães e gatos e estão entre os ingredientes mais estudados e discutidos atualmente, principalmente em relação a sua qualidade proteica e perfil de aminoácidos essenciais. As proteínas são moléculas orgânicas compostas por aminoácidos em cadeia peptídicas, fundamentais para o crescimento, manutenção e saúde dos animais, sendo importantes para estruturas das membranas celulares, proteínas plasmáticas, enzimas, hormônios e anticorpos, exercendo importante função no sistema imune (Nelson e Cox, 2014). As proteínas são adicionadas às rações seja a partir de ingredientes de origem animal ou vegetal, cereais, entre outros.

A farinha de vísceras de frango, dentre os ingredientes de origem animal, é a mais utilizada pela indústria *pet food*. Ela é adquirida após o processamento de subprodutos de abatedouros e representa boa fonte de nutrientes, contém adequado balanço de aminoácidos essenciais, quantidades adequadas de proteína, gordura e matéria mineral em sua composição, além de apresentar boa palatabilidade, digestibilidade e disponibilidade comercial (Carciofi, 2008; Kawauchi *et al.*, 2014). Porém, esse ingrediente pode sofrer grande variação em sua composição nutricional e na digestibilidade, de acordo com método de processamento empregado e a inclusão de componentes da carcaça, resultando em ingredientes com valores nutricionais bastante diferentes (Carciofi, 2008; Carciofi *et al.*, 2009; Dozier *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2019). Dessa forma, é essencial o estudo de novos ingredientes e tecnologias com o objetivo de desenvolver matérias primas mais estáveis e padronizados, com excelente qualidade nutricional e que venham a desempenhar funções biológicas benéficas.

Em dietas para cães, as proteínas são frequentemente adicionadas de forma íntegra e não passam por processo de hidrólise industrial prévia. No intestino delgado a proteína consumida é prontamente hidrolisada em peptídeos menores e aminoácidos livres por ação de enzimas como proteases e oligopeptidases. Porém,

está pode ser hidrolisada previamente à produção das rações com o objetivo de melhorar a qualidade final do ingrediente, uma vez que após o processo de hidrólise enzimática ocorre o aumento da sua digestibilidade, redução de sua antigenicidade e criação de funcionalidades orgânicas potenciais, desenvolvidas por peptídeos bioativos liberados no processo de hidrólise (Cave, 2006; Etemadian *et al.*, 2021; Noli *et al.*, 2021).

2.2. Proteína hidrolisada de frango e peptídeos bioativos

A farinha de vísceras de frango hidrolisada é um ingrediente proteico inovador obtido pelo emprego da hidrólise enzimática em vísceras, miúdos e carne de frango desossada. Essa biotecnologia vem sendo aplicada a diversos ingredientes de origem animal e vegetal, com o intuito de melhorar as características nutricionais e funcionais, pois no processo de hidrólise enzimática ocorre a quebra das ligações peptídicas das proteínas pela ação das proteases, liberando fragmentos de diferentes tamanhos, como os poli, tri e dipeptídeos e aminoácidos livres. Isto resulta em produto com elevada digestibilidade, além do desenvolvimento de grupos funcionais, como peptídeos bioativos benéficos ao organismo (Kristinsson e Rasco, 2000; Dieterich *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2017).

A bioatividade dos peptídeos pode ser influenciada por diferentes fatores, o que torna complexo se estabelecer e garantir que todos os hidrolisados tenham a mesma composição de peptídeos e bioatividade. Durante o processo de hidrólise os peptídeos assumem graus diferentes de polimerização, que pode influenciar profundamente a sua bioatividade (Etemadian *et al.*, 2021; Noli e Beltrando, 2021). O tipo de enzimas utilizadas, tempo de hidrólise, temperatura utilizada no processo de hidrólise e no processamento das rações e o pH influenciam marcadamente na bioatividade final do ingrediente (Moraes *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2021).

Os peptídeos bioativos são aminoácidos ligados covalentemente entre si. Permanecem inativos dentro da proteína íntegra e só se tornam ativos após a ação das proteases presentes no trato gastrointestinal ou pela hidrólise industrial, também utilizando proteases. A aplicação industrial de proteases é o método mais utilizado e menos agressivo, pois confere menor danos aos aminoácidos e as enzimas são

desativadas imediatamente após a hidrólise. Inversamente, a ação das enzimas endógenas é incontrolável, possuem sítios de clivagem específicos o que pode fornecer uma quantidade restrita de peptídeos bioativos (Lafarga e Hayes, 2014). Estudos realizados com algumas espécies animais, como ratos, camundongos, suínos, aves e peixes evidenciaram alguns efeitos benéficos das proteínas hidrolisadas, como efeitos anti-hipertensivos, atividade antioxidante e antimicrobiana, hipocolesterolêmica e melhora do sistema imunológico (Mas-Capdevila *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2022; Liang *et al.*, 2006). Na nutrição de cães e gatos, sua utilização ocorre principalmente em dietas hipoalergênicas e em palatabilizantes, podendo ser utilizadas também para animais com doença inflamatória intestinal (Cave, 2006).

2.3. Ações dos peptídeos bioativos

2.3.1. Ações metabólicas

A enzima conversora da angiotensina (ECA) está envolvida, em especial, na regulação do líquido extracelular e da pressão arterial por sua ação vasoconstritora, (Reece, 2017). A ECA é responsável por converter a angiotensina I em angiotensina II. A angiotensina II está envolvida em especial na regulação do líquido extracelular e da pressão arterial devido a sua ação vasoconstritora, estimulando diretamente a reabsorção de sódio e, indiretamente, aumentando a secreção de aldosterona pelo córtex da adrenal e da vasopressina pela hipófise, que atua por sua vez nos ductos coletores aumentando a ecreção de água (Reece, 2017).

Em humanos hipertensos são utilizados medicamentos que atuam inibindo a ECA, entretanto muitos medicamentos oferecem alguns efeitos adversos: angioedema, tosse seca, alterações do paladar, alergias cutâneas, entre outros (Sica, 2004). A ocorrência desses efeitos colaterais e o aumento expressivo da população hipertensa e com problemas cardiovasculares, contribuíram para pesquisas para seres humanos sobre os peptídeos com ação anti-hipertensiva derivados de alimentos (Ryan *et al.*, 2011).

Os peptídeos bioativos inibem a ECA se ligando ao seu sítio ativo, ou ainda, alterando sua conformação ao se ligar a um sítio inibidor impossibilitando que a

Angiotensina I se ligue ao local ativo (Ryan *et al.*, 2011). Estudos realizados *in vitro* utilizando diversos hidrolisados de subprodutos de aves, dentre eles da crista e da “papada”, dos pés, vísceras, pele, do colágeno comercial obtido de aves, do extrato de osso, entre outros evidenciaram capacidade *in vitro* de inibição da atividade da ECA (Bezerra *et al.*, 2019; Mas-Capdevila *et al.*, 2018; dos Santos Aguilar *et al.*, 2019; Mane e Jamdar, 2017; Onuh *et al.*, 2015; Yusop *et al.*, 2016; Soladoye *et al.*, 2015)

Existem diversos estudos *in vivo* com hidrolisados proteicos que avaliaram efeitos inibitórios da ECA, tendo ratos como modelo animal. Dentre estes, Mas-Capdevila *et al.* (2018) ao alimentar ratos hipertensos com uma dose de 55 mg/kg de hidrolisado de pé de frango evidenciaram redução na atividade da ECA. Igualmente em um estudo com ratos hipertensos, Huang *et al.* (2016) observaram redução na atividade sérica da ECA quando utilizou dose de 200 mg/kg de hidrolisado proteico de sardinha. No entanto, ao estudar esses efeitos fisiológicos *in vivo*, esses mesmos efeitos não foram observados em gatos alimentados com farinha de vísceras hidrolisadas (Ramos, 2022; Miltenburg *et al.*, 2020).

A inibição da ECA é considerada a principal abordagem terapêutica para o tratamento da hipertensão, motivo pelo qual está potencial bioatividade de hidrolisados proteicos tem chamado muito a atenção de pesquisadores (Zaky *et al.*, 2022). A presença e a qualidade dos peptídeos bioativos, no entanto, são influenciadas pelos tipos de proteases empregadas, pela sua capacidade de resistir às diferenças de pH e às enzimas do trato gastrointestinal, condições de processamento das rações e os substratos proteicos empregados, que irão determinar a capacidade desses peptídeos se ligarem corretamente aos sítios de inibição da ECA (Lopez-Barrios *et al.*, 2014; Wongngam *et al.*, 2020).

Durante o processo de produção as matérias-primas são misturadas, extrusadas e secas. Alguns autores pesquisaram se essas alterações realmente poderiam influenciar na qualidade do peptídeo e conseqüentemente na atividade da ECA. Foi evidenciado que quando submetidos a 100 °C por 1 hora a atividade da ECA não é influenciada, mas quando submetidas a 100 °C por 3 horas esta é eliminada (López-Sánchez *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2019).

Dentre seus diversos mecanismos de ação, os hidrolisados proteicos podem também auxiliar na redução do colesterol sérico. Esse feito deve-se à ação dos peptídeos bioativos presentes no hidrolisado proteico, que podem atuar como inibidores da atividade enzimática da 3-hidroxi-3metilglucaril-CoA redutase (HMG-CoA), enzima que atua na liberação de colesterol (Romero-Garay *et al.*, 2022). Outros possíveis mecanismos de ação dos peptídeos proposto para seres humanos estão relacionados com suas alterações no metabolismo da lipoproteína de baixa densidade (LDL), na indução da expressão de receptores para LDL, aumento da síntese de ácidos biliares e queda da absorção de esteroides pelo intestino (Erdmann *et al.*, 2008).

Existem algumas evidências científicas que indicam que os efeitos hipocolesterolêmicos estejam relacionados com as diferenças no perfil de aminoácidos presentes nas matérias primas. Por exemplo, foram observados que esse efeito pode ser observado em seres humanos utilizando proteínas de soja e peixes, isso pode estar relacionado com a baixa relação metionina-lisina e lisina-arginina nesses ingredientes (Wergedahl *et al.*, 2004). Peptídeos da caseína bovina tendem a aumentar os níveis de colesterol devido à alta relação metionina-glicina e lisina-arginina (Erdmann *et al.*, 2008). Em ratos, as proporções de metionina-glicina e lisina-arginina são determinantes da aterogenicidade e aumento dos níveis de colesterol sanguíneo, respectivamente, e a arginina e a glicina quando em maiores concentrações podem agir como fatores protetores (Giroux *et al.*, 1999; Sarwar e Ratnayake *et al.*, 1995).

Em modelos animais os estudos que avaliam esses efeitos dos peptídeos sobre os níveis do colesterol na corrente sanguínea são escassos. Em um experimento realizado *in vivo* com camundongos alimentados com hidrolisado de fígado de frango juntamente com uma dieta de alta gordura, foi evidenciado a redução nos níveis séricos de colesterol total e colesterol de lipoproteína de baixa densidade (Wu *et al.*, 2020). Entretanto, os mecanismos exatos e as correlações entre os aminoácidos e seus efeitos sobre o colesterol sérico e LDL são pouco conhecidos (Peighambardoust *et al.*, 2021).

2.3.2. Capacidade Antioxidante

Alguns peptídeos derivados de produtos animais como carnes e peixes, podem apresentar funções antioxidantes pela remoção de radicais livres e/ou inibição dos produtos das reações oxidativas (Hou *et al.*, 2017; Aguilar-Toalá e Liceaga, 2021). Algumas enzimas são utilizadas como biomarcadores do estresse oxidativo, como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione transferase que tem funções importantes na manutenção constante da concentração de radicais oxidativos e remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O acúmulo de EROs e a destruição de células no estresse oxidativo é observado quando ocorre a inibição da atividade de uma dessas duas enzimas (Rudenko *et al.*, 2021).

Outro importante biomarcador do estresse oxidativo é a capacidade antioxidante total (TAC), que traduz o efeito sinérgico entre as enzimas e componentes antioxidantes presentes no organismo (Crews *et al.*, 2000). Em seres humanos foi observado que algumas doenças cardiometabólicas, como hipertensão arterial, hiperglicemia, obesidade, valores altos de triglicerídeos e baixos de HDL estão associadas com o estresse oxidativo, observado pelo aumento da produção de EROs devido as mudanças metabólicas. Esse aumento, por sua vez, causa diminuição da CAT devido a maior concentração de EROS comparadas a outros componentes antioxidantes (Barbosa *et al.*, 2010; D'Archivio *et al.*, 2012; Kaefer *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2013). No entanto, existem poucos estudos que relacionem a TAC às doenças cardiometabólicas.

Em um estudo recente com cães alimentados com 24% hidrolisado de fígado de frango, foi observado ausência de diferença na capacidade antioxidante total. Isso pode ter ocorrido devido ao aumento no estresse oxidativo causado pelo aumento da monoamina oxidase (MAO), que durante o processo de desaminação produzem amônia e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Pinto *et al.*, 2023).

A Glutathione (GSH) é uma enzima antioxidante que está diretamente relacionada à defesa das células contra o estresse oxidativo e morte celular, agindo na proteção celular contra as EROs (Joseph *et al.*, 1997). A GSH possui duas formas de defesa, enzimática e não enzimática, e sua ação enzimática compreende várias enzimas do ciclo redox, sendo a glutathione peroxidase a mais importante. Outras

formas de defesa enzimática incluem a SOD e a catalase, que vão agir na remoção de EROs promovendo redução do estresse oxidativo (Chen *et al.*, 2010). Em ratos a inclusão do hidrolisado proteico de pés de frango resultou num aumento na atividade da glutathiona reduzida (GSH) e este achado foi relacionado com redução do estresse oxidativo (Mas-Capdevila *et al.*, 2019). Em outros estudos realizados *in vivo* com hidrolisado proteico de origem vegetal foi observado aumento na atividade da SOD e glutathiona peroxidase em suínos (Han *et al.*, 2017) e camundongos (Fang e Wang, 2009) alimentados com hidrolisado de glúten de milho.

2.3.3. Capacidade imunomoduladora

As citocinas são polipeptídeos imunomoduladores divididos em classes principais: Interleucinas (IL), interferons (IFN), quimiocinas, fatores estimulantes de colônias (CSF) e fatores de necrose tumoral (TNF) (Merck Corporation, 2013; Paltrinieri, 2008; Javard *et al.*, 2017). São produzidas em cascata, isto é, após a produção de uma citocina ela estimulará as suas células-alvos a produzirem outras citocinas que podem aumentar (citocinas pró inflamatórias produzidas pelas células Th1) ou atenuar (citocinas anti-inflamatórias produzidas pelas células Th2) a resposta inflamatória, influenciando a atividade, diferenciação, proliferação e conservação da célula imunológica (Zhang *et al.* 2007). As respostas Th1 e Th2 podem ser antagonistas, ou seja, quando uma célula é ativada a outra é suprimida, desencadeando diferentes respostas imunes (Male *et al.* 2006; Halliwell and Gorman, 1992).

As interleucinas IL2, IL6 e TNF (fator de necrose tumoral) são citocinas pró-inflamatórias produzidas por células inflamatórias, especialmente os macrófagos, que exercem importantes efeitos na inflamação, reparação tecidual e fibrose. Subpopulações de macrófagos são responsáveis principalmente pela liberação de IL-1 β e TNF- α (Male *et al.*, 2006; Sommer *et al.*, 2010; Curfs *et al.*, 1997). A TNF- α é uma das citocinas responsáveis pela resposta de fase aguda ao estímulo inflamatório e exerce muitas ações protetoras nas mucosas, estimula as atividades microbidas dos neutrófilos e macrófagos e induzem o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção (Male *et al.*, 2006; Halliwell and Gorman, 1992). A IL-6 atua na imunidade natural e adquirida e é sintetizada por fagócitos

mononucleares e linfócitos, sob estímulo de outras citocinas como IL-1 e TNF. Esta estimula a produção de neutrófilos e o crescimento de linfócitos B. Está envolvida na produção de muitas outras citocinas, promovendo a produção de IL-2 pelos linfócitos Th ativados. A IL-2 induz a expressão de receptores (IL-2R) para a IL-2 e age na regulação, crescimento, sobrevivência e diferenciação das células responsáveis pela imunidade, como os leucócitos e linfócitos T. A IL-6 pode desempenhar algumas outras funções, como: efeito sinérgico com a IL-4 promovendo a diferenciação das células Th2; cofator junto com a IL-1 na síntese de IgM e junto com a IL-5 na síntese de IgA (Male *et al.*, 2006; Halliwell and Gormann 1992).

As citocinas IL-10 e IL-4 são consideradas anti-inflamatórias, produzidas por uma variedade de células do sistema imune. Auxiliam as células B na diferenciação plasmática secretando anticorpos, especificamente as imunoglobulinas (IgG, IgA ou IgE) durante a resposta imune humoral (Day e Schultz, 2014). Inibem as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células Th1, principalmente TNF e IL-6 e atuam na proliferação de mastócitos (Male *et al.*, 2006; Halliwell and Gormann 1992).

Diante dessas funções das citocinas na imunomodulação e do proposto de que os peptídeos presentes nos hidrolisados proteicos podem apresentar ação potencial sobre a produção sérica destes compostos e na resposta imunológica dos animais, estudos em camundongos (Yang *et al.*, 2009), frangos (Wu *et al.*, 2022), gatos (Ramos, 2022), cães (Pinto *et al.*, 2023) e peixes (Liang *et al.*, 2006) foram conduzidos, investigando efeitos da proteína hidrolisada de origem animal e vegetal nessas espécies. Foi evidenciado o aumento da secreção das citocinas Interleucina IL-2 e IL-6 em camundongos alimentados com preparação de oligopeptídeo marinho de salmão-keta, pelo método de hidrólise enzimática (Yang *et al.*, 2009). Em um estudo recente, Wu *et al.*, (2022) investigaram a ação do hidrolisado proteico de glúten de milho em frangos desafiados com *Escherichia coli*, também demonstrando aumento na secreção das citocinas TNF- α e IL-6. Esse efeito pôde ser evidenciado também em gatos saudáveis alimentados com farinha de vísceras de aves hidrolisada, onde foi possível observar estímulo ao aumento sérico das citocinas Fator de células tronco, fator quimiotático de monócitos e IL-8, IL-2, IFN-gama e TNF-alfa (Ramos, 2022). Em cães, existem poucos estudos sobre os efeitos da proteína hidrolisada de origem animal. Recentemente, Pinto *et al.*, 2023 observou

que cães alimentados com hidrolisado de fígado de aves (HFA) não apresentaram redução nas concentrações plasmáticas de IgA ao longo de 45 dias, enquanto cães alimentados com a dieta controle, tiveram suas concentrações de IgA reduzida ao longo desse período. No entanto, sabe-se que as concentrações plasmáticas de IgA pouco se correlacionam com a IgA secretora, que é encontrada predominantemente na mucosa intestinal (German et al., 1998). Nesse mesmo estudo foram avaliadas as concentrações séricas de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10), entretanto todas se mantiveram normal após 45 dias de consumo da dieta à base de HFA com exceção da IL-4 que houve uma redução independente da dieta. (Pinto et al., 2023).

Com o objetivo de reduzir estresse e doenças em psicultura, Liang *et al.*, (2006) avaliaram o efeito do hidrolisado proteico de peixes (HPP) em robalos. Os autores verificaram que o índice fagocitário foi significativamente maior nos grupos alimentados com HPP do que o grupo controle, identificando melhora na resposta imune inata. Adicionalmente, em peixes alimentados com hidrolisado proteico de origem animal, foram observados efeitos significativos no aumento de imunoglobulinas, sugerindo que a inclusão desse ingrediente na alimentação resulta em melhora das condições biológicas e imunológicas e resistência a doenças (Bui *et al.*, 2014). Entretanto, o conhecimento da influência dos hidrolisados sobre as células de defesa, índices fagocitários e produção de anticorpos permanece ainda incerto para cães, existindo desafios de pesquisa para estudos adicionais nessa área para diferentes espécies animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local do estudo

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal.

Os procedimentos experimentais *in vivo* foram submetidos previamente à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Estes foram aprovados sob o processo número 7511/22.

3.2. Animais e manejo alimentar

Foram utilizados 32 cães da raça beagle, machos ou fêmeas, castrados ou não, com peso médio de $13,3 \pm 0,4$ kg e idade média de $4 \pm 1,5$ anos. A média do escore de condição corporal dos cães foi de $6 \pm 1,5$, na escala de 1 a 9 pontos (Laflamme, 1997). Os cães foram imunizados com as vacinas polivalentes e anti-rábica, vermifugados e passaram por avaliação física, hematológica, bioquímica sérica (alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, ureia, creatinina, proteína total e albumina), exame de urina e exame coproparasitológico para confirmação da saúde.

Durante o período de adaptação os cães permaneceram alojados em canis com solário, medindo 1,5m x 4,0m. Durante este período os animais foram soltos diariamente em área gramada, para a prática de exercícios voluntários e socialização. Durante o período de coleta de urina, para análise dos parâmetros urinários, os cães foram alojados em gaiolas metabólicas individuais em INOX, medindo 1,0m x 1,0m x 1,0m, permitindo a quantificação da ingestão alimentar e coleta total da urina para análise dos parâmetros urinários.

A quantidade de alimento oferecida aos cães foi individualmente calculada de acordo com a energia metabolizável da dieta e a necessidade energética individual, de acordo com as recomendações do Nutrient Requirements of Dogs and Cats (NRC, 2006). Os cães foram pesados semanalmente e a quantidade de alimento fornecida foi ajustada, se necessário, para manutenção do peso corporal dos animais. A quantidade total diária foi oferecida uma vez ao dia às 15:30 horas. Água permaneceu *ad libitum* durante todo o período experimental.

3.3. Tratamentos experimentais

Com base na composição química analisada dos ingredientes teste (Tabela 1), foi formulada uma ração experimental controle, com apenas farinha convencional de vísceras de aves (FVA) *low ash* como fonte de proteína. Esta formulação teve substituição de 25%, 50% e 100% da proteína adicionada por farinha de vísceras de aves hidrolisada (FVH), gerando assim quatro dietas com composição semelhante de proteína e gordura (Tabela 2). Devido às diferenças de composição entre a FVA e a FVH, ajustes nas fontes de carboidratos, gordura, fosfato bicálcico e carbonato de cálcio foram necessários para que as rações apresentassem composições químicas semelhantes. Todas as formulações foram completas e balanceadas em relação aos nutrientes essenciais para cães adultos, de acordo com as recomendações da FEDIAF (2021).

Tabela 1. Composição química analisada da farinha convencional de vísceras de aves *low ash* e da farinha de vísceras de aves hidrolisadas.

	Farinha de vísceras de aves	
	Convencional <i>low ash</i>	Hidrolisada
Composição química (%)		
Umidade	3,4	5,2
Extrato Etéreo hidrólise ácida	13,9	6,1
Matéria mineral	8,1	4,7
Cálcio	1,8	0,2
Fósforo	1,4	1,3
Proteína bruta	69,0	75,5
Aminoácidos essenciais (%)		
Arginina	4,8	5,2
Histidina	1,6	1,8
Isoleucina	3,1	3,4
Leucina	5,5	5,8
Metionina	1,9	2,1
Metionina + Cistina	2,8	2,9
Fenilalanina	3,0	3,0
Fenilalanina + Tirosina	5,5	5,4
Treonina	3,1	3,2
Valina	3,9	3,9
Triptofano	0,9	0,9
Lisina	4,9	5,6
Aminoácidos não essenciais (%)		
Alanina	4,3	4,9
Ácido Aspártico	6,3	6,7
Ácido Glutâmico	9,2	10,6
Glicina	5,3	6,3
Prolina	3,8	4,3
Serina	3,1	3,0
Aminoácidos Totais (%)	68,0	74,0

Tabela 2. Composição de ingredientes das dietas experimentais para cães com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

Ingrediente (%)	Dietas experimentais ¹			
	CO	25%	50%	100%
Milho grão	30,00	30,00	30,00	30,00
Arroz quirera	24,79	24,51	24,24	23,69
Farinha vísceras <i>Low Ash</i>	28,51	21,38	14,25	-
Farinha de vísceras de aves hidrolisada	-	6,55	13,10	26,19
Gordura de aves	9,19	9,67	10,15	11,11
Fibra de cana ²	2,50	2,50	2,50	2,50
Palatabilizante líquido ³	2,00	2,00	2,00	2,00
Calcáreo	0,49	0,70	0,90	1,32
Fosfato bicálcico	0,36	0,58	0,81	1,26
Premix MIN/VIT ⁴	0,60	0,60	0,60	0,60
Sal comum	0,50	0,50	0,50	0,50
Cloreto de potássio	0,60	0,54	0,49	0,37
Cloreto de colina	0,32	0,32	0,32	0,32
Antifúngico ⁵	0,10	0,10	0,10	0,10
Antioxidante ⁶	0,05	0,05	0,05	0,05

¹CO, dieta controle sem o ingrediente teste; 25% da farinha de vísceras de aves hidrolisada; 50% da farinha de vísceras de aves hidrolisada; 100% da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

²Vit2be Fiber, Dilumix Industrial Ltda., Leme, Brasil.

³D'TECH 10L, Palatabilizante Líquido, SPF do Brasil Indústria e Comércio Ltda., Descalvado, Brasil.

⁴Adicionado por kg da dieta: Vitamin A, 18,750 IU; Vitamin D3, 1,500 IU; Vitamin E, 125 IU; Vitamin K3, 1,5 mg; Vitamin B1, 5 mg; Vitamin B2, 16.25 mg; Pantothenic Acid, 37.5 mg; Vitamin B6, 7.5 mg; Vitamin B12, 45 mcg; Vitamin C, 0,125 g; Nicotinic Acid, 0.0625; Folic Acid, 0.75 mg; Biotin, 0.315 mg; Iron, 0.1 g; Copper, 9.25 mg; Manganese, 6.25 mg; Zinc, 0.15 g; Iodine, 1.875 mg; Selenium, 0.135 mg.

⁵Mold Zap Citrus: Ammonium dipropionato, acetic acid, sorbic acid and benzoic acid. Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda.

⁶ Banox, Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda., Araucária, Brasil.

As dietas foram analisadas (AOAC, 2010) por meio de secagem em estufa para avaliação da matéria seca (MS) (método 934-01), oxidadas em mufla para determinação de matéria mineral (método 942-05), a proteína bruta foi determinada por método de Kjeldahl (método 954-01), fibra bruta com tratamento ácido e básico (método 991-43) e extrato etéreo mediante hidrólise ácida prévia (método 954-02). A quantidade de amido foi determinada segundo (Hendriks e Sritharan, 2002). A fibra dietética total foi avaliada por método enzimático-gravimétrico (método 2009.01). O grau de gelatinização do amido foi determinado pelo método da amiloglicosidade (Sá *et al.*, 2013) para se acessar a qualidade de processamento. O perfil de aminoácidos dos ingredientes foi analisado de acordo com Hagen e Frost (1989). O teor de triptofano foi determinado segundo Lucas e Sotelo (1980). Os conteúdos de lisina livre foram avaliados pelo método 1-fluoro-2:4-dinitrobenzeno (FDNB), conforme descrito pela AOAC (método 975.44). Além disso, as dietas foram encaminhadas para análise de cloretos por metodologia interna do laboratório em potenciômetro, potássio (AOAC: 2013.06,21ed, 2019) e sódio (AOAC: 2013.06,21ed, 2019) na Eurofins do Brasil (Garibaldi - RS). As análises foram realizadas em duplicata e repetidas quando o coeficiente de variação foi superior a 5%. A composição química analisada das rações encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Composição analisada, com base na matéria seca, das rações experimentais para cães com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

Ingrediente (%)	CO ¹	Farinha de vísceras de aves hidrolisada (%)		
		25%	50%	100%
Matéria Seca	95,8	97,6	95,5	94,5
Proteína Bruta	27,8	27,8	27,6	27,9
Amido	37,8	37,5	37,1	37,3
Extrato Etéreo Hidrólise Ácida	13,5	13,6	13,7	13,8
Matéria Mineral	5,5	5,8	5,6	5,2
Fibra dietética total	12,5	12,2	11,9	11,8
Sódio	0,34	0,27	0,26	0,36
Potássio	0,63	0,57	0,48	0,66
Cloretos	0,8	0,8	0,8	0,8

¹ CO, dieta controle sem o ingrediente teste.

3.4. Delineamento experimental

O estudo seguiu delineamento em blocos casualizados, com quatro blocos de 8 unidades experimentais (cães) e dois animais por tratamento, totalizando oito animais (repetições) por ração (tratamento). Em cada bloco a distribuição dos cães foi homogeneizada para que estes apresentassem idade e escore de condição corporal similares ($P>0,05$). O fator de bloco foi o tempo, devido a impossibilidade de estrutura para condução concomitante do estudo em 32 animais.

Anteriormente ao período experimental, no tempo zero, foi realizada coleta de sangue para determinação do perfil antioxidante, ensaio de fagocitose e perfil de citocinas séricas nos animais e coleta de fezes frescas para quantificação de IgA fecal. Cada bloco do estudo teve duração de 30 dias, com todos os animais consumindo as dietas de forma randomizada. Do dia 28 ao dia 30 foi realizada coleta total de urina para determinação de pH, densidade, volume, concentração de sódio, potássio e cloretos, e, no dia 30 foram realizadas mensurações da pressão arterial sistêmica média e coleta de sangue dos animais para o estabelecimento do perfil antioxidante, atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), colesterol total e frações, ensaio de fagocitose e perfil de citocinas séricas.

3.5. Coletas de sangue dos animais

O sangue foi coletado por meio de punção venosa central ou periférica, com os animais em jejum alimentar de oito horas e hídrico de duas horas. Foram adotadas técnicas de contenção física mínima. Os cães são previamente adaptados ao procedimento, como parte dos protocolos de manejo do laboratório, de modo a não demonstrarem desconforto ou medo durante o procedimento. Foram coletados 13 mL de sangue de cada animal, armazenados em tubo com ativador de coágulo (BD Vacutainer® 4mL, Becton-Dickinson, USA) e com tempo de formação de coágulo de 30 minutos. Após este tempo, os tubos foram centrifugados à 4 °C e 3.000G durante 10 minutos e em seguida o soro foi aliquotado com auxílio de micropipetas em tubos do tipo Eppendorf, com quantidades específicas para cada parâmetro a ser avaliado descritos abaixo, e armazenado a - 80°C.

3.6. Parâmetros avaliados

3.6.1. Variáveis metabólicas

Atividade da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA)

Para a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), foram utilizados 1,5 mL de soro para esta análise. As amostras foram enviadas ao laboratório certificado Endomed (Jaboticabal/SP) e analisadas por metodologia enzimática de acordo com Noorani e Nazeer (2020).

Mensurações de pressão arterial sistêmica média

A determinação da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada por método não invasivo. Os animais foram colocados em decúbito lateral direito, foram utilizados manguitos do tipo neonatal de diversas larguras, escolhidos conforme a circunferência do membro torácico, colocados no terço médio da região rádio-ulnar, de acordo com Acierno et al. (2018). As mensurações foram realizadas no término do experimento (dia 30) e foram realizadas cinco mensurações consecutivas, considerando a média aritmética dos valores obtidos.

Previamente à mensuração da PAS, determinou-se a circunferência do membro do animal ao nível do terço médio do rádio-ulna, para escolha de manguito adequado, com largura correspondente a 40% da circunferência do membro. O transdutor foi posicionado entre os coxins do carpo e metacarpo, sobre a região da artéria medial, iniciando-se a insuflação do manguito até a interrupção do pulso. A PAS é caracterizada no momento do retorno da percepção do pulso (ao desinflar o manguito), de acordo com metodologia já estabelecida (WARE, 2011).

Os seguintes equipamentos e materiais foram utilizados: gel à base de água para contato de transmissão ultrassônica (Ultra-Gel ULTRA, MultiGel, Silvianópolis-MG, Brasil); doppler veterinário DV 610V (Medmega, Franca-SP, Brasil); manguitos veterinários número quatro e cinco (Centaurus Vet, USA, 5 a 9,5cm de circunferência); esfigmomanômetro aneróide manual (Premium® ML177, Wenzhou-Zhejiang, China). Todas as mensurações ocorreram no ambiente em que os animais já estavam habituados, a fim de se minimizar eventuais alterações comportamentais e, conseqüentemente, de pressão arterial (Rodan et al., 2011; Acierno et al., 2018).

Colesterol total e frações

As análises de colesterol total, colesterol HDL e triglicérides foram realizadas com auxílio de kits comerciais veterinários (Labtest – Colesterol Liquiform ref.76, Colesterol HDL ref.13, Triglicérides Liquiform ref.87) seguindo as especificações do fabricante em espectrofotômetro (Labquest, Labtest Diagnóstica S.A, Lagoa Santa, Brasil). A concentração de colesterol LDL foi calculada pela fórmula de Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972).

Quantificações urinárias

Para quantificações urinárias, a urina de 24h de cada animal foi coletada nas gaiolas metabólicas durante três dias consecutivos. Estas foram coletadas em garrafas plásticas com conservante timol na concentração de 100 mg (Sinthy, LabSinthy, Diadema, São Paulo, Brasil). Após o término de cada período de 24h, o volume, pH e a densidade urinária foram mensurados e as urinas armazenadas em freezer -20 °C. Anteriormente às análises de sódio, potássio e dos cloretos, as amostras foram descongeladas em geladeira durante 24h e homogeneizadas compondo uma única amostra representativa dos três dias de coleta de cada animal. As concentrações de sódio e potássio foram obtidas por eletrodos íon-seletivos (Roche Diagnostics, 9180, Indianapolis, USA). A análise de cloretos foi realizada por meio de kit bioquímico comercial específico (Labtest Cloretos Liquiform ref.115) seguindo as especificações do fabricante em espectrofotômetro (Labquest, Labtest Diagnóstica S.A, Lagoa Santa, Brasil). Utilizando esses resultados, foi possível calcular a excreção renal destes eletrólitos através dos valores de concentração urinária do eletrólito e volume de urina produzido diariamente (Mendonça *et al.*, 2018).

Os cálculos de ingestão de cada macroelemento foram realizados considerando-se a ingestão total diária média de ração de cada cão e as concentrações destes macroelementos nas dietas.

3.6.2. Variáveis imunológicas e inflamatórias

Ensaio de fagocitose de neutrófilos e monócitos

Para o ensaio de fagocitose foi coletado 1,0 mL de sangue via punção jugular com heparina. Posteriormente, 100 µL de cada amostra foi incubada com 20 µL de “pHrodo *E. Coli* BioParticles”, reagente fornecido pelo kit comercial (pHrodo *E. coli* BioParticles A10025, Molecular Probes Inc., Oregon, EUA). Para cada amostra de sangue, dois tubos foram preparados com o reagente, um foi acondicionado em gelo e o outro mantido em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. Após isso, as amostras foram submetidas a lise de hemáceas, centrifugadas e lavadas, de acordo com as especificações do fabricante. Duas amostras de controle negativo também foram processadas da mesma forma em cada dia de coleta, ambos os tubos sem a presença de biopartículas. As amostras foram analisadas por citômetro de fluxo (FACSCanto, Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA, EUA) e os resultados mostrados em porcentagem do sinal de fluorescência dentro da população desejada de neutrófilos e monócitos. A marcação da população das células foi analisada de acordo com seu volume e complexidade de acordo com o *software* FlowJo™ versão 10 (Neaga et al., 2013).

Perfil sérico de citocinas

Para o perfil sérico de citocinas foram analisados: fator de necrose tumoral (TNF) alfa e interleucinas (IL) 2, 6 e 10. As dosagens de citocinas no soro foram realizadas em duplicata por meio do kit Luminex específico para cães, de acordo com as recomendações do fabricante (MILLIPLEX MAP Canine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay - Merck Millipore, St Charles-Missouri-USA).

3.6.3. Perfil antioxidante

Para avaliar os parâmetros oxidativos foram analisadas as concentrações de ácido tiobarbitúrico (TBARS), a partir da concentração do malondialdeído (MDA) conforme descrito por Payá *et al.* (1992). A capacidade antioxidante total (TAC) foi mensurada por meio de um kit comercial (Antioxidant Assay Kit, CS0790, Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante. A atividade doadora de hidrogênio pelos antioxidantes do soro foi avaliada através da capacidade de sequestração do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), por espectrofotômetro

UV-visível (SpectraMax M5, Molecular Devices, San José, Califórnia, EUA) A carbonilação de proteínas (PC) foi medida usando kit comercial (Protein Assay Kit Colorimetric Carbonyl, Cayman Chemical Company), conforme descrição do fabricante. A medição de tiol total, ou grupos sulfidríla (SH), foi realizada de acordo com o método descrito por Hu (1994). Glutathiona na forma reduzida (GSH) foi quantificada por absorbância em microplacas (Sedlak e Lindsay, 1968), e proteínas totais em microplacas por coloração de Bradford (Bradford, 1976). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

3.6.4. IgA Fecal

Fezes frescas (imediatamente após a eliminação) foram coletadas por três dias consecutivos antes e 30 dias após o consumo das dietas experimentais. Em cada período, as amostras de fezes foram agrupadas por cão e IgA fecal extraída usando uma solução salina (Peters, 2004). Aproximadamente 1 grama de fezes foi pesada e diluída em 10 mL de tampão de extração composto por solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M (pH 7,4), Tween 0,5% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e azida sódica 0,05%. Após a homogeneização, as suspensões fecais foram centrifugadas a 1.500 x g por 20 min a 5 °C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um microtubo estéril contendo 20 µL de um coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Para a remoção dos resíduos, as amostras foram centrifugadas a 15.000 x g por 15 min a 5 °C, e os sobrenadantes foram mantidos em microtubos a -20 °C até a análise. A quantificação de IgA foi realizada por kit ELISA para determinação de IgA canina (Bethyl laboratories, Montgomery, TX, EUA). A densidade óptica (DO) foi lida a 450 nm com um leitor de microplacas (MRX TC Plus, Dynex Technology, Chantilly, Virginia, EUA). Para calcular a concentração de IgA, a DO das amostras foi comparada com a DO de um padrão com concentração conhecida de IgA. A amostra de IgA canino padrão foi fornecida no kit, e sete diluições do padrão foram feitas para desenvolver uma curva de regressão entre a quantidade de DO e IgA. As

amostras foram analisadas em duplicata, e as análises foram repetidas quando a variação entre as repetições foi maior que 10%.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo foi analisado segundo delineamento em blocos casualizados, com 4 blocos, 4 tratamentos e 8 repetições por tratamento. A unidade experimental foi considerada um cão. Todas as variáveis foram verificadas quanto às pressuposições de homocedasticidade de homogeneidade de variâncias seguindo o valor de λ e normalidade dos erros pelo método de Cramer-von Mises. As concentrações séricas de citocinas e concentrações séricas de colesterol LDL não atenderam às suposições da análise de variância e foram comparadas usando o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). A quantificação de IgA, índice fagocitário e capacidade antioxidante foram submetidos a análise de variância considerando efeitos de bloco e dieta, utilizando-se o tempo zero (valor basal) como covariável. Os resultados obtidos para as demais variáveis foram submetidos a análise de variância considerando apenas efeito de bloco e dieta. Quando diferiram pelo teste F, médias foram desdobradas em contrastes polinomiais segundo o nível de inclusão da FVH ($P < 0,05$). Os dados das variáveis utilizadas para analisar os parâmetros urinários, pressão arterial, atividade da ECA, colesterol total, HDL e triglicérides foram submetidos à análise de variância e quando significativos ao teste F comparados por meio de contrastes polinomiais segundo o nível de inclusão do FVH ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do PROC MIXED, do programa computacional Statistical Analysis System (SAS).

5. RESULTADOS

As rações foram bem aceitas pelos animais, que mantiveram peso corporal constante ao longo do estudo ($P > 0,05$; dados não apresentados). As fezes foram sempre bem formadas, sem episódios de diarreia ou fezes amolecidas. Os valores de volume e densidade urinários (Tabela 4) não diferiram entre os grupos ($P > 0,05$) e

se mantiveram de acordo com o valor de referência para a espécie (Thrall et al., 2017). O pH da urina apresentou redução quadrática, com menor valor para cães alimentados com as rações com 100% de FVH ($P = 0,007$). A ingestão de sódio apresentou elevação quadrática e maiores valores para cães alimentados com a dieta 100% FVH ($P < .001$). A concentração urinária e excreção renal de sódio aumentaram de modo linear ao aumento da inclusão de FVH ($P = 0,008$ e $P < .001$, respectivamente). A ingestão de potássio diferiu entre os tratamentos, com elevação quadrática e maiores valores para os cães alimentados com a dieta controle e 100% ($P < 0,001$), porém a concentração do eletrólito na urina e sua excreção renal não diferiram entre os tratamentos. A ingestão, concentração urinária e excreção renal de cloretos foram similares entre os cães alimentados com as dietas experimentais ($P > 0,05$).

Tabela 4. Características da urina, ingestão, concentração urinária e excreção renal de sódio, potássio e cloretos de cães alimentados com dietas com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

Item	Dietas experimentais ¹				EPM ²	P valor	Contraste ³	
	CO	25%	50%	100%			Linear	Quadrático
Características da urina								
Ph	6,60	6,80	6,67	6,11	0,07	<0,001	<0,001	0,007
Volume (mL/kg/dia)	23,15	19,04	21,95	22,89	1,11	0,459	0,714	0,327
Densidade (mOsm/kg)	1.026	1.029	1.030	1.032	0,00	0,503	0,174	0,524
Sódio								
Ingestão (mg/kg/dia)	90,64	75,29	74,29	103,68	2,93	<.001	0,006	<.001
Concentração na urina (mg/dL)	126,50	179,69	183,71	209,30	10,56	0,035	0,008	0,289
Excreção Renal (mg/kg/dia)	27,70	30,64	33,89	41,66	1,88	0,000	<.001	0,732
Potássio								
Ingestão (mg/kg/dia)	170,45	156,62	138,55	191,28	5,12	<0,001	0,045	<0,001
Concentração na urina (mg/dL)	358,21	409,23	406,79	436,21	19,41	0,561	0,204	0,677
Excreção Renal (mg/kg/dia)	78,63	76,63	76,73	86,78	3,61	0,458	0,203	0,309
Cloretos								
Ingestão (mg/kg/dia)	216,44	219,82	229,46	229,76	5,21	0,755	0,342	0,704
Concentração na urina (mg/dL)	483,84	551,82	542,09	573,81	27,76	0,713	0,330	0,685
Excreção Renal (mg/kg/dia)	104,59	102,77	100,7	114,02	4,40	0,445	0,231	0,264

¹CO, dieta controle sem o ingrediente teste; 25% da farinha de vísceras de aves hidrolisada; 50% da farinha de vísceras de aves hidrolisada; 100% da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

² Erro Padrão da Média (n= 8 cães por dieta).

³ Efeito linear ou quadrático da inclusão da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

Os valores de pressão arterial sistêmica média não diferiram entre tratamentos ($P=0,393$; Tabela 5), permanecendo dentro dos valores da referência para animais saudáveis (Acierno *et al.*, 2018). A atividade da ECA também não diferiu entre os cães alimentados com as diferentes rações ($P=0,482$), permanecendo também dentro dos valores da referência para animais saudáveis (TECSA, 2017). As concentrações séricas de triglicérides, colesterol total e lipoproteínas alta e baixa densidade (HDL e LDL) também não diferiram com o consumo de FVH ($P>0,05$).

Tabela 5. Pressão arterial sistêmica média, atividade da enzima conversora de angiotensina e concentração sérica de triglicerídeos, colesterol total e suas frações de cães alimentados com dietas com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

Item	Dietas experimentais ¹				EPM ²	P valor
	CO	25%	50%	100%		
Pressão Arterial Sistêmica média (mmHg)	134,8	129,8	125,2	130,0	2,04	0,39
Atividade da Enzima Conversora da Angiotensina (U/L)	39,0	44,3	45,1	40,4	1,60	0,48
Colesterol Total (mg/dL)	285,3	284,9	267,2	219,6	11,98	0,17
Colesterol HDL (mg/dL) ³	196,4	190,3	195,2	173,3	5,14	0,37
Colesterol LDL (mg/dL) ^{4, 5}	94 (31-149)a	72 (20-210)ab	44 (12-143)ab	28 (4-44)b	8.32	0.03
Triglicérides (mg/dL)	62,0	57,7	55,3	60,5	3,71	0,93

¹CO, dieta controle sem o ingrediente teste; 25% da farinha de vísceras de aves hidrolisada; 50% da farinha de vísceras de aves hidrolisada; 100% da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

² Erro Padrão da Média (n= 8 cães por dieta).

³ HDL - Lipoproteínas de alta densidade.

⁴ LDL- Lipoproteína de baixa densidade.

⁵Para variáveis não-paramétricas são apresentados os valores de mediana (mínimo – máximo). Medianas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Kruskal-Wallis $P<0,05$).

Os índices fagocitários (%) de neutrófilos e monócitos também não diferiram entre os cães alimentados com as diferentes rações ($P < 0,05$; Tabela 6).

Tabela 6. Índice fagocitário de monócitos e neutrófilos (% de células positivas) de cães alimentados com dietas com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

Item		Dietas experimentais ¹				EPM ²	P valor
		CO	25%	50%	100%		
Índice fagocitário %							
Neutrófilo	dia 30	96,8	96,2	97,1	97,1	0,37	0,647
Monócitos	dia 30	92,9	93,2	94,1	94,7	1,18	0,206

Cães alimentados com 100% FVH tiveram menores concentrações séricas de IL-2 e TNF ($P < 0,05$). As concentrações de IL-6 e IL-10 foram menores em cães alimentados com 100% FVH do que em animais alimentados com 25% FVH e 50% FVH ($p < 0,05$), apresentando valores intermediários quando comparados com animais alimentados com a dieta controle (Tabela 7). As concentrações de IgA foram maiores nas fezes de cães que receberam a dieta 100% FVH com efeito quadrático ($P = 0,003$).

Tabela 7. Concentração sérica de citocinas e concentração de IgA fecal de cães alimentados com dietas com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

Item	Dietas experimentais ¹				EPM ²	P valor	Contraste ³	
	CON	25,0%	50,0%	100,0%			Linear	Quadrático
IgA*	1,29	0,49	1,14	9,12	1,42	0,004	0,081	0,003
Citocinas séricas⁴								
IL2	1822 (110-16540) a	12099 (73-24098) a	7807 (77-13567) a	23 (2-98) b	1160	0.003	-	-
IL6	1233 (67-8374) ab	6358 (181-12504) a	4573 (1314-7243) a	49 (71-89) b	656	0.007	-	-
IL10	429 (253-3945) ab	1588 (37-3935) a	957 (931-2263) a	87 (7-506) b	230	0.02	-	-
TNFa	817 (11-5171) a	4038 (8-6150) a	2969 (8-4149) a	6 (2-22) b	230	0.04	-	-

¹CO, dieta controle a base de farinha de vísceras de aves convencional; 25% da farinha de vísceras de aves hidrolisada; 50% da farinha de vísceras de aves hidrolisada; 100% da farinha de vísceras de aves hidrolisada como fonte proteica.

² Erro Padrão da Média (n= 8 cães por dieta).

³ Efeito linear ou quadrático da inclusão da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

*Valores transformados para valor de Lambda para análise estatística.

⁴Para variáveis não-paramétricas são apresentados os valores de mediana (mínimo – máximo).

a, b Medianas nas linhas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Kruskal-Wallis P<0,05).

Não houve, por fim, diferenças estatísticas nas variáveis analisadas para atividade antioxidante de cães alimentados com as diferentes inclusões de FVH (P<0,05). Os resultados destas variáveis são apresentados na Tabela 7.

Tabela 8. Parâmetros oxidativos séricos de cães alimentados com dietas com inclusões crescentes da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

Item	Dietas experimentais ¹				EPM ²	P valor
	CO	25%	50%	100%		
Glutathione redutase ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}$ de proteína-1)	5,21	4,98	5,19	5,53	0,20	0,789
DPPH ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}$ de proteína-1)	1,32	1,44	1,26	1,47	0,06	0,268
Malondialdeído ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}$ de proteína-1)	0,11	0,11	0,1	0,11	0,01	0,838
Capacidade antioxidante total ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}$ de proteína-1)	4,0	3,50	3,50	3,70	0,19	0,895
Carbonil ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}$ de proteína-1)	0,037	0,036	0,037	0,040	0,001	0,267
Proteínas Totais (mg/mL)	73,9	73,8	71,6	70,7	2,09	0,805

¹CO, dieta controle sem o ingrediente teste; 25% da farinha de vísceras de aves hidrolisada; 50% da farinha de vísceras de aves hidrolisada; 100% da farinha de vísceras de aves hidrolisada.

² Erro Padrão da Média (n= 8 cães por dieta).

6. DISCUSSÃO

Na nutrição de cães e gatos, os hidrolisados proteicos são utilizados sobretudo em dietas hipoalergênicas e em palatilizantes e pode ser também utilizada em animais com doença inflamatória intestinal (Cave, 2006). Os peptídeos bioativos específicos presentes no hidrolisado podem auxiliar na recuperação da morfologia, motilidade e funções intestinais (por exemplo: secreção, motilidade e reações anti-inflamatórias), benefício do anabolismo e ingestão de alimentos, em correlação com uma quantidade de aminoácidos livres (Hou *et al.*, 2017; Cave, 2006). Recentemente os efeitos inflamatórios e imunológicos em gatos saudáveis foi comprovado por Ramos (2022). No entanto, alguns estudos recentes seguindo a mesma linha de pesquisa, não comprovaram os efeitos metabólicos, inflamatórios e imunológicos do hidrolisado para cães e gatos saudáveis (Pinto *et al.*, 2023;

Miltenburg *et al.*, 2020; Capim, 2022). A maioria dos estudos foram realizados com animais sob variadas condições de estresse ou doença infecto-contagiosa (Yang *et al.*, 2014; Duarte, *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2022; Liang *et al.*, 2006). No presente estudo não foram observadas alterações metabólicas negativas, caracterizando a inclusão desse ingrediente como seguro para cães que necessitam de dietas hipoalergênicas.

O tratamento com 100% FVH apresentou o menor valor de pH urinário comparado as demais dietas. As variações no pH urinário podem ser afetadas pelas flutuações nas composições química dos macroelementos na dieta que são fontes de ácidos ou base, e quantidade e fonte proteica adicionada (Allen & Kruger, 2000; Zentek e Schulz, 2004). No entanto, a maior contribuição de ácidos da dieta pode ser dada pelo balanço de ânions e cátions metabolizáveis ou altos teores de proteína (Markwell *et al.*, 1998; Stevenson *et al.*, 2004). Esta associação entre proteína e pH urinário pode ser pela maior concentração de enxofre, presente nos aminoácidos sulfurados em dietas com elevados teores proteicos. No entanto, no presente estudo essa correlação não pode ser encontrada, pois todas as rações eram isoproteicas, e apenas a 100% FVH apresentou pH mais baixo, sugerindo que essas diferenças no pH podem estar correlacionadas com equilíbrio de macroelementos da dieta. Ocorreu alterações nos teores de sódio e potássio entre as rações, sendo esses valores maiores nas dietas controle e 100% FVH. Porém, como houve diferença no pH entre as duas dietas, acredita-se que essas quantidades de sódio não foram suficientes para fazer essas alterações no pH, e sim que outros minerais ou componentes não analisados no presente estudo influenciaram mais que o sódio no pH urinário. O método mais utilizado e prático para se predizer o efeito de um alimento sobre o pH urinário é pelo do cálculo do excesso de base (EB), sendo comprovados por vários estudos que os cátions e ânions na composição do alimento estão correlacionados com o pH urinário em gatos (Kienzle & Wilms-Eilers, 1994; Markwell, 1998; Wagner *et al.*, 2006; Yamka *et al.*, 2006) e em cães (Zentek *et al.*, 1995). Em um estudo recente com gatos utilizando uma inclusão de 30% de FVH, ocorreu elevação no pH urinário, no entanto, foi necessário acrescentar carbonato de cálcio e fosfato bicálcico nas dietas com FVH devido às baixas concentrações de cálcio e fósforo no FVH em

comparação com a FVA convencional, o que justifica esse pH mais elevado. Já as concentrações de sódio e cloro foram similares entre os tratamentos, porém com 30% de inclusão do FVH ocorreu aumento de 13% nas concentrações de potássio (Ramos, 2022). Enfatizando mais uma vez a necessidade de calcular o EB das dietas para explicar as alterações no pH urinário de cães e gatos.

Os maiores teores de sódio e potássio nas dietas com inclusão de 100% FVH, ocasionou aumento na ingestão de sódio e potássio (Tabela 5). Isso explica as maiores concentrações de sódio na urina e excreção renal pelos animais desse mesmo tratamento. Sabe-se que o volume de urina se relaciona ao consumo de sódio, cães alimentados com dietas com elevados teores de sódio aumentam a ingestão de água e, conseqüentemente, o volume urinário (Cizek, 1959; Bailey, 1973; Hamar *et al.*, 1976; Nogueira, 2010). No presente estudo, no entanto, esta correlação não pode ser observada, porque os volumes de urina foram similares entre os tratamentos ($P>0,05$). Embora tenha ocorrido uma maior ingestão de potássio também devido à sua flutuação na composição das dietas experimentais, sendo maiores no tratamento controle e 100% FVH, não foram encontradas diferenças nas concentrações urinárias e excreção renal.

Em estudos recentes realizados *in vitro*, foi observado inibição da atividade da ECA para proteína hidrolisada de frango. Quando estes efeitos foram avaliados em gatos, esses mesmos autores concluíram que ocorreu apenas uma tendência a redução da atividade da ECA (Miltenburg *et al.*, 2020). Da mesma forma, em outro estudo recente com gatos, a inclusão de até 30% de FVH também não evidenciou a inibição da atividade da ECA (Ramos, 2022). Não foram encontrados também, efeitos na redução da atividade da ECA a longo prazo (120 dias) em cães saudáveis alimentados com inclusão de 10% de FVH em dietas extrusadas, mas os valores permaneceram entre os valores de referência para espécie (Capim, 2022).

Esses efeitos também não foram comprovados pelo presente estudo, apesar de ter ocorrido uma maior excreção de sódio em cães alimentados com 100% FVH, não ocorreu um aumento do volume urinário e a atividade inibitória da ECA não foi detectada. A maior excreção renal de sódio e de água está correlacionada com a atividade inibitória da ECA (Reece, 2017). No entanto, esse aumento da excreção de sódio e o aumento da concentração de sódio na urina, pode ser explicado pela maior

quantidade de sódio presente na composição da dieta 100% FVH, ocasionando aumento na ingestão de sódio pelos animais (Tabela 2). Embora o aumento da concentração de sódio na urina de cães alimentados com as dietas 25 e 50% FVH tenha sido observado, não foram observadas diferenças na excreção de sódio. Além disso, as dietas 25 e 50% apresentaram menores teores de sódio em sua composição química analisada e, conseqüentemente, menor ingestão de sódio pelos cães e ambas não diferiram. Essa ausência na inibição da ECA pode ser observada também pela ausência de diferenças na pressão arterial dos diferentes tratamentos, entretanto, todos os animais se mantiveram entre os valores de pressão recomendados para espécie, de 100 mmHg – 140 mmHg (Acierno *et al.*, 2018).

Embora existam alguns estudos que comprovaram os efeitos *in vitro* ou *in vivo* de hidrolisados proteicos na redução de colesterol, HDL, LDL ou triglicerídeos (Yang *et al.*, 2014; Amigo e Hernández-Ledesma, 2020; Wu *et al.*, 2020), não foi possível observar esses efeitos nas concentrações de colesterol, HDL, e triglicerídeos no presente estudo. No entanto, no presente estudo observamos uma diminuição da concentração do colesterol LDL em animais alimentados com a dieta 100% FVH. Corroborando com nossos resultados, camundongos alimentados durante 20 semanas com uma dieta de alta gordura juntamente com hidrolisado de fígado de frango esse efeito também pode ser observado, entretanto os mecanismos de ação dos peptídeos presentes nos hidrolisado ainda são desconhecidos (Wu *et al.*, 2020). Essa ausência de efeitos *in vivo* do FVH sobre os outros parâmetros lipídicos pode ser explicada por diversos fatores, seja decorrente de alterações que possam ocorrer com os peptídeos durante a hidrólise enzimática, durante a fabricação das rações, onde pode ocorrer modificações nas proteínas e peptídeos, durante a digestão no trato gastrointestinal, ou à fatores ligados ao metabolismo dos próprios animais no controle desses efeitos. Em cães e gatos saudáveis, as lipoproteínas são muito eficientes no transporte de gordura sérica, talvez para animais com dislipidemia ou raças com predisposição a hipercolesterolemia (Schenck, 2006; Pasquini *et al.*, 2008)) a inclusão do hidrolisado possa ser interessante.

As citocinas são polipeptídeos produzidos em resposta a microrganismos e outros antígenos, que medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias e

tem como função o crescimento e diferenciação de linfócitos, ativação de células efectoras e desenvolvimento de células hematopoiéticas. Os hidrolisados por conterem peptídeos funcionais, podem agir de forma imunomoduladora e reduzir a inflamação, sendo evidenciado no presente estudo pela diminuição das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-2 em cães alimentados com uma dieta 100% FVH. O mesmo pode ser observado em cães com enteropatia crônica confirmada ou suspeita alimentados com uma dieta contendo proteína hidrolisada de frango e submetidos a estimulação *ex vivo* de células de sangue total, onde foram observadas menores concentrações de TNF- α e IL-10, sugerindo assim um menor estado inflamatório geral, com níveis mais baixos dessas citocinas (Kathrani *et al.*, 2019). Em ratos alimentados com hidrolisado de peixe obtido por hidrólise fermentativa, foi evidenciado este mesmo padrão de estimulação. A atividade imunomoduladora atribuída aos peptídeos bioativos durante o processo de hidrólise, melhoraram a resposta imune inespecífica no intestino desses animais, através da avaliação imuno-histoquímica da mucosa intestinal onde foi possível verificar o aumento na expressão de IL-4, IL-10, IL-6, IFN-gama e TNF-alfa, e esses resultados foram relacionados a elevação do índice fagocitário por macrófagos peritoneais e de células produtoras de IgA (Duarte, et al., 2006). No presente estudo, a concentração de IgA fecal observada foi maior também em animais alimentados com 100% FVH. Estudo recente utilizando hidrolisado de fígado de aves em cães alimentados por 45 dias também propôs esse mesmo efeito, porém relacionando ao aumento das concentrações plasmáticas de IgA (Pinto *et al.*, 2023). No entanto, as concentrações plasmáticas de IgA pouco se correlacionam com a IgA secretora presentes predominantemente nas mucosas intestinais.

Não foi observado neste estudo diferenças significativas no índice fagocitário entre os tratamentos. As células fagocíticas são células brancas e atuam na primeira linha de defesa contra microrganismos, sendo os monócitos os principais mediadores da resposta inflamatória prévia à infecção. No entanto, efeito *in vivo* dos hidrolisados no índice fagocitário foi observado em peixes (Liang *et al.*, 2006). Com objetivo de reduzir o estresse e doenças infecciosas na criação de robalos em larga escala na China, Liang *et al.*, (2006) avaliaram o efeito da inclusão do hidrolisado proteico de peixes (HPP) em robalos alimentados por 30 dias. Os autores

verificaram que a atividade fagocitária foi significativamente maior nos grupos alimentados com HPP (5, 15 e 25% de inclusão na dieta) do que o grupo controle, identificando melhora na resposta imune inata de fagócitos.

As enzimas antioxidantes são responsáveis por em conjunto manterem a quantidade de espécies reativas em níveis aceitáveis, protegendo as células contra a morte celular. No presente estudo não houve alterações nas concentrações séricas de nenhuma variável dos parâmetros oxidativos entre os tratamentos. Portanto não foi possível correlacionar a inclusão de FVH com a redução do estresse oxidativo. Em gatos alimentados com hidrolisado de vísceras de frango, foi possível correlacionar que a elevação conjunta da peroxidação lipídica e da glutathiona sugere que esse aumento seja uma resposta à produção de radicais livres e peroxidação nestes gatos (Ramos, 2022). A Glutathiona (GSH) é uma importante enzima antioxidante e está correlacionada à defesa das células contra o estresse oxidativo, agindo na proteção celular contra as EROs (Joseph et al., 1997). Além disso, outros estudos encontraram propriedades antioxidantes oriundos de proteínas e peptídeos que possam diminuir o estresse oxidativo por múltiplas vias (Elias, Kellerby, & Decker, 2008). Assim como no presente estudo, não foi evidenciado por Pinto et al., (2023) alterações na capacidade antioxidante total de cães alimentados com 24% hidrolisado de fígado de frango, isso pode ter ocorrido devido ao aumento no estresse oxidativo causado pelo aumento da monoamina oxidase (MAO) que durante o processo de desaminação produzem amônia e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A TAC é um dos biomarcadores do estresse oxidativo mais importantes, pois ela define o efeito sinérgico entre as enzimas e componentes antioxidantes presentes no organismo (Crews et al. 2000).

Diante desses resultados, estudos futuros podem ser interessantes para entender as possíveis implicações metabólicas e fisiológicas dessas alterações e o potencial de bioatividade do ingrediente, especialmente se o efeito reduzir marcadores inflamatórios em cães doentes

7. CONCLUSÃO

O consumo de 100% FVH reduziu o pH urinário, porém dentro da faixa segura para cães saudáveis, aumentou a excreção renal e concentração urinária de sódio devido ao aumento desse macroelemento nessa ração, entretanto não foram observadas alterações na pressão arterial e na atividade da ECA. O presente estudo, no entanto, abriu um potencial mecanismo adicional de ação das proteínas hidrolisadas, uma vez que esta induziu redução da inflamação sistêmica em cães saudáveis. As menores concentrações séricas de LDL, IL-2, TNF- α , IL-6 e IL-10 e maiores concentrações de IgA fecal em animais alimentados com dieta à base de FVH como fonte proteica sugerem efeitos fisiológicos deste hidrolisado, com alterações em lipídeos séricos, redução da inflamação e preparo da imunidade de mucosa.

Estudos que possam relacionar os hidrolisados proteicos com seus potenciais efeitos benéficos em animais doentes são necessários para se compreender melhor seus efeitos metabólicos em cães.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIERNO, Mark J. et al. ACVIM consensus statement: guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. **Journal of Japanese association of veterinary nephrology and urology**, v. 12, n. 1, p. 30-49, 2020.

AGUILAR-TOALÁ, J. E.; LICEAGA, A. M. Cellular antioxidant effect of bioactive peptides and molecular mechanisms underlying: beyond chemical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 5, p. 2193–2204, 2021.

ALLEN, T.A.; KRUGER, J.M. Enfermedad Felina De Las Vias Urinarias. In: HAND, M.S.; THATCHER, C.D.; REMILLARD, R.L.; ROUDEBUSH, P. **Nutrición clínica en pequeños animales**. Panamericana, Bogotá, 4 ed., p. 811-845, 2000.

ALVAREZ MO, CHAMORRO S, BRENES A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. **Food Research International** 73:204–212, 2015.

AMIGO, L.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Current evidence on the bioavailability of food bioactive peptides. **Molecules**, v. 25, n. 19, 2020.

AOAC: Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis of AOAC International. Washington. DC. USA. 18th ed, 2010.

Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET). Disponível em: https://abinpet.org.br/wp-content/uploads/2023/07/abinpet_folder_dados_mercado_2023_draft5.pdf. Acesso em janeiro de 2024.

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BAILEY, C. B. Formation of siliceous urinary calculi in calves given supplements containing large amounts of sodium chloride. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 55-60, 1973.

BEZERRA, T. K. A. et al. 2019. Identification of angiotensin I-converting enzyme-inhibitory and anticoagulant peptides from enzymatic hydrolysates of chicken combs and wattles. **Journal of Medicinal Food**. doi: 10.1089/jmf.2019.0066.

BRADFORD, H. F.; WARD, H. K. On glutaminase activity in mammalian synaptosomes. **Brain research**, v. 110, n. 1, p. 115-125, 1976.

BUI, H. T. D. et al. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. **Aquaculture**, v. 418, p. 11–16, 2014.

CAPIM, Luis Fernando dos Santos (2022). **Efeito da farinha de vísceras hidrolisada em alimentos extrusados para cães na digestibilidade e função renal**. 34 f. Trabalho de conclusão de curso (Medicina Veterinária) – UFPB.

CARCIOFI, Aulus Cavalieri et al. Avaliação de dietas com diferentes fontes protéicas para cães adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 754-760, 2006.

CARCIOFI AC. Fontes de proteína e carboidratos para cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia** 37:28-41, 2008.

CARCIOFI, A. C. et al. Comparison of micronized whole soybeans to common protein sources in dry dog and cat diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 151, n. 3–4, p. 251–260, 2009.

CAVE, N. J. Hydrolyzed Protein Diets for Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 36, n. 6, p. 1251–1268, 2006.

CIZEK, Louis J. Long-term observations on relationship between food and water ingestion in the dog. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 197, n. 2, p. 342-346, 1959.

CREWS, H. et al. A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. **Br J Nutr**. 2001, 1:S5-35. doi: 10.1079/bjn2001337. PMID: 11520422.

CHEN, Haolin et al. Effect of glutathione redox state on Leydig cell susceptibility to acute oxidative stress. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 323, n. 2, p. 147-154, 2010.

CURFS JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA - A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev**, 1997;10:742-780.

DANG, T. D. et al. Characterization of plasma cytokines in an infant population cohort of challenge-proven food allergy. **Allergy**, v. 68, n. 10, p. 1233-1240, 2013.

D ARCHIVIO, Massimo et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali-Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348, 2007.

DAY, M. J.; SCHULTZ, R. D. Antigen presentation and cytokines. In: CRC PRESS (Ed.). **Veterinary Immunology**. 2nd. ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, p. 81–94, 2014.

DIETERICH, F. et al. Development and characterization of protein hydrolysates originated from animal agro industrial byproducts. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 1, n. 2, p. 1–7, 2014.

DOS SANTOS AGUILAR, Jessika Gonçalves; DE SOUZA, Ana Karoliny Santos; DE CASTRO, Ruann Janser Soares. Enzymatic hydrolysis of chicken viscera to obtain added-value protein hydrolysates with antioxidant and antihypertensive properties. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, p. 717-725, 2020.

DOZIER WA, DALE NM, DOVE CR.. Nutrient composition of feed-grade and pet-food-grade poultry by-product meal. **Journal of Applied Poultry Research** 12:526-530, 2003.

DUARTE, J. et al. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. **Immunobiology**, v. 211, n. 5, p. 341–350, 2006.

ELIAS, R.J.; KELLERBY, S.S.; DECKER, E.A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 2008, 48, 430–441.

ERDMANN, K.; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRÖDER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 10, p. 643–654, 2008.

ETEMADIAN, Y. et al. Development of animal/ plant-based protein hydrolysate and its application in food, feed and nutraceutical industries: State of the art. **Journal of Cleaner Production**, v. 278, 2021.

FANG, N., WANG, W. Effects of enzymatic hydrolyzed wheat gluten on immune function of mice. **Cereal Feed Ind.** 2: 37–38, 2009.

FEDIAF. **Nutritional Guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs**. Bruxelles: The European pet food industry Federation, 2021.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499–502, jun. 1972.

GAO, Ruomei et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, mar. 1998.

GIROUX, Isabelle; KUROWSKA, Elzbieta M.; CARROLL, Kenneth K. Role of dietary lysine, methionine, and arginine in the regulation of hypercholesterolemia in rabbits.

The Journal of Nutritional Biochemistry, v. 10, n. 3, p. 166-171, 1999.

HABIG, W. H. et al. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 71, n. 10, p. 3879-82, Oct 1974.

Hagen Sr, Frost B, Augustin J. 1989. PrecolumnPhenylisothiocyanate Derivatization and Liquid-Chromatography of Amino-Acids in Food. **Journal of The Association of Official Analytical Chemists** 72 (6): 912-916.

HALLIWELL, R.E.W.; GORMAN, N.T. Veterinary clinical immunology. London : W.B. Saunders, 1989.

HAMAR, D. Effect of sodium chloride in prevention of experimentally produced phosphate uroliths in male cats. **J. Ame. Ani. Hos. Asso.**, v. 12, p. 514-517, 1976.

HAN, Fei et al. Effects of enzymatically hydrolyzed wheat gluten on growth performance, antioxidant status, and immune function in weaned pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 97, n. 4, p. 574-580, 2017.

HAN, Jeong-Hwa et al. Association between oxidative stress and blood pressure in Korean subclinical hypertensive patients. Korean **Journal of Nutrition**, v. 46, n. 2, p. 126-136, 2013.

HENDRIKS, W. H.; SRITHARAN, K. Apparent ileal and fecal digestibility of dietary protein is different in dogs. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1692S-1694S, 2002.

HOU Y, WU Z, DAI Z, WANG G, WU G. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production. bioactive peptides. and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 8:1-13, 2017.

HUANG, J. et al. 2016. Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Activities and In Vivo Antihypertensive Effects of Sardine Protein Hydrolysate. **J Food Sci** 81: H2831-H2840.

JAVARD, R. et al. Acute-Phase Proteins and Iron Status in Cats with Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 2, p. 457–464, 2017.

JIANG ZY, HUNT JV, WOLF SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analyt Biochem** 202: 384-389, 1992.

JOSEPH, P. D.; Mannervik, B.; Ortiz de Montellano, P.; Molecular Toxicology, 1st ed., Oxford University Press: New York, 1997, p.152-186.

JUNTTILA, Ilkka S. Tuning the cytokine responses: an update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 888, 2018.

KAEFER, Michelle et al. Plasma malondialdehyde levels and risk factors for the development of chronic complications in type 2 diabetic patients on insulin therapy. **Clinical Laboratory**, v. 58, n. 9-10, p. 973-978, 2012.

KAUR, A. et al. Recently isolated food-derived antihypertensive hydrolysates and peptides: A review. **Food Chemistry**, v. 346, p. 128719, 2021.

KAWAUCHI IM, SAKOMURA NK, PONTIERI CF, REBELATO A, PUTAROV TC, MALHEIROS, EB, CARCIOFI AC. Prediction of crude protein digestibility of animal by-product meals for dogs by the protein solubility in pepsin method. **Journal of nutritional science**, 3, 2014.

KHOSRAVI, S. et al. Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream *Pagrus major*. **Fish & shellfish immunology**, v. 45, n. 2, p. 858–868, 2015.

KIENZLE, E; WILMS-EILERS, S.K. Struvite Diets In Cats: Effect Of Ammonium Chloride And Carbonates On Acid Base Balance Of Cats. **American Institute of Nutrition**. V.22, P. 3166-94, 1994.

KRISTINSSON HG, RASCO BA. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

LAFARGA, Tomas; HAYES, Maria. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. **Meat science**, v. 98, n. 2, p. 227-239, 2014.

LAFLAMME, D. et al. Myths and misperceptions about ingredients used in commercial pet foods. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 44, n. 4, p. 689–698, 2014.

LIANG M, WANG J, CHANG Q, MAI K. Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828). **Aquaculture Research**, v.37, p. 102-106, 2006.

LÓPEZ-BARRIOS, Lidia; GUTIÉRREZ-URIBE, Janet A.; SERNA-SALDÍVAR, Sergio O. Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. **Journal of food science**, v. 79, n. 3, p. R273-R283, 2014.

LÓPEZ-SÁNCHEZ, J. et al. Effects of heat and pH treatments and in vitro digestion on the biological activity of protein hydrolysates of *Amaranthus hypochondriacus* L. grain. **Journal of food science and technology**, v. 53, p. 4298-4307, 2016.

MALE, David et al. **Immunology. 7th edition**. UK: Elsevier, 2006.

MANE, Sushma; JAMDAR, S. N. Purification and identification of Ace-inhibitory peptides from poultry viscera protein hydrolysate. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. e12275, 2017.

MARKWELL, P.J. BUFFINGTON, C.T. SMITH, B.H.E. The Effect Of Diet On Lower Urinary Tract Diseases In Cats. **Journal of Nutrition**. v.128, n.12, p.2753s-2757s, 1998.

MAS-CAPDEVILA, Anna et al. Dose-related antihypertensive properties and the corresponding mechanisms of a chicken foot hydrolysate in hypertensive rats. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1295, 2018.

MAS-CAPDEVILA, Anna et al. Long-term administration of protein hydrolysate from chicken feet induces antihypertensive effect and confers vasoprotective pattern in diet-induced hypertensive rats. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 28-35, 2019.

MENDONÇA, F. S. et al. Hydroxyproline and starch consumption and urinary supersaturation with calcium oxalate in cats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 246, n. September 2015, p. 72–81, 2018.

MERCK; CORPORATION, E. M. **Feline Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel 96-Well Plate Assay MCYTOMAG-70K-PMX**. 2013.

MILTENBURG, T. Z. et al. Effects of enzymatically hydrolysed poultry byproduct meal in extruded diets on serum angiotensin-converting enzyme activity and aldosterone in cats. **Archives of Animal Nutrition**, v. 75, n. 1, p. 64–77, 2020.

MORAIS, H. A. et al. Use of different proteases to obtain whey protein concentrate hydrolysates with inhibitory activity toward angiotensin-converting enzyme. **Journal of Food Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 102–109, 2014.

NELSON, D. L. AND COX, M. M. **Lehninger's Principles of Biochemistry**. 3rd ed. Worth publishers, New York. Available online at <http://www.worthpublishers.com/lehninger> Worth Publishers, USA, 2000.

NOGUEIRA, Sandra Prudente. (2010). **Relação entre o excesso de bases da dieta, sua manipulação mediante adição de cátions e ânions e o pH urinário e equilíbrio ácido-básico de cães**. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – UNESP, Jaboticabal.

NOLI, C.; BELTRANDO, G. The usefulness of a hydrolysed fish and rice starch elimination diet for the diagnosis of adverse food reactions in cats: an open clinical trial. **Veterinary Dermatology**, v. 32, n. 4, p. 326-e90, 2021.

NOORANI, K. P. M.; NAZEER, R. A. Enzymatic Production of Two Tri-peptides on ACE-I Inhibition and Antioxidant Activities. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 4, p. 2365–2377, 2020.

NRC—National Research Council. Nutrient requirements of dogs and cats. Washington, DC: National Academy Press, 2006.

ONUH, John O. et al. Kinetics of in vitro renin and angiotensin converting enzyme inhibition by chicken skin protein hydrolysates and their blood pressure lowering effects in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 133-143, 2015.

OLIVRY, Thierry; BEXLEY, Jennifer; MOUGEOT, Isabelle. Extensive protein hydrolyzation is indispensable to prevent IgE-mediated poultry allergen recognition in dogs and cats. **BMC veterinary research**, v. 13, p. 1-9, 2017.

PABLACK, N. et al. Short term effects of increasing dietary salt concentrations on urine composition in healthy cats. **Veterinary Journal**, v. 201, n. 3, p. 401–405, 2014.

PALTRINIERI, S. The feline acute phase reaction. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 26–35, 2008.

PASQUINI, A.; LUCHETTI, E.; CARDINI, G. Plasma lipoprotein concentrations in the dog: the effects of gender, age, breed and diet. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 92, n. 6, p. 718-722, 2008.

PEIGHAMBARDOUST, S. H. et al. A Review on Health-Promoting, Biological, and Functional Aspects of Bioactive Peptides in **Food Applications Biomolecules**, 2021.

PERES, Francine Mendes. **Fontes proteicas de origem vegetal sobre o processo de extrusão e a digestibilidade aparente de dietas para cães**. 82 f. 2018. Dissertação Mestrado em Zootecnia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2018.

PINTO, Caroline Fredrich Dourado et al. Effects of Diets Based on Hydrolyzed Chicken Liver and Different Protein Concentrations on the Formation and Deamination of Biogenic Amines and Total Antioxidant Capacity of Dogs. **Animals**, v. 13, n. 16, p. 2578, 2023.

PINTO, Caroline Fredrich Dourado et al. Hydrolyzed chicken liver used as single source of animal protein in diet and its effect on cytokines, immunoglobulins, and fecal microbiota profile of adult dogs. **Plos one**, v. 17, n. 7, p. e0271932, 2022.

REECE, W. O. Regulação da osmolalidade e do volume do líquido extracelular. In: REECE, W. O. et al. (Eds.). **Fisiologia dos animais domésticos**. 13ed. ed. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, p. 410–427, 2017.

RIAZ, M. N. **Extruders in food applications**, Boca Raton: CRC Press, 2000.

RIBEIRO, L. B. et al. Oxidative stability and nutritional quality of poultry by-product meal: An approach from the raw material to the finished product. **Animal Feed Science and Technology**, v. 255, n. July, p. 114226, 2019.

RODAN, I. et al. AAFP and ISFM Feline-Friendly Handling Guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 5, p. 364–375, 2011.

RONDELLI, Mariana Cristina Hoepfner et al. A retrospective study of canine cutaneous food allergy at a Veterinary Teaching Hospital from Jaboticabal, São Paulo, Brazil. **Ciência Rural**, v. 45, p. 1819-1825, 2015.

ROMERO-GARAY, M. G. et al. Bioactivity of peptides obtained from poultry by-products: A review. **Food Chemistry: X**, v. 13, n. August 2021, 2022.

RUDENKO, P. et al. The Role of Lipid Peroxidation Products and Antioxidant Enzymes in the Pathogenesis of Aseptic and Purulent Inflammation in Cats. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 8, n. 2, p. 210–217, 2021.

RYAN, Joseph Thomas et al. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. **Nutrients**, v. 3, n. 9, p. 765-791, 2011.

SÁ FORTES, C. M.L. **Composição química, digestibilidade e energia metabolizável de ingredientes amiláceos e protéicos para cães**. 2005. 88 p. Tese (Doutorado) em Zootecnia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SÁ, F. C. et al. Enzyme use in kibble diets formulated with wheat bran for dogs: Effects on processing and digestibility. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. SUPPL.1, p. 51–59, 2013.

SAADI S, SAARI N, ANWAR F, HAMID AA, MOHD-GHAZALI H. Recent advances in food biopeptides: Production. biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances** 33:80–116, 2015.

SARWAR, G. et al. Influence of feeding alkaline/heat processed proteins on growth and protein and mineral status of rats. **Impact of Processing on Food Safety**, p. 161-177, 1999.

BASSI SCARPIM, Lucas et al. Hydrolysed poultry byproduct meal in extruded diets for cats. **Archives of Animal Nutrition**, p. 1-15, 2024.

SCHENCK, P. A. Canine hyperlipidemia: causes and nutritional management. **Encyclopedia of canine clinical nutrition**, p. 222-245, 2006.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SHANDILYA, U. K. et al. Induction of immune tolerance to caseins and whey proteins by oral intubation in mouse allergy model. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 98, n. 3, p. 467-475, 2014.

SHI, Caiyue et al. Effect of processing conditions and simulated gastrointestinal digestion on the activity of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from duck meat hydrolysate. **CyTA-Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 393-399, 2019.

SICA, Domenic A. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors' Side Effects—Physiologic and Non-Physiologic Considerations. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 7, p. 17-23, 2005.

SOLADOYE, Olugbenga P. et al. Antioxidant and angiotensin 1 converting enzyme inhibitory functions from chicken collagen hydrolysates. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 5, n. 3, p. 1, 2015.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, chemokines and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F. Pharmacology of Pain. Seattle. 2010.

STEVENSON, A.E.; WRIGGLESWORTH, D.J.; SMITH, B.H.E.; MARKWELL, P.J. Effects of dietary potassium citrate supplementation on urine pH and urinary relative supersaturation of calcium oxalate and struvite in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v. 61, n.4, p. 430-435, 2000.

SZCZEPANIK, M. P. et al. Evaluation of a hydrolysed salmon and pea hypoallergenic diet application in dogs and cats with cutaneous adverse food reaction. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, p. 67-73-67-73, 2022.

TANG, P. K. et al. A feline-focused review of chronic kidney disease-mineral and bone disorders — Part 1: Physiology of calcium handling. **Veterinary Journal**, v. 275, n. July, p. 105719, 2021.

VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 224, p. 160–171, 2017.

WAGNER, E.; KEISCH, C.H.; IBEN, C.H. Influence of the feed Base Excess on urine parameters in cats. **Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition**. n. 90, p. 10- 24, 2006.

WEIR, G. S. D. Protein hydrolysates as flavourings. **Developments in food proteins**, 1986.

WERGEDAHL, Hege et al. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 6, p. 1320-1327, 2004.

WONGNGAM, W. et al. Production and characterization of chicken blood hydrolysate with antihypertensive properties. **Poultry Science**, v. 99, n. 10, p. 5163–5174, 2020.

WU, Y. H. S. et al. Cardiac protection of functional chicken-liver hydrolysates on the high-fat diet induced cardio-renal damages via sustaining autophagy homeostasis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 6, p. 2443–2452, 2020.

YAMKA, R.M.; FRIESEN, K.G.; SCHAKENRAAD, H. The Prediction Of Urine pH Using Dietary Cations And Anions In Cats Feed Dry And Wet Foods. *Journal Appl Research Veterinary Medicine*. v. 44, n.1, p. 58-66, 2006.

YANG, K. T. et al. Effects of chicken-liver hydrolysates on lipid metabolism in a high-fat diet. *Food Chemistry*, v. 160, p. 148–156, 2014.

YANG, R. et al. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 464–470, 2009.

YOUN, J. H.; MCDONOUGH, A. A. Recent advances in understanding integrative control of potassium homeostasis. **Annual Review of Physiology**, v. 71, p. 381–401, 2009.

YUJUN WU, WENYU WANG, IN HO KIM, YING YANG. Dietary hydrolyzed wheat gluten supplementation ameliorated intestinal barrier dysfunctions of broilers challenged with *Escherichia coli* O78, *Poultry Science*, Volume 101, Issue 2, 2022.

YUSOP, Salma Mohamad et al. Production of antihypertensive elastin peptides from waste poultry skin. **Int J Food Eng**, v. 2, p. 21-25, 2016.

ZAKY, A. A. et al. Bioactivities, Applications, Safety, and Health Benefits of Bioactive Peptides From Food and By-Products: A Review. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, n. January, p. 1–18, 2022.

ZENTEK, J.; MEYER, H.; BEHNSEN, K. Einfluss der Futterzusammensetzung auf den Harn-pH beim Hund [Influence of food composition on the urine pH in the dog]. **Kleintierpraxis**, v. 40, n. 1, p. 9-18, 1995.

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

ZHANG, Jun-Ming; AN, Jianxiong. Cytokines, inflammation and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27, 2007.