

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

**Farinha de penas hidrolisadas por micro-organismos como ingrediente
alternativo em dietas para cães adultos**

GERUZA SILVEIRA MACHADO

Zootecnista (UFSM)
Mestre em Zootecnia (UFRGS)

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em
Zootecnia
Área de Concentração Produção Animal
(Nutrição e Alimentação de Não-ruminantes)

Porto Alegre – RS, Brasil
Março, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Silveira Machado, Geruza
Farinha de penas hidrolisadas por micro-
organismos como ingrediente alternativo em dietas
para cães adultos / Geruza Silveira Machado. -- 2018.
136 f.
Orientador: Luciano Trevizan.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. nutrição animal. 2. cães. 3. penas. 4.
hidrólise microbiana. I. Trevizan, Luciano, orient.
II. Título.

Geruza Silveira Machado
Mestre em Zootecnia

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTORA EM ZOOTECNIA

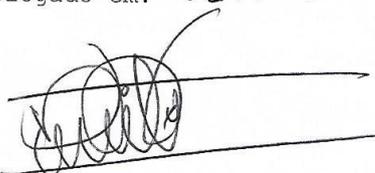
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 28.03.2018
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 02/05/2018
Por



LUCIANO TREVIZAN
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador



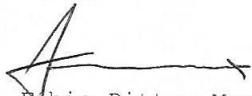
DANILO PEDRO STREIT JR.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



Adriano Brandelli
UFRGS



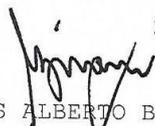
Alexandre de Mello Kessler
UFRGS



Fábio Ritter Marx
Empresa Privada



Márcia de Oliveira Sampaio Gomes
USP



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

*“E não há mal que sempre dure
E não há bem que nunca acabe”
(Pirisca Grecco)*

DEDICO

Ao meu filho Teodoro, por ser minha inspiração para seguir sempre em frente.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus pela minha vida e as oportunidades que Ele coloca em minha vida.

Aos meus familiares, pelo amor e carinho que sempre me ofereceram. Em especial meus pais, toda a dedicação e amor que sempre me ofertaram. A minha irmã, Alessandra, que mesmo longe esteve sempre muito presente “que amor é esse tão forte assim, amor de anjo que existe em mim”.

Ao meu companheiro Giovani, que talvez não perceba o quanto ele é um exemplo para mim, pela sua dedicação, foco e perseverança com seus objetivos. Obrigado por toda ajuda, amor e convivência ao longo destes 10 anos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro recebido.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Aos professores do Departamento de Zootecnia, em especial a Professora Andréa Ribeiro por todos os ensinamentos e convivência nestes 6 anos.

Aos professores que auxiliaram a execução deste projeto, especialmente aos professores Adriano Brandelli e Alexandre de Mello Kessler. Desde a confecção do projeto, a execução e conclusão, vocês fazem parte da minha conquista, muito obrigado.

Aos alunos do laboratório 218 do ICTA –UFRGS, obrigado por compartilharem e me acolherem tão bem no laboratório, em especial a aluna de pós-doutorado Ana Folmer pela parceria na execução do projeto, meus mais sinceros agradecimentos.

A equipe do LNA, pela ajuda e convivência, especialmente as queridas Mônica e Aline, nunca mediram esforços para me ajudar.

Aos meus queridos colegas do LEZO, ao longo desses 6 anos de convivência, foram muitos aprendizados, risos, choros, alegrias, conquistas e principalmente amizade.

Estarão sempre em meu coração.

A Paula e Patrícia, obrigado gurias por sempre me acolherem na casa de vocês e pela amizade. Lembre-se sempre que precisarem podem contar comigo.

A empresa NutribarraSul pela parceria e ao Alexandre pela ajuda com a confecção do “digestor”, parte essencial deste projeto.

Ao meu orientador prof. Luciano Trevizan, ao longo destes 6 anos de pós-graduação foi uma honra ter você como orientador e amigo. Muito obrigado pelo exemplo de bom caráter, dedicação e profissionalismo. “A arte de interrogar é bem mais a arte dos mestres do que as dos discípulos; é preciso ter já aprendido muitas coisas para saber perguntar aquilo que se não sabe” (Jean-Jacques Rousseau).

E por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer imensamente ao meu filho Teodoro. Obrigado por toda a compreensão nos momentos que não pude estar presente. Agradeço também a cada sorriso que me oferece, pois eles são meus estímulos, que me dão força para lutar pelos meus objetivos sempre. Filho, meu amor por você é incondicional sempre vou tentar te proporcionar um ótimo futuro e acredito que a melhor forma é a educação. Te amo.

Agradeço do fundo do coração!

FARINHA DE PENAS HIDROLISADAS POR MICRO-ORGANISMOS COMO INGREDIENTE ALTERNATIVO EM DIETAS PARA CÃES ADULTOS¹

Autor: Geruza Silveira Machado

Orientador: Luciano Trevizan

RESUMO

A produção da farinha de penas hidrolisadas (FPH) está atrelada a produção de carne de frango. O processo da FPH é a hidrólise térmica, o que pode reduzir a disponibilidade de aminoácidos (aa) essenciais devido à alta temperatura e pressão que as penas são submetidas. O uso de micro-organismos (MIC) para hidrólise pode ser uma alternativa vantajosa por minimizar essas perdas. Foram conduzidos três experimentos com o objetivo de avaliar a capacidade de degradação das penas por MIC, o coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) das classes nutricionais e energia. Também avaliar as características fecais e urinárias em cães alimentados com dietas contendo FPH por micro-organismo *Bacillus subtilis* (FPHm) ou maneira convencional (FPHc) e a palatabilidade da FPHm. No experimento 1, foram realizadas hidrólises *in vitro* de penas, utilizando quatro cepas de MIC diferentes e *blend* enzimático, foram determinados o fator de degradação, o teor de proteína solúvel, a digestibilidade *in vitro* e aa livres. No experimento 2, determinou-se CDA das dietas experimentais com inclusão por cobertura de 10% de FPHm ou FPHc sobre a dieta basal e a influência nas características fecais e urinárias, além da observação da resistência dos *Bacillus subtilis* ao passar pelo trato gastrointestinal (TGI). No terceiro experimento, foi realizado teste de palatabilidade, utilizando o método “two-pan” com as mesmas dietas testadas no experimento 2. Os resultados do experimento 1 indicaram que os MIC utilizados tiveram capacidade de degradar as penas e de melhorar a solubilidade proteica quando as penas foram adicionadas em concentrações de 5 e 8%. No experimento 2, os CDA da matéria seca (MS), PB e energia foram menores para a dieta contendo 10% de FPHm ($P < 0,05$). Apesar de não haver diferença entre os tratamentos para densidade urinária, pH urinário e fecal e escore fecal ($P > 0,05$), os animais que consumiram dietas com FPHm produziram maior quantidade de fezes (MS) diárias ($P < 0,05$). Os valores de energia digestível para FPHm e FPHc foram 2.198 e 4.443 kcal/kg, respectivamente. Foi possível verificar maior presença de *Bacillus sp.* nas fezes dos cães que receberam FPHm, demonstrando que os MIC sobreviveram ao TGI. No experimento 3, a inclusão da FPHm melhorou significativamente a palatabilidade nas dietas para cães adultos ($P < 0,05$).

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, caninos, fontes de proteína, hidrólise.

¹Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (130p.) março, 2018.

FEATHER MEAL OF MICRO-ORGANISMS HYDROLYSISED AS AN ALTERNATIVE INGREDIENT IN DIETS FOR ADULT DOGS²

Author: Geruza Silveira Machado
Advisor: Luciano Trevizan

ABSTRACT

The production of hydrolyzed feather meal (FPH) is linked to the production of chicken meat. The process of FPH is thermal hydrolysis, which may reduce the availability of amino acids (aa) essences due to the high temperature and pressure that the feathers are subjected to. The use of microorganisms (MIC) for hydrolysis may be an advantageous alternative to minimize such losses. Three experiments were carried out with the objective of evaluating feather degradability by MIC, the apparent digestibility coefficient (CDA) of the nutritional and energy classes, and to evaluate fecal and urinary traits in dogs fed diets containing FPH by microorganism *Bacillus subtilis* (FPHm) or conventional manner (FPHc) and the palatability of FPHm. In experiment 1, in vitro hydrolyses of feathers were performed, using four different MIC strains and enzymatic blend, and the degradation factor, soluble protein content, in vitro and free digestibility were determined. In Experiment 2, CDA was determined from the experimental diets with inclusion of 10% FPHm or FPHc on the basal diet and the influence on fecal and urinary traits, as well as the observation of *Bacillus subtilis* resistance when passing through the gastrointestinal tract (TGI). In the third experiment, a palatability test was performed using the two-pan method with the same diets tested in experiment 2. The results of experiment 1 indicated that the MICs used had the ability to degrade feathers and to improve protein solubility when the feathers were added in concentrations of 5 and 8%. In experiment 2, CDA of dry matter (DM), CP and energy were lower for the diet containing 10% FPHm ($P < 0.05$). Although there was no difference between the treatments for urinary density, urinary and fecal pH and fecal score ($P > 0.05$), the animals that consumed diets with FPHm produced a greater amount of feces ($P < 0.05$). The digestible energy values for FPHm and FPHc were 2,198 and 4,443 kcal / kg, respectively. It was possible to verify greater presence of *Bacillus* sp. in the faeces of the dogs that received FPHm, demonstrating that the MICs survived the TGI. In experiment 3, the inclusion of FPHm significantly improved palatability in diets for adult dogs ($P < 0.05$).

Keywords: *Bacillus subtilis*, dogs, hydrolysis, protein sources;

²Doctoral thesis in Animal Science – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (130p.) March, 2018.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	10
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	12
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	13
CAPÍTULO I.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
HIPOTESES E OBJETIVOS.....	31
CAPITULO II.....	32
ARTIGO I: Avaliação comparativa de quatro micro-organismos queratinolíticos e um blend enzimático sobre a hidrólise de penas de frango <i>in vitro</i>	33
CAPITULO III.....	50
ARTIGO II: Determinação do valor nutritivo da farinha de penas hidrolisada por micro-organismos em dietas para cães adultos e seu potencial uso como probiótico.....	51
CAPITULO IV.....	82
ARTIGO III: Palatabilidade de farinha de penas hidrolisada por micro-organismos em dietas para cães e adultos.....	83
CAPITULO V.....	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
APÊNDICES.....	116
NORMAS DAS REVISTAS ESCOLHIDAS PARA PUBLICAÇÃO.....	116
VITA.....	136

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

Tabela 1.	Tratamentos utilizados no experimento.....	42
Tabela 2.	Fator de degradação das penas após cultivo das bactérias KR6, P45, FTC01 e FTC01PR2 e da enzima comercial por 5 dias à 37°C nas concentrações de 5 e 8% de penas.....	43
Tabela 3.	Digestibilidade da proteína <i>in vitro</i> de caseína e hidrolisados de penas, nas concentrações de 5 e 8%, para os tratamentos testados.....	45

CAPITULO III

Tabela 1	Composição química da farinha de penas hidrolisada por <i>Bacillus subtilis</i> sp. (FPHm) e farinha de penas hidrolisada de maneira convencional (FPHc) na matéria seca (MS).....	72
Tabela 2	Perfil de aa (aa) farinha de penas hidrolisada por <i>Bacillus subtilis</i> (FPHm) e farinha de penas hidrolisada de maneira convencional (FPHc) comparada a pena in natura.....	75
Tabela 3	Ingredientes e composição química das dietas experimentais contendo 10 % farinha de penas hidrolisada por <i>Bacillus subtilis</i> (FPHm) e 10% de farinha de penas hidrolisada de maneira convencional (FPHc).....	77
Tabela 4	Consumo de nutrientes, digestibilidade e características fecais e urinária para cães que consumiram dietas experimentais contendo 10 % farinha de penas hidrolisada por <i>Bacillus subtilis</i> (FPHm) e 10% de farinha de penas hidrolisada de maneira convencional (FPHc).....	75
Tabela 5	Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC / g) na dieta basal (DB), dietas contendo 10% de farinha de penas hidrolisadas por <i>Bacillus subtilis</i> (FPHm), 10% de farinha de penas hidrolisada de maneira convencional (FPHc) e fezes dos cães que consumiram as dietas.....	81

CAPITULO IV

Tabela 1	Composição química das farinhas experimentais: farinha de penas hidrolisada por <i>Bacillus subtilis</i> . (FPHm) e farinha de penas convencional (FPHc). Ingredientes e composição química da dieta comercial basal (DC) e dietas contendo 10% FMHB e 10%	98
-----------------	--	-----------

	CFM.....	
Tabela 2	Resultados do teste de preferência alimentar das dietas contendo 10% de farinha de penas hidrolisada por <i>Bacillus subtilis</i> . (FPHm) e 10% de farinha de penas convencional (FPHc).....	100
Tabela 3	Presença das aminos ativas na farinha de penas hidrolisada por <i>Bacillus subtilis</i> . (FPHm) e na farinha de penas convencional (FPHc).....	101
Tabela 4.	Perfil de aa (aa) de farinha de penas hidrolisada por <i>Bacillus subtilis</i> sp. (FPHm) e farinha de penas convencional (FPHc) em comparação com penas <i>in natura</i>	102

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPITULO I		
Figura 1	Estrutura da pena de aves.....	18
Figura 2	Vias de formação de aminas bioativas.....	30
CAPITULO II		
Figura 1	Solubilidade proteica (mg/L) após 96 horas de hidrólise com inclusões de 5% e 8%.....	44
Figura 2	Aa livres (μmol) antes da hidrólise (tempo inicial) e após as 96h de incubação.....	46
CAPITULO III		
Figura 1	Microscopia eletrônica de varredura da pena in natura (A), farinha de penas hidrolisada por <i>Bacillus subtilis</i> (B) e farinha de penas hidrolisada de maneira convencional (C).....	73
Figura 2	Placas de cultura com meio Agar Nutriente: presença de colônias de <i>Bacillus</i> spp. ($5,9 \times 10^4$ UFC/g).....	74
Figura 3	Protein Efficiency ratio (PER) calculado através das equações de Alsmeyer et al., (1974).....	76
Figura 4	Valores da Digestibilidade Aparente da energia da FPHm e FPHc. (FPHm: 40.0; FPHc: 76.0, $P < 0,05$). Médias diferentes pelo teste de Tukey 5%.....	79
Figura 5	Valores da de Energia Digestível para a FPHM e FPHC em cães adultos. (FPHM: 2198 kcal/kg; FPHC: 4443 kcal/kg; $P < 0,05$). Médias diferentes pelo teste de Tukey 5%.....	80
CAPITULO IV		
Figura 1	Animal recebendo alimentação simultaneamente com duas dietas experimentais. Dieta comercial adicionada de 10% FPHc (A) e dieta comercial adicionada 10% FPHm (B).....	99

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aa	Aa
BHI	Brain heart infusion
CAD	Coefficiente de digestibilidade aparente
CD	Capacidade de degradação
DB	Dieta basal
EB	Energia bruta
FOA	Farinha de origem animal
FPH	Farinha de penas hidrolisadas
FPHc	Farinha de penas hidrolisada de maneira convencional
FPHm	Farinha de penas hidrolisada por micro-organismos
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
ID	Intestino delgado
IG	Intestino grosso
IR	Relação de consumo
MIC	Micro-organismo
MS	Matéria Seca
Pa	Pascal
PB	Proteína bruta
PC	Peso corporal
PE	Primeira escolha
PER	Protein efficiency ratio
PS	Proteína solúvel
TGI	Trato Gastrointestinal

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A produção mundial de carne de frango estimada em 2017 foi de 89 milhões de toneladas e a produção brasileira de 14 milhões de toneladas (ABPA). A produção de carne de frango está atrelada à produção de penas que são consideradas coprodutos do abate. O rendimento de carcaça a partir do peso vivo do animal é de aproximadamente 70% e as penas colaboram com cerca de 7% do peso corporal (Holanda, 2009). De acordo com a estimativa de 2016 foram produzidas aproximadamente 6,26 milhões de toneladas de penas no mundo, sendo que 1 milhão de toneladas produzidas no Brasil. No início de outubro de 2017, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) adiantou as projeções para 2018, estima-se que a produção mundial de carne de frango deverá atingir 91,28 milhões de toneladas em 2018, com um incremento de 1,22% frente as 90,18 milhões de toneladas esperadas para este ano.

As penas não são produtos comestíveis por humanos, mas possuem aproveitamento na nutrição animal. Seu alto conteúdo proteico e a presença de aa essenciais limitantes nas dietas para animais trazem aplicabilidade para este ingrediente. Quando descartadas na natureza representam grande potencial poluente, portanto, inconcebível diante da crescente demanda mundial por sustentabilidade nas diversas esferas da cadeia produtiva, inclusive na produção de carne de frango.

Na indústria das graxarias, as penas são transformadas em farinha de penas hidrolisadas (FPH), através de digestão por processamento térmico. O método, entretanto, não é satisfatório, visto que a digestibilidade proteica da farinha de penas hidrolisada é baixa, em torno de 60% (Elmayergi & Smith, 1971; Biorai et al., 1981; Pacheco et al., 2016). A queratina, constituinte proteico majoritário das penas, é rico em pontes de dissulfeto, as quais devem ser hidrolisadas para facilitar o processo digestivo pelo animal. O uso de microorganismos proteolíticos para a digestão de penas é uma alternativa em potencial, tendo em vista a importância de novas técnicas de processamento que permitam melhorar a qualidade dos coprodutos gerados pela indústria de

carnes para serem utilizados na alimentação animal. De acordo com Cedrola et al. (2012), a biodegradação da queratina por micro-organismos representa um método alternativo que pode melhorar o valor nutricional das penas. O aumento da digestibilidade da FPH torna viável a incorporação deste ingrediente em diversas dietas para diferentes espécies, inclusive para cães.

Outro fator importante a ser considerado sobre a FPH é o baixo peso molecular das proteínas que compõe as farinhas processadas (Pacheco et al., 2016). A ação de micro-organismos ou enzimas produzidas por outros micro-organismos resultam em ingredientes de baixo peso molecular. Atualmente ingredientes proteicos com proteínas com esta característica tem uso potencial nas dietas hipoalergênicas para cães e gatos, um segmento crescente do mercado de petfood.

O objetivo deste estudo foi testar *in vitro* a hidrolise de penas com utilização de 4 cepas de micro-organismos queratinolíticos em comparação a um *blend* enzimático, após o teste *in vitro* foi escolhido a melhor cepa e confeccionado farinha de penas hidrolisadas por micro-organismo (FPHm) e testado na alimentação de cães adultos comparada a farinha de penas hidrolisadas convencional (FPHc) e observado o CDA dos nutrientes e energia, além da influência nos parâmetros fecais, urinárias, potencial probiótico da cepa utilizada e a palatabilidade das FPH.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Farinha de penas na alimentação animal

A competição entre os seres humanos e animais domésticos por fontes de proteína de qualidade tende a ser intensificada com a perspectiva do aumento da população humana. Explorar e potencializar novas fontes proteicas para animais de companhia é fundamental para serem mantidas fontes alternativas de ingredientes.

Em decorrência da expansão da cadeia avícola, verifica-se um aumento na demanda de matérias primas para fabricação de rações e um número considerável de coprodutos que são disponibilizados, com características específicas e passíveis de utilização na alimentação animal, principalmente se processados de maneira adequada (Butolo, 2010). Dentre os coprodutos disponíveis podemos ressaltar a farinha de penas um ingrediente que carece de melhores formas de processamento para ser utilizado com maior eficiência.

O aumento da produção e abate de aves vem ao encontro da responsabilidade de destinação adequada dos resíduos de abatedouros (Onifade et al., 1998). As indústrias de processamento de coprodutos de origem animal processam estes resíduos transformando-os em farinhas com valor agregado utilizadas na composição de rações (Sinhorini, 2013).

Na natureza as penas provenientes de um animal são decompostas naturalmente. Isso indica que há ação de micro-organismos locais que praticam tal hidrólise (Brandelli, 2008). A reciclagem das penas é assunto de interesse entre os nutricionistas, devido ao seu potencial como fonte alternativa de proteína (Bertsch & Coello, 2005), principalmente na alimentação de animais de companhia como cães, gatos e peixes ornamentais carnívoros, em que o uso de proteínas de origem animal é necessário.

Há especial interesse na farinha de penas devido ao seu alto teor de proteína bruta (PB) e alto conteúdo de aa sulfurados. As farinhas de penas têm sido utilizadas em substituição parcial ou total às fontes proteicas tradicionais para diferentes espécies de hábito carnívoro e omnívoro como cães, aves, suínos e peixes (Bielorai et al., 1981; Cupo & Cartwright, 1991; Chiba et al.,

1995, Pacheco et al., 2016). Recentemente os peptídeos com baixo peso molecular apresentado por farinhas de penas hidrolisadas por processos térmicos tradicionais apontam para seu uso como ingrediente com baixo potencial antigênico quando compoendo dietas para animais.

2.1.1. Pena

As penas das aves possuem a seguinte estrutura: cálamo - é a parte do tubo transparente que fica mergulhado dentro da pele; ráquis - é a continuação do cálamo que fica para fora da pele “eixo da pena”; Barbas - ramificações que saem da raque dos dois lados formando o vexilo e barbulas - ramificação da barba.



Figura 1. Estrutura da pena de aves.

Fonte: <<http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/adaptacoes-das-aves-para-voo.htm>>

As penas frescas são constituídas de aproximadamente 1% de gordura, 9% de água, uma pequena proporção de matéria mineral e cerca de 90% proteínas estruturais como a queratina, que representa cerca de 90% da PB da pena.

2.1.2. Queratina

As queratinas são proteínas fibrosas insolúveis em água e desempenham um papel basicamente estrutural. São compostas por polipeptídios com massa molar média da ordem de $10.000 \text{ g.mol}^{-1}$ (Yamauchi & Yamauchi, 2002), sendo muito resistente às enzimas proteolíticas. A principal

característica que diferencia a queratina quando comparada a outras proteínas fibrosas, tais como o colágeno, a elastina e as proteínas miofibrilares, é a ocorrência de uma grande quantidade de resíduos de cisteína (Onifade et al., 1998; Nascimento, 2000; Schrooyen et al., 2000).

A queratina tem na sua composição aa sulfurados como a cisteína cujo as pontes de dissulfeto conferem à proteína alta insolubilidade e baixa digestibilidade. O conteúdo de ligações dissulfeto é o principal determinante das características de resistência e estabilidade das diferentes queratinas. Nesse sentido as queratinas são classificadas de acordo com o teor de cisteína: rígidas, com alto conteúdo de cisteína e ligações dissulfídicas, ou leves, menor conteúdo de cistina, inferior a aproximadamente 10% do conteúdo (Schrooyen et al., 2001; Gradisar et al., 2005). A camada mais externa da epiderme, quinta camada, é composta por queratinas flexíveis, com um baixo conteúdo de ligações dissulfeto, enquanto as penas são formadas pelas queratinas resistentes, as quais possuem um alto conteúdo de ligações dissulfeto (Schrooyen et al., 2000; Moore et al., 2006).

As queratinas também podem ser classificadas através da predominância das estruturas secundárias presentes nas cadeias das proteínas de queratinas. Podem ser subdivididas em α -hélices (α -queratina) ou β -pregueadas (β -queratina), cada uma mostrando um padrão diferente na difração de raio-X. Desta forma, as queratinas flexíveis e também as queratinas resistentes presentes em mamíferos são classificadas α -queratinas, enquanto as queratinas resistentes presentes em répteis e aves são as β -queratinas (Schrooyen et al., 2001).

As farinhas de penas possuem pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas dentro da molécula de queratina e pontes de dissulfeto presentes na cisteína, que mantém a maior estabilidade da proteína. Quando a proteína sofre o ataque de enzimas endógenas da digestão, a estabilidade inerente da proteína confere baixo aproveitamento dos aa (Nascimento, 2000).

2.1.3. Proteases e os micro-organismos queratinolíticos

Apesar da alta estabilidade da queratina, percebe-se que não há acúmulo na natureza. Isto confirma a existência de micro-organismos decompositores capazes de utilizar a queratina como substrato para seu crescimento. Esses micro-organismos queratinolíticos vem sendo estudados devido à importância de seu potencial industrial para o processamento do couro, produção de rações, e para o tratamento e aproveitamento de resíduos da indústria avícola (Onifade et al., 1998).

As proteases são amplamente utilizadas na indústria de alimentos e de detergentes. São enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases e catalisam a reação da hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e podem também agir sobre as ligações éster e amina, sendo a sua principal função biológica a hidrólise de proteínas (Santos e Koblitz, 2010).

Antigamente as proteases mais utilizadas eram de origem vegetal e animal, hoje, as enzimas microbianas estão ganhando o mercado, representando 40% do total utilizado, devido à alta eficiência e produção em larga escala. A maior parte das proteases comerciais é produzida por bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Geobacillus* (Santos e Koblitz, 2010).

As proteases são classificadas de acordo com dois critérios: o modo de ação e a natureza química do seu sítio catalíticos. De acordo com o modo de ação as proteases são divididas em exopeptidases e endopeptidases. Porém, as proteases não degradam com eficiência todas as proteínas: por exemplo, a queratina não é degradada por enzimas proteolíticas comuns, como tripsina e pepsina, por conter grande número de pontes de dissulfeto e de hidrogênio (Riffel et al., 2007). As queratinas são degradadas por enzimas específicas, denominadas queratinases, que são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas e são produzidas por micro-organismos e vegetais (Said & Pietro, 2004). Estas enzimas distinguem-se das outras proteases por uma maior capacidade de degradação de substratos compactos (Onifade et al., 1998).

Segundo Plácido (2007), um dos fatores da insolubilidade da queratina em água é o alto conteúdo de aa sulfurados, particularmente cisteína. Os micro-organismos, como os *Bacillus* spp., agem sobre a estrutura da queratina

da pena, resultando em modificação estrutural da mesma, alterando sua resistência às enzimas do trato digestivo. Desta forma a digestibilidade e o balanço de aa da farinha de penas obtêm grande melhora nutricional (Elmayergi & Smith, 1971). Além da ação da protease microbiana outro ponto importante para degradação das queratinas das penas é o potencial redox, produzido pelo meio com os MIC. O potencial redox é a tendência de uma espécie química adquirir elétrons e, desse modo, ser reduzida.

Temos muitos estudos que levaram o isolamento de micro-organismos, principalmente a partir de resíduos das indústrias avícolas e do solo em que estes se encontram, com capacidade de produzir diferentes queratinases (William et al., 1990; Lin et al., 1992; Thomas et al., 1995; Zaghloul et al., 1998; Ichida et al., 2001; Riffel e Brandelli, 2002; Riffel et al., 2003; Daroit, 2011; Maciel et al., 2016). Grande parte das bactérias queratinolíticas dos estudos relaciona-se ao gênero *Bacillus* (Fonseca, 1998; Zaghloul et al., 1998; Kim et al., 2001, Pillai et al., 2008; Correa et al. 2009; Daroit et al., 2010, Daroit, 2011; Ferrareze et al., 2016).

Os micro-organismos queratinolíticos e suas enzimas podem ser empregados para o processamento biotecnológico de penas, podendo fazer a bioconversão de material potencialmente poluentes em ingrediente para ração, já que possuem nutrientes importantes e aa essenciais como os sulfurados, glicina e leucina, além de proporcionarem enriquecimento adicional da ração pela própria biomassa microbiana (Said & Pietro, 2004)

3. Processamento da farinha de penas

Penas *in natura* não são utilizadas na alimentação animal por dois motivos: alta contaminação por micro-organismos e a baixa disponibilidade de nutrientes. No entanto, a farinha de penas deve passar por processamento térmico, para que as penas possam ser hidrolisadas e seus nutrientes disponibilizados aos animais, fator este diretamente ligado à qualidade do ingrediente para a alimentação animal.

Embora a queratina seja indigesta, se previamente hidrolisada, a fração proteica remanescente se torna mais suscetível às enzimas proteolíticas digestivas. Portanto, a resistência às enzimas proteolíticas comuns, pode ser parcialmente contornada pelo tratamento térmico, desnaturando a queratina, dessa forma passando a apresentar digestibilidade que varia entre 60 a 70% (Elmayergi; Smith, 1971). O tratamento térmico, porém, resulta em perdas significativas de alguns aa (Wang; Parson, 1997).

As penas, por serem insolúveis, têm que sofrer uma hidrólise parcial (ácida ou alcalina) para que haja a degradação parcial da estrutura da queratina, tornando-as mais solúveis e mais digestíveis. Através da hidrólise a altas temperaturas, é produzida uma farinha de penas que constitui excelente fonte de aa sulfurados para uso na formulação de rações.

O processo de hidrólise consiste na quebra das ligações entre os aa que compõem a queratina, de forma a torná-la digerível. A hidrólise é realizada em digestores, que são equipamentos termo-mecânicos que permitem realizar a cocção de penas (Fonseca et al., 1991).

No método convencional de processamento da farinha de penas, as penas *in natura* entram limpas e úmidas no digestor (umidade em torno de 45%) e são mantidas em cozimento por aproximadamente uma hora a 160°C sob 3 a 4 Pa de pressão. Logo a temperatura é reduzida e o produto é levado a secagem até atingir entre 8 e 10% de umidade. Esse produto é submetido à moagem para uniformizar a forma física da farinha de penas. Assim a farinha de penas hidrolisadas é um produto resultante da cocção sob pressão de penas limpas e da sua moagem.

Este processo de produção da farinha é caro, pois requer uma quantidade significativa de energia, e transforma aa essenciais nutricionalmente importantes como metionina, lisina e triptofano em outros não-nutritivos como lisinoalanina e lantionina, resultando em um produto de digestibilidade variável com perda significativa de nutrientes essenciais (Williams et al., 1990; Sangali & Brandelli, 2000; Nitisinprasert et al., 1999; Nam et al., 2002).

O processamento térmico excessivo, pode resultar na Reação de Maillard reduzindo a disponibilidade da proteína dietética. Também podem ocorrer ligações cruzadas entre certos aa e peptídeos, gerando compostos indisponíveis ao organismo, como a lisinoalanina (Cowel et al., 2000).

Os diferentes métodos de processamento das penas causam variações significativas no valor nutricional. O processo de aquecimento com alta temperatura e pressão rompe as ligações de dissulfeto da queratina, permitindo que ocorra a ação das enzimas digestivas no trato gastrintestinal, melhorando a disponibilidade de alguns aa e modificando os aa termossensíveis como cisteína (Bielorai et al., 1982; Grazziotin et al., 2006; Rebafka & Kulshrestha, 2009).

O processamento excessivo pode gerar um produto com baixo teor proteico, no entanto, um processamento insuficiente ocasionará hidrólise incompleta das penas. O excesso de umidade pode provocar o aumento de fungos e bactérias, acidificação e rancificação das farinhas de penas, fatores estes que podem ser controlados na etapa de secagem pós cocção. Por fim, o produto passa por um processo de moagem.

Para melhor utilização das farinhas de penas, seria necessária padronização do seu processo produtivo, o que afetaria diretamente os padrões de qualidade do produto final, melhorando o valor nutricional e a viabilidade de utilização destes insumos na alimentação animal. De acordo com Penz (2005), farinhas de origem animal são largamente utilizadas, exigindo o desenvolvimento tecnológico e científico para melhoria dos processos e maior eficiência na obtenção de produtos de maior qualidade.

Em estudo realizado por Scapim et al. (2003), foram analisados o impacto de tempo e temperatura durante o processamento da farinha de penas sobre seu valor nutricional. Os parâmetros investigados foram diferentes tempos de processo (30, 40, 50 e 60 minutos) e secagem (75, 90, 105 e 120 min a 180°C) com a pressão constante (4 kgf.cm⁻²). O maior conteúdo energético e os maiores coeficientes de digestibilidade para os aa foram obtidos com o menor tempo de processo e secagem. Os resultados foram

semelhantes aos encontrados em outros estudos de processamento da farinha de penas (Wisman et al., 1958; Fialho et al., 1984; Albino et al., 1992a,b).

Outros estudos relacionaram o tempo de processamento das penas, e suas respectivas influências na qualidade final das farinhas (Rocha & Silva, 2004; Holanda, 2009). O tempo de processamento nos digestores, quando excessivo gera um produto com baixo teor proteico, devido às perdas dos aa sulfurados já citado anteriormente. Contudo, um processamento insuficiente, ocasionará um processo de hidrólise incompleto das penas, que não serão digeridas pelos animais (Abé, 1981; Fialho et al., 1983; Albino et al., 1992;). O teor de proteína e a digestibilidade dos aa das farinhas de penas, dependem basicamente da temperatura, do tempo de cocção e da secagem do material. Estes processos variam de um sistema para o outro, alterando significativamente a qualidade das farinhas de penas. A qualidade do produto depende ainda das proporções das matérias-primas brutas processadas, afetando significativamente a composição final do material (Silva et al., 2000; Latshaw, 1990). Pois em algumas graxarias ainda são utilizadas além das penas, vísceras ou sangue junto ao processo da farinha de penas.

As pesquisas buscam melhorar o valor nutricional da farinha de penas de uma forma ambientalmente correta. O processamento das penas com micro-organismos queratinolíticos e/ou adição de enzimas associados a menor pressão e temperatura no digestor, está sendo investigado como alternativa para produção de farinhas de penas hidrolisadas com melhor qualidade para inclusão na alimentação animal (Riffel & Brandelli, 2002; Riffel et al., 2003; Grazziotin et al., 2006; Prakash et al., 2010; Pacheco et al., 2016, Maciel et al., 2016; Rieger et al., 2017; Kshetri et al., 2017), podendo ser uma alternativa aos métodos de hidrólise térmica e às altas temperaturas para proporcionar maior disponibilidade de nutrientes.

O hidrolisado de penas produzido a partir de queratinases produzidas por bactérias apresentam um aumento no valor nutricional da queratina da pena (Grazziotin et al. 2006). Desta forma a proteólise da queratina das penas por micro-organismos com atividade queratinolítica representa um método alternativo para melhorar o valor nutricional das penas, através do

enriquecimento proteico pela própria biomassa microbiana, além de evitar a destruição de certos aa essenciais que nas penas já não se encontram em níveis elevados como: metionina, lisina, histidina, devido ao processamento com altas temperaturas e pressões (Daroit, 2011; Maciel et al., 2016).

Em estudo de Rieger et al. (2017), foi avaliada a bioconversão de penas e a produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 e evidenciado o potencial de degradação de penas, com de cultivos de 10 g/L penas, 94,5% ± 3% das penas inteiras foram degradadas após 4 dias. Também foram observados maiores teores de proteínas solúveis e a produção máxima de protease ocorreu no quarto dia.

Ao testar o potencial da bactéria *Kocuria rosea* na degradação de penas, Bertsh e Coello (2005) verificaram que a biomassa bacteriana pode contribuir para melhorar o conteúdo de alguns aa, como a lisina, histidina (deficientes na farinha de penas), asparagina, metionina e alanina. A biodegradação das penas apresenta ainda a vantagem de não formar complexos com aa essenciais e a desnaturação proteica ocasionado o aumento de aa não essenciais (Williams et al., 1991; Manczinger et al., 2003; Said & Pietro, 2004;). Por outro lado, a utilização de penas constitui uma solução ecológica na medida em que seu acúmulo pode ser causa de poluição e contaminação ambiental (Singh, 1999; Shawkey et al., 2003).

Bertsch & Coello (2005) ao compararem três tipos de farinha de penas (in natura, processada de maneira convencional e tratada com micro-organismos queratinolíticos (*Kocuria rosea*), observaram melhora significativa no perfil de aa, com aumento em alguns essenciais na farinha de penas hidrolisada com micro-organismos em relação às demais, indicando que a queratina das penas pode ser utilizada como fonte de proteína após processamento. Em estudos com ratos, hidrolisado de penas produzido pelo *Vibrio* sp. KR2 poderia substituir até 20% da proteína de soja do alimento, quando suplementado com metionina (Grazziotin et al., 2008).

Em estudo com farinha de penas na alimentação de cães adultos, Rebefka & Kulshrestha (2009), observaram que a substituição de farinha de vísceras por 9% a 14% de farinha de penas em dietas para cães adultos, não

acarretou em diferenças significativas na digestibilidade aparente da proteína da dieta, ficando acima de 80%, porém a inclusão prejudicou as características fecais e escore fecal, aumentando o teor de umidade das fezes (74%) mediante ingestão de dieta com 14% de inclusão.

As farinhas de penas por possuírem grande quantidade de queratina que possuem elevado teor proteico que a torna muito atrativa para cães e gatos, isso favorece a utilização como ingrediente alternativo. Outro fator importante é que a proteína da farinha de penas hidrolisada possui baixo peso molecular. Em estudo realizado com farinha de penas hidrolisadas de forma convencional e farinha de penas hidrolisadas com *blend* enzimáticos, Pacheco et al. (2016), verificaram que ambas possuem proteínas de baixo peso molecular sendo que aproximadamente 95% das moléculas são menores do que 10.000 Da e 50% menores do que 500 Da. Esta característica da FPH confere grande potencial para confecção de dietas com baixo potencial antigênico para cães e gatos devido à baixa capacidade de induzir reações alérgicas em animais sensíveis, considerando que, de maneira geral, moléculas proteicas com peso molecular entre 10.000 e 70.000 Da são mais relacionadas com a ocorrência de hipersensibilidade alimentar (Sampson, 1993).

4. Farinha de penas e a influência na amônia fecal

A consistência fecal, em cães e gatos, é alterada pela qualidade da dieta. Através da manipulação da dieta podemos alterar o escore fecal. O escore fecal está relacionado à digestibilidade dos nutrientes, principalmente das fontes proteicas. Segundo Zentek, (1995), o teor de umidade da dieta não é efetivo para avaliar a qualidade fecal sendo importante avaliar também a quantidade e o tipo de proteína dietética, umidade e agentes geleficantes.

O odor fecal é de suma importância, pois é proveniente de substâncias geradas por bactérias endógenas e de substratos não-digeridos da degradação de proteínas. Estas substâncias incluem: amônia, aminas alifáticas (agmatina, cadaverina, putrescina e tiramina), ácidos graxos ramificados (isobutirato e isovalerato), indóis (indól, 3-metilindol, 2-metilindol e 2,3-metilindol), fenóis

(fenól, p-cresol e 4-etilfenol) e compostos sulfurados voláteis (dimetil disulfeto, dietil disulfeto, di-n-propildisulfeto e di-n-butil disulfeto). Estes compostos são produzidos a partir de aa, por meio de desaminação (ex: amônia), desaminação-descarboxilação (ex: ácidos graxos de cadeia ramificada) ou descarboxilação (ex: aminas alifáticas) (Hussein et al., 1999). Quanto maior a quantidade de proteína indigestível que chega ao intestino grosso, maior é a sua disponibilidade para a microbiota (Hesta et al., 2003), o que conseqüentemente alterará as características fecais, principalmente a concentração de nitrogênio amoniacal nas fezes. Importante observar que a digestibilidade da farinha de penas é de aproximadamente 70%, e que os substratos de proteínas não digeridos poderão sofrer a ação de micro-organismos intestinais resultando em problemas com a qualidade fecal e aumento da amônia fecal.

4.1. Efeito probiótico dos micro-organismos utilizados na hidrólise da farinha de penas

O intestino delgado (ID) dos cães possui população microbiana simples, no duodeno e jejuno encontram-se, predominantemente, *Streptococcus* e *Lactobacillus* e, no íleo, *Escherichia coli* e bactérias anaeróbias. No intestino grosso (IG) além da absorção de água e eletrólitos, ocorre a fermentação microbiana dos nutrientes que não foram metabolizados no intestino delgado. A microbiota do IG dos cães, diferente do ID, apresenta população complexa e diversificada (NRC, 2006). Os micro-organismos presentes no trato gastrintestinal mantêm relações simbióticas ou antagônicas, nutrindo-se dos componentes de alimentos não digeridos e das secreções do trato gastrintestinal (Teshima, 2003). Também podem ser moduladas através de alguns fatores como: dieta, pH, temperatura e peristaltismo.

A utilização de probióticos na alimentação é uma forma de modular a microbiota no trato gastrointestinal (TGI). O probiótico é um suplemento alimentar que contém micro-organismos vivos, ou componentes microbianos que, quando ingeridos em determinado número, apresentam efeito benéfico

sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro. Um probiótico ideal, independentemente da sua fonte, é aquele capaz de se estabelecer, multiplicar-se e colonizar o epitélio de revestimento do intestino do hospedeiro (Nayak, 2010). São capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos positivos à saúde do indivíduo (Salminen et al., 1999; Dupont, 2001; FAO/WHO, 2001; Isoulari, 2001; Reid et al., 2001; Sanders, 2003; Feliciano et al. 2009).

Acredita-se que a microbiota benéfica possa auxiliar a digestão e absorção de nutrientes, produza vitaminas que serão utilizadas pelo hospedeiro e diminua, por exclusão competitiva, a proliferação de agentes patogênicos (Silva & Nörnberg, 2003). Alguns micro-organismos probióticos precisam apresentar resistência do endósporo celular, que garante não só, melhores condições de armazenamento, uso de temperatura ambiente e possibilidade de dessecação, como também a sobrevivência no pH gástrico, permitindo que micro-organismos viáveis sigam pelo sistema digestório (Duc et al., 2004; Cutting, 2011). Um probiótico ideal, independentemente da sua fonte, é aquele capaz de se estabelecer, multiplicar-se e colonizar o epitélio de revestimento do intestino do hospedeiro (NAYAK, 2010).

Em cães, Swanson et al. (2002) verificaram que a administração de *Lactobacillus acidophilus* aumentou a digestibilidade da matéria seca, da matéria orgânica e da proteína bruta.

Micro-organismos probióticos apresentam-se como uma alternativa ao uso de antibióticos, agindo como supressores de micro-organismos indesejáveis. Segundo Lee e colaboradores (2010), a utilização de *Bacillus subtilis* como complemento alimentar na dieta de aves, levou a efeitos inibitórios significativos no crescimento de micro-organismos patogênicos como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*, melhorando a imunidade humoral e celular das respostas imunológicas no epitélio intestinal.

Em estudo com aves, Lee et al. (2013), compararam 0,1% de virginiamicina, 0,1% de micro-organismos na alimentação direta que continham *Lactobacillus reuteri* e 0,1% de micro-organismo na alimentação que continham uma mistura de *L. reuteri*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*,

observaram que o ganho de peso, de 0 a 21 dias, não foi diferente do grupo que recebeu antibiótico para o grupo que recebeu a mistura de micro-organismos, sendo considerada uma alternativa viável aos antibióticos nas dietas de frangos de corte.

5. Farinha de penas e a presença de aminas bioativas

Aminas bioativas são bases orgânicas alifáticas, de baixo peso molecular que participam de processos metabólicos normais de animais, plantas e micro-organismos (Halász et al., 1994; Bardócz, 1995; Silla-Santos, 1996). As aminas podem ser classificadas de acordo com o número de grupos amina: monoaminas (tiramina, feniletilamina), diaminas (histamina, serotonina, triptamina, putrescina, cadaverina) ou poliaminas (espermina, espermidina, agmatina). Com relação à função que exercem, as aminas bioativas são classificadas em poliaminas (espermidina e espermina): moduladoras e promotoras do crescimento por atuarem no crescimento e manutenção do metabolismo celular; e em aminas biogênicas: vasoativas e neuroativas (tiramina, histamina e serotonina) devido ao seu efeito nos sistemas vascular e neural (Bardocz, 1995).

A formação de aminas bioativas, podem ser interferidas por alguns fatores como: a disponibilidade de aa livres, a presença de micro-organismos que possuem atividade descarboxilase e condições adequadas, que permitam o crescimento dos micro-organismos e a produção de suas enzimas (Nout et al., 1994; Bardócz, 1995) (figura 2). Como exemplo, temos a histamina, está presente nos mastócitos e basófilos (tecido muscular) podendo aparecer naturalmente ou podem ser formadas por atividade de enzimas de micro-organismos adicionados ou contaminantes no tecido liberando substrato para a formação da amina. (Lima & Glória, 1999; Lavon et al., 2008).

Inúmeras espécies bacterianas são produtoras de aminas, principalmente as representantes da família *Enterobacteriaceae*, particularmente os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus* ao lado de espécies dos gêneros *Achromobacter*, *Lactobacillus*,

Leuconostoc, *Pseudomonas*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Propionobacterium*, *Clostridium* (Shalaby, 1996; Lavon et al., 2008).

Como as aminas podem ser formadas pela descarboxilação de aa, por atividade enzimática de micro-organismos, elas estão frequentemente associadas a produtos em deterioração ou que passaram por etapas de maturação ou fermentação (Simon-Sarkadi et al., 1994). Sendo assim a análise de aminas bioativas seria uma forma de determinar a qualidade das farinhas de origem animal (FOA), como indicadores de graus de contaminação e a influência destas aminas na palatabilidade do ingrediente e do alimento.

Outro ponto importante é a investigação da influência das aminas bioativas sobre a palatabilidade para cães. Em condições fisiológicas normais, os músculos possuem espermidina, espermina e putrescina em pequenas concentrações, as quais atuam como fatores de crescimento, e ainda histamina armazenada em mastócitos e basófilos (Halász et al., 1994; Bardócz, 1995; Glória, 2005). A presença destas aminas nas farinhas pode favorecer o consumo e a preferência alimentar para cães, pois remete a memória ancestral carnívora destes animais. Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que investigou o efeito das aminas bioativas sobre a palatabilidade para cães adultos.

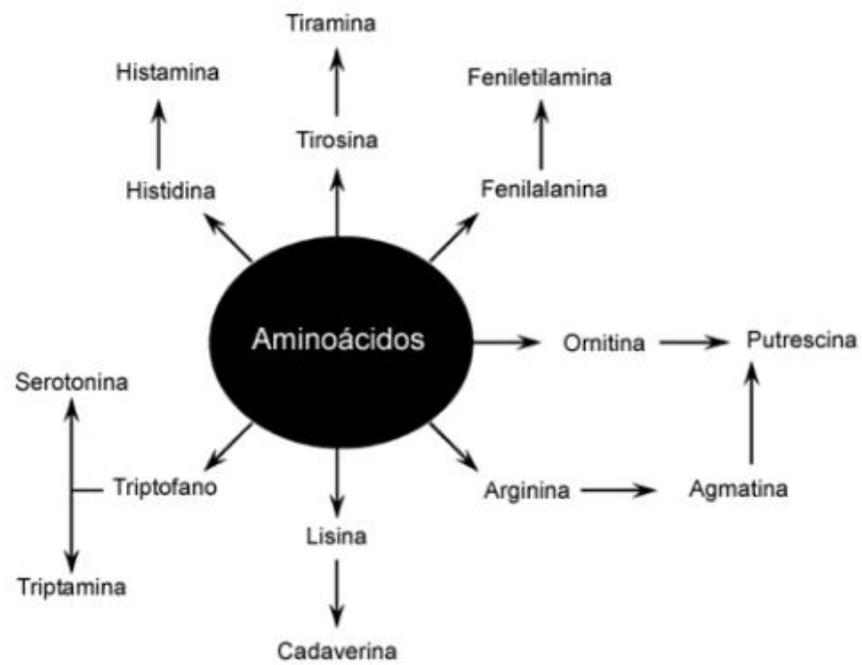


Figura 2. Vias de formação de aminas bioativas. Fonte: Botelho et al., (2009).

HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese estabelecida foi:

1. A hidrólise da farinha de penas por micro-organismos *Bacillus subtilis* melhora a qualidade nutricional da farinha de penas influenciando positivamente na palatabilidade, digestibilidade e características fecais e urinárias quando adicionada em dietas para cães.

Dessa forma para investigar a hipótese acima foram executados três estudos que objetivaram:

- Testar quatro cepas de micro-organismos queratinolíticos *in vitro* e verificar a cepa com maior fator de degradação para utilização nos estudos com alimentação animal.
- Determinar a digestibilidade das penas mediante processos hidrolítico através do uso de cepas de *Bacillus subtilis*.
- Determinar a influência das penas hidrolisadas *Bacillus subtilis* nos parâmetros fecais e urinários nos cães.
- Avaliar o peso molecular e o perfil aminoacídico do hidrolisado.
- Avaliar a presença de *Bacillus sp.* no conteúdo fecal dos cães alimentados com a farinha de penas hidrolisada por micro-organismo.
- Avaliar a palatabilidade da farinha de penas hidrolisada por micro-organismos *Bacillus subtilis* adicionada em dietas para cães adultos.

CAPÍTULO II³

³Artigo escrito conforme as normas da *Animal Feed Science and Technology* – no formato de *short communication*.

Avaliação comparativa de quatro micro-organismos queratinolíticos e um blend enzimático sobre a hidrólise de penas de frango *in vitro*

G. S. Machado^{a*}, A. P. F. Corrêa^b, A. Brandelli^b, L. Trevizan^b

^aAutor para correspondência: gsm_sg@hotmail.com, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, RS 90540-003, Brasil Telefone: +5505133086854

^bUniversidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, RS 90540-003, Brasil

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar a viabilidade e a ação de quatro cepas de micro-organismos queratinolíticos (três *Bacillus sp.*: FTC01, FTC02PR1, P45 e um *Chryseobacterium sp.*: KR6) na hidrólise de penas de frango *in natura*. Um *blend* enzimático comercial contendo proteases e lipases também foi testado. Nas recomendações do fabricante da enzima comercial é indicada a adição de metabissulfito de sódio (2,5 g/kg). O estudo seguiu delineamento fatorial em fatorial 2x2x5, em que foram testados 20 tratamentos, utilizando duas concentrações de penas (5 e 8%), quatro micro-organismos e uma enzima comercial com ou sem adição de metabissulfito de sódio. Os parâmetros avaliados para determinar a eficiência das cepas e enzima foram: fator de degradação das penas, concentração de proteína solúvel, digestibilidade *in vitro* e conteúdo de aa livres. Todas as cepas e enzima degradaram as penas nas concentrações de 5 e 8% de penas, para a concentração de 5%, obtivemos os resultados melhores (acima de 85%), já na concentração de 8% valores ficaram em torno de 70%. Os maiores valores de

digestibilidade foram observados na concentração de 5% para os tratamentos T1, T2 e T8 e para a concentração de 8% os tratamentos T6 e T9. As curvas de aa livres demonstraram que após o período de incubação foi gerado no hidrolisado uma concentração maior de aa livres. As cepas utilizadas demonstraram potencial de degradação melhores que a enzima comercial. Observa-se a necessidade de avaliação de outras concentrações de penas para comprovar sua viabilidade de uso em escala industrial para alimentação animal.

Palavras chaves: enzima, degradação, queratina, bactérias;

1. Introdução

As farinhas de carne, sangue, vísceras e penas são ingredientes proteicos utilizados na alimentação de animais não-ruminantes. São conhecidos como coprodutos de origem animal que podem entrar como substitutos ao farelo de soja, dependendo do custo que estas matérias-primas apresentam no mercado, uma vez que são boas fontes de nutrientes, quando bem processadas (Moura et al., 1994; Pereira et al., 1994; Brugalli et al., 1999; Bellaver et al., 2001). Porém, existe uma variação na forma como estes ingredientes sofrem processamento, afetando diretamente o valor nutritivo destes ingredientes. A farinha de penas, por exemplo, é processada sob alta pressão e temperatura permitindo a digestão parcial da queratina, que representa cerca de 90% da PB contida na pena (Scapim et al., 2003). Apesar de ser uma via de hidrólise, o processo térmico é pouco eficiente e isso gera em torno de 50% de disponibilidade de aa, somente. Sendo assim, é necessário um processo mais efetivo. A hidrólise das penas por micro-organismos queratinolíticos ou a adição enzimas específicas, associada ou não a menores temperaturas e pressão durante o processamento poderia ser uma alternativa para produzir farinhas de penas de melhor

aproveitamento digestivo. Para a elaboração de novos produtos, a partir de micro-organismos, é necessário o estudo dos fatores que podem influenciar na produção da biomolécula de interesse (Kalil et al., 2000). O objetivo deste estudo foi verificar o efeito queratinolítico de quatro cepas de micro-organismos e de um *blend* enzimático sobre a degradação de penas com vistas na produção de uma farinha de maior digestibilidade *in vitro*.

2. Material e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Ciência de Alimentos (ICTA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2.1 Micro-organismos e enzima

Foram utilizadas quatro cepas de bactérias queratinolíticas, sendo três *Bacillus sp.* (FTC01, FTC02PR1 e P45) e uma *Chryseobacterium sp.* (KR6), para degradação *in vitro* das penas de frango. Estas cepas foram isoladas e fornecidas pela Fatec (Arujá, Brasil) e Riffel et al. (2003), respectivamente.

Para controle da comparação da degradação pelos micro-organismos foi utilizada uma enzima comercial (Allzyme FD - Alltech© do Brasil) composta por protease (> 12.500 HUT/g) e lipase (130 LU/g), adicionadas segundo recomendações do fabricante (*blend* enzimático: 0,5 g/kg; Metabissulfito de sódio: 2,5 g/kg).

O fator de degradação das penas, concentração de proteína solúvel, digestibilidade *in vitro* e conteúdo de aa livres foram usados para determinar a ação dos micro-organismos e das enzimas.

2.2 *Tratamentos*: o estudo seguiu delineamento fatorial 2x2x5, totalizando 20 tratamentos e considerado como fatores: concentração de 5 ou 8% de penas na

solução; a inclusão ou não de metabissulfito de sódio (2,5 g/kg) e o uso *blend* enzimático ou de uma das quatro cepas de micro-organismo avaliadas (FTC01; FTC02PR1; P45; KR6). Frente a recomendação do fabricante do *blend* enzimático e para descartar possível efeito da inclusão do metabissulfito de sódio, foram gerados tratamentos com as cepas testadas incluindo este composto (Tabela 1).

2.3 Preparo das penas, cultivo e hidrolisado

As penas de frango foram adquiridas de frangos criados e abatidos no Laboratório de Ensino Zootécnico da UFRGS para outros estudos de desempenho zootécnico. Foram lavadas em água corrente e retirada todas impurezas, unhas, sangue e pedaços de pele. As penas foram pesadas e autoclavadas para eliminar a presença de micro-organismos indesejados. Foi determinada a matéria seca e proteína bruta (PB) das penas a serem incubadas com as cepas do estudo, conforme protocolo da AOAC (1995).

As colônias das linhagens queratinolíticas (*Bacillus* sp. e *Chryseobacterium* sp.) utilizadas foram coletadas por raspagem de placas e transferidas para o meio caldo pena (composição: 0,5 g/L NaCl, 0,3 g/L K₂HPO₄, 0,4 g/L KH₂PO₄, 10 g de farinha de penas) para confecção do pré-inóculo. A cultura foi incubada por 48 horas a 37°C e 120 rpm em equipamento incubador com agitação.

Foram realizados cultivos com concentrações de 5% e 8% de inclusão de pena e incubados por 5 dias com agitação de 120 rpm a 37°C. A cada 24 h foram retiradas alíquotas para determinação da concentração de proteína solúvel e mensurado o pH no início e no final da hidrólise. Após o cultivo, o material hidrolisado foi filtrado e o remanescente não degradado, foi lavado com água destilada, secos em estufa e pesados.

A porção líquida foi liofilizada (Liotop, model L101, Brasil), seca e misturadas as sobras do filtrado para confecção da farinha que foi utilizada no teste da digestibilidade *in vitro*.

2.4 Fator de degradação

O fator de degradação (%) foi calculado através da seguinte equação:

$$Fd = \frac{(P - p)}{P}$$

Onde:

P, massa de penas inicial, pesadas antes da incubação;

p, massa de penas final, filtrado e pesados após a incubação;

2.5 Concentração da Proteína Solúvel (PS)

Para determinar o conteúdo de PS das amostras utilizou-se o método descrito por Lowry et al. (1951), com o emprego de reagente de Folin-Ciocalteu (FC). As determinações de proteína solúvel de cada ponto foram realizadas em triplicata e foi medida a absorbância (750 nm) em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UVmini-1240, Tóquio, Japão). Paralelamente, foi preparado um controle com 100 µL de água destilada mais reagentes. A concentração de proteína foi determinada através de comparação com curva-padrão preparada com albumina sérica bovina.

2.6 Digestibilidade *in vitro*

A digestibilidade *in vitro* dos hidrolisados de pena foram avaliadas em comparação a digestibilidade da caseína através do método descrito por Ikeda et al. (1995). Em frasco de 50 mL, foi adicionado 0,25g do substrato e 7,5 mL de solução de pepsina (0,3 mg/mL em HCl 0,1 N) seguido a incubação das amostras por 3 horas a 37°C. Para neutralizar as amostras foi adicionado 7,5 mL de NaOH 0,2 M e 3,75 mL de solução de pancreatina (2,2 mg/mL em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0). As amostras foram incubadas por 24 horas a 37°C. Posteriormente, a reação foi

interrompida com 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 30%. O volume foi levado a 25 mL com TCA 5% e as amostras centrifugadas a 10.000 g por 30 min a 4°C, sendo separado o sobrenadante.

A digestibilidade foi calculada através da seguinte fórmula:

$$D = \frac{(\text{concentração de PS após a digestibilidade} * 100)}{\text{concentração P na amostra não digerida}}$$

Onde:

D, digestibilidade;

PS, proteína solúvel após digestibilidade *in vitro*;

P, proteína;

2.7 Aa livre

O conteúdo de aa livres (μmol) da solução foi quantificado pelo ensaio da ninhidrina (Yemm & Cocking, 1955) e hidrantina modificado. Brevemente, foram adicionados 100 μL de amostra em 2,0 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,2, adicionou-se 500 μL de ninhidrina e foi colocado em banho-maria a 100°C por 15 minutos, depois adicionou-se 5 mL de etanol a 50%, em seguida foi lida a absorbância a 560 nm em espectrofotômetro (Hitachi U-1100, Tóquio, Japão). Em paralelo foi preparado uma curva padrão com glicina.

2.8 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em duplicata. Os dados de digestibilidade *in vitro* foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância para verificar se as diferenças entre os hidrolisados foram significativas. Foi utilizado o software MINITAB® 17.1.0 (2013).

3. Resultados e discussão

Micro-organismos queratinolíticos são utilizados na indústria. Suas aplicações são as mais diversas, desde indústria de fertilizantes e detergentes, a indústria

farmacêutica e de alimentação animal (Brandelli, 2008; Santos e Koblitiz, 2010). Vários estudos vêm sendo realizados, confirmando a importância dos micro-organismos queratinolíticos na transformação de alimentos (Thys e Brandelli, 2006; Riffel et al., 2007; Kumar et al. 2008, Pillai et al., 2008; Correa et al., 2009, Daroit et al, 2010; Ferrareze et al., 2016).

Foi utilizado o metabissulfito de sódio junto com as cepas e enzima devido orientação do fabricante da enzima, mas acreditamos que a utilização seja referente ao fato de que o metabissulfito de sódio vá agir como um agente redutor, criando um potencial redox, favorecendo a ação da enzima. Já que quando utilizamos os micro-organismos eles proporcionam esse potencial e favorecem a ação das enzimas. Todos os tratamentos com as cepas queratinolíticas na concentração de 5% de penas obtiveram fator de degradação acima de 85% enquanto para os tratamentos com concentração de 8% de penas foi superior a 70%, o que demonstra a eficiência da degradação das penas pelos micro-organismos testados (Tabela 2), os tratamentos T5 e T15 demonstraram a necessidade da utilização do agente redutor para ação da enzima, pois quando adicionados no T10 e T20 foi possível verificar que os níveis de degradação foram semelhantes aos dos demais tratamentos com as cepas queratinolíticas. Apesar disso, ocorreu redução no fator de degradação com o aumento da concentração de penas para 8%. Esta diminuição na degradação pode estar relacionada à inibição do substrato ou repressão da produção de proteases, uma vez que a maior concentração de penas pode resultar em menor fluxo de massa de ar e líquido e, conseqüentemente, menor quantidade de oxigênio (Suntornsuk et al., 2003; Park et al. 2009), limitando o processo de degradação. Os valores de pH não apresentaram variações, permaneceram neutros ao longo da hidrólise (no tempo 0: pH 6 e após 120h: pH 7).

Em relação a proteína solúvel (mg/L) os maiores valores de solubilidade proteicas foram encontrados para a cepa FTC02PR1 (T4 e T14) e FTC01(T3 e T13), em ambas inclusões, demonstrando a eficiência das proteases e queratinases produzidas (Figura 1). Provavelmente as queratinases produzidas por esses micro-organismos mantiveram-se estáveis no meio o que tornou o processo mais eficiente, já que as condições do meio de cultivo, temperatura, pH, agitação e inóculo podem afetar diretamente a eficiência de degradação (Fakhfakh-zouari et al, 2010).

Os valores de digestibilidade *in vitro* das diferentes fontes proteicas revelam que a proteína referência, caseína, apresentou maior digestibilidade em relação aos demais hidrolisados de penas (Tabela 2). Este resultado foi esperado, já que na caseína havia apenas aa e proteína solúvel e nos demais hidrolisados também apresentavam queratina residual e células bacterianas, além de aa e proteína solúvel. O hidrolisado de pena obtido do filtrado do meio de cultura do micro-organismo T9, T1, T2 com 5% de concentração de penas e T13 e T11 com concentração de 8% apresentaram maior digestibilidade em relação aos demais tratamentos. A utilização de maior quantidade de penas (8%) demonstrou uma maior eficiência das cepas FTC01 e KR6, sem o metabissulfito de sódio, sendo seus valores de digestibilidade foram semelhantes aos demais hidrolisados com menor concentração de penas (5%). Este fator é um ponto significativo para estas cepas pois conseguiram ser eficientes na maior concentração de penas testada.

Foi possível verificar que a concentração de aa livres foi influenciada positivamente pela hidrólise dos micro-organismos. Nos hidrolisados dos 20 tratamentos testados, após as 120h, como esperado foi possível encontrar maior concentração de aa livres (Figura 3). Nos tratamentos (com concentração de 5%) T7, T3, T8, T9, T4, T10 e (com concentração de 8%) T13 e T14 as curvas foram maiores. A

grande vantagem em termos nutricionais é que com o aumento o número de aa livres ocorreu o decréscimo no conteúdo de grandes peptídeos.

4. Conclusão

As cepas bacterianas (KR6, P45, FTC01, FTC02PR1) e o *blend* enzimático utilizados demonstraram potencial de degradação e influenciaram na digestibilidade *in vitro* nas concentrações de penas testadas. A utilização do metabissulfito de sódio como agente redutor influenciaram apenas nos tratamentos com enzima comercial. A degradação por micro-organismos é uma alternativa eficiente para melhorar a digestibilidade *in vitro* de penas, podendo também melhorar a disponibilidade de aa e solubilidade proteica, tendo potencial para utilização para alimentação animal, necessitando ser testada em maior escala. Neste estudo a cepa FTC01 foi a cepa que apresentou maior potencial de degradação para a maior concentração de penas, podendo ser explorada para produção em larga escala da farinha de penas hidrolisadas.

Tabela 1. Tratamentos utilizados no experimento.

Nome		Inclusão penas (%)	Metabissulfito de sódio
T1	KR6	5	Não
T2	P45	5	Não
T3	FTC01	5	Não
T4	FTC02PR1	5	Não
T5	Enzima FD	5	Não
T6	KR6	5	Sim
T7	P45	5	Sim
T8	FTC01	5	Sim
T9	FTC02PR1	5	Sim
T10	Enzima FD	5	Sim
T11	KR6	8	Não
T12	P45	8	Não
T13	FTC01	8	Não
T14	FTC02PR1	8	Não
T15	Enzima FD	8	Não
T16	KR6	8	Sim
T17	P45	8	Sim
T18	FTC01	8	Sim
T19	FTC02PR1	8	Sim
T20	Enzima FD	8	Sim

Tabela 2. Fator de degradação (%) de solução com 5 ou 8% de penas de frango após cultivo com cepas bacterianas KR6, P45, FTC01 e FTC01PR2 e de *blend* enzimático.

Tratamentos	Digerido (g)	Fator de degradação (%)
Concentração de 5% de penas		
T1	4,34	87
T2	4,50	90
T3	4,68	94
T4	4,58	92
T5	1,64	33
T6 ¹	4,29	86
T7 ¹	4,45	89
T8 ¹	4,77	95
T9 ¹	4,55	91
T10 ¹	4,43	87
Concentração de 8% de penas		
T11	6,23	77
T12	6,30	79
T13	6,58	82
T14	6,35	79
T15	3,01	38
T16 ¹	6,21	78
T17 ¹	6,23	78
T18 ¹	6,25	78
T19 ¹	6,21	78
T20 ¹	6,30	79

¹Adição de metabilssulfito em proporção indicada pelo fabricante da enzima (2,5 g/kg).

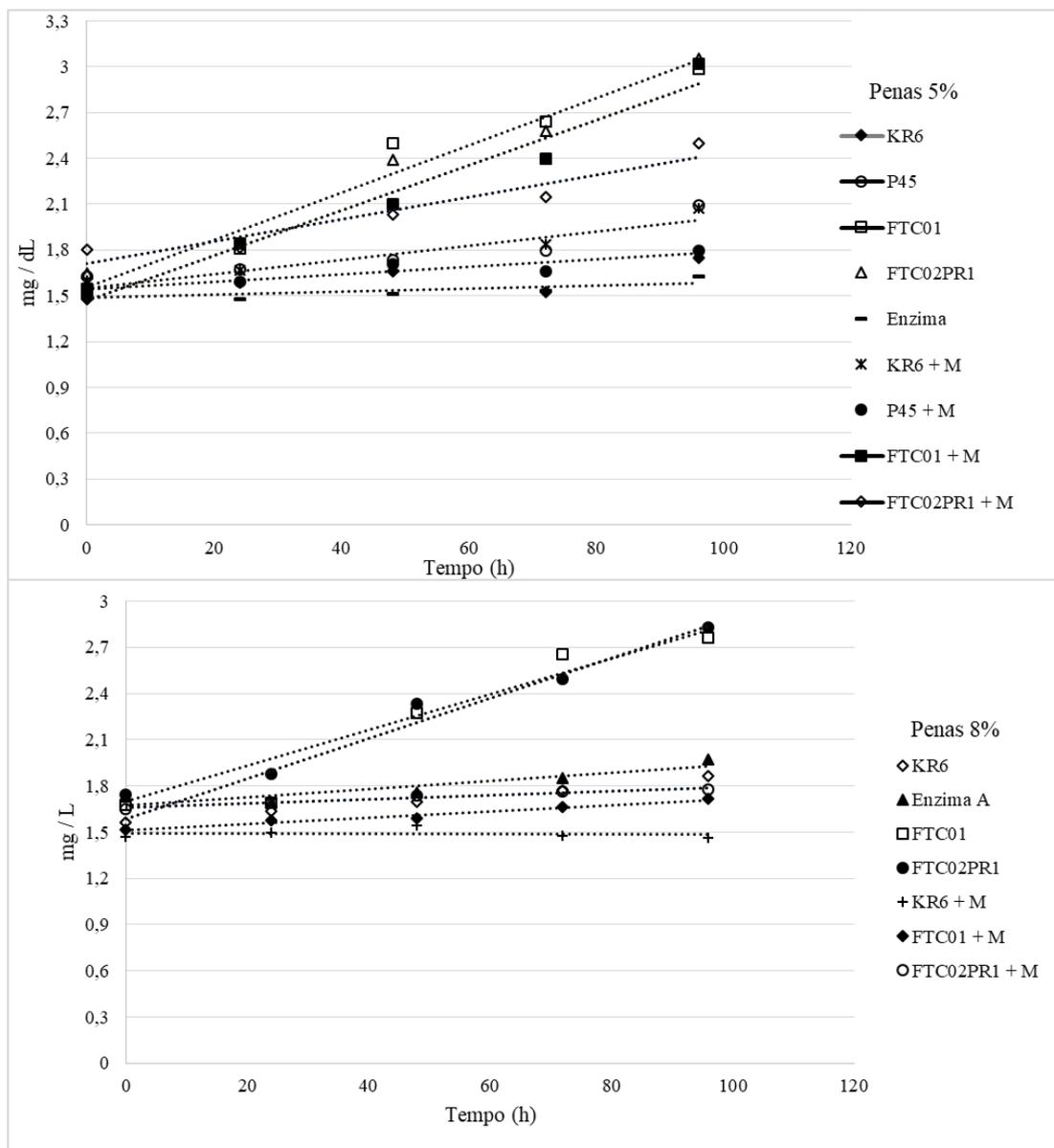


Figura 1. Curva da solubilidade proteica (mg/L) após 120 horas de hidrólise com inclusões de 5% e 8%.

Tabela 3. Digestibilidade da proteína *in vitro* de caseína e hidrolisados de penas, nas concentrações de 5 e 8 %, para os tratamentos testados.

Tratamento	Concentração de penas (g/100ml)	Proteína total ¹	Digestibilidade (%) ^{*2}
Caseína	-	77,47	0,61 ^A
FTC02PR1 + M	5	74,41	0,50 ^B
KR6	5	74,41	0,47 ^{BC}
P45	5	74,41	0,44 ^{BCD}
KR6	8	74,41	0,44 ^{BCD}
FTC01	8	74,41	0,43 ^{BCDE}
FD	5	74,41	0,43 ^{BCDE}
P45	8	74,41	0,43 ^{BCDE}
KR6 + M	5	74,41	0,41 ^{CDEF}
P45 + M	8	74,41	0,41 ^{CDEF}
P45 + M	5	74,41	0,41 ^{CDEF}
FD + M	8	74,41	0,40 ^{CDEF}
FD + M	5	74,41	0,37 ^{DEFG}
FTC02PR1	8	74,41	0,37 ^{DEFG}
FD	8	74,41	0,37 ^{DEFG}
FTC02PR1	5	74,41	0,37 ^{DEFG}
FTC01 + M	5	74,41	0,36 ^{EFG}
KR6 + M	8	74,41	0,35 ^{FG}
FTC01 + M	8	74,41	0,32 ^G
FTC02PR1 + M	8	74,41	0,32 ^G

*Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (P < 0,05)

¹Proteína total na amostra inicial (%).

²Teste *in vitro*, adaptado de Ikeda et al. (1995).

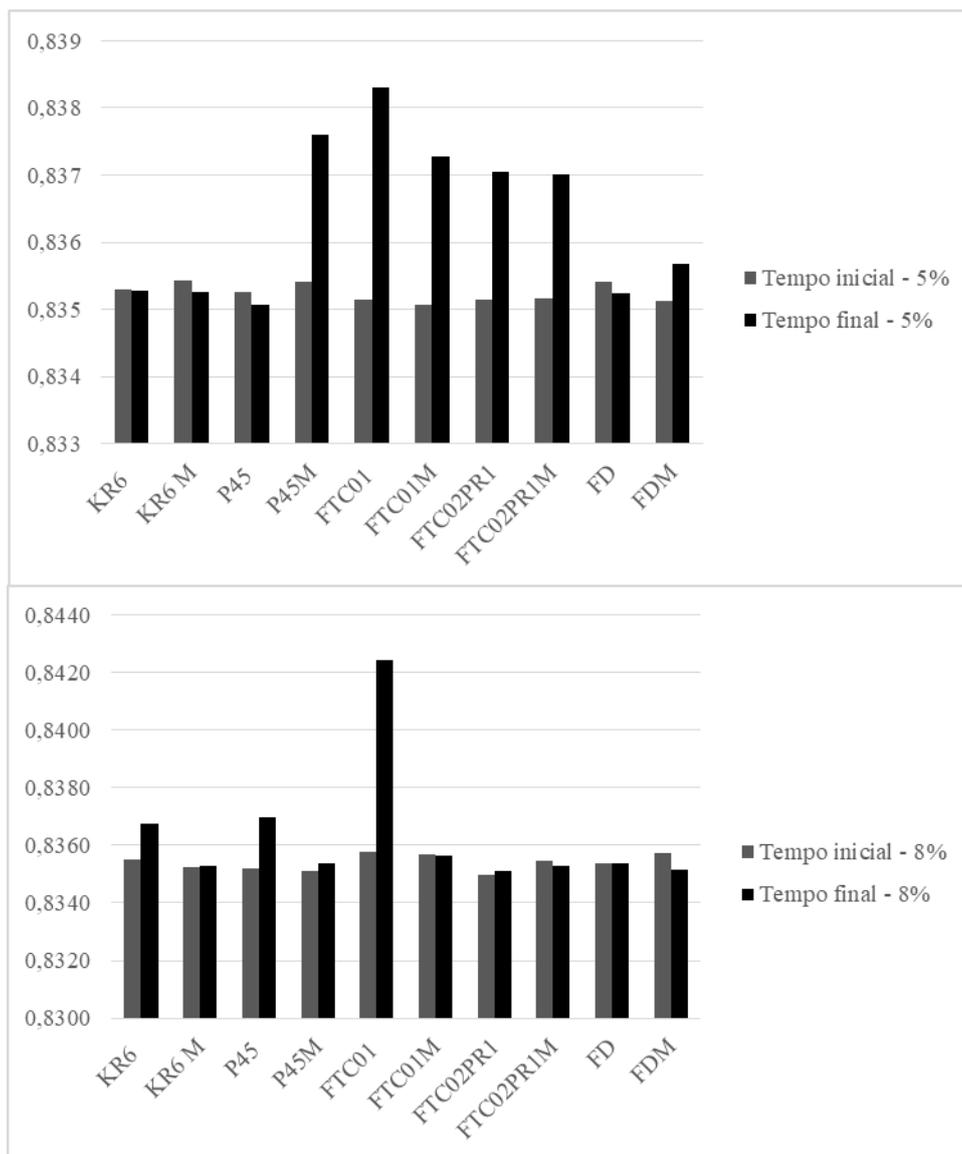


Figura 2. Aa livres (μmol) antes da hidrólise (tempo inicial) e após as 120 h de incubação.

5. Referências Bibliográficas

- Bellaver, C. et al. 2001. Substituição parcial do farelo de soja pela farinha de vísceras de aves em dietas balanceadas com base na proteína e em aa totais ou digestíveis para frangos de corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 3 (3), 233-240.
- Brandelli, A. 2008. Bacterial Keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 105-116.
- Brugalli, I. et al. 1999. Efeito do tamanho da partícula e do concentração de substituição nos valores energéticos da farinha de carne e ossos para pintos de corte. *Revista Brasileira Zootecnia*, 28 (4), 753-757.
- Correa, A. P. F.; Daroit, D. J.; Brandelli, A., 2009. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus sp.* P7 isolated from Amazonian environment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64, 1-6.
- Daroit, D. J., Correa, A. P. F., Segalin, J., Brandelli, A. 2010. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus sp.* P45. *Biocatalysis and Biotransformation*, 28,370-379.
- Fakhfakh, N., Ktari, N., Haddar, A., Mnif, I.H., Dahmen, I., Nasri, M. 2011. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. *Process Biochem*, 46, 1731–1737.
- Ferreze A. G., A. P. F. Correa, A. Brandelli. 2016. Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.7, 102-109.
- Ikeda, K. et. al. 1995. Factors affecting protein digestibility in soybean foods. *Cereal Chemistry*, 72,401-405.

- Kalil, S.J.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I., 2000. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochemistry*, 35, 539-550.
- Kumar, A.G. et al., 2008. Characterization of an alkaline active – thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology*. 104, 411-419.
- Lowry, O. H.; et al., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.
- Moura, C.C. et al. 1994. Farinha de penas e sangue em rações para suínos em crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 23(4),632-641.
- Pacheco B., Dias M.T., Baldini N. F. G., Tanikawa V. L.S., Sgarbieri C., Valdemiro C., 2005. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25(2): 333-338.
- Park, G.T., Son, H.J., 2009. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium. *Microbiol. Res*. 164, 478–485.
- Pereira, L.E.J. et al. 1994. Farinha de vísceras de aves em substituição ao farelo de soja na alimentação de suínos em crescimento e terminação. *Rev. Bras. Zoot.* 23 (6), 930-939.
- Pillai, P., Archana, G., 2008. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 643-650.
- Riffel, A., Lucas, F., Heeb, P., Brandelli, A., 2003. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch. Microbiol.* 179, 258-265.

- Riffel, A.; Brandelli, A.; Bellato, C.M.; Souza, G.H.M.F.; Eberlin, M.N.; Tavares, F.C.A. 2007. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *Journal of Biotechnology*. 128, 693-703.
- Santos L. F.; Koblitiz M. G. B. 2010. Proteases. *Bioquímica de Alimentos: Teoria e aplicações práticas*. Rio de Janeiro. Ed.1. Guanabara Koogan.
- Scapim, M.R.S.; Loures, E.G.; Rostagno, H.S. et al. 2003. Avaliação nutricional da farinha de penas e de sangue para frangos de corte submetida a diferentes tratamentos térmicos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 25(1), 91-98.
- Suntornsuk, W., Suntornsuk, L. 2003. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. *Bioresour. Technol.* 86, 239–243.
- Thys, R.C., Brandelli A., 2006. Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. *Journal of Applied Microbiology*. 101, 1259-1268.
- Yemm E.W, Coccking E.C. 1955. The determination of amino acid with ninhydrin. *Analyst*, 80, 209-213.

CAPÍTULO III⁴

⁴Artigo escrito conforme as normas da revista *Journal of Animal Science*.

Running head: Farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* na dieta de cães

Determinação do valor nutritivo da farinha de penas hidrolisada por micro-organismos em dietas para cães adultos e seu potencial uso como probiótico

G. S. Machado,* A. P. F. Correa,* P. G. da S. Pires,* A. Brandelli, A. de M.

Kessler*and L. Trevizan*⁵

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil,

CEP 91540-000

RESUMO

⁵Corresponding author: ltrevizan@ufrgs.br

Na indústria, as penas são transformadas em farinha de penas hidrolisadas, através da digestão por processamento térmico, com alta pressão e temperatura. Porém este método é sem padronização de produção e podendo afetar na qualidade das farinhas produzidas. Outros métodos alternativos de processamento vem sendo estudados, entre eles a utilização de bactérias queratinolítica para realização da hidrólise da proteína. O objetivo deste estudo foi comparar a farinha de penas hidrolisada de maneira convencional com a farinha de penas hidrolisada por micro-organismos (*Bacillus subtilis* FTC01) e determinar a digestibilidade das farinhas em dietas para cães adultos e a possibilidade do uso como probiótico da cepa utilizada. O coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) de macro nutrientes e energia foram avaliadas. Três tratamentos foram testados, a dieta basal (DB), a dieta basal adicionada com 10% de farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* (FPHm) e a dieta basal adicionaram 10% de farinha de penas hidrolisada convencionalmente (FPHc). Nove cães adultos foram distribuídos aleatoriamente em blocos casualizados. Foram realizados dois blocos experimentais de 10 dias cada, divididos em fase de adaptação (Dias 1 a 5) e período de coleta total de fezes (Dias 6 a 10). Foram realizadas contagem microbiana pela técnica de contagem em superfície nas farinhas, dieta e fezes dos animais. Os CDA da matéria seca, proteína bruta e energia foram menores para a dieta 10% de FPHm quando comparada às dietas basal e 10% FPHc ($P < 0,05$). Apesar de não haver diferença entre os tratamentos para o escore fecal ($P > 0,05$), animais que consumiram dietas a base de FPH apresentaram maior matéria seca de fezes produzidas por dia ($P < 0,05$) devido à baixa digestibilidade da FPHm. Densidade urinária, pH urinário e fecal não foram identificados diferenças ($P > 0,05$). Os CDA de energia de FPHm e FPHc foram 40,0 e 76,0, respectivamente ($P < 0,05$). O valor de ED encontrado para FPHm foi de 2.198 kcal/kg e o de FPHc foi de 4.443 kcal/kg, ($P < 0,05$). Foram observadas culturas de

Bacillus spp. nas fezes dos animais que receberam FPHm. Os resultados demonstram que o processo convencional da farinha de penas está sendo eficiente para fornecer nutrientes e energia, porém a hidrólise bacteriana da FPHm não apresentou bons resultados em relação aos CDA dos nutrientes, mas demonstrou potencial probiótico do *Bacillus subtilis* para cães adultos já que foram observados culturas nas fezes.

Keywords: nutrition dogs; poultry byproducts; processing;

INTRODUÇÃO

A produção de penas está condicionada à produção de carne de frango. As penas são consideradas coprodutos do abate. De acordo com a estimativa do USDA em 2018, a produção mundial de frango deverá atingir 91,3 milhões de toneladas. O rendimento da carcaça do peso vivo do animal é de aproximadamente 70% e as penas contribuem com cerca de 7% do peso corporal da ave (Hollanda, 2009). A produção estimada em 2018 é de 6,4 milhões de toneladas de penas.

Na indústria, as penas são transformadas em farinha de penas hidrolisadas, através da digestão por processamento térmico, com alta pressão e temperatura elevada. O método, no entanto, não é satisfatório, uma vez que a digestibilidade da proteína da farinha de penas é relativamente baixa, cerca de 60% (Elmayergi & Smith, 1971; Bielorai et al., 1981). O uso de micro-organismos proteolíticos para a digestão de penas é uma alternativa tendo em vista a importância das novas técnicas de processamento que podem melhorar a qualidade dos coprodutos gerados pela indústria da carne e utilizados na alimentação animal. De acordo com Cedrola et al., (2012), a biodegradação da queratina por micro-organismos representa um método alternativo para melhorar o valor nutricional das penas, um coproduto que contém aa essenciais, mas com baixa

disponibilidade. O aumento da disponibilização de aa possibilita a incorporação deste ingrediente em maior proporção em dietas de diferentes espécies. Outro fator importante a ser considerado é o baixo peso molecular adquirido pelas farinhas processadas (Pacheco et al., 2016) por calor e pressão ou mesmo por micro-organismos. Atualmente, os ingredientes proteicos com esta característica têm potencial uso em dietas hipoalergênicas para cães e gatos, uma categoria de alimentos para animais de estimação com alta demanda (Nascente et al., 2006; Harvey & Hall, 2009).

Outro ponto interessante é o acúmulo dos micro-organismos digestores junto a farinha de penas que se incorporam na forma esporulada, podendo ter potencial probiótico. Os esporos de *Bacillus* spp., com capacidade queratinolítica, são amplamente difundidos como probióticos e agentes de exclusão competitiva em seres humanos e animais, o que os diferencia das outras espécies de micro-organismos utilizados que estão na sua forma vegetativa. A forma esporulada da bactéria tem a capacidade de resistir ao baixo pH do estômago e atingir o intestino em grandes quantidades, onde germinam e depois são eliminadas no conteúdo fecal. Uma vez no ambiente intestinal, colonizam e se multiplicam, promovendo a exclusão competitiva e o efeito probiótico (Casula e Cutting, 2002). O objetivo do presente estudo foi comparar a farinha de penas hidrolisada de maneira convencional com a farinha de penas hidrolisada por micro-organismos (*Bacillus subtilis*) e determinar os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e energia digestível das dietas a base de farinhas de penas hidrolisadas para cães adulto e a possível utilização dos *Bacillus subtilis* utilizados para hidrolise da FPHm como probiótico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de

Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

As dietas experimentais foram feitas a partir de uma dieta basal extrusada e formulada para atender as necessidades nutricionais para cães adultos de acordo com as recomendações do FEDIAF (2016). Todos os cães utilizados no estudo pertenciam ao Departamento de Zootecnia – Laboratório de Ensino Zootécnico da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Foram utilizados nove cães da raça Beagle, adultos, saudáveis, livres de endo e ectoparasitas comprovados previamente antes do estudo.

Preparação da farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* (FPHm) e farinha de penas convencional (FPHc).

A FPHc foi produzida de forma convencional com presença de altas temperaturas e pressão de 3 atm, pela empresa Kabsa Exportadora S.A. (Porto Alegre, RS, Brazil). Ao chegar a matéria prima é descarregada na moega, são realizadas inspeções visuais para detectar presença de materiais estranhos como plástico, ferro, papel, entre outros. Neste caso havendo a presença de materiais estranhos, o material é retirado, segregado e enviado a central de resíduos atendendo a legislação específica. Após, as penas passam por uma rosca, onde recebem a primeira adição de antioxidante na proporção de 0,075 L/ton para proteger a matéria prima durante a hidrólise/cozimento. Em seguida, as penas passam pela prensa para retirada da umidade da matéria prima, sendo em seguida encaminhadas ao hidrolisador contínuo, onde ocorre a hidrólise/cozimento, durante um tempo mínimo de 15 a 20 minutos, contado a partir do momento que o equipamento atinge a temperatura de entrada entre 110°C a 170°C (3 atm) e a temperatura de saída entre 110°C a 170°C. Após, o produto é descarregado no secador contínuo, onde ocorre a secagem da matéria prima, durante

um tempo mínimo de 30 minutos, a partir do momento que o equipamento atinge a temperatura máxima 110°C. Na saída a temperatura fica em torno de 50°C a 110°C. Ao sair do secador, a farinha é encaminhada para a peneira pré-separadora, última peneira do processo. Em seguida a farinha é moída e recebe mais uma adição de antioxidante na proporção de 0,45 L/ton. Finalmente a farinha passa pelo elevador e vai para o silo, para ser ensacada.

A FPHm foi produzida no Laboratório de Ensino Zootécnico (LEZO) da UFRGS. As cepas utilizadas no estudo foram multiplicadas para formar o pré inóculo em caldo *brain heart infusion* (BHI) adicionado de alçadas com *Bacillus subtilis* cepa *FTC01*, incubado por 24 h em um incubador com agitação de 120 rpm e 37 °C. Após, o pré inóculo foi adicionado a um caldo (composição: 0,5 g/L NaCl, 0,3 g/L K₂HPO₄, 0,4 g/L KH₂PO₄) com a adição de penas (10%), e incubadas em biodigestor com agitação a 70 rpm à 37 °C, por 120 h. Em seguida o conteúdo foi colocado em vasilhas de plástico e seco em estufa de ar forçado à 55 °C por 72 h. O conteúdo seco foi moído através de uma tela de 1-mm em moinho tipo Wiley (DE-LEO ® - Brasil).

$$\text{Fator de Degradação} = \frac{\text{Massa de penas inicial} - \text{Massa de penas final}}{\text{Massa de penas inicial}}$$

Foi realizada a contagem microbiana na FPHm pela técnica de contagem em superfície. Foi diluído 25g de fezes *in natura* em 225mL de solução salina (NaCl 0,85%), seguido de diluições seriadas, adicionando 1mL da mistura em 9 tubos contendo 9 mL de solução salina (0,85%) em sequência. Uma alíquota de 0,1mL das diluições foram transferidas para as 10 placas de Petri contendo meio de cultura ágar-nutriente sólido (Ágar-agar a 2% e nutrientes 13 g/L). Posteriormente, a alíquota foi espalhada sobre o meio com auxílio de alça Drigalsky até absorção completa da alíquota

pelo meio. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. Após as colônias foram contadas e identificadas por sua morfologia e análise por método de Gram.

Na FPHm e FPHc foram realizadas as seguintes análises: matéria seca (MS) (934.01), matéria orgânica (MO) (920.36), matéria mineral (942.05), proteína bruta (PB) (954.01) (Model TE 036/2, Tecnal, Piracicaba, Brazil), fibra bruta (FB) (962.10) e extrato etéreo (EE) (954.02) (Model 170/3, Fanem, São Paulo, Brazil), como descrito na Association of Official Analytical Chemists - AOAC (950.02), (1995) (Tabela 1). Para realização dos aminogramas foram encaminhadas amostras das farinhas para análise no Laboratório CBO, Valinhos, São Paulo, Brasil. O método utilizado foi o de cromatografia líquida de alta performance (HPLC,) seguindo a metodologia descrita por White et al. (1986) e Hagen et al. (1989). O aa triptofano foi analisado segundo metodologia descrita por Lucas & Sotelo, 1980. O valor de *protein efficiency ratio* (PER) foi calculado em relação as penas *in natura*, a partir da composição dos aa encontrados nos aminogramas (Tabela 1), baseado em três equações desenvolvidas por Alsmeyer, Cunningham e Happich (1974).

Equação 1: $PER = -0,684 + 0,456 (\text{leucina}) - 0,047 (\text{prolina})$

Equação 2: $PER = -0,468 + 0,454 (\text{leucina}) - 0,105 (\text{tirosina})$

Equação 3: $PER = -1,816 + 0,435 (\text{metionina}) + 0,780 (\text{leucina}) + 0,211 (\text{histidina}) - 0,944 (\text{tirosina})$

Avaliação ultraestrutural. Para verificar a ação dos microorganismos na estrutura da pena, foram retiradas pequenas alíquotas de aproximadamente 0,1g das farinhas (FPHm e FPHc) e também de penas *in natura*. Em seguida o conteúdo foi montado em um *stub*, revestidas com ouro-paládio de 35nm por três minutos (Sputter Coater - SCD 050 Balzers, Alemanha) e analisadas através de um microscópio eletrônico de varredura (JEOL 6060, Japão) com um aumento padrão de 500x.

Alimentos e manejo alimentar. As dietas experimentais foram confeccionadas com utilização de uma formula basal (DB) que foi adicionado por cobertura 10% de FPHm ou 10% de FPHc, segundo metodologia descrita por Adeola (2001). Três tratamentos foram testados, tratamento controle DB, DB + FPHM (10%) e DB + FPHc (10%). As farinhas foram incluídas na dieta basal pré-calculada de acordo com as necessidades de cada animal conforme as exigências de manutenção estabelecida pelo NRC (2006), (Tabela 2). A EM (kcal/kg) da DB foi estimada pelas equações propostas pelo NRC (2006) e a quantidade de alimento fornecida aos cães foi calculada de acordo com os requisitos de energia de manutenção para cães adultos [EM = 120 kcal × PC (kg)^{0,75} / d]. A quantidade de alimento foi dividida em duas porções iguais e fornecidas às 0900h e às 1700h. O consumo de água foi medido nos dias da coleta com auxílio de uma bureta, foi utilizado uma vasilha controle para as perdas por evaporação. Nos outros dias a água foi fornecida *ad libitum*.

Ensaio de digestibilidade. O ensaio foi conduzido segundo protocolo AAFCO (2008). Nove Beagle adultos, pesando 11,3 kg ± 1,60 kg, foram alojados em gaiolas metabólicas individuais para coleta total de fezes e urina, equipada com alimentadores e bebedouros, com temperatura ambiente média de 25°C, com ciclo luz/escuro de 14:10.

Delineamento experimental. O experimento foi realizado em delineamento de blocos ao acaso constituído por dois blocos de 10 dias, com três tratamentos e três cães por tratamento em cada bloco, totalizando seis repetições por tratamento. Cada período incluiu uma fase de adaptação de cinco dias (d 1 a d 5) seguido por uma fase de coleta total fezes e urina (d 6 a d 10). No início e no final de cada período de coleta foi fornecido, via oral, uma cápsula de gelatina contendo 1.000 mg de óxido de ferro (III)

Fe₂O₃, para separar os períodos. Os pesos corporais (PC) foram obtidos em d 1 e d 10.

Análises. Amostras de dietas, fezes e urina foram coletadas, pesadas e armazenadas em um congelador a - 22 °C. Durante a coleta de dados, o escore fecal foi mensurado de acordo com a seguinte escala: 1 = seco e duro; 2 = bem formado, não deixa marca quando apanhada; 3 = início úmido para perder forma, deixando uma marca definida quando retirada; 4 = a maioria, se não toda a forma é perdida, consistência fraca, viscosa e 5 = diarreia aquosa (Moxham, 2001). Além disso, foram retiradas alíquotas de fezes frescas durante os cinco dias de coleta para medir pH e amônia fecal. Para medir o pH foi usado pHmetro digital (Kasvi modelo K39-2014B, Paraná, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão de pH 7 e 10. A concentração de amoníaco foi determinada em 3 g de fezes frescas, que foram incubadas durante 1 h em Erlenmeyer de 500 mL com tampa, contendo 250 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionado à solução, 3 gotas de álcool octil (1-octanol) e 2 g de óxido de magnésio, Em seguida a solução foi destilada num aparelho macro-Kjeldahl e recuperada num Becker contendo 25 mL de ácido bórico. Finalmente, a amônia foi titulada, utilizando ácido sulfúrico padronizado a 0,1 N. A concentração de amônia fecal foi calculada como: amônia-N (g / kg) = N × raio de correção × 17 × (volume de ácido em branco) / amostra peso (g) (Felix et al., 2013). A concentração de amônia das fezes foi corrigida para MS fecal. Foram feitas contagem microbiana nas fezes e na DB pela mesma técnica de contagem de superfície.

Ao final das coletas de fezes, as amostras de fezes foram homogeneizadas e secas em estufa de ar forçado a 55 °C por 120 h e depois trituradas através de uma tela de 1 mm em um moinho Wiley (DE-LEO ® - Brasil) com uma peneira de 1 mm. A energia bruta (EB) de dietas e fezes foi determinada pela calorimetria de bomba isoperibólica (calorímetro, Modelo C2000 básico, Ika®-Werke, Staufen, Alemanha). As

dietas e fezes foram analisadas em sua MS (934.01), MO (920.36), MM (942.05), PB (954.01) (Modelo TE 036/2, Tecnal, Piracicaba, Brasil), FB (962.10) e EE em hidrólise ácida (954.02) (Modelo 170/3, Fanem, São Paulo, Brasil), de acordo com as recomendações da AOAC (950.02), (1995).

Durante a coleta, o volume total de urina foi medido com o auxílio de uma proveta e uma alíquota foi retirada diariamente para mensurar o pH da urina e densidade urinária. As amostras de urina restantes foram liofilizadas para análise de PB e EB seguindo os protocolos do AOAC (1995). Todas as análises foram realizadas em duplicata e repetidas quando a variação foi maior que 1% para energia e mais de 5% para outras análises.

Cálculo e análises estatísticas. A energia digestível (ED; kcal/kg) da FHPm e FPHc foram calculadas de acordo com a metodologia descrita por Adeola (2001). As médias dos dados foram analisadas por ANOVA, com auxílio do *software* MINITAB® 17.1.0 (2013) e as médias comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores de escores fecais foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Durante todo o experimento não foram observados casos de recusa do alimento e nem episódios de diarreia, êmese ou qualquer manifestação clínica relacionado à alteração trato gastrointestinal ou a outro sistema.

Foram realizadas cinco batidas no biodigestor para conseguir a massa de penas hidrolisadas suficiente para a confecção da farinha necessária para proceder com o teste *in vivo*. Cada batida foi seca em estufa e armazenada a $- 20\text{ }^{\circ}\text{C}$. No final todas as batidas foram misturadas para formar uma única farinha. O fator de degradação das penas foi

calculado e resultou em 45%.

As imagens da microscopia eletrônica revelaram diferenças entre as farinhas e a pena *in natura* (Figura 1). As colônias foram contadas nas placas que cresceram de maneira uniforme, a contagem de *Bacillus* spp. nas fezes identificou a capacidade das bactérias probióticas sobreviverem e resistirem as condições do trato gastrointestinal dos cães (Figura 2).

As análises das farinhas hidrolisadas revelam concentrações semelhantes de macronutrientes com maior concentração de matéria mineral na dieta hidrolisada por micro-organismos (Tabela 1). Os resultados calculados de PER estão apresentados na Figura 3 e foram realizados com a utilização da composição dos aa (Tabela 2). O perfil de aa das penas foi modificado pela fermentação (Tabela 2). O conteúdo de lisina e triptofano na FPHm é cerca de 100% maior em comparação a FPHc, mas os aa sulfurados foram reduzidos.

As dietas testadas foram isenergéticas e isonutritivas, exceto para a proteína que variou de acordo com a inclusão da farinha de penas (Tabela 3).

Ensaio de Digestibilidade. Durante o ensaio de digestibilidade, o peso corporal dos cães não foi alterado ($P > 0,05$). Os animais consumiram todas as refeições e não foram observadas sobras das dietas. O consumo de energia e dos nutrientes foi semelhante, exceto o consumo de proteína bruta que foi maior para os tratamentos com inclusão de FPHm e FPHc (Tabela 4). O consumo de água e as características urinárias, pH e densidade, não foram alteradas pela inclusão de 10% da FPHm e FPHc ($P > 0.05$). As características fecais como escore e pH fecal não foram alteradas pelas farinhas de penas processadas ($P > 0.05$) nos tratamentos testados. A produção total de fezes (fezes g/d) (Tabela 4) foram alteradas pela inclusão das farinhas, sendo maiores para o

tratamento FPHm. A concentração de amônia também foi afetada pela inclusão das farinhas e foi observando a maior concentração para a inclusão de 10% de FPHc ($P > 0,05$).

Os coeficientes de digestibilidade aparente da energia (AD) da FPHm e FPHc (Figura 2) foram diferentes ($P < 0,05$), a FPHc apresentou maior coeficiente (76%). Os valores da de ED foram 2.198 kcal/kg e 4.443 kcal/kg para FPHm e FPHc, respectivamente ($P < 0,05$) (Figura 4 e 5). Foi possível fazer contagem bacteriana de *Bacillus* spp. nas fezes dos animais que receberam FPHm, e foi possível observar maior presença dos *Bacillus* spp. nas fezes em relação aos demais tratamentos (Tabela 5).

DISCUSSÃO

Os testes *in vitro* evidenciaram excelente fator de degradação do micro-organismo sobre as penas e (Riffel e Brandelli, 2002; Riffel et al., 2003; Daroit, 2011; Maciel et al., 2016; Ferrareze et al., 2016). No entanto, quando a degradação foi realizada em maior escala o fator de degradação alcançado foi de 0.42 considerado baixo em relação a outros estudos que testaram a hidrólise *in vitro* (Ferrareze et al., 2016; Maciel et al., 2016.), desta forma a digestibilidade da farinha foi afetada.

Na análise de microscopia de varredura foi identificada a mudança estrutural da pena através da hidrólise, nas imagens aumentas 500x é possível verificar que as FPHm e FPHc sofreram a ação da hidrólise ficando evidente que a FPHc teve a estrutura bem mais afetadas que a FPHm.

O *Bacillus* spp. permaneceu presente na farinha após o processo de hidrólise. Durante o processo de secagem em que a umidade foi reduzida e a temperatura foi elevada até 65 °C deve ter induzido a esporulação do micro-organismo despertando o interesse pela capacidade probiótica desta cepa. A contagem das *Bacillus* spp. nas fezes

dos cães revelou que a FPHm foi carreadora dos *Bacillus* spp. que passaram pelo trato gastrointestinal dos animais e foram encontrados na forma viável dentro do conteúdo fecal, sendo então o hospedeiro atuante para o microrganismo (Casula e Cutting, 2002). Neste estudo foi verificado apenas a resistência do *Bacillus* spp. ao processo e ao sistema digestivo de cães, sabem que a eficácia de uma cepa probiótica é dependente de inúmeros fatores como: a dose administrada, período, método de aplicação do aditivo, frequência da alimentação com o probiótico e fatores de estresse ambiental (GUARNER et al., 2008).

Segundo Friedmam (1996), o PER estima o quanto da proteína ingerida poderá ser usada para o crescimento animal. Normalmente, um PER abaixo de 1.5, indica uma proteína de baixa qualidade, entre 1.5 e 2.0, uma proteína de qualidade média, e acima de 2.0, uma proteína de boa qualidade. O mesmo autor cita também que a qualidade das proteínas é uma medida do equilíbrio dos aa que são absorvidos e utilizados para o crescimento e outras funções e a digestibilidade é uma medida de hidrólise de proteína e absorção de aa liberados. Os valores de PER encontrados no estudo mostram que o perfil de aa das farinhas testadas e das penas *in natura* são de proteínas de boa qualidade (FPHm: 2.5, 2.8, 2.7; FPHc: 2.2, 2.7, 3.1; pena *in natura*: 2.0, 2.6, 2.7), porém essa medida não é única, é preciso levar em conta a digestibilidade da proteína.

Ao analisar as farinhas e comparar com as penas *in natura* foi possível visualizar que tanto a hidrólise com microrganismos quanto a hidrólise convencional foram capazes de modificar as concentrações de aa essenciais como lisina, metionina e triptofano, além de melhorar o perfil de tirosina, arginina e fenilalanina. Em estudo utilizando uma cepa queratinolítica (*Kocuria rósea*), incubada em penas, Bertsch & Coello, (2005) obtiverem resultados semelhantes e relataram que a biomassa bacteriana melhorou o conteúdo de aa essenciais como lisina (3,46%), histidina (0,94%) e

metionina (0,69%).

Neste estudo também foi possível identificar a redução da quantidade do aa cistina (Tabela 2), o pH não foi mensurado durante o processo, mas pode ter ocorrido alcalinização do meio o que favoreceu a redução da cistina, quando ocorre alcalinização do meio o aa se torna um ânion devido à doação do H^+ pelo grupamento NH_3^+ . Riffel et al. (2003) ao estudarem o cultivo de micro-organismos KR6 em penas observaram alcalinização do meio, mesmo quando a hidrólise ocorre em baixas temperaturas, o que pode ter contribuído para a perda de aa sulfurados.

O consumo de proteína pelos animais foi afetado devido a maior inclusão de proteína nas dietas com o acréscimo das FPHm ou FPHc. Não houve diferenças no consumo dos demais componentes dietéticos. Os menores coeficientes de digestibilidade da matéria orgânica proteína bruta e energia bruta foram verificados na dieta com FPHm. Murray et al. (1997) avaliando subprodutos de origem animal, processados ou não, como ingredientes de dietas para cães, consideraram a presença de penas um dos fatores que poderiam influenciar negativamente a digestibilidade de subprodutos de aves. Presume-se que a degradação por microrganismos não foi tão eficiente como o processo convencional. As ligações das pontes de dissulfeto da estrutura da queratina reduzem o aproveitamento da proteína. Admite-se que as ligações de dissulfeto da FPHm foram menos atingidas ocasionando a baixa solubilidade da FPHm dificultando a ação das enzimas digestivas dos cães (a pepsina e a tripsina). Estudos anteriores avaliaram a farinha de penas hidrolisadas de maneira convencional na alimentação de cães. Cavalari et al. (2006), verificaram que os coeficientes de digestibilidade aparente da EB, MS e da PB foram respectivamente 79.8, 76.0 e 82.3 %. Resultados de CAD semelhantes foram encontrados neste estudo com valores de EB: 86, MS: 79 e PB: 85. Pacheco et al. 2016, verificaram que a farinha de penas com

inclusão de enzimas no processo de hidrólise convencional com menor pressão e temperatura, resultou em melhora no CAD e CAM da energia bruta em relação a da farinha de penas sem enzimas (77, 66, 67,57), respectivamente e concluíram que o ingrediente processado com enzima pode ser considerado uma fonte de proteínas nas dietas para cães adultos. Estudos realizados com suínos utilizando farinha de penas hidrolisadas da maneira convencional apresentaram resultados de que a FPHc pode ser utilizada como um ingrediente proteico, os autores recomendam o uso deste ingrediente, principalmente quando suplementados com aa essenciais sintéticos (Chiba et al. 1995; Chiba et al. 1996; Divakala et al. 2008).

A umidade e o escore fecal não foram afetados pelos tratamentos, os resultados estão de acordo com a margem considerada ideal de escore segundo Moxham (2001) (BD: 2.8; FPHm: 2.8 e FPHc: 2.9). Estes resultados estão de acordo como os resultados de umidade e escore fecal para cães encontrados por Pacheco et al. (2016) que incluiu 7 e 15% de farinha de penas hidrolisadas nas dietas.

A produção de fezes (g/dia) foi afetada pela inclusão da FPHm (148.7), que diferiu do tratamento controle (119.6), mas não apresentou diferença em relação a FPHc (133.7) ($P < 0.05$). Pacheco et al. (2016), também encontraram resultados superiores para o grupo de animais que foram alimentados com 15% de farinha penas processadas de maneira convencional ou processadas com adição de enzimas e menor temperatura em relação a dieta basal (221.7, 208.6 e 180.0, respectivamente).

Em nosso estudo foi utilizado 10% de pena *in natura* para hidrólise, sendo possível verificar que a hidrólise com o *Bacillus subtilis*, nestas quantidades de penas, não foi eficiente. Em estudo com mesmo micro-organismo, Zaghoul et al. (2011) realizou a hidrólise em digestor com inclusão de 2% de penas e foi possível, em 48h, verificar a completa solubilização das penas. O valor de CAD para a FPHm (CAD:

40.0) encontrado em nosso estudo, demonstra que nas condições utilizadas os *Bacillus subtilis* não foram capazes de disponibilizar os nutrientes e energia das penas *in natura*, como o processo convencional. Malmann (2015), em estudo realizado com penas na alimentação de frangos de corte, observou que o menor coeficiente de digestibilidade ileal foi encontrado para as penas hidrolisadas pelos *Bacillus subtilis* comparado com a farinha de penas convencional. Em nosso estudo com cães foi encontrado o valor de 2.198 kcal de energia digestível, valor bem baixo quando comparado com o valor encontrado para FPHc, que foi de 4.443 kcal. Este baixo valor encontrado foi devido a baixa digestibilidade da FPHm.

Como esperado, o teor de amônia fecal foi afetado pela inclusão das farinhas de penas (FPHm e FPHc), o que pode indicar presença de uma maior quantidade de proteína não digerida no intestino dos animais. Quanto maior a quantidade de proteína indigestível que chega ao intestino grosso, maior é a sua disponibilidade para a microbiota (Hesta et al., 2003), o que conseqüentemente alterará as características fecais, principalmente a concentração de nitrogênio amoniacal nas fezes. Felix et al., 2013, relatam que a maior fermentação intestinal pode contribuir para valores de digestibilidade aparente semelhantes no trato total obtido para cães adultos e filhotes.

Implicações

O *Bacillus subtilis* é um agente queratinolítico que possui alta atividade *in vitro*, porém sua ação foi limitada quando aplicado no protótipo industrial. Dessa forma a degradação foi limitada, o que gerou uma FPHm pouco digestível embora tenham havido sinais da atuação do micro-organismo sobre o substrato, evidenciado pelo perfil aminoacídico e pela fotomicrografia. Além disso o *Bacillus subtilis* se mostrou resistente ao processamento e passou pelo trato gastrointestinal chegando viável nas

fezes, podendo ser capaz de modular a microbiota do animal e trazer benefício para a saúde. O estudo do valor probiótico desta cepa é relevante uma vez que ele cresce sob um substrato fácil de encontrar que são as penas. O melhoramento da técnica de hidrólise da farinha de penas pode ser uma forma de produzir um ingrediente rico e disponível que ainda poderá carrear micro-organismos que podem ter efeito probiótico.

LITERATURA CITADA

- ABPA. Brazilian Association of Animal Production. 2017. Relatório Anual. <http://abpa-br.com.br/> (Accessed 20 January 2018).
- Alsmeyer, R.H., Cunningham, A.E., Happich, M.L. 1974. Equations predict PER from amino acid analysis. *Food Technol.* 28:34–38
- American Association of Feed Control Officials (AAFCO), Official publication. 2008. Oxford, Ind: Association of American Feed Control Officials.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Bertsch, A.; Coello N. 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresource Technology*, Oxford, 96:1703-1708.
- Bielorai, R., B. Iosif, H. Neumark, E. Alumot. 1992. Nutritional Value of Feather-Meal Protein for Chicks. *J Nutr*, 112(2):249-254.
- Casula, G. and S. M. Cutting. 2002. *Bacillus* probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(5):2344-2352.
- Cavalari, A. P. M., J. L. Donzele, J. A. Viana, M. L. T. Abreu, A. L. S. Oliveira, L. S. Freitas, Pereira, A. C. Carciofi. 2006. Determinação do valor nutritivo de alimentos energéticos e proteicos utilizados em rações para cães adultos. *Rev. Bras. Zoot.* 35:1985-1991.
- Cedrola, S. M. L., A. C. N. de Melo, A. M. Mazotto, U. Lins, R. B. Zingali, A. S. Rosado, R. S. Peixoto, A. B. Vermelho. 2012. Keratinases and sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to recycle feather waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28:1259-1269.

- Chiba L.I., H.W. Ivey, K.A. Cummins, B.E. Gamble. 1996. Hydrolyzed feather meal as a source of amino acids for finisher pigs. *Animal Feed Science Technology*. 57:15-24.
- Chiba L.I., H.W. Iveyb, K.A. Cumminsa, B.E. Gambleb. 1995. Effects of hydrolyzed feather meal as a source of extra dietary nitrogen on growth performance and carcass traits of finisher pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 53:1-16
- DivakalaK. C., L. I. Chiba, R. B. Kamalakar, S. P. Rodning, E. G. Welles, K. A. Cummins, J. Swann, F. Cespedes and R. L. Payne. 2008. Amino acid supplementation of hydrolyzed feather meal diets for finisher pigs. *J ANIM SCI*, 87:1270-1281. doi:10.2527/jas.2008-1121.
- Elmayergi, H. H. and R. E. Smith, 1971. Influence of growth of *Streptomyces fradiae* on pepsin-HCl digestibility and methionine content of feather meal. *Canadian Journal Microbiology*, 17:1067 – 1072.
- Félix A.P., Zanatta C.P., Brito C.B.M., Sá Fortes C.M.L., Oliveira S. G., Maiorka A. 2013. Digestibility and metabolizable energy of raw soya manufactured with different processing treatments and fed to adult dogs and puppies. *J. Anim. Sci.* 91:2794-2801
- Ferrareze A. G., A. P. F. Correa, A. Brandelli. 2016. Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.7:102-109. doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.009
- Friedman M. 1996. Nutritional value of proteins from different food sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(1):06-29.
- Grazziotin, A., F.A. Pimentel, E.V. de Jong, A. Brandelli. 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:135–144.

- Hagen S., B. Frost, J. Augustin. 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino acids in food. *Journal of The Association of Official Analytical Chemists*. 72(6): 912-916.
- Harvey, R., Hall, E. 2009. Alergia/intolerância alimentar. *Veterinary Focus*, Descalvado, SP: Royal Canin, 19 (1): 36-41. <http://www.hillspet.com> (Accessed 25 January 2018).
- Hesta, M., G. P. J. Janssens, s. Millet, R. de Wilde. 2003. Fecal odor components in dogs: nondigestible oligosaccharides and resistant starch do not decrease fecal emission. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, Washington, v1, <http://www.jarvm.com/articles/Vol1Iss3/Hesta.htm> (Accessed 25 February 2018).
- Mallmann B. de A. 2015. Digestibilidade de aa de penas submetidos a diferentes processos em dietas de frango de corte. Dissertação mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 60p.
- Moxham G. 2001. Waltham feces scoring system –A tool for veterinarians and pet owners: How does your pet rate? *Waltham Focus*.11:24-25.
- Murray, S.M., A.R. Patil, G. C Fahey Jr., N. R. Merchen, D. M. Hughes. 1997. Raw and rendered animal by-products as ingredients in dog diets. *The Journal of Nutrition*, 1997. 75:2497–2505
- Nascente P. da S., M. O. Xavier, C. S. da Rosa, L.L. Souza, M.C. A. Meireles, J..R. de B. Mello. 2006. Hipersensibilidade Alimentar em Cães e Gatos. *Revista Clínica Veterinária*, 64:60-66.
- National Research Council. 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. National Academies Press. Washington, DC.

- Pacheco G. F. E., J. G. Pezzali, A. M. Kessler, L. Trevizan. 2016. Inclusion of exogenous enzymes to feathers during processing on the digestible energy content of feather meal for adult dogs. *R. Bras. Zootec.* 45(6):288-294.
- Riffel, A., F. Lucas, P. Heeb, A. Brandelli. 2003. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch. Microbiol.* 179:258–265.
- The European Pet Food Industry–FEDIAF, 2013. Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs. Brussels.
- White J., R. Hart, J. Fry. 1986. An Evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry* 8(4): 170-177.

Tabela 1. Composição química da farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* sp. (FPHm) e farinha de penas hidrolisada de maneira convencional (FPHc) na matéria seca (MS).

<i>Itens, %</i>	FPHm	FPHc
Matéria Seca	93,6	93,7
Proteína Bruta	90,0	88,8
Extrato Etéreo	6,80	8,30
Matéria Mineral	3,20	1,90
Energia Bruta, kcal/kg	5.505	5.868

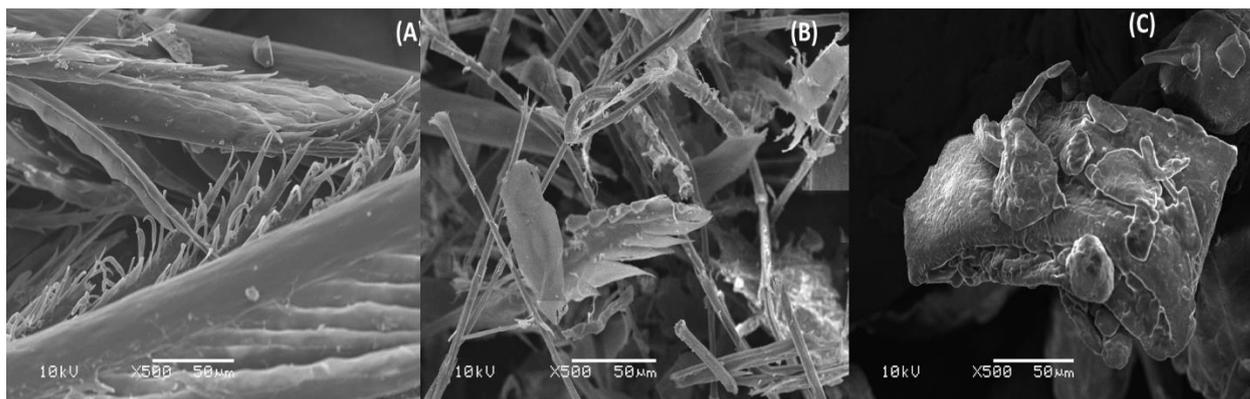


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura da pena *in natura* (A), farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* (B) e farinha de penas hidrolisada de maneira convencional (C).

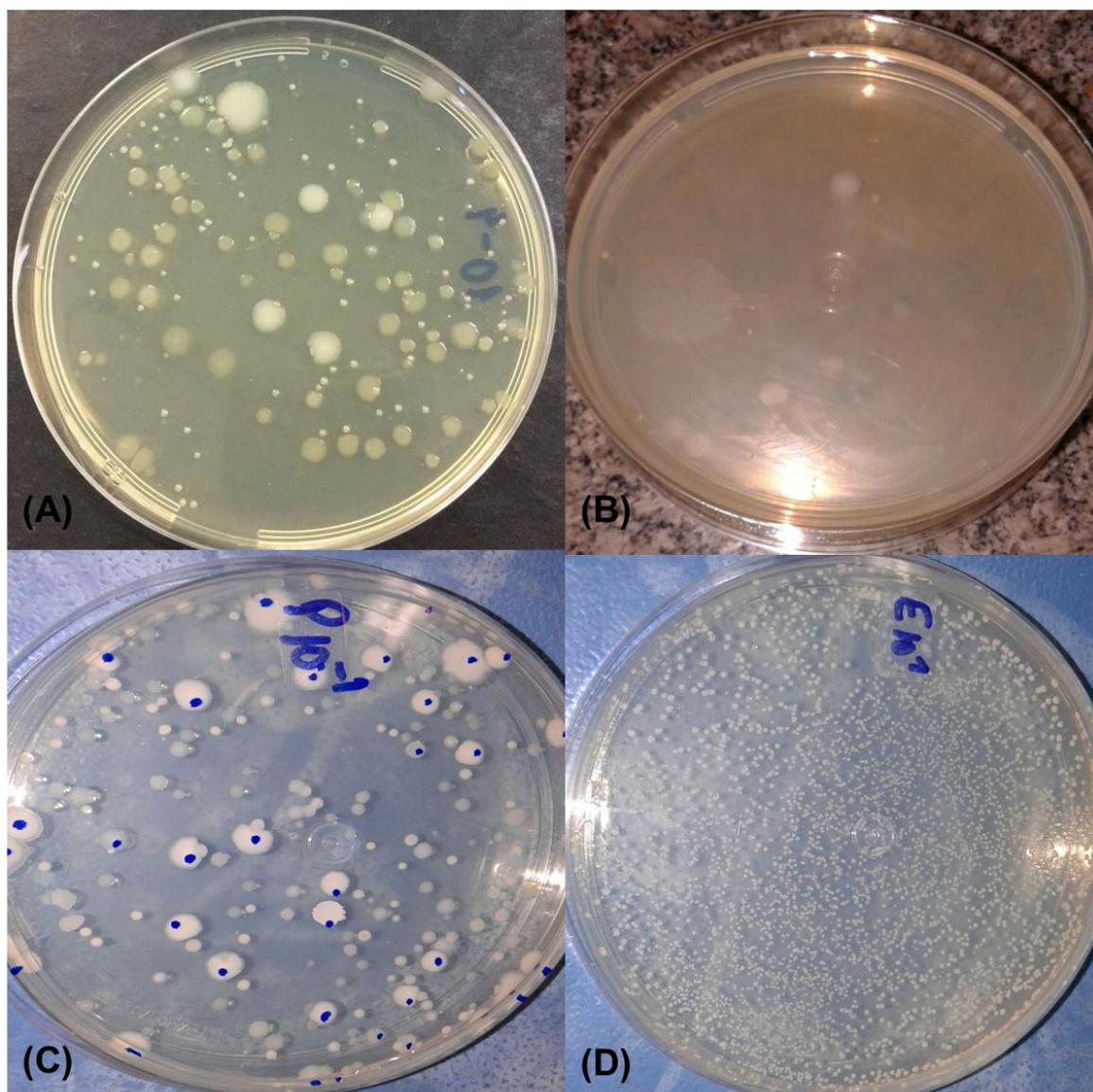


Figura 2. Placas de cultura com meio Agar Nutriente. (A) presença de colônias de *Bacillus* spp. ($5,9 \cdot 10^4$ UFC/g) na farinha de penas hidrolisadas por *Bacillus subtilis* (FPHm); (B) dieta basal sem a presença de *Bacillus* spp.; (C) presença de colônias de *Bacillus* spp nas fezes dos animais que consumiram FPHm; (D) ausência de colônias de *Bacillus* spp nas fezes de animais que consumiram sem FPHm.

Tabela 2. Perfil de aa (aa) farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* (FPHm) e farinha de penas hidrolisada de maneira convencional (FPHc) comparada a pena *in natura*.

aa ¹	FPHm	FPHc	Penas <i>in natura</i>
Ácido Aspártico	6.95	6.23	4.8
Ácido Glutâmico	10.8	9.06	7.4
Serina	10.2	10.9	17.2
Glicina	7.62	6.47	11.3
Histidina	0.85	0.41	0.00
Taurina	6.25	5.67	4.50
Arginina	3.93	3.99	4.70
Treonina	4.01	3.57	4.70
Alanina	8.44	9.87	11.1
Prolina	2.43	2.11	1.00
Tirosina	6.12	6.58	7.40
Valina	1.53	2.41	0.00
Metionina	3.38	8.11	6.70
Cistina	4.10	4.29	4.60
Isoleucina	7.31	6.98	7.00
Leucina	4.25	4.39	3.60
Fenilalanina	2.43	1.14	0.00
Lisina	0.40	0.19	0.00
Tritofano ³	90.9	92.4	96.0
Aa totais	88.3	84.1	95.5
Matéria seca	93.6	93.7	

¹ HPLC- Segundo White et al. (1986) e Hagen et al. (1989).

² Conforme apresentado por Arai et al. (1982).

³ Lucas & Sotelo (1980).

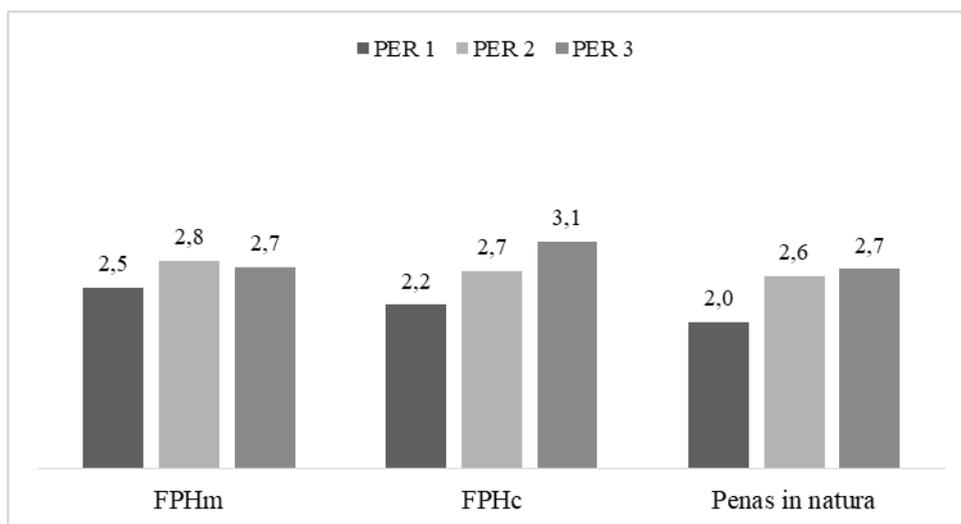


Figura 3. Protein Efficiency ratio (PER) calculado através das equações de Alsmeyer et al., (1974) (Equação 1: $PER = -0,684 + 0,456 (\text{leucina}) - 0,047 (\text{prolina})$); Equação 2: $PER = -0,468 + 0,454 (\text{leucina}) - 0,105 (\text{tirosina})$; Equação 3: $PER = -1,816 + 0,435 (\text{metionina}) + 0,780 (\text{leucina}) + 0,211 (\text{histidina}) - 0,944 (\text{tirosina})$).

Tabela 3. Ingredientes e composição química das dietas experimentais contendo 10 % farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* (FPHm) e 10% de farinha de penas hidrolisada de maneira convencional (FPHc).

	Tratamentos		
	BD ¹	BD + FPHM ²	BD+FPHC ³
Inclusão ingredientes %			
DB	100	100	100
FPHm	0	10	0
FPHc	0	0	10
Composição química analisada (%)			
Matéria Seca	96.7	96.4	96.4
Matéria Mineral	8.8	8.3	8.2
Proteína Bruta	27.1	32.7	32.6
Extrato Etéreo	13.0	12.4	12.6
Fibra Bruta	5.2	4.7	4.7
Energia Bruta, kcal/kg	4.866	4.924	4.956

¹Dieta Basal (DB) – Ingredientes para 1000 kg de dieta basal: grãos de arroz (244,8); farelo de arroz (229,2); milho (156,3); farinha de carne e ossos (130,2); farinha de aves por produto (125,0); farelo de trigo (104,2); cloreto de sódio (5,2); Prémix mineral / vitaminas (4,2) - Vitamina A. 7000 UI; Vitamina B1. 2 mg; Vitamina b12. 25 mcg; Vitamina B2. 4 mg; Vitamina B6. 2 mg; Vitamina D3. 600 UI; Vitamina E. 50 UI; Vitamina K3 1 mg; FolicAcid.0.2 mg; Ácido pantotênico. 10 mg; Biotina 0,03 mg; Niacina. 30 mg; Cobalto. 10 mg; Cobre. 7 mg; Ferro. 80 mg; Iodo. 1,5 mg; Manganês. 5 mg; Selênio. 0,2 mg; Zinco. 100 mg; Antioxidante (BHT). 150 mg; caramelo (0,5).

²DB + FPHm = dieta basal adicionada por cobertura 10% de farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis*;

³DB + FPHc= dieta basal adicionada por cobertura em 10% de Farinha de penas

hidrolisada de maneira convencional;

Tabela 4. Consumo de nutrientes, digestibilidade e características fecais e urinária para cães que consumiram dietas experimentais contendo 10 % farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* (FPHm) e 10% de farinha de penas hidrolisada de maneira convencional (FPHc).

Itens	Diets ¹			SEM ²	P-value ³
	BD	BD + FPHM	BD + FPHC		
Peso corporal. kg					
Inicial	11.4	11.2	11.2	0.429	0.984
Final	11.5	11.3	11.3		
Consumo diário. g/d					
MS	217.5	216.4	225.3	30.22	0.845
MO	198.5	197.8	206.2	27.6	0.828
PB	294.5 ^b	367.8 ^a	381.4 ^a	47.0	0.010
Consumo de água, mL/d	442.6	445	439.4	101.8	0.995
Consumo energia, kcal/d					
ED. kcal	913.0	917.6	998,2	138,9	0.471
EM. kcal	848.4	848.6	917.0	127.9	0.544
Digestibilidade Aparente, %					
MS	79.89	75.46	78.61	2.422	0.013
MO	84.09 ^a	78.72 ^b	82.48 ^a	1.957	0.001
PB	87.81 ^a	74.81 ^b	85.02 ^a	3.052	0.001
EE hidrolise ácida	89.37	87.13	87.73	2.745	0.366
Energia Bruta	83.96 ^a	79.61 ^b	83.09 ^a	1.907	0.005
Valor nutricional dieta, kcal/ kg					
ED kcal	4.085 ^b	4.107 ^b	4.321 ^a	96.07	0.001
EM estimada kcal ⁴	3.788 ^b	3.789 ^b	3.961 ^a	91.28	0.004
Características urinaria e fecal					
Total volume, mL/d	243.4	247.5	297.8	82.41	0.427
pH urinario	7.63	7.41	7.04	0.442	0.083
Densidade urinaria	1.033	1.028	1.033	0.005	0.204
Energia urina, kcal/d	7.88	7.07.	5.47	1.44	0.578
Escore fecal ⁵ , 1 a 5	2.86	2.82	2.90	0.06	0.725
pH fecal	6.64	6.78	6.84	0.390	0.672
Fecal MS, %	36.63	35.61	34.98	1.522	0.183
Fezes total	598.3 ^b	743.4 ^a	668.3 ^{ab}	89.72	0.041
Fezes g/d	119.65 ^b	148.68 ^a	133.67 ^{ab}	17.944	0.041
Fezes g/d (DM g/d)	43.56 ^b	52.87 ^a	46.83 ^{ab}	6.115	0.05
Amônia ⁶ , (DM g/kg)	2.090 ^b	2.658 ^{ab}	3.377 ^a	0.850	0.045

¹DB = dieta basal; DB + FPHm = dieta basal adicionada por cobertura em 10% de Farinha de penas hidrolisada po *Bacillus subtilis*; DB + FPHc= dieta basal adicionada por cobertura em 10% de Farinha de penas hidrolisada de maneira convencional;

²SEM – erro padrão, n = 6 animais por dieta.

³Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

⁴EM estimada de acordo com FEDIAF (2013).

⁵Escore fecal (Moxham. 2001). Não significativo pelo teste Kruskal-Wallis.

⁶ Amônia-N (g/kg) = $N \times \text{correction factor} \times 17 \times (\text{volume of acid} - \text{blank}) / \text{sample weight (g)}$.

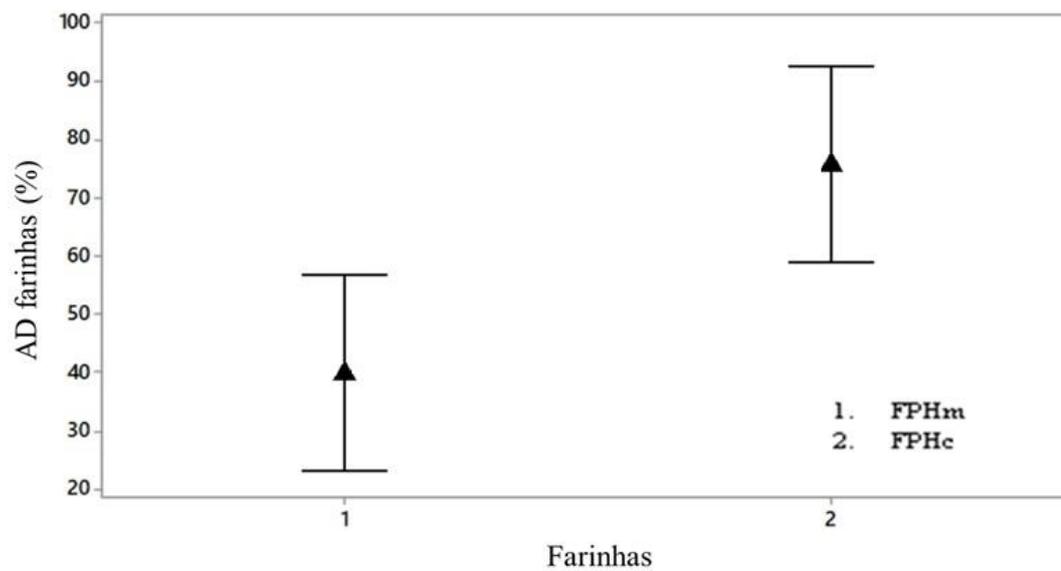


Figura 4. Valores da digestibilidade aparente da energia da FPHm e FPHc (FPHm: 40,0; FPHc: 76,0, $P < 0,05$). Médias diferentes pelo teste de Tukey 5%.

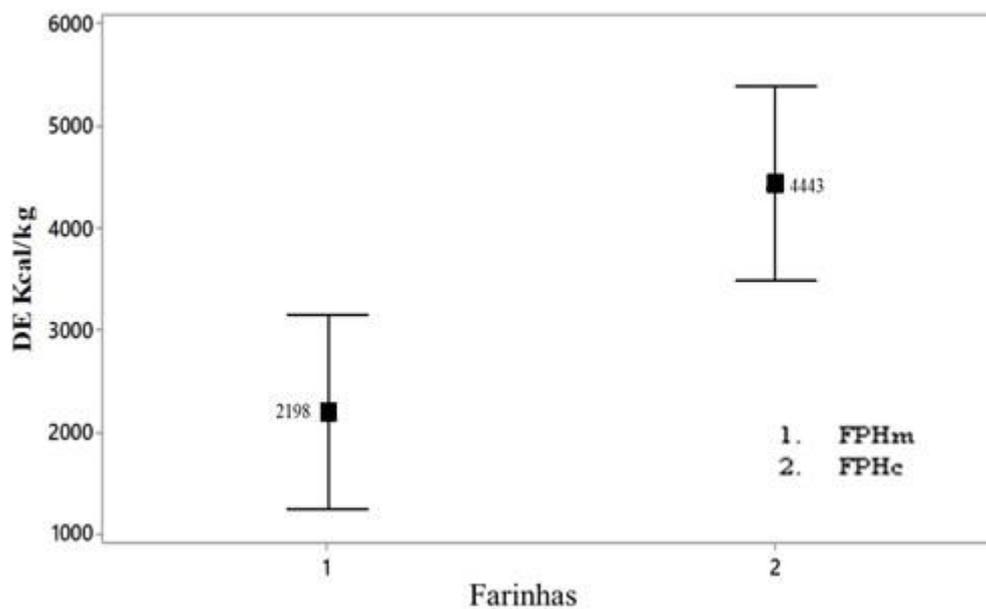


Figura 5. Valores da de Energia Digestível para a FPHM e FPHC em cães adultos. (FPHM: 2198 kcal/kg; FPHC: 4443 kcal/kg; $P < 0,05$). Médias diferentes pelo teste de Tukey 5%.

Tabela 5. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC / g) na dieta basal (DB), dietas contendo 10% de farinha de penas hidrolisadas por *Bacillus subtilis* (FPHm), 10% de farinha de penas hidrolisada de maneira convencional (FPHe) e fezes dos cães que consumiram as dietas.

<i>Alimento</i>	
	UFC/g
BD	<10
FPHc	<10
FPHm	$5,9.10^4$
<i>Fezes</i>	
Cães receberam FPHm	
A ²	$11,9.10^4$
B ²	$10,9.10^5$
C ²	$17,6.10^5$
D ²	$5,3.10^6$
E ²	$17,1.10^6$
F ²	<10
Cães que receberam FPHc ¹	<10
Cães que receberam DB ¹	<10

¹Total para o grupo teste com 6 animais

²Representa cada animal

CAPÍTULO IV⁵

⁵Artigo escrito conforme as normas da revista *Journal Animal Science*

Running head: Palatability of feather meal diets for adult dogs

**Palatabilidade de farinha de penas hidrolisada por micro-organismos em deitas
para cães e adultos⁶**

**G. S. Machado,* L. M. Vilella,* C. Ongaratto,* A.P. F. Correa, *A. Brandelli,*and
L. Trevizan*⁷**

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil,

91540-000

RESUMO

⁶The authors thank the financial support provided by CNPq (Brasília, Brazil).

⁷Corresponding author: ltrevizan@ufrgs.br

A avaliação da palatabilidade é fundamental para a indústria de alimentos destinada aos animais de estimação. Durante o desenvolvimento de novos ingredientes a avaliação do produto final se torna necessária, especialmente se o ingrediente é pouco convencional como a farinha de penas processada de forma alternativa. O objetivo deste estudo foi comparar a palatabilidade da farinha de penas convencional (FPHc) com a farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* sp. (FPHm), acrescentadas sobre dietas secas para cães adultos. O teste foi conduzido segundo metodologia “two-pan”, descrita por Griffin (2003). Foram utilizados 12 Beagle adultos, saudáveis, sendo observados por 5 dias, em duas alimentações diárias, totalizando 48 observações. As farinhas de penas foram adicionadas sobre a dieta comercial (DC), no nível de 10%, por cobertura, no momento da alimentação. A primeira escolha (PE) e razão de ingestão (RI) dos alimentos foram observadas. As farinhas foram caracterizadas pela composição de macronutrientes, pelas aminas bioativas e aminogramas. Os animais foram pesados no início e no final do período experimental. Os resultados do teste PE foram analisados pelo teste qui-quadrado ($P < 0,01$) e a RI pelo teste t ($P < 0,05$). Os cães despertaram grande interesse pelo acréscimo das farinhas de penas nas dietas e ganharam peso nos cinco dias de teste ($P < 0,05$). A FPHm influenciou positivamente o consumo da dieta e a primeira escolha ($P < 0,05$). Na FPHm foi observada a presença de duas aminas bioativas: espermidina e feniletilamina, além de maior concentração dos aa: lisina, histidina e alanina, em comparação a FPHc. A FPHm demonstrou ser preferida pelos animais. Sugerimos que as aminas bioativas e o perfil aminoacídico modificado pela fermentação possam ter influenciado a escolha feita pelos cães.

Palavras chaves: petfood, aminas bioativas, olfato, preferência alimentar.

INTRODUÇÃO

O advento das inovações tecnológicas e a utilização de alimentos não convencionais na alimentação de cães podem impactar na palatabilidade, o que muitas vezes prejudica a ingestão adequada de um alimento ou mesmo limita a inclusão de um ingrediente. A palatabilidade se estabelece como um fator importante no desenvolvimento de alimentos podendo ser definida como propriedades físicas e químicas da dieta que permitem condicionar o comportamento de aceitação ou recusa do alimento por parte do animal (Araújo & Milgram, 2004; NRC, 2006). A percepção da palatabilidade do alimento pelos cães ocorre a partir da interação do olfato, sabor e textura, porém o fator determinante na primeira escolha do animal é o odor do alimento. Cães possuem aproximadamente 1.700 papilas gustativas (Levesque, 1997), apesar disso, cães não possuem papilas gustativas para sabores salgados, entretanto, possuem papilas gustativas muito bem desenvolvidas para sabores doces, o que explica sua preferência pelo açúcar (Haupt et al., 1978; Haupt & Smith, 1981; Bradshaw, 1991; Horowitz et al., 2013). Porém, por serem carnívoros, as unidades sensíveis aos aa também estão presentes, sendo mais sensíveis aos aa considerados “doces” como L-prolina, L-cisteína, L-ornitina, L-lisina, L-histidina e L-alanina (Bradshaw, 1991; Bradshaw, 2006).

Há vários hidrolisados de origem animal disponíveis no mercado, que são obtidos por hidrólise enzimática e são utilizados como eficientes palatilizantes em dietas para cães. São ingredientes líquidos ou em pó que possibilitam o aumento significativo da palatabilidade e consumo do alimento.

Além dos palatilizantes o acréscimo de ingredientes que reforcem a palatabilidade do produto, é necessário. Dessa forma, alguns ingredientes além de possuírem capacidade nutritiva agregam valor a dieta pela atratividade que causam ao

produto final.

A farinha de penas é um ingrediente fácil de encontrar, rico em proteína, porém com baixa disponibilidade de aa digestíveis. A disponibilidade pode aumentar de acordo com a hidrólise à qual as penas são submetidas. O método utilizando de alta pressão e calor é o mais utilizado, mas ainda existem as enzimas exógenas e os micro-organismos. Vários estudos de hidrólise de penas com micro-organismos mostraram alteração no perfil proteico e de aa (Riffel & Brandelli, 2002; Riffel et al., 2003; Odetallah et al., 2005; Gupta & Ramnani, 2006; Grazziotin et al., 2006; Prakash et al., 2010; Maciel et al., 2016; Rieger et al., 2017; Kshetri et al., 2017), porém nenhum estudo verificou o potencial palatilizante destes hidrolisados, uma vez que possuem aa livres e pequenos peptídeos.

Outro ponto importante é a crescente preocupação com a sustentabilidade e o meio ambiente, aliado ao surgimento de novas tecnologias na conversão desses coprodutos em matéria prima, têm motivado o estudo de micro-organismos queratinolíticos, agregando ao coproduto valor econômico e beneficiando ambiental. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações presentes nas penas de frango hidrolisadas por *Bacillus subtilis* e o seu efeito sobre a palatabilidade de dietas destinada a cães adultos e comparar com a farinha de penas processada de maneira convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

O teste de preferência alimentar foi conduzido no Laboratório de Ensino Zootécnico da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Doze cães, pesando $11,5 \pm 1,72$, foram utilizados para avaliar a palatabilidade da farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis*, cepa *FTC01* (FPHm) em comparação a farinha de penas convencional (FPC) adicionados sobre uma dieta comercial (DC). Durante o período experimental, os

cães foram alojados em sala ambientalmente controlada a 25 °C a noite e durante o dia permaneceram em pátio externo. Os cães permaneceram nas gaiolas metabólicas de aço inoxidável no período da alimentação. As gaiolas foram equipadas com comedouros e bebedouros. A água foi fornecida *ad libitum* ao longo do período experimental.

Farinha de penas hidrolisadas por *Bacillus subtilis* (FPHm), farinha de penas convencional (FPHc). A FPHm foi produzida no Laboratório de Ensino Zootécnico (LEZO) da UFRGS. As cepas utilizadas no estudo foram multiplicadas para formar o pré inóculo: meio caldo *brain heart infusion* (BHI) em que foram adicionadas alçadas com *Bacillus subtilis* cepa *FTC01*, incubado por 24 h em um incubador com agitação de 120 rpm e 37 °C. Após, o pré inóculo foi adicionado a um meio caldo (composição: 0,5 g/L NaCl, 0,3 g/L K₂HPO₄, 0,4 g/L KH₂PO₄) com a adição de penas (10%), e incubadas em biodigestor com agitação a 70 rpm à 37 °C, por 120 h. Em seguida o conteúdo foi colocado em vasilhas de plástico e seco em estufa de ar forçado à 55 °C por 72 h. O conteúdo seco foi moído através de uma tela de 1-mm em moinho tipo Wiley (DE-LEO ® - Brasil).

A FPHc foi produzida de forma convencional pela empresa Kabsa Exportadora S.A. (Porto Alegre, RS, Brasil). As penas ao chegar na empresa são descarregadas na moega para retiradas de impurezas visíveis. Posteriormente, as penas passam pela prensa pena, responsável pela retirada da umidade da matéria prima, sendo em seguida encaminhadas ao hidrolisador contínuo, onde ocorre a hidrólise/cozimento, durante um tempo mínimo de 15 a 20 minutos, contado a partir do momento que o equipamento atinge a temperatura de entrada entre 100°C a 170°C (3 atm) e a temperatura de saída entre 100°C a 170°C. Após a descarga do hidrolisador contínuo, o produto segue para o ciclone, que descarrega o produto dentro do secador contínuo, onde ocorre a secagem da

matéria prima, durante um tempo mínimo de 30 minutos, contado a partir do momento que o equipamento atinge a temperatura de entrada máxima 110°C e a temperatura de saída de 50°C a 110°C. Ao sair do secador contínuo, a farinha é encaminhada para a peneira pré-separadora, que é responsável pela separação de corpos estranhos que por ventura possam estar presentes. Após, a farinha passa pelo moinho e pela peneira rotativa. Finalmente a farinha passa pelo elevador e vai para o silo, para ser ensacada.

As farinhas de penas foram analisadas para a matéria seca (MS) (934.01), matéria orgânica (MO) (920.36), matéria mineral (942.05), proteína bruta (PB) (954.01) (Model TE 036/2, Tecnal, Piracicaba, Brazil), fibra bruta (FB) (962.10) e extrato etéreo (EE) (954.02) (Model 170/3, Fanem, São Paulo, Brazil), como descrito na Association of Official Analytical Chemists - AOAC (950.02), (1995) (Tabela 1). Foi realizada a determinação do perfil de aa em cada farinha por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) seguindo a metodologia de White Ja et al., 1986 and Hagen et al., 1989. A análise de triptofano seguiu o método enzimático descrito por Bernardo & Sotelo (1980).

A determinação de aminas biogênicas foi feita por cromatografia líquida de alta performance (HPLC, Shimadzu modelo LC-10AD, Kyoto, Japão) por par iônico, derivação pós-coluna com o-ftalaldeido e detecção fluorimétrica, seguindo a metodologia descrita por Vale & Gloria (1997).

Dieta comercial. A dieta comercial utilizada foi produzida no mesmo lote, contendo todos os nutrientes necessários para cães adultos e foi utilizada como base para a aplicação dos tratamentos. A necessidade dietética de cada animal foi calculada segundo NRC (2006) e foi adicionado 10% das farinhas de penas a serem testadas sobre as dietas (Tabela 1).

Design experimental. A palatabilidade foi determinada pelo método de escolha

"2-pan" descrito por Griffin (2003). As 3 comparações foram feitas para avaliar a preferência das dietas: DB vs. FPHc 10%; DB% vs. FPHM 10%; e FPHc 10% vs. FPHM 10% em um delineamento de blocos ao acaso completo, com 3 comparações, 2 blocos (períodos) e 4 refeições, totalizando 48 observações para cada comparação de dietas.

Durante a fase de teste, os animais foram pesados no início e no final da fase. A alimentação foi realizada da seguinte maneira: às 8 h, 350 g das dietas foram oferecidas lado a lado, simultaneamente, em comedouros idênticos, durante 20 minutos (Figura 1). Após esse período, os cães ficaram no pátio com gramado. Às 17h, os animais foram colocados de volta em suas gaiolas metabólicas, onde ficaram até a manhã seguinte, e foram alimentados com 350 g de cada dieta teste. As sobras foram coletadas, pesadas e depois descartadas. Os alimentadores foram alternados para cada refeição para eliminar qualquer efeito de lateralização. A primeira escolha (PE) e a relação de consumo (IR) foram observadas. O PE é o número de vezes que uma dieta foi escolhida em primeiro lugar, e foi observada sempre quando a comida foi oferecida aos cães. O IR foi calculado com base na proporção de consumo de acordo com Griffin (2003):

$$IR = \frac{\text{consumo da primeira dieta comparada, g}}{\text{consumo total das duas dietas comparadas, g}}$$

Análises químicas. O conteúdo energia bruta (GE) das dietas foi determinado pela calorimetria de bomba isoperibólica (calorímetro, Modelo C2000 básico, Ika®-Werke, Staufen, Alemanha). As dietas foram analisadas na matéria seca (MS) (934.01), matéria orgânica (MO) (920.36), matéria mineral (MM) (942.05), proteína bruta (PB) (954.01) (Modelo TE 036/2, Tecnal, Piracicaba, Brasil), fibra bruta (FB) (962.10) e gordura hidrólise ácida (EE) (954.02) (Modelo 170/3, Fanem, São Paulo, Brasil),

conforme descrito na AOAC (950.02), (1995). Todas as análises foram realizadas em duplicado e assumido o erro padrão entre repetições de menos de 5% para todos os métodos e menos de 1% para a energia.

Análise estatística. Os pesos dos animais no início e final do teste foram comparados através do teste t pareado ($P < 0,05$). Os resultados do teste de preferência foram submetidos ao teste t ($P < 0,05$) para determinar se o IR diferiu em $P < 0,05$ e o PE foi analisado pelo teste qui-quadrado ($P < 0,01$) usando o pacote estatístico MINITAB® 17.1.0 (2013). Como o número de cães utilizados neste teste, os valores de PE e IR maiores que 0,80 foram considerados relevantes para determinar se uma dieta foi preferida a outra de acordo com o método descrito por Griffin (2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais ganharam peso durante o teste de palatabilidade. O peso médio inicial foi de $11,5 \pm 1,72$ e final de $12,9 \pm 1,80$ ($P < 0,05$). Segundo Araújo & Milgram (2004), o teste de “two-pan”, não controla os efeitos do excesso dos alimentos e pode não ser útil para a análise de palatabilidade a longo prazo. De fato, o teste de palatabilidade revelou que o acréscimo das farinhas de penas permitiu que os cães ingerissem maiores quantidades de alimento, fato que reforça a palatabilidade proporcionada pelo acréscimo das penas sobre as dietas.

O consumo de alimento relativo entre as dietas demonstrou que os animais consumiram diferentes quantidades de cada dieta experimental ($P < 0,05$). Foram observadas diferenças significativas para todas as comparações em que a FPHm estava sendo comparada. No teste de primeira escolha, os cães foram capazes de diferenciar as dietas quando duas delas foram apresentadas simultaneamente ($P < 0,05$), indicando que a presença de FPHm em 10 % tornou a dieta muito mais atraente para os cães (Tabela

2).

Coprodutos que passam por processos de degradação proteica com origem microbiológica geram aminas biogênicas, substâncias altamente voláteis que conferem odor facilmente perceptível pelos cães (Bellaver, 2005). Ao analisar as aminas bioativas das FPHm e FPHc, verificamos presença de diferentes aminas na FPHm (tiramina, putrescina, cadaverina, espermidina e feniletilamina), enquanto que a FPHc apresentou maior concentração de aminas, porém de menor diversidade (tiramina, putrescina e cadaverina), oriundas do processo de putrefação do alimento. A maior diversidade em relação as aminas ativas da FPHm podem ter influenciado na palatabilidade e estimulado o maior consumo devido a presença das aminas (espermidina e feniletilamina).

A percepção da palatabilidade do alimento pelos cães ocorre a partir da interação de três mecanismos sensoriais principais: odor, sabor e textura (Kitchell, 1978). É sabido que o fator determinante na primeira escolha do animal é o odor do alimento, mas existe um conhecimento limitado sobre os odores que estimulam a palatabilidade em cães. Chen et al. (2016), correlacionou os resultados de preferência alimentar de 8 cães com análise química (micro extração em fase sólida e cromatografia de massa) identificados 53 compostos de aroma dos palatáveis de alimentos de cães, destes isolou três: benzaldeído, vanilina e 2,5-dimetilpirazina e testou a influencia na palatabilidade. Concluiu que são compostos aromáticos necessários e que a manipulação desses compostos melhora potencialmente a palatabilidade dos alimentos secos para cães. Segundo Hall et al., (2017), ainda não está claro como as preferências por odores influenciam as preferências alimentares caninas. Os mesmos autores em estudo com cães relatam que os animais selecionaram seus alimentos durante a fase de amostragem e que a seleção do produto foi provavelmente baseada em odor ou

informações potencialmente visuais já que na maior parte das vezes (89%) os cães consumiram mais do alimento que foi escolhido primeiro. Estes resultados corroboram com os encontrados em nosso estudo, a primeira escolha foi o alimento mais consumido. Não foi encontrado na literatura estudos relacionando a presença de aminos bioativas e a influência na palatabilidade para cães, porém é sabido que a feniletilamina está relacionada com feromônios (Liebowitz. & Klein, 1979) e é utilizada como fármaco adrenérgico, mas não apresenta atividade estimulante do sistema nervoso central (Cordellini & Gallacci, 2014), mas pode-se observar que na farinha preferida pelos cães este componente estava presente e pode ser umas das causas do estímulo ao consumo.

Na FPHc, as aminos bioativas que denotam estado avançado de deterioração do alimento, como a putrescina, cadaverina, histamina e tiramina somam cerca de 50 mg/kg de aminos biovoláteis, valores que indicam estágio de deterioração do alimento de acordo com o índice de qualidade química, proposto por Veciana-Nogués et al. (1997). Nas farinhas testadas, FPHm e FPHc, ao realizarmos a soma das aminos, ambas estão acima das 50 mg/kg (90,53 e 285,12 mg/kg, respectivamente) porém a FPHc possui bem mais aminos bioativas, demonstrando maior deterioração do que a FPHm. Essa maior quantidade de aminos pode te influenciado negativamente na hora da escolha das dietas.

Os aa também influenciam positivamente a palatabilidade. Segundo Bradshaw (2006), dentre as papilas gustativas, é observada uma predominância de unidades sensíveis aos aa caracterizados como doces por humanos, L-prolina, L- cisteína, L- ornitina, L-Lisina, L-histidina e L-alanina. Ao observar os aminogramas (Tabela 4) a FPHm apresenta maior presença de lisina, histidina e alanina, o que também pode ter influenciado na preferência alimentar dos animais, pois os cães respondem a um amplo

espectro de substâncias doces, e estes aa estão neste espectro. Esses valores maiores provavelmente são provenientes da biomassa dos micro-organismos que hidrolisaram as penas, e estudos realizados por alguns pesquisadores relatam que a biomassa favorece o aumento de aa e melhoram o valor nutricional do hidrolisado (Maciel et al., 2016; Rieger et al., 2017; Kshetri et al., 2017).

Implicações

Este estudo serviu como piloto para determinar a influência de hidrolisados de penas sobre a palatabilidade. Foi possível verificar que a FPHm influenciou positivamente a palatabilidade ($P < 0,05$), porém não foi possível estabelecer os fatores que proporcionaram esta preferência. Acredita-se que a associação da presença de aminos bioativas espermidina e feniletilamina com a maior quantidade dos aa, preferido por cães, lisina, histidina e alanina tenham influenciado a primeira escolha e o consumo pelos animais.

LITERATURA CITADA

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem.,
Arlington, VA
- Araujo J.A, C.M. Studzinski, B.T. Larson, N. W. Milgram. 2004a. Comparison of the
cognitive palatability assessment protocol and the two-pan test for use in assessing
palatability of two similar foods in dogs. *Am J Vet Res.* 65(11):1490–1496.
- Araujo, J. A. & N. W. Milgram. 2004b. A novel cognitive palatability assessment
protocol for dogs. *Journal of Animal Science*, 82(7): 2200-2206.
- Bellaver C., 2005. Limitações e vantagens do uso de farinhas de origem animal na
alimentação de suínos e de aves. Anais 2º Simpósio Brasileiro Alltech da Indústria
de Alimentação Animal. Curitiba, Paraná.
- Bernardo L. & Sotelo A., 1980. Effect of alkalies, temperature and hydrolysis times on
tryptophan determination of pure proteins and of food. *Analytical Biochemistry.*
109:192-197.
- Bradshaw JW. 1991. Sensory and experiential factors in the design of foods for
domestic dogs and cats. *Proc Nutr Soc.* 50(1):99–106
- Bradshaw JW. 2006. The evolutionary basis for the feeding behavior of domestic dogs
(*Canis familiaris*) and cats (*Felis catus*). *J Nutr.* 136(7 Suppl):1927–1931.
- Carciofi, A.C. 2008. Uma Visão Industrial. IV Curso Teórico-Prático sobre Nutrição de
Cães e Gatos, FCAV/Unesp Jaboticabal, 79.
- Chen M, Chen X, Nsor-Atindana J, Masamba KG, Ma J, Zhong F. 2016. Opti-mization
of key aroma compounds for dog food attractant. *Anim Feed Sci Technol.*
225:173–181.
- Cordellini S. & Gallacci M. 2014. Fármacos Adrenérgicos e Antiadrenérgicos. In:
Delucia, R. et al. (Ed.). *Farmacologia integrada.* 5.ed. Rio de Janeiro, Revinter.

211-224.

- Felix, A.P.; Oliveira, S.G.; Maiorka, 2010. A. Fatores que interferem no consumo de alimentos em cães e gatos. In: Vieira, S. Consumo e preferência alimentar de animais domésticos. 1 ed. Brasil: Londrina. 3:162-199.
- Grazziotin, A., F.A. Pimentel, E.V. de Jong, A. Brandelli. 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:135–144.
- Griffin, R.W. 2003. Palatability Testing: parameters and analyses test conclusions. In: Kvamme, J.L.; Phillips, T.D. *Petfood technology*. Illinois. Watt Publishing Company. 187-193.
- Gupta, R., Ramnani, P., 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 70:21–33.
- Hagen S., B. Frost, J. Augustin. 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino acids in food. *Journal of The Association of Official Analytical Chemists.* 72(6): 912-916.
- Hall N. J., F. Péron, S. Cambou, L. Callejon and C. D.L. Wynne. 2017. Food and Food-Odor Preferences in Dogs: A Pilot Study Chemical Senses. 00: 1–10.
doi:10.1093/chemse/bjx016
- Horowitz A, Hecht J, Dedrick A. 2013. Smelling more or less: Investigating the olfactory experience of the domestic dog. *Learn Motiv.* 44:207–217.
- Haupt K, Hintz HF, Shepherd P. 1978. The role of olfaction in canine food preferences. *Chem Senses.* 3:281–290.
- Haupt KA, Smith SL. 1981. Taste preferences and their relation to obesity in dogs and cats. *Can Vet J.* 22(4):77–85.

- Kitchell, R.L. 1978. Taste perception and discrimination by the dog. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 22:287–314.
- Kshetri P., Roy S. S., Sharma S. K., Singh T.S., Ansari M. A., Prakash N. Ngachan S. V. 2017. Transforming chicken feather waste into feather protein hydrolysate using a newly isolated multifaceted keratinolytic bacterium *chryseobacterium sediminis* RCM-SSR-7. *Waste Biomass Valor.* doi:10.1007/s12649-017-0037-4.
- Levesque, A. 1997. La gestation chez le chien et le chat. *Le Point Vétérinaire.* 28:45-53.
- Liebowitz, M. R. & Klein D.F. 1979. Hysteroid dysphoria, *Psychiatric Clinic of North America.* 2:555-575.
- Maciel J. L., Werlang P. O., Daroit D. J. Brandelli A. 2016. Characterization of Protein-Rich Hydrolysates Produced Through Microbial Conversion of Waste Feathers. *Waste Biomass Valor.* doi:10.1007/s12649-016-9694-y
- National Research Council. 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. National Academies Press. Washington, DC.
- Odetallah, N.H.; Wang J.J.; Garlich, J.D.; Shih J.C.H. 2005. Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance. *Poultry Science.* 84: 858-864.
- Prakash, P.; Jayalakshmi, S. K.; Sreeramulu, K. 2010. Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2: partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goatskin. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* doi:10.1007/s12010-009-8702-0.
- Rieger T. J., De Oliveira C. T., Pereira J. Q., Brandelli A.; Daroit D. J. 2017. Proteolytic system of *Bacillus* sp. CL18 is capable of extensive feather degradation and

hydrolysis of diverse protein substrates. *British Poultry Science*. doi:

10.1080/00071668.2017.1293229

- Riffel, A., F. Lucas, P. Heeb, A. Brandelli. 2003. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch. Microbiol.* 179:258–265.
- Riffel, A.; Brandelli, A. 2002. Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, 29(5):255-258.
- Vale, S.R.; Glória, M.B.A. 1997. Methodology for the determination of biogenic amines in cheese. *J. AOAC Int.* 80(5): 1006-1012.
- Veciana-Nogués, M.T., A. Marine-Font, M.C. Vidal-Carou. 1997. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *J. Agric. Food Chem.*45:2036-2041.
- White J., R. Hart, J. Fry. 1986. An Evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry* 8(4): 170-177.

Tabela 1. Composição química das farinhas de penas experimentais: farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* (FPHm) e farinha de penas convencional (FPHc). Ingredientes e composição química da dieta comercial basal (DB) e dietas contendo 10% FPHm e 10% FPHc.

	Tratamentos				
	DC ¹	FPHm ²	DC + FPHm ³	FPHc ²	DC+FPHc ⁴
Dieta basal ¹ (%)	100		90		90
FPHm (%)	0		10		0
FPHc (%)	0		0		10
Analyzed chemical composition, %					
MS	96.7	93.6	96.4	93.7	96.4
MM	8.80	3.20	8.30	1.90	8.2
PB	27.1	90.0	32.7	88.8	32.6
EE	13.0	6.80	12.4	8.30	12.6
FB	5.2	0.00	4.7	0.00	4.7
EB, kcal/kg	4,866	5,505	4,924	5,868	4,956

¹Dieta comercial (DC) - Ingredients of 1000 kg basal diet: rice (244.8); full fat rice bran (229.2); corn (156.3); meat and bone meal (130.2); poultry viscera meal (125.0); wheat bran (104.2); sodium chloride (5.2); premix minerals and vitamins (4.2) - Vitamin A, 7000 IU; Vitamin B1, 2 mg; Vitamin B12, 25 mcg; Vitamin B2, 4 mg; Vitamin B6, 2 mg; Vitamin D3, 600 IU; Vitamin E, 50 IU; Vitamin K3, 1 mg; Folic Acid, 0.2 mg; Pantothenic Acid, 10 mg; Biotin, 0.03 mg; Niacin, 30 mg; Cobalt, 10 mg; Copper, 7 mg; Iron, 80 mg; Iodine, 1.5 mg; Manganese, 5 mg; Selenium, 0.2 mg; Zinc, 100 mg; Antioxidant (BHT), 150 mg; yucca (0.3); caramel dye (0.5).

² Values in dry matter;

³DC + FPHm = basal diet added 10% feather meal hydrolyzed by *Bacillus subtilis* sp. (FPHm);

⁴DC + FPHc = basal diet added 10% conventional feather meal (FPHc);



Figura 1. Animal recebendo alimentação simultaneamente com duas dietas experimentais. Dieta comercial adicionada de 10% FPHc (A) e dieta comercial adicionada 10% FPHm (B).

Tabela 2. Resultados do teste de preferência alimentar das dietas contendo 10% de farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* (FPHm) e 10% de farinha de penas convencional (FPHc).

Test diets ¹	Primeira Escolha ³		IR ⁵		
	%	<i>P</i> -value	IR	SEM	<i>P</i> -value
DB ² vs. FPHc	70 (28 ⁴)	<i>P</i> < 0.01	0.77	0.005	<i>P</i> < 0.01
DB ² vs. FPHm	15 (6 ⁴)	<i>P</i> < 0.01	0.21	0.005	<i>P</i> < 0.01
FPHc ² vs. FPHm	10 (4 ⁴)	<i>P</i> < 0.01	0.11	0.005	<i>P</i> < 0.01

¹DB = dieta basal; FPHM = dieta comercial adicionada 10% Farinha hidrolisada por *Bacillus subtilis* sp.; FPHC= dieta comercial adicionada 10% farinha de penas hidrolisada de maneira convencional;

²A vs B. primeira dieta comparada (A); segunda dieta comparada (B).

³40 observações 12 cães (3,5 refeições).

⁴Número de Cães que escolheram a primeira comparação de dieta.

⁵Intake ratio = consumo (g) da primeira dieta (A) /total consumo das dietas (g) (A+B).

Tabela 3. Presença das aminos bioativas na farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* (FPHm) e na farinha de penas convencional (FPHc).

Aminas Ativas	FPHm, (mg/kg)	FPHc, (mg/kg)
Tiramina	37,55	29,83
Putrescina	3,64	137,08
Cadaverina	49,34	118,21
Histamina	nd	nd
Serotonina	nd	nd
Agmatina	nd	nd
Espermidina	15,15	nd
Feniletilamina	19,12	nd
Triptamina	nd	nd

*nd – não detectada.

Tabela 4. Perfil de aa (aa) de farinha de penas hidrolisada por *Bacillus subtilis* sp. (FPHm) e farinha de penas convencional (FPHc) em comparação com penas *in natura*.

aa ¹	FPHm	FPHc	Penas <i>in natura</i>
Ácido Aspártico	6.95	6.23	4.8
Ácido Glutâmico	10.8	9.06	7.4
Serina	10.2	10.9	17.2
Glicina	7.62	6.47	11.3
Histidina	0.85	0.41	0.00
Taurina	6.25	5.67	4.50
Arginina	3.93	3.99	4.70
Treonina	4.01	3.57	4.70
Alanina	8.44	9.87	11.1
Prolina	2.43	2.11	1.00
Tirosina	6.12	6.58	7.40
Valina	1.53	2.41	0.00
Metionina	3.38	8.11	6.70
Cistina	4.10	4.29	4.60
Isoleucina	7.31	6.98	7.00
Leucina	4.25	4.39	3.60
Fenilalanina	2.43	1.14	0.00
Lisina	0.40	0.19	0.00
Tritofano ³	90.9	92.4	96.0
Aa totais	88.3	84.1	95.5
Matéria seca	93.6	93.7	

¹ HPLC- Segundo White et al., 1986 and Hagen et al., 1989.

² Valores retirados de estudo de Arai et al., 1982.

³ Metodologia descrita por Lucas & Sotelo, 1980.

CAPÍTULO V

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os coprodutos, se bem processados, contribuem de forma substancial para o crescimento das indústrias fabricantes de alimentos e fornecem parte dos nutrientes das dietas podendo favorecer a relação custo vs benefício. A utilização de coprodutos para alimentação animal é uma forma sustentável de produção. Atualmente, a preocupação com a sustentabilidade e o meio ambiente é real. Desta forma, vêm surgindo novas tecnologias na conversão desses coprodutos em matérias primas de qualidade, o que nos motivou a executar este estudo. Nossa busca foi agregar benefícios nutricionais para as penas, coproduto da cadeia avícola, através da hidrólise de micro-organismos queratinolíticos. Os avanços com nutrição animal, especialmente cães e gatos, estão cada vez maiores e os alimentos completos estão cada vez mais modernos, digestíveis e com muitos benefícios. Por isso a utilização da FPHm não somente como fonte proteica, mas como um aditivo alimentar seria uma forma de trazer benefícios aos animais, além de agregar valor nutricional.

Ao realizar este projeto foi encontrada grande dificuldade em produzir, em grande volume, a farinha de penas hidrolisadas pelos micro-organismos (FPHm), principalmente devido à dificuldade de encontrar um digestor que seguisse os parâmetros que precisávamos como: volume, temperatura e rotações. Desta forma foi confeccionado um digestor, com volume de 20L que limitou a quantidade de farinha produzida. Em decorrência disso não foi possível confeccionar farinha em quantidade suficiente para ser extrusada junto à dieta, como tínhamos pensado inicialmente.

Foi observada uma grande limitação na produção da FHPm, o processo exige grande quantidade de água, porém o hidrolisado poderia ser utilizado em dietas úmidas, onde o produto seria utilizado de maneira integral sem a secagem completa, reduzindo consideravelmente o custo do produto.

A FPHm apresentou baixa digestibilidade (40%), porém foi observado aumento para alguns aa essenciais como: lisina, histidina, arginina e triptofano, além de grande potencial palatabilizante observado na FPHm.

Este projeto serve como um piloto, que abre a possibilidade para mais estudos relacionando outros níveis de inclusão de penas, outros micro-organismos e até mesmo novas tecnologia de processamento das penas, já que verificamos potencial probiótico e palatabilizante da FMHB. Estudos nutricionais mais aprofundados devem ser realizados com a espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABÉ, P. T. **Avaliação Energética e Nutritiva da Farinha de Pena e sua Utilização na Alimentação de Frangos de Corte e Poedeiras**. 1981. 70 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1981.
- ABPA. Brazilian Association of Animal Production. **Relatório Anual**. São Paulo: [ABPA], 2017. p. 68. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/>>. Acesso em: 20 jan. 2018.
- ALBINO, L. F. T.; SILVA, M. A. Determinação dos valores de energia metabolizável aparente e verdadeira de alguns alimentos para aves, usando diferentes métodos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 21, p. 47-58, 1992.
- ALSMEYER, R. H. et al. Equations predict PER from amino acids analysis. **Food Technology**, Chicago, v. 28, n. 7, p. 34-38, 1974.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5th ed. Champaign, USA: AOCS, 2009.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food in their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 6, n. 10, p. 341-346, Oct. 1995.
- BERTSCH, A.; COELLO N. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 96, n. 15, p.1703-1708, 2005.
- BIELORAI, R. et al. Low Nutritional Value of Feather-Meal Protein for Chicks. **The journal of nutrition**, Rockville, v. 112, n. 2, p. 249-254, 1981.
- BOTELHO, B. G. **Perfil e teores de aminos bioativas e características físico-químicas em cervejas**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. 75p.

BRANDELLI, A. Bacterial Keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 1, n. 2, p. 105-116, 2008.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. 2. ed. Campinas, SP: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2010. p. 273-278.

CARCIOFI, A. C. Fontes de proteína e carboidratos para cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. especial, p. 28-41, 2008.

CEDROLA, S. M. L. et al. Keratinases and sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to recycle feather waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 28, n. 3, p. 1259-1269, 2012.

CHIBA, L. I. et al. Hydrolyzed feather meal as a source of amino acids for finisher pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, n. 57, n. 1-2, p. 15-24, 1995.

CORREA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from Amazonian environment. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 64, n. 1, p. 1-6, 2009.

COWELL, C. S. et al. Making commercial pet foods. In: HAND, M. S. et al. (Ed.). **Small animal clinical nutrition**. 4. ed. Kansas: Mark Morris Institute, 2000. p.127-146.

CUPO, M. A.; CARTWRIGHT, A. L. The effect of feather meal on carcass composition and fat pad cellularity in broilers: Influence of the calorie:protein ratio of the diet. **Poultry Science**, Champaign, v. 70, n. 1, p. 153-159, 1991.

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, London, v. 28, n. 2, p. 214-220, 2011.

DAROIT, D. J. et al. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation** (Print), v. 28, n. 5-6, p. 370-379, 2010.

DAROIT, D. J. **Potencial Queratinolítico e caracterização de uma queratinase extracelular de *Bacillus* sp. P45**. 2011. 167 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

DUC, H. et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 70, n. 4, p. 2161–2171, 2004.

DUPONT, C. Probiotiques et prébiotique. **Journal de Pédiatrie et de Puériculture**, Paris, v.14, n. 2, p. 77-81, 2001.

ELMAYERGI, H. H.; SMITH, R. E. Influence of growth of *Streptomyces fradiae* on pepsin-HCl digestibility and methionine content of feather meal. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 17, n. 8, p. 1067 - 1072, 1971.

FELICIANO, M. A. R. et al. Efeitos de probióticos sobre a digestibilidade, escore fecal e características hematológicas em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 6, p. 1268-1274, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/28660>>. Acesso em: 08 fev. 2018.

FERRAREZE A. G.; CORREA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 102-109, 2016.

FIALHO, E. T. et al. Influência da pressão e tempo de cozimento das farinhas de penas sobre a digestibilidade de proteína e energia para suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 20., 1983, Pelotas-RS. **Anais...** Pelotas: SBZ, 1983.

FONSECA, J. B. et al. Determinação dos valores de energia e de aa aparentemente metabolizáveis da Farinha de Penas. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 20, n. 3, p. 291-297, 1991.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLDHEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba: [FAO], 2001. 34 p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2017.

GLORIA, M. B. A. Bioactive amines. In: HUI, H.; NOLLET, L. L. **Handbook of food science, technology and engineering**. New York: M. Deker, 2005. p. 1-38. v. 4.

GRADISAR, H. et al. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 3420-3426, 2005.

GRAZZIOTIN, A. et al. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinases. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 135-144, 2006.

GRAZZIOTIN, A. et al. Poultry feather hydrolysate as a protein source for growing rats. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 61-67, 2008.

GRIFFIN, R. Palatability testing methods: Parameters and analyses that influence test conditions. Pages 187-193 In: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. (Ed.). **Petfood Technology**. Mt. Morris, IL: Watt Publishing Co, 2003

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

HESTA, M. et al. Fecal odor components in dogs: nondigestible oligosaccharides and resistant starch do not decrease fecal emission. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, Washington, v. 1, n. 3, p. 225-232, 2003. Disponível em: <<http://jarvm.com/articles/Vol1Iss3/Hesta.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

HOLANDA, M. A. C. **Avaliação nutricional da farinha de penas hidrolisada na alimentação de frangos de corte**. 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

HUSSEIN, S. H. et al. Petfood Applications of Inulin and Oligofructose. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 129, p. 1454-1456, 1999.

ICHIDA, J. M. et al. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. **Journal of Microbiology Methods**, Shannon, v. 47, n. 2, p. 199–208, 2001.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

KIM, J. M.; LIM, W. J.; SUH, H. J. Feather degrading *Bacillus* species from poultry waste. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 37, n. 3, p. 287-291, 2001.

KSHETRI P. et al. Transforming Chicken Feather Waste into Feather Protein Hydrolysate Using a Newly Isolated Multifaceted Keratinolytic Bacterium *Chryseobacterium sediminis* RCM-SSR-7. **Waste and Biomass Valorization**, s/v., s/n., s/p., 2017

LATSHAW, J. D. Quality of feather meal as affected by feather processing conditions. **Poultry Science**, Savoy, v. 69, n. 6, p. 953-958, 1990.

LAVON, O.; LURIE, Y.; BENTUR, Y. Scombroid fish poisoning in Israel, 2005-2007. **IMAJ**, Ramat Gan, Israel, v. 10, n. 11, p. 789-792, 2008

LIMA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A. Aminoácidos bioativos em alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 1, n. 33, p. 70-79, Jan./June 1999.

LIN, X. et al. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 10, p. 3271-3275, 1992

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACIEL J. L. et al. Characterization of Protein-Rich Hydrolysates Produced Through Microbial Conversion of Waste Feathers. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 4, p. 1177-1186, 2017.

MANCZINGER, L. et al. Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 19, n. 1, p. 35-39, 2003.

MOORE, G. R. P. et al. Queratina de penas de frango: extração, caracterização e obtenção de filmes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 26, n. 2, p. 421-427. 2006.

NAM, G. et al. Native – feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase – producing thermophilic anaerobe. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 178, n. 6, p. 538 – 547, 2002

NASCIMENTO, A. H. **Determinação do valor nutritivo da farinha de vísceras e da farinha de penas para aves, utilizando diferentes metodologias**. 2000. 106 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, DC: National Academies Press, 2006.

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 29, n. 1, p. 2-14, 2010.

NITISINPRASERT, S. et al. Characterization of two bacterial strains and their synergism in feather degradation. **Natural Science**, Bangkok, v. 33, p. 191–199, 1999.

NOUT, M. J. R. Fermented foods and food safety. **Food Research International**, Barking, v. 27, n. 3, p. 291-298, 1994.

ONIFADE, A. A. et al. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, Essex, v. 66, n. 1, p. 1-11, 1998.

PACHECO G. F. E. et al. Inclusion of exogenous enzymes to feathers during processing on the digestible energy content of feather meal for adult dogs. **R. Bras. Zootec**, Viçosa, v. 45, n. 6, p. 288-294. 2016 .

PENZ, J. R. A. M. **Justificativas para o uso de proteínas e gorduras de ruminantes para a alimentação de aves e suínos**. Documento pessoal

enviado ao Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. SINDIRAÇÕES, 2005.

PILLAI, P.; ARCHANA, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 78, n. 4, p. 643-650, 2008.

PLÁCIDO, R. G. **Extração, Caracterização e Uso da Queratina de Penas de Frango para a Obtenção de Filmes Biodegradáveis**. 2007. 128 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2: partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 7, p. 1909-1920, 2010.

REBAFKA, F. P.; KULSHRESTHA, A. **Adding value to feather goldmehl: a new potential for petfood industry. Petfood industry**. Rockford, Illinois WATT: Global Media, 2009. p. 88. Disponível em: <<http://www.petfoodindustry.com/uploadedFiles/Petfoodindustry/artigos/1003P etnovel%20feather%20meal.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2015.

REID, G.; HAMMOND, J. A. Probiotics. Some evidence of their effectiveness. **Canadian Family Physician**, Don Mills, Ont., v. 51, p. 1487-1493, 2005

RIEGER T. J. et al. Proteolytic system of *Bacillus* sp. CL18 is capable of extensive feather degradation and hydrolysis of diverse protein substrates. **British Poultry Science**, Abingdon, v. 58, n. 3, p. 329-335, 2017.

RIFFEL, A. et al. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native featherkeratin. **Archives of Microbiology**, New York, v. 179, n. 4, p. 258–265, 2003.

RIFFEL, A.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Nutritional regulation of protease production by the feather-degrading bacterium *Chryseobacterium* sp. kr6. **New Biotechnol.**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 153–157, 2011.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 29, n. 5, p. 255-258, 2002.

RIFFEL, A. et al. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 128, n. 3, p. 693-703, 2007.

ROCHA T. C.; SILVA, B. A. N. Utilização da Farinha de Penas na Alimentação de Animais Monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 1, Artigo n. 5., p. 35-43, 2004.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 413.

SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M. C. Gastrointestinal physiology and function-targets for functional food development. **British Journal of Nutrition**, v. 80, p. 147–171, 1998.

SALMINEN, S. et al. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 10, n. 3, p. 107-110, 1999.

SAMPSON, H. A. Adverse reactions to foods. In: MIDDLETON, E.; REED, C. E.; ELLIS, E. F. et al. (Ed.). **Allergy: Principles and Practice**. St Louis, MO: Mosby-Year Book Inc, 1993. p. 1661-1686.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 87, n. 1, p. 17-24, 2000.

SANTOS L. F.; KOBLITZ, M. G. B. Proteases. P. 77-105. In: **Bioquímica de Alimentos: Teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SCAPIM, M. R. S. et al. Avaliação nutricional da farinha de penas e de sangue para frangos de corte submetida a diferentes tratamentos térmicos. **Acta Scientiarum Animal Science**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 91-98, 2003.

SCHROOYEN, P. M. M. et al. Partially carboxymethylated feather keratins. 1. properties in aqueous systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 9, p. 4326-4334, 2000.

SCHROOYEN, P. M. M. et al. Carboxymethylated feather keratins. 2. Thermal and mechanical properties of films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 1, p. 221-230, 2001.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Res. Int.**, Barking, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996

SHAWKEY, M. D.; PILLAI, S. R.; HILL, G. E. Chemical warfare? Effects of uropygial oil on feather – degrading bacteria. **Journal of Avian Biology**, Copenhagen, v. 34, n. 4, p. 345–349, 2003.

SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **Int. Journal Food Microbiology**, London, v. 29, n. 2/3, p. 213-231, Apr. 1996.

SILVA, J. H. V.; MUKAMI, F.; ALBINO, L. F. T. Uso de rações à base de aa digestíveis para poedeiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1446-1451, 2000.

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 983-990, 2003.

SINGH, C. J. Exocellular proteases of *Malbranchea gypsea* and their role in keratin deterioration. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 143, n. 3, p. 147–150, 1999.

SINHORINI, M. R. **Processo de Produção de Farinha de Penas Hidrolisadas**: estudos de Otimização do Teor Protéico e do Valor de Digestibilidade da Proteína. 2013. 105 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2013.

SOLAURI, E. Quelles raisons pour un traitement probiotique chez les nourrissons allergiques? The rationale of probiotic therapy in allergic infants. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique**, v. 41, n. 7, p. 624-627, 2001.

SWANSON, K. S. et al. Fructooligosaccharides and Lactobacillus acidophilus modify bowel function and protein catabolites excreted by healthy humans. **J. Nutr.**, Rockville, v. 132, n. 10, p. 3042-3050, 2002.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: [s.n.], 2003. p. 35-60.

THOMAS, J. S. Overview of plasma protein. In: TOMASIK, P. J.; TOMASIK, P. Probiotics and prebiotics. *Cereal Chem.*, v.80, p.113-117, 2003.

USDA. United States Department of Agriculture. **Poultry and Products Semi-annual Report**. [S.l.]: [USDA], 2018. p. 4. Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br/portugues/reports.asp>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

WANG, X.; PARSONS, C. M. Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals. **Poult. Sci.**. Oxford, v. 76, n. 3, p. 491-496, 1997.

WANG, X.; PARSON, C. M. Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hog hair meals. **Poultry Sci.**, Oxford v. 76, n. 3, p. 491-496, 1997.

WILLIAMS, C. M. et al. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 1509-1515, 1990.

YAMAUCHI, A.; YAMAUCHI, K. Formation and properties of wool keratin films and coatings. In: GENNADIOS, A. (Ed.). **Protein-Based Films and Coatings**. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 253-273.

ZAGHLOUL, T. T.; ALBAHRA, M.; ALAZMECH, H. Isolation, identification and keratinolytic activity of several feather-degrading bacterial isolates. **Appl. Biochem Biotechnol**, Clifton, v. 70, n. 2, p. 207-213, 1998.

ZENTEK, J. Influence of diet composition on the microbial activity in the gastrointestinal tract of dogs: (I) effects of varying protein intake on the composition of the ileum chyme and the faeces. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Oxford, v. 74, n. 1-5, p. 43-52, 1995.

6. APÊNDICES

6.1 Normas das revistas escolhidas para as publicações.



ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY

An International Scientific Journal Covering Research on Animal Nutrition, Feeding and Technology

DESCRIPTION.

Animal Feed Science and Technology is a unique journal publishing scientific papers of international interest focusing on animal feeds and their feeding. Papers describing research on feed for ruminants and non-ruminants, including poultry, horses, companion animals and aquatic animals, are welcome. The journal covers the following areas: Nutritive value of feeds (e.g., assessment, improvement) Methods of conserving and processing feeds that affect their nutritional value Agronomic and climatic factors influencing the nutritive value of feeds Utilization of feeds and the improvement of such Metabolic, production, reproduction and health responses, as well as potential environmental impacts, of diet inputs and feed technologies (e.g., feeds, feed additives, feed components, mycotoxins) Mathematical models relating directly to animal-feed interactions

Analytical and experimental methods for feed evaluation.

Environmental impacts of feed technologies in animal production The journal does not encourage papers with emphasis on animal products, molecular biology, genetics or management, or the regulatory or legal aspects of feeds as well as animal production studies with a focus on animal nutrition that do not have a direct link to a feed or feed technology. Manuscripts must be prepared in accordance with the journal's Guide for Authors. Before preparing their manuscript, it is suggested that authors examine the following editorials by the

Editors-in-Chief:

Editorial on terminology and analytical methods (Anim. Feed Sci. Technol. 118 (2005) 181-186) Editorial on experimental design and statistical criteria (Anim. Feed Sci. Technol. 129 (2006) 1-11) Editorial on general suggestions and guidelines (Anim. Feed Sci. Technol. 134 (2007) 181-188) Editors comments on plagiarism (Anim. Feed Sci. Technol. 154 (2009) 292-293) Editorial on review techniques and responding on editorial comments (Anim. Feed Sci. Technol. 155 (2010) 81-85) Editorial on use of replicates in statistical analyses in papers submitted for publication in Animal Feed Science and Technology (Anim. Feed Sci. Technol. 171 (2012) 1-5) For an example of a sample manuscript click here.

GUIDE FOR AUTHORS.

INTRODUCTION

Types of article 1. Original Research Papers (Regular Papers) 2. Review Articles 3. Short Communications 4. Book Reviews Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. A Short Communication is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than six printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references). Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books

which are not more than two years old. Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor: Professor G. Flachowsky, Federal Research Centre of Agriculture, Institute of Animal Nutrition, Bundesallee 50D-38116 Braunschweig, Germany

Manuscripts describing the use of commercial feed products are welcome, but should include the following information: major components, contents of active ingredients (for example enzyme activities). Independent verification, as opposed to a manufacturer's guarantee, is always desirable and often avoids difficulties in the review process, especially where there are no, or few, treatment impacts. The Editors reserve the right to reject any manuscript employing such products, where this information is not disclosed. Submissions concerning feedstuff composition are welcome when published and/or accepted analytical procedures have been employed. However, unusual feedstuffs and/or a wide range of data are pre-requisites. Submissions concerning NIRS may be suitable when more accurate, precise or robust equations are presented. Mathematical, technical and statistical advancement, may constitute the foundation for acceptance. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4. Contact details for submission: For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the Elsevier Support Center. Authors can determine the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System. Submission checklist: You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details. Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details: • E-mail address • Full postal address

AUTHOR INFORMATION

files have been uploaded: Manuscript: • Include keywords • All figures (include relevant captions) • All tables (including titles, description, footnotes) • Ensure all figure and table citations in the text match the files provided • Indicate clearly if color should be used for any figures in print Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable) Supplemental files (where applicable) Further considerations: • Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked' • All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa • Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet) • A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare • Journal policies detailed in this guide have been reviewed • Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing. Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication. Human and animal rights: If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed. All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. Declaration of interest: All authors must disclose

any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest:none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification
Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Changes to authorship
Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright
Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights
As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing
Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source
You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and

interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Funding body agreements and policies Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication. Open access This journal offers authors a choice in publishing their research: Subscription • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs. • No open access publication fee payable by authors.

Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse. • An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses: Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is USD 2600, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>. Green open access Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more. This journal has an embargo period of 12 months. Elsevier Researcher Academy Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease. Language (usage and editing services) Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop. Submission Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. Poorly written and/or presented manuscripts (relative to the journal's guidelines) may be returned to authors for upgrading by the editorial office, prior to a review for scientific merit. Before preparing their manuscript, it

is suggested that authors examine the editorial by the Editors-in-Chief in Vol. 134/3-4, which outlines several practices and strategies of manuscript preparation that the Editors-in-Chief have found to be successful. This editorial also outlines practices that can lead to difficulties with reviewers and/or rejection of the manuscript for publication. Submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION Peer review This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review. Use past tense for current findings, and the present tense for "truths" and hypotheses.

Article Structure Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered continuously. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive use of italics to emphasize part of the text.

Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described. If reference is made to AOAC, ISO or similar analytical procedure(s), the specific procedure identification number(s) must be cited. A number of references for neutral and acid detergent fibre (NDF, ADF) assays exist, and an alternative reference to the now out-of-print USDA Agriculture Handbook 379 must be used. There are many options for NDF and ADF assays (e.g. sodium sulfite, alpha amylase, residual ash), which must be specified in the text. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4. The following definitions should be used, as appropriate:

- aNDFom-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- NDFom-NDF not assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- aNDF-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- NDF-NDF assayed without a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- ADFom-ADF expressed exclusive of residual ash.
- ADF-ADF expressed inclusive of residual ash.
- Lignin (sa)-Lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid.
- Lignin (pm)-Lignin determined by oxidation of lignin with permanganate.

While expressions of NDF and ADF inclusive of residual ash will continue to be acceptable (i.e., the terms aNDF, NDF and ADF above), the Editors-in-Chief highly recommend reporting all fibre values, including digestibilities, on an OM basis. Silica is partially soluble in ND, is quantitatively recovered in AD, and so may contribute to the 'fibre' values and to subsequent digestibility coefficients. Reporting 'hemicellulose' values as the difference between NDF and ADF is generally only acceptable if the analyses have been sequential on the same sample. Crude fibre (CF), nitrogen-free extract (NFE) and total digestible nutrients (TDN) are not acceptable terms for describing feeds and should only be referred to in a historical context.

Results Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Combined 'Results and Discussion' sections are only acceptable for 'Short Communications', except under compelling circumstances.

Conclusions The main conclusions of the study may be

presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should contain the following specific information: purpose of study; experimental treatments used; results obtained, preferably with quantitative data; significance of findings; conclusions; implications of results if appropriate.

Graphical abstract Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources List funding sources in this standard way to facilitate compliance to

funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents for further information. Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified. SI or SI-derived units should be used throughout (e.g. MJ and not Kcal for energy concentrations). Concentrations should be expressed on a 'per kg' basis (w/w); however, w/v, v/v, mol/mol or M may be accepted depending on the circumstances. In addition, 'units' and 'equivalents' are acceptable. Normality should be avoided, as it may be ambiguous for certain acids. If analytical standards have been used, they should be specified by name (e.g. yeast RNA) and form (e.g. lactose monohydrate). Percents should only be used when describing a relative increase or decrease in a response. Proportions should be maximum 1.0 or ≤ 1.0 . For more details see the editorial in Vol. 118/3-4. Percent is only used to indicate relative changes. For composition, both w/w (often solids composition/kg) and w/v (e.g. g/L), v/v (e.g. mL), mol/mol or M can be accepted depending on the circumstances. Specify units (e.g. g/L) and never as percent. Digestibility/metabolisability and degradability should always be expressed as a coefficient (not %), and the content of, for example, the digestible component should be expressed as g/kg: thus, the coefficient of digestibility of dry matter is 0.8, while the content of digestible dry matter is 800g/kg. A distinction between true and apparent digestibility should be made, as well as between faecal and ileal (e.g. coefficient of total tract apparent digestibility - CTTAD). The terms 'availability' and 'bioavailability' should be avoided without definition in context. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ¹⁸O. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P₂O₅).

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae inline with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). If differences between treatments are statistically significant, this should be indicated by adding the actual 'P' value obtained. If $0.10 > P > 0.05$, then differences can be considered to suggest a trend, or tendency, to a difference, but the actual 'P' value should be stated. Further information on this issue

can be found in Animal Feed Science and Technology Vol. 129/1-2. Spaces should be used between all values and units, except for the following: Between the value and degrees or percent. In equations around * and /. In probability expressions ($P < 0.05$). When probability values are given, the 'P' should be a capital letter.

**JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE (JAS) PUBLISHES ORIGINAL RESEARCH ARTICLES
AND INVITED REVIEW ARTICLES.**

Instructions to Authors

The mission of the American Society of Animal Science (ASAS) is to foster communication and collaboration among individuals and organizations associated with animal science research, education, industry, or administration "To discover, disseminate, and apply knowledge for sustainable use of animals for food and other human needs". The Journal of Animal Science (JAS), which is published monthly by ASAS, accepts manuscripts presenting information for publication with this mission in mind. Its editorial policies are established by the editor-in-chief, managing editor, section editors, and editorial board, subject to review by the publications committee, board of directors, and the membership of ASAS. Views expressed in papers published in JAS represent the opinions of the author(s) and do not necessarily reflect the official policy of the institution with which the author is affiliated, ASAS, or the editor-in-chief.

JAS is one of the most frequently cited peer-reviewed, agriculturally oriented research journals in the world, based on statistics published by ISI, Inc. (Philadelphia, PA). Its high impact factor attests to the quality standards maintained by the JAS editorial board and by authors who submit manuscripts for publication.

MANUSCRIPT PREPARATION (STYLE AND FORM)

The most important thing authors can do as they prepare their manuscripts is to consult recent published articles in JAS. Manuscripts that are not consistent with the Instructions for Authors will be returned to the authors without review.

General

Manuscripts must be written in English and must use American spelling and usage, as well as standard scientific usage.

Manuscripts should be prepared double-spaced in Microsoft Word, with lines and pages numbered consecutively, using Times New Roman font at 12 points and no less than 2.54-cm (1 inch) margins all around (do not right justify articles). Special characters (e.g., Greek and symbols) should be inserted using the symbols palette available in this font. Complex equations should be entered using Math-Type (<http://www.dessci.com/en/products/mathtype/>) or LaTeX. Tables and figures should be placed in separate sections at the end of the manuscript, and not placed in the text. Tables and figures should be grouped together (tables together and figures together) Manuscripts should be uploaded to Thomson Reuters ScholarOne Manuscripts using the fewest files possible to facilitate the review and editing processes.

Manuscripts should contain the following sections in this order.

Title Page

The title page includes:

1. A running head (the first word only and any proper nouns capitalized and no more than 45 keystrokes [i.e., characters and spaces; a space is counted as a keystroke]);
2. The title (only the first word and any proper nouns capitalized).
3. Names of authors (e.g., John E. Ethredge; no title, positions, or degrees) and institutions, including
4. the department, city, state or country (all with first letters capitalized), and ZIP or postal code.
5. Author affiliations are footnoted using the symbols *, †, ‡, §, #, ||, and ¶ and are placed below the author names. If a consortium is listed in the byline, a footnoted reference to a website showing the names and affiliations of each member of the consortium should be included in acknowledgements; names and affiliations of each member of the consortium will

not be listed on the title page. Superscript numbers are used to reference footnotes on the first page.

6. Acknowledgments, including acknowledgements of consortia, grants, experiment station, or journal series number, are given as a footnote to the title.

7. Authors disclosing potential or actual conflicts of interest related to the research presented in the manuscript should describe this in a footnote with other acknowledgements (for details, see Conflict of Interest).

Abstract

ABSTRACT consists of no more than 2,500 keystrokes (characters and spaces) in one paragraph and contains a summary of the pertinent results, with statistical evidence (i.e., P-values), in a brief but understandable form. Abbreviations in the abstract must be defined at first use. Abbreviations in the abstract must be re-defined in the body of the manuscript.

Key words

List up to 6 key words. Key words should be in alphabetical order and separated by commas. The first letter of each key word is lowercase, unless it is a proper noun, and no abbreviations should be used.

Introduction

INTRODUCTION should contain a justification for conducting the research, the hypotheses to be tested, and the objective(s).

Materials and Methods

MATERIALS AND METHODS is a required section and must contain a clear description or specific original reference for all biological, analytical, and statistical procedures, and the threshold (e.g. $P < 0.05$) for significance should be listed. Appropriate statistical methods should be used, although the biology should be emphasized. The experimental unit is the smallest unit to which an individual treatment is imposed. Measurements on the same experimental unit over time are not independent and should not be considered as independent experimental units. Sex, age, species, breed names should be listed. Manufacturer information must be provided at the first mention of each proprietary product used in the research (for details see, Commercial Products). Provide a validation for assays (e.g., mean and CV for repeated analysis of a sample [both between and within-assay if available] and the sensitivity [minimum amount or concentration detectable]). Also, provide a publication reference for the methods.

Results

RESULTS are presented in the form of tables or figures when feasible. The text should explain or elaborate on the tabular data, but numbers should not be repeated within the text. Sufficient data, all with some index of variation attached, including significance level (e.g., $P = 0.042$ or $P < 0.05$), should be presented to allow readers to interpret the results of the experiment. Reporting the P-value is preferred to the use of the terms significant and highly significant, which are more editorial than quantitative descriptions. Thus, the P-value (e.g., $P = 0.042$ or $P < 0.05$) should be presented, thereby allowing readers to decide what to reject. Other probability (alpha) levels may be discussed if properly qualified so that the reader is not misled (e.g., trends in the data).

Discussion

DISCUSSION contains the interpretations of the results of the study. The presentation should be clear and concise, address biological mechanisms and their significance, and integrate the research findings with the body of previously published literature to provide readers with a broad base on which to evaluate the author's, or authors', interpretations and assertions. The discussion must be consistent with the data from the research. Authors should limit speculation. A stand-alone DISCUSSION should not refer to any tables or figures, nor should it include P-values, unless citing a P-value from another work."

Results and Discussion

RESULTS AND DISCUSSION. In JAS, authors have the option of combining the results and discussion into one section.

Literature Cited

To be listed in LITERATURE CITED, papers must be published or accepted for publication ("in press").

Citations in the Text

In the body of the manuscript, refer to authors as follows: Smith and Jones (1992) or Smith and Jones (1990, 1992). If the sentence structure requires the authors' names to be included in parentheses, the proper format is (Smith and Jones, 1982; Jones, 1988a,b; Jones et al., 1992, 1993). When there are more than 2 authors of an article, the first author's name is followed by the abbreviation et al. More than 1 article listed in the same sentence or parentheses must be in chronological order first and alphabetical order for 2 publications in the same year.

FORMAT FOR REFERENCES:

Journal articles

Perez, V. G., A. M. Waguespark, T. D. Bidner, L. L. Southern, T. M. Fakler, T. L. Ward, M. Steidinger, and J. E. Pettigrew. 2011. Additivity of effects from dietary copper and zinc on growth performance and fecal microbiota of pigs afterweaning. *J. Anim. Sci.* 89:414–425. doi:10.2527/jas.2010-2839.

Abstracts

Centon, J. R., G. E. Erickson, T. J. Klopfenstein, K. J. Vander Pol, and M. A. Greenquist. 2007. Effects of roughage source and level in finishing diets containing wet distillers grains on feedlot performance. *J. Anim. Sci.* 85(Suppl. 2):76. (Abstr.) doi:10.2527/jas.2006-354.

(NOTE: The doi is now considered part of a citation.)

Books and chapters in books

AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.

NRC. 2000. Nutrient requirements of beef cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Robinson, P. H., E. K. Okine, and J. J. Kennelly. 1992. Measurement of protein digestion in ruminants. In: S. Nissen, editor, *Modern methods in protein nutrition and metabolism*. Academic Press, San Diego, CA. p. 121–127.

Conference proceedings

Bailey, E. A., J. R. Jaeger, J. W. Waggoner, G. W. Preedy, L. A. Pacheco, and K. C. Olson. 2012. Effect of weaning method on welfare and performance of beef calves during receiving. *Proc. West. Sec. Amer. Soc. Anim. Sci.* 63:25-29.

Tables and Figures

Tables and figures must be prepared so they can be understood without referring to information in the body of the manuscript. Tables and figures shall be placed at the end of the manuscript. Each table and each figure shall be placed on a separate page (separated with section breaks) and identified with table and figure numbers. Author-defined abbreviations must be defined in each table and figure. Manufacturer name and location must be provided for any proprietary product appearing in a table or figure. Tables must be created using the table feature in MS Word. Each column must have a heading (e.g., Item, Ingredient, Trait, Fatty acid). Units (e.g., kg) should be separated from headings by a comma, rather than being shown in parentheses. In the body of the table, numerals are used to reference footnotes. Each footnote should begin on a new line. Lowercase, superscript letters are used to indicate significant differences among means within a row or column and to reference footnotes explaining how to interpret the letters. Figure captions should be typed double-spaced on a separate page.

For examples, please see a current issue of JAS.

Appendices

An appendix or appendices are optional and used to provide numerical examples or give extensive detail of analytical procedures. However, if the supplemental material is of interest only to a limited number of JAS readers, it should not be included as an appendix. Instead, state that supplemental information is available on request from the corresponding author; addresses for websites with appropriate supplemental information are acceptable. If extensive, the data may be included as an e-supplement to the manuscript (see E-Supplements). Appendices should follow LITERATURE CITED and be introduced with a major heading (e.g., APPENDIX 1: TITLE). E-Supplements. Authors may present material in an e-supplement (e.g., detailed data sets, Excel files, and video) that is more extensive or detailed than necessary for a JAS article. A note will appear in the JAS article that more material can be found online. Material in an e-supplement must undergo peer review and, thus, should be in a format that is easily accessible (i.e., does not require dedicated software or software that is not generally available) to most reviewers and readers.

Additional Usage Notes

Abbreviations

The Journal of Animal Science discourages the overuse of abbreviations. Author defined abbreviations may used, but must be defined in the abstract, defined at first use in the body of the manuscript, in each table and figure. Avoid starting a sentence with an abbreviation. The standard abbreviations for weights and measures (see below) may be used without author definition (units of time may only be abbreviated when used with a number).

Quantitative Trait Loci and DNA Markers and Microarray Data

Authors of papers that contain original quantitative trait loci (QTL) or DNA marker association results for livestock are strongly encouraged to make their data available in an electronic form to one of the publicly available livestock QTL databases after the manuscript appears on the JAS Advance Articles website (<https://academic.oup.com/jas/advance-articles>). The date on which the paper is posted to the TAS-Papers in Press website may represent the official public disclosure date for the contents of the article. Similarly, for microarray data, authors are encouraged to submit a complete dataset to an appropriate database.

Commercial Products

The use of names of commercial products should be minimized. When a commercial product is used as part of an experiment, the manufacturer name and location (city and state if in the US; city, administrative region or district [e.g., province], and country if outside the US) or a website address must be given parenthetically at first mention in text, tables, and figures. The generic name should be used subsequently. No TM, ®, or © symbols should be used.

POLICIES AND PROCEDURES OF JAS

The mission of the American Society of Animal Science (ASAS) is to “foster the discovery, sharing, and application of scientific knowledge concerning the responsible use of animals to enhance human life and wellbeing” (<https://asas.org/about-asas/history-and-mission>).

The Journal of Animal Science, which is published monthly by ASAS, accepts manuscripts presenting information for publication with this mission in mind.

The Editor-in-Chief, Managing Editor, and Section Editors establish the editorial policies of JAS, subject to review by the publications committee and ASAS Board of Directors. The views expressed in articles published in JAS represent the opinions of the author(s) and do not necessarily reflect the official policy of the institution with which an author is affiliated, the ASAS, or the JAS Editor-in-Chief. Authors are responsible for ensuring the accuracy of collection, analysis, and interpretation of data in manuscripts and ultimately for guaranteeing the veracity of the contents of articles published in JAS.

General Usage

- For general style and form, authors should follow that recommended in *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. 7th ed. Council of Science Editors, Reston, VA.
- For American English spelling and usage, consult Merriam-Webster Online. <http://www.m-w.com/>
- For SI units, the National Institute of Standards and Technology provides a comprehensive guide. <http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>
- Abbreviations are not used to begin sentences. Words must be spelled out.
- “Sex” should be used, rather than “gender.” Gender is more appropriate for describing a role in society than for describing biological sex.
- The hierarchy for brackets and parentheses is [()]. For example, $[(2 + 3) \times (12 \div 2)] \times 2 = 60$.
- Meat shear force should be expressed in kilograms (kg), although newtons (N) may also be acceptable.
- Report time using the 24-h system (e.g., 1410 h rather than 2:10 p.m.).
- Use italics to designate genus and species.
- Names of muscles are not italicized.
- Specify the basis (i.e., as-fed or dry matter) for dietary ingredient and chemical composition data listed in text or in tables. Similarly, specify the basis for tissue composition data (e.g., wet or dry basis).
- Calculations of efficiency should be expressed as output divided by input (i.e., gain:feed, not feed:gain).
- A diet is a feedstuff or a mixture of feedstuffs; a ration is the daily allotment of the diet.
- The word “Table” is capitalized and never abbreviated.
- Except to begin a sentence, the word “Figure” should be abbreviated to “Fig.”
- Except to begin a sentence, experiment and equation should be abbreviated to Exp. And Eq., respectively, when preceding a numeral (e.g., Exp. 1).

- Avoid jargon unfamiliar to scientists from other disciplines. Do not use the term “head” to refer to an animal or group of animals. Instead, use animal, sow, ewe, steer, heifer, cattle, etc.
- Avoid bi- as a prefix because of its ambiguity; biweekly means twice per week and once every 2 weeks.
- Breed and variety names should be capitalized (e.g., Landrace and Hereford).
- Trademarked or registered names should be capitalized, but no ™ or ® symbols should be used.

Contact Information

For information on the scientific content of the journal, contact the Editor-in-Chief, Dr. James Sartin, American Society of Animal Science, P.O. Box 7410, Champaign, Illinois 61826-7410; e-mail: jsartin@asas.org.

For questions about submitting a manuscript and ScholarOne Manuscripts, contact Ms. Lindsey Burnett; e-mail: lindseyb@asas.org.

For assistance with author proofs, contact Mr. Robert Leon, Production Editor; e-mail: jas@oup.com.

Care and Use of Animals

All authors submitting to JAS must complete the Care and Use of Animals form certifying that any research that involves animals has followed established standards for the humane care and use of animals and must specify which standards were used. Only investigations that have followed high standards for the humane care and use of animals in research will be reported in JAS. Also, the manuscript must include a statement of institutional animal care and use committee (IACUC), or country-specific equivalent, approval of all animal procedures. The IACUC statement should appear as the first item in MATERIALS AND METHODS and should specify which publically available animal care and use standards were followed (e.g., ADSA-ASASPSA Guide for Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching; Primary Industries Ministerial Council, Model code of practice for the welfare of animals: the sheep). The manuscript should describe anesthetics, analgesics, tranquilizers, and care taken to minimize pain and discomfort during preoperative, operative, and postoperative procedures. If research requires discomfort to the animals or stressful conditions, justification for these conditions must be evident in papers published in JAS.

Protection of Human Subjects

In the United States, federally funded or regulated research involving human subjects must comply with Code of Federal Regulations (CFR), Title 45 Public Welfare, Part 46 Protection of Human Subjects. However, CFR 45 Part 46.101(b) exempts some research from these regulations. For all exempted research and other details, see <http://www.hhs.gov/ohrp/humansubjects/guidance/45cfr46.html>. Exempted research includes that in which the only involvement of human subjects is for “taste and food quality evaluation and consumer acceptance if 1) wholesome foods without additives are consumed or 2) a food is consumed that contains a food ingredient at or below the level and for a use found to be safe, or agricultural chemical or environmental contaminant at or below the level found to be safe, by the Food and Drug Administration or approved by the Environmental Protection Agency or the Food Safety and Inspection Service of the U.S. Department of Agriculture.” If human subjects were used in exempted research and the research was in compliance with CFR 45 Part 46, or equivalent regulations where the research was conducted, authors must state in MATERIALS AND METHODS or acknowledgements that they were in full compliance. If human subjects were used in research that was not exempted in CFR 45 Part 46, or equivalent regulations

where the research was conducted, authors must certify that the research received prior approval from an appropriate Institutional Review Board.

Conflict of Interest

All JAS editors, ASAS staff, ASAS Board of Directors, and submitting authors must disclose any actual or potential conflicts of interest that may affect their ability to objectively present or review research or data.

Disclosures for JAS authors are to be provided as an acknowledgement on the title page of a manuscript (for instructions, see Title Page). The JAS may use such information as a basis for editorial and publication decisions, and may publish such disclosures if that is deemed relevant and sufficient. The JAS editors, ASAS staff, and ASAS Board of Directors with actual or potential conflicts of interest that may affect their ability to objectively evaluate or manage a manuscript will be prevented from gaining access to the manuscript and associated documents, unless they are an author or coauthor, in which case ScholarOne Manuscripts will limit their access to the Corresponding Author Center.

Types of Articles

Research Articles

Results of research contained in manuscripts submitted to JAS must not have been published in or submitted to another peer reviewed scientific journal prior to receiving a decision from JAS. Previous presentation at a scientific meeting or the use of data in field-day reports or similar documents, including press publications or postings to personal or departmental websites, does not preclude the publication of such data in JAS.

Articles simultaneously posted to websites and submitted to JAS should carry a disclaimer on the website that this version of the paper has not undergone JAS peer review and is not to be considered the final published form of the article. If the article has been published in JAS, the author should include the complete JAS citation.

Because JAS holds the copyright to articles it publishes, posting altered JAS articles that are represented as exact duplicates of the published version constitutes copyright violation.

Special Topics. This Section includes Biographical or Historical Sketches and Contemporary Issues in the animal sciences. Contemporary Issues include topics such as environmental concerns, legislative proposals, systems analysis, and various “newsworthy” scientific issues. Even though Contemporary Issues manuscripts do not have to include original data, authors’ assertions should be substantiated with references to established information from credible published sources. Special Topics papers will be subject to peer review in a manner similar to other JAS submissions. Because of the nature of these manuscripts, their format may vary from that of standard scientific articles, although the ABSTRACT must be consistent with keystroke (characters and spaces) limitations defined earlier in this document. Teaching articles should be submitted to Translational Animal Science.

Rapid Communications. JAS will consider rapid publication of short communications that are considered novel and highly significant to animal science. Submitted papers should follow JAS guidelines, but are restricted to 2 figures or tables or a combination of 1 figure/1 table. The words “Rapid Communication:” should begin the title. When preparing the file, please include the following at the top of the first page, in bolded text: NOTE: THIS IS A RAPID

COMMUNICATION SUBMISSION. This note will ensure that the submission is processed immediately. The final published paper will be no more than 5 printed pages (approximately 15 Word file pages). A JAS Section Editor handles the review and outcome is to accept or reject the paper. The reviews will generally be complete by 2 weeks and if accepted, added to the First Look page within 2 days and placed in the next available journal issue. If significant revisions are needed, the Section Editor will reject the manuscript and require a new submission. Generally there will not be a revision. All papers are subject to the \$100 submission fee (applied towards publication if accepted). The manuscript will be published Open Access and the fee for publication of this rapid format will be \$1,000 (members) and \$2,000 (nonmembers).

Technical Notes. A technical note is used to report a new method, technique, or procedure of interest to JAS readers. When possible, a technical note should include a comparison of results from the new method with those from previous methods, using appropriate statistical tests. The advantages and disadvantages of the new procedure should be discussed. When typeset for publication, a technical note shall not exceed 10 pages (approximately 18 Microsoft Word document pages), including tables and figures. "Technical note:" shall be the first portion of the title of such manuscripts. The review process for a technical note will be the same as that for other manuscripts. Information that is more extensive or detailed than necessary for a Technical note may be presented in an e-supplement (see E-Supplements).

Letters to the Editor. A letter judged suitable for publication will be printed in a "Letters to the Editor" section of JAS. The purpose of this section is to provide a forum for scientific exchange relating to articles published in JAS. To be acceptable for publication, a letter must adhere to the following guidelines. 1) Only a letter that addresses matters of science and relates to information published in JAS will be considered. In general, a letter should not exceed 5,000 keystrokes and should contain no more than 5 citations. 2) A letter should provide supporting evidence based on published data for the points made or must develop logical scientific hypotheses. A letter based on conjecture or unsubstantiated claims will not normally be published. No new data may be presented in a letter. 3) The Editor-in-Chief will evaluate each letter and determine whether a letter is appropriate for publication. If a letter is considered appropriate, the author(s) of original JAS article(s) will be invited to write a letter of response. Normally both letters will be published together. 4) All letters will be subject to acceptance and editing by the Editor-in-Chief and editing by a technical editor.

Review Articles

The journal publishes invited review articles only.

Submission of Manuscripts

Manuscripts should be submitted electronically through ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/jas>. Authors with questions about using the electronic manuscript submission system or, for technological reasons, are unable to submit manuscripts electronically may contact Ms. Lindsey Burnett (lindseyb@asas.org).

The submission fee must be paid at the time of submission, but will be credited towards total article fee if the article is published. Please note: the submission fee is not refundable if the article is rejected.

Copyright and Permission to Publish

Authors shall complete the Manuscript Submission form for each new manuscript submission. The form is completed during the submission process through ScholarOne Manuscripts.

Authors, such as United States government employees, who are unable to grant copyright to ASAS for material that was produced as an official duty of a U.S. Government employee is considered public domain. Authors of JAS manuscripts who include material (usually tables or figures) taken from other copyrighted sources must secure permission from the copyright holders and provide evidence of this permission at the time the manuscript is submitted to JAS for review. Tables or figures reproduced from the work of others, or data extracted from the work of others and used to construct summary tables (or figures) or for meta-analyses, must include an acknowledgement of the original source in a footnote or legend and, when appropriate, a complete citation in LITERATURE CITED. The ASAS and the author(s) of JAS articles agree to publish under the Creative Commons CC-BY NC ND license; the author agrees that ASAS will manage any requests for rights not granted under this license.

Review of Manuscripts

General Procedures

The Editor-in-Chief and Section Editors determine whether manuscripts are suitable for publication in JAS. All communications about a submitted manuscript should maintain confidentiality. Each manuscript will undergo closed scientific review. Manuscripts that are not written clearly, concisely, and coherently, or they are not consistent with guidelines in the current Instructions for Authors, Journal of Animal Science may be rejected without review. Authors whose first language is not English are urged to have an editing service review their manuscripts before they are submitted to JAS. For your convenience, JASEdits is available from ASAS (<https://www.asas.org/services/jasedits>).

Appeals

If a manuscript is rejected, the decision may be appealed to the Editor-in-Chief if the author(s) believe(s) that the judgment was erroneous or biased. A letter presenting the reasons for the appeal should be sent to the Editor-in-Chief within 30 days of the date on the rejection notification. The Editor-in-Chief will decide whether to accept or deny the appeal.

Revisions

All revised manuscripts must be returned to Section Editors via JAS Scholar- One Manuscripts. Authors will be permitted 15 days to revise and return manuscripts classified as Minor Revision and permitted 35 days to revise and return manuscripts classified as Major Revision. In most cases manuscripts will not be allowed more than a single revision. Unsatisfactory or incomplete revisions will be a cause for rejection of the manuscript.

Manuscripts that exceed the revision-option deadline will be withdrawn. If withdrawn for lack of timely revision, they may be resubmitted for new review. Requests for extensions must be communicated to the Section Editor responsible for the manuscript before the revision-option expires.

Papers in Press, Author Proofs, and Publication Charges

Advanced Papers

To facilitate earlier disclosure of research results, accepted manuscripts will be assigned a digital object identifier (doi) and posted to the JAS Advance Articles site (<https://academic.oup.com/jas/advance-articles>) in the form in which they are accepted. The authors bear the primary responsibility for the content of manuscripts posted to the Papers in Press site. Articles posted to this site have not been professionally edited and typeset, and do not represent the final, published form of the manuscript. The date a complete monthly issue of JAS is posted online is the official publication date for JAS articles. However, the date on which a manuscript is posted to the JAS-Advanced Papers website may represent the official public disclosure date for the contents of the article. Authors concerned about intellectual property

issues, such as patents and disclosure dates, should seek legal counsel before submitting manuscripts to a scientific journal.

Author Proofs

Proofs of all manuscripts will be provided to the corresponding author and should be read carefully and checked against the typed manuscript. Accuracy of the author proof is the sole responsibility of the author(s). Authors will receive a link to the PDF proof of their manuscript on our online system by email, and it is essential that a current email address is supplied with all manuscripts. Proofing instructions will accompany the PDF file but the proof should be checked immediately upon receipt and uploaded in accordance with covering instructions. Only essential corrections should be made at the proof stage. Excessive author changes made at the proof stage may result in a \$250 surcharge for additional typesetting, and they may be deemed so excessive that the manuscript will be returned to the Section Editor for additional scientific review.

Policies Regarding Number Usage for JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE

Number usage in JAS is consistent with the Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers.

Additional Resources

Sample Template for Building Your JAS Manuscript

JAS Professional Writing Service

JAS Ethics Policy

Revision Checklist for Authors

Guidelines for Creating Tables in Microsoft Word

Quality Guidelines for JAS Figures

Biographical Sketches

If you have trouble viewing any of these PDF files please be sure you have the most current version of Adobe Reader.

Ethics

Authors should observe high standards with respect to publication ethics as set out by the Commission on Publication Ethics (COPE). Falsification or fabrication of data, plagiarism, including duplicate publication of the authors' own work without proper citation, and misappropriation of the work are all unacceptable practices. Any cases of ethical misconduct are treated very seriously and will be dealt with in accordance with the COPE guidelines.

Third-party copyright

In order to reproduce any third party material, including tables, figures, or images, in an article authors must obtain permission from the copyright holder and be compliant with any requirements the copyright holder may have pertaining to this reuse. When seeking to reproduce any kind of third party material authors should request the following:

- non-exclusive rights to reproduce the material in the specified article and journal;
- print and electronic rights, preferably for use in any form or medium;
- the right to use the material for the life of the work; and
- world-wide English-language rights.

It is particularly important to clear permission for use in both the print and online versions of the journal, and we are not able to accept permissions which carry a time limit because we retain journal articles as part of our online journal archive.

Further guidelines on clearing permissions can be found [here](#).

Third-party content in Open Access papers

If you will be publishing your paper under an Open Access license but it contains material for which you do not have Open Access re-use permissions, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

Title of content

Author, Original publication, year of original publication, by permission of [rights holder]

Conflict of interest

Oxford University Press requires declaration of any conflict of interest upon submission online. If the manuscript is published, conflict of interest information will be communicated in a statement in the published paper.

Permissions regarding reuse of OUP material

Self-archiving policy

Open Access

Journal of Animal Science authors have the option to publish their paper under the Oxford Open initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication.

After your manuscript is accepted, the corresponding author will be required to accept a mandatory license to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

Licenses

RCUK/Wellcome Trust/COAF funded authors publishing in Journal of Animal Science can use the Creative Commons Attribution license (CC BY) for their articles.

All other authors may use the following license:

- Creative Commons Attribution Non-Commercial license (CC BY-NC)
- Please click [here](#) for more information about Creative Commons licenses.

Charges

The open access charges are as follows.

Charges for CC BY:

- Nonmember charge: £2610/ \$3550 / €3158
- Member charge: £2060 / \$2800 / €2490
- List B Developing country charge*: £1194.50 / \$1625 / €1445.50
- List A Developing country charge*: £0 / \$0 / €0

Charges for CC BY-NC:

- Nonmember charge: £2389/ \$3250 / €2891
- Member charge: £1838 / \$2500 / €2224
- List B Developing country charge*: £1194.50 / \$1625 / €1445.50
- List A Developing country charge*: £0 / \$0 / €0

*Visit our [developing countries page](#) (click here for a list of qualifying countries).

You can pay open access charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post.

Please note that these charges are in addition to any page charges that may apply.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution, and ensure you account for your own local VAT correctly.

Page charges

Page charges are \$200 per page for nonmembers and \$100 per page for ASAS members.

STANDARD JAS ABBREVIATIONS

The following abbreviations should be used without definition in JAS. Plural abbreviations do not contain a final "s" because the context of an abbreviation implies whether it is singular or plural. Use of the standard 3-letter abbreviations for amino acids (e.g., Ala) is acceptable in JAS. Use of the internationally recognized chemical symbols for chemical elements (e.g., P and S) is acceptable in JAS. Except for N (not italicized), which is the recognized abbreviation for nitrogen and newton (unit of force), chemical symbols for elements are reserved for elements (e.g., C is for carbon and never for control). For chemical units and abbreviations, refer to the ACS Style Guide (published by the American Chemical Society, Washington, DC).

Physical units

Item	Unit
Bq	becquerel
°C	degree Celsius
cal	calorie
Ci	curie
cM	centimorgan (spell out morgan if used without a prefix)
Da	dalton
Eq	equivalent (only can be used with a prefix; e.g., mEq)
g	gram
ha	hectare
Hz	hertz
IU	international unit
J	joule
L	liter
lx	lux
m	meter
M	molar (concentration; preferred over mol/L)
mol	mole
N	newton (N not italicized)
N	normal (concentration)
Pa	pascal
rpm	revolutions/minute (not to be used to indicate centrifugal force)
t	metric ton (1,000 kg)
V	volt
W	watt

Units of time (units of time may only be abbreviated when used with a number).

Item	Unit
s	second
min	minute
h	hour
d	day
wk	week
mo	month

yr year

Statistical symbols and abbreviations

Item Term

ANOVA	analysis of variance
CI	confidence interval
CV	coefficient of variation
df	degree(s) of freedom (spell out if used without units)
F	F-distribution (variance ratio)
LSD	least significant difference
n	sample size (used parenthetically or in footnotes; note italics)
P	probability
r	simple correlation coefficient
r ²	simple coefficient of determination
R	multiple correlation coefficient
R ²	multiple coefficient of determination
s ²	variance (sample)
SD	standard deviation (sample)
SE	standard error
SED	standard error of the differences of means
SEM	standard error of the mean
t	t-(or Student) distribution
α	probability of Type I error
β	probability of Type II error
μ	mean (population)
σ	standard deviation (population)
σ ²	variance (population)
χ ²	chi-squared distribution

7. VITA

Geruza Silveira Machado, filha de Altamiro Rodrigues Machado e Maria Elizabete Silveira Machado, nasceu em 19 de agosto de 1987, em Curitiba, PR. Durante o ensino médio, estudou no Colégio da URCAMP- Universidade da Região da Campanha, em São Gabriel, RS.

Graduou-se Zootecnista pela Universidade Federal de Santa Maria – UFSM - RS, em 2011. Participou da Unidade de apoio Pedagógico, como bolsista, no Centro de Ciências Rurais (CCR), participando da organização de eventos pedagógicos e auxílio no desenvolvimento de material didático do CCR. Atuou na pesquisa da área de produção e nutrição de aves, com participação em projetos, com estágio extracurricular nesta área no Laboratório de Avicultura (LAVIC). Durante o curso foi monitora da disciplina de Melhoramento animal I e Melhoramento Animal II e participou da fundação do Grupo de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia - GRENAC. Durante a graduação atuou no Diretório Acadêmico Octavio Domingues e participou da realização de eventos acadêmicos.

Em abril de 2012, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na área de concentração nutrição de não ruminantes com ênfase em nutrição de cães e gatos sob orientação do professor Dr. Luciano Trevizan. Período em que foi bolsista de mestrado do Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. Desenvolveu seu projeto de mestrado na área de nutrição de animais de companhia, intitulado: “Avaliação do glicerol em dietas de gatos adultos”. Durante o período do mestrado também participou de pesquisas paralelas na área de nutrição e avaliação de alimentos para aves e suínos. Obteve o grau de Mestre em Zootecnia no ano de 2014; ano em que iniciou os estudos de doutorado no mesmo programa de pós-graduação.

No doutorado continuou a condução de experimentos no âmbito de avaliação de nutrição de animais de companhia. Foi bolsista de doutorado do CNPq. Neste período também participou de trabalhos paralelos na área de nutrição e avaliação de alimentos para aves e suínos e qualidade de ovos. Além de ter participado de aulas relacionados a nutrição animal e a técnicas de processamento de alimentos para animais realizados no Departamento de Zootecnia da UFRGS e ministrado palestras e cursos em outras instituições de ensino.