



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

LUNA ANALIA TEIXEIRA AMORIM DOS SANTOS

**EFEITO DA PROTEÍNA HIDROLISADA DE FRANGO SOBRE A
DIGESTIBILIDADE, FERMENTAÇÃO INTESTINAL E MARCADORES DA
FUNÇÃO RENAL E CARDÍACA DE CÃES**

Salvador-BA
Novembro/ 2023

LUNA ANALIA TEIXEIRA AMORIM DOS SANTOS

**EFEITO DA PROTEÍNA HIDROLISADA DE FRANGO SOBRE A
DIGESTIBILIDADE, FERMENTAÇÃO INTESTINAL E MARCADORES DA
FUNÇÃO RENAL E CARDÍACA DE CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção de Monogástricos.

Orientador: Dra. Bruna Agy Loureiro, BSc, PhD.

Co-orientador: Dr. Wilmer Alejandro Zamora Restan.

Salvador-BA

Novembro/2023

Dados internacionais de catalogação-
na-publicação (SIBI/UFBA/Biblioteca

Santos, Luna Analia Teixeira Amorim dos.

Efeito da proteína hidrolisada de frango sobre a digestibilidade, fermentação intestinal e marcadores da função renal e cardíaca de cães / Luna Analia Teixeira Amorim dos Santos. - 2023.

59 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Bruna Agy

Loureiro. Coorientador: Prof. Dr.

Wilmer Alejandro Zamora Restan.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2023.

1. Zootecnia. 2. Nutrição animal. 3. Cães - Alimentação e rações. 4. Cães - Nutrição. 5. Rins - Doenças - Aspectos nutricionais. 6. Cardiologia veterinária. I. Loureiro, Bruna Agy. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária

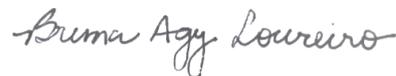
**EFEITO DA PROTEÍNA HIDROLISADA DE FRANGO SOBRE A
DIGESTIBILIDADE, FERMENTAÇÃO INTESTINAL E MARCADORES DA
FUNÇÃO RENAL E CARDÍACA DE CÃES**

Luna Analia Teixeira Amorim dos Santos

Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia

Salvador, 03 de novembro de 2023

Comissão examinadora:



Dra. Bruna Agy Loureiro
Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Orientadora / Presidente

Documento assinado digitalmente
gov.br RICARDO SOUZA VASCONCELLOS
Data: 04/12/2023 17:16:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Universidade Estadual de Maringá (UEM)



Dr. Érico de Mello Ribeiro
University of Guelph

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais e meus irmãos por todo incentivo, dedicação e apoio para que o meu mestrado fosse possível. Sou grata ao universo por ter vocês como família e alicerce em todos os momentos da minha vida. Meus pais que se mostraram presentes e ao apoio e amor incondicional, muito obrigada por tudo.

A minha orientadora, Bruna Agy que é uma referência e inspiração, sou grata de ter tido você como minha orientadora de mestrado. Obrigada por todos os ensinamentos e apoio em todo o trabalho desenvolvido, todas as conversas, conselhos e aulas foram aprendizados para a vida. A meu coorientador Alejandro por todo apoio e ensinamentos nessa trajetória.

Aos meus companheiros de trabalho que dividiram comigo todos os momentos do experimento, ao Elias por todo apoio na execução do projeto, a Rayssa por todo carinho e por sempre estar disposta a ajudar, sua ajuda foi essencial em todo trabalho até aqui. As minhas companheiras de vida e de mestrado, Mirna e Rafa que foram essenciais no projeto, sou eternamente grata a vocês, por toda paciência, ajuda, carinho, amizade e troca que sempre tivemos e se tornou tão importante nesse momento, sou feliz de ter vocês como amigas.

Minhas companheiras desde a graduação, Ingrid e Mayra pela escuta e amizade de sempre. Meus amigos da vida: Ana, Carol, Lilian e Lucas que mais uma vez estão presentes em mais um ciclo da minha vida, obrigada pela escuta e pela amizade durante toda minha trajetória. A Lilian por ter ido me visitar lá na Paraíba, serei eternamente grata, você foi um acalento no meu coração.

Ao amor da minha vida, Tarcisio que esteve do meu lado em todos os momentos da escrita desse projeto, me auxiliando, me escutando e estando presente com carinho e atenção ao meu momento, sou grata por ter você na minha vida e mais ainda por estar dividindo esse final de ciclo ao seu lado.

Agradeço ao PPGZ UFBA, sou feliz, realizada e grata por ter feito minha graduação e mestrado nesta universidade, experiências e oportunidades que estarão guardadas para sempre na minha memória. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e a PremierPet®, pelo financiamento da pesquisa e auxílio na produção dos alimentos utilizados no estudo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de ingredientes e química das dietas experimentais contendo proteína hidrolisada de frango e convencional	13
Tabela 2. Peso corporal inicial dos cães, em kg, dos tratamentos FVC e FHF.....	14
Tabela 3. Escore de condição corporal e peso corporal (média ± desvio padrão) dos grupos experimentais ao longo do estudo	15
Tabela 4. Ingestão e coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e energia metabolizável das dietas FVC e PHF.....	22
Tabela 5. Características fecais e produtos finais da fermentação de cães alimentados com PFC e PHF.....	23
Tabela 6. Hormônios e parâmetros bioquímicos mensurados em cães durante os 120 dias de consumo de FVC e PHF.....	25
Tabela 7. Parâmetros ecocardiográficos de cães alimentados com FVC e PHF.....	26
Tabela 8. Parâmetros bioquímicos do teste de eficácia da PHF.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGCC - Ácidos graxos de cadeia curta
- AGCR - Ácidos graxos de cadeia ramificada
- AGV - Ácidos graxos voláteis
- AAFCO - Association of American Feed Control Officials
- AE - Átrio esquerdo
- AINEs - Antiinflamatórios Não Esteroides
- AngI - Angiotensina I
- AngII - Angiotensina II
- CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
- DIVEd - Dimensão interna do ventrículo esquerdo no final da sístole
- DRC - Doença renal crônica
- EPLVE - Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo
- ECA - Enzima conversora de angiotensina I
- EFk - Excreção fracionada de potássio
- EFNa - Excreção fracionada de sódio
- EB – Energia bruta
- FVC – Farinha de Vísceras de Aves Convencional
- PHF- Proteína Hidrolisada de Frango
- iECA - Inibidor da ECA
- K - Potássio
- N-NH₃ - Nitrogênio amoniacal
- NEM - Necessidade energética de manutenção
- Na – Sódio
- NN – Não nitrogenado
- PB - Proteína bruta
- PM – Peso Metabólico
- pH - Potencial hidrogeniônico
- SRAA - Sistema renina-angiotensina-aldosterona
- SDMA - Dimetilarginina simétrica
- TRIV - Tempo de relaxamento isovolumétrico
- TGF – Taxa de filtração glomerular
- UAldo:C - Relação aldosterona:creatinina urinária

VE - Ventrículo esquerdo

VS - Volume sistólico

VVEd - Volume diastólico final do ventrículo esquerdo

VVEs - Volume Sistólico final do ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
	2.1 Farinha de Vísceras de Aves Convencional: Uso, qualidade e processamento.....	3
	2.2 Proteínas Hidrolisadas e Peptídeos Bioativos	5
	2.3 Atividade Anti-Hipertensiva dos Hidrolisados Proteicos de Origem Animal.....	6
	2.4 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)	8
	2.4.1 SRAA e Função Renal.....	9
	2.4.2 Escape de Aldosterona.....	10
	2.4.3 Avaliação do SRAA Farmacologicamente Ativado em Cães Clinicamente Normais	11
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
	3.1 Local dos Experimentos	12
	3.2 Dietas Experimentais.....	12
	3.3 Estudo 1: Proteína Hidrolisada de Frango em dieta para Cães: Digestibilidade e Efeito do consumo a longo prazo na atividade da ECA, função renal e cardíaca.....	14
	3.3.1 Animais, instalações, peso corporal e consumo alimentar	14
	3.3.2 Coeficiente de Digestibilidade aparente das dietas e Características fecais.....	15
	3.3.3 Determinação do pH fecal e Produtos de fermentação intestinal nas fezes	16
	3.3.4 Avaliação do SRAA e Função Renal	17
	3.3.5 Função Cardíaca	18
	3.4 Estudo 2: Eficácia da Proteína Hidrolisada de Frango na Inibição da enzima conversora de angiotensina em cães com SRAA ativado.	19
	3.5 Análise Estatística	21
4	RESULTADOS	22
	4.1 Estudo 1: Proteína Hidrolisada de Frango em dieta para Cães: Digestibilidade e Efeito do consumo a longo prazo na atividade da ECA, função Renal e cardíaca.....	22
	4.1.1 Consumo, digestibilidade e produtos de fermentação intestinal	22
	4.1.2 Parâmetros Bioquímicos.....	24
	4.1.3 Função Cardíaca	26
	4.2 Estudo 2: Eficácia da Proteína Hidrolisada de Frango na inibição da enzima conversora de angiotensina em cães com SRAA ativado.	27
5	DISCUSSÃO	28
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
	REFERÊNCIAS	36

EFEITO DA PROTEÍNA HIDROLISADA DE FRANGO SOBRE A DIGESTIBILIDADE, FERMENTAÇÃO INTESTINAL E MARCADORES DA FUNÇÃO RENAL E CARDÍACA DE CÃES

RESUMO

A proteína hidrolisada de frango (PHF) tem sido utilizada como ingrediente funcional em pet food, visto que possui proteínas com menor peso molecular, alta digestibilidade e peptídeos com propriedade anti-hipertensiva, capazes de inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA). Esta pesquisa envolveu 2 estudos. O primeiro estudo teve como objetivo avaliar a inclusão de 10% de PHF na dieta de cães em substituição à farinha de vísceras de aves convencional (FVC), na digestibilidade dos nutrientes e efeito do consumo à longo prazo na atividade sérica da ECA, concentração de aldosterona e no funcionamento dos sistemas cardiovascular e renal. Foram utilizadas duas dietas (PHF e FVC), 8 cães por dieta e avaliação durante 120 dias. As digestibilidades da matéria seca, matéria orgânica, extrato etéreo, proteína bruta, extrativo não nitrogenado, fibra bruta e energia metabolizável foram determinadas pelo método de coleta total de fezes sem coleta de urina. Nos dias 0, 60 e 120 de consumo foram realizadas coletas de sangue e urina para avaliação da ECA, aldosterona e função renal; e realizados ecocardiograma e eletrocardiograma. O segundo estudo constituiu um teste de eficácia da PHF em inibir a ECA, aplicando protocolo em 5 cães saudáveis com sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) farmacologicamente ativado por furosemida, com duração de 32 dias. Dados foram avaliados por ANOVA utilizando SigmaPlot v.12.0 a 5% de probabilidade. Como resultados do primeiro estudo, a digestibilidade dos nutrientes e energia metabolizável foram semelhantes entre os tratamentos FVC e PHF ($p > 0,05$). Não houve efeito das dietas sobre os parâmetros cardíacos avaliados ($p > 0,05$). Verificou-se efeito de tempo, mas não de dieta, para ECA, aldosterona, creatinina e potássio séricos e excreção fracionada de sódio e potássio, contudo os valores permaneceram dentro do intervalo de referência. A relação aldosterona:creatinina urinária (UAldo/cr) não foi alterada ao longo do tempo. Como resultado do segundo estudo, a PHF na inclusão de 10% não foi capaz de manter a inibição da ECA em cães com SRAA ativado. A inclusão de 10% de PHF em dietas extrusadas para cães e seu consumo durante 120 dias não promoveu efeitos adversos nos sistemas renal e cardiovascular ou na digestibilidade dos nutrientes, além de não promover alterações no SRAA e na saúde geral dos cães.

Palavras- Chave: Hidrolisado Proteico, Cães, Peptídeos Bioativos, Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, Peptídeo anti-hipertensivo.

EFFECT OF HYDROLYZED CHICKEN PROTEIN ON DIGESTIBILITY, INTESTINAL FERMENTATION AND MARKERS OF KIDNEY AND HEART FUNCTION IN DOGS

ABSTRACT

Hydrolyzed poultry by-product meal (HPM) has been used as a functional ingredient in pet food, as it has proteins with lower molecular weight, high digestibility and peptides that have antihypertensive properties, which are capable of inhibiting the activity of angiotensin-converting enzyme (ACE). This research involved 2 studies. The first study aimed to evaluate the inclusion of 10% HPM in the diet of dogs, replacing conventional poultry by-product meal (CPM), on the digestibility of nutrients and on the long-term consumption on serum ACE activity, aldosterone concentration and functioning of the cardiovascular and renal systems. Two diets were used (CPM and HPM), 8 dogs per diet and evaluated for 120 days. The digestibility of dry matter, organic matter, ether extract, crude protein, nitrogen-free extract, crude fiber and metabolizable energy were determined by the total feces collection method without urine collection. At days 0, 60 and 120 of consumption, blood and urine were collected to evaluate ACE, aldosterone and renal function; and an echocardiogram and electrocardiogram were performed. The second study evaluated the efficacy of HPM in inhibiting ACE, applying a protocol to 5 healthy dogs with renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) pharmacologically activated by furosemide, lasting 32 days. Data were evaluated by ANOVA using SigmaPlot v.12.0 at 5% probability. As results of the first study, nutrient digestibility and metabolizable energy were similar between CPM and HPM treatments ($p>0.05$). There was no effect of the diets on the cardiac parameters evaluated ($p>0.05$). There was a time effect, but no diet effect, for serum ACE, aldosterone, creatinine and potassium; and fractional excretion of sodium and potassium, however values remained within the reference range. The urinary aldosterone:creatinine did not change over time. As a result of the second study, PHF at 10% inclusion was not able to keep inhibition of ACE in dogs with activated RAAS. The inclusion of 10% PHF in extruded diets for dogs and its consumption for 120 days does not promote adverse effects on the renal or cardiovascular systems and nutrient digestibility, in addition to not promoting changes in the RAAS and the health of dogs.

Keywords: Protein Hydrolyzate, Dogs, Bioactive Peptides, Renin-Angiotensin-Aldosterone System, Antihypertensive peptide.

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais ingredientes utilizados pela indústria *pet food*, a farinha de vísceras de aves contém diversas características que são vantajosas na alimentação animal como boa absorção alimentar, ingrediente palatável, alto teor proteico e elevada disponibilidade de cálcio e fósforo (Cave, 2006). Os benefícios no uso da farinha de vísceras de aves vão além das questões nutricionais, pois é uma opção barata comparada a outros ingredientes proteicos e ambientalmente sustentável já que é obtida através da evisceração das aves para consumo humano e o material, considerado resíduo dos frigoríficos e que poderia ser descartado, irá para produção da farinha (Brandelli *et al.*, 2015).

O processo tradicional de obtenção da FVC consiste, brevemente, no transporte das vísceras até os digestores, com o cozimento em altas temperaturas; posteriormente a massa é prensada para separação do óleo e transportada para moagem da fase sólida remanescente (ABINPET, 2019). Novos estudos e novas aplicações estão sendo relatados baseados na hidrólise de subprodutos com o intuito de obter produtos de maior valor agregado como peptídeos bioativos com efeitos fisiológicos importantes como anti-hipertensivos e hipoalergênicos com aplicações promissoras no mercado *pet food* (Toldrá *et al.*, 2016). Neste contexto, destaca-se o desenvolvimento das proteínas hidrolisada de frango.

A proteína hidrolisada de frango (PHF) já é muito utilizada no mercado *pet food* em alimentos hipoalergênicos para cães com afecções dermatológicas e intestinais responsivas à dieta devido às características advindas da hidrólise como: cadeias menores de peptídeos, abaixo de 3.000 kDa, reduzindo a probabilidade de causar reações alérgicas, alta digestibilidade – auxiliando em um eficiente metabolismo de nutrientes – melhora da deposição proteica, além de possuir aminoácidos essenciais (BRF, 2022).

As proteínas alimentares contêm sequências de aminoácidos que permanecem inativas quando presentes como um componente intrínseco da estrutura primária. No entanto, após a liberação por hidrólise enzimática, as sequências de aminoácidos (peptídeos) tornam-se ativas e podem modular positivamente diversos processos fisiológicos. Estudos têm demonstrado que este grupo de peptídeos, definidos como uma sequência entre 2 a 20 aminoácidos, possuem a capacidade de inibir enzimas associadas ao SRAA, podendo melhorar as condições de hipertensão e fornecer benefícios cardioprotetores (Aluko, 2021).

Esses peptídeos são capazes de modificar a pressão arterial ao inibir a ECA, já que a angiotensina I ativada elevará a pressão arterial (Toldrá *et al.*, 2019). Recentemente um estudo avaliou o uso de proteínas hidrolisadas de frango em alimentos para gatos e verificou efeito

inibidor da ECA (Miltenburg *et al.*, 2021). Não foram localizados estudos neste sentido na espécie canina.

A ECA tem como função a conversão da angiotensina I em angiotensina II, potente vasoconstritor e estimulador da secreção de aldosterona pertencente ao SRAA, que está envolvido no controle da pressão arterial. Tradicionalmente, para controle da hipertensão em cães, drogas anti-hipertensivas como enalapril e benazepril atuam inibindo a ECA, porém efeitos adversos são demonstrados em cães e gatos (Ames *et al.*, 2019). Estudos demonstram que a veiculação destes inibidores a longo prazo desencadeia escape de aldosterona, tornando esta terapia farmacológica por vezes ineficiente (Adin *et al.*, 2020).

A hipertensão sistêmica em cães frequentemente é associada a insuficiência renal aguda, tendo consequências patológicas e sistêmicas com alterações nos órgãos vitais, como coração, sistema nervoso central, rins e olhos, porém essas alterações são revertidas por meio de tratamento medicamentoso anti-hipertensivo (Acierno *et al.*, 2018). Como essa condição está comumente associada a uma doença subjacente, a PHF pode ser um potencial ingrediente funcional utilizado pela indústria *pet food* para formulação de dietas coadjuvantes para animais hipertensos.

Neste sentido, para validação das afirmações acima, o estudo teve como objetivo avaliar a proteína hidrolisada de frango em alimentos extrusados para cães adultos e seu efeito inibidor da ECA, efeito sobre a digestibilidade dos nutrientes da dieta e fermentação intestinal, sistema cardiovascular e sistema renal. Compreender o valor nutricional e o funcional da proteína hidrolisada de frango, são importantes fatores para respaldar o seu uso na formulação de alimentos coadjuvantes no manejo da hipertensão ou de distúrbios gastrointestinais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Farinha de Vísceras de Aves Convencional: Uso, qualidade e processamento

A farinha de vísceras de aves convencional (FVC) é uma das principais fontes de proteína para cães na indústria *pet food*. Segundo Carciofi *et al.* (2006), dentre as formulações de rações contendo uma única fonte de proteína, a farinha de vísceras de frango representou cerca de 85% dos ingredientes proteicos presentes nas diferentes rações comerciais. Aldrich e Daristóteles (1998) também demonstraram que a FVC é bastante utilizada nas formulações de dietas secas para cães, excelente fonte de um nutriente essencial como o ácido linoleico e palatabilizante, um fator importante que respalda seu uso no *pet food* e está atrelado à palatabilidade das refeições, já que a gordura das aves será bem aceita pelos cães e gatos, sendo seu sabor preferível às várias outras fontes de gordura.

A principal função das gorduras nas dietas de cães é o atendimento da necessidade energética e de ácidos graxos essenciais, além de contribuir no sabor, aroma, textura, aparência e absorção de vitaminas lipossolúveis (ABINPET, 2019). Na etapa de processamento, no processo de extração de óleo, a farinha de aves pode conter ainda cerca de 15% de gordura e em relato de literatura os ácidos graxos mais predominantemente encontrados foram oleico (18:1n-9), palmítico (16:0) e linoleico (18:2n-6) em 41, 22 e 20%, respectivamente (Kirkland e Fuller, 1971).

Outro aspecto relacionado ao uso da FVC na dieta de cães está relacionado ao teor proteico, composição de aminoácidos e boa digestibilidade (Compêndio brasileiro de alimentação animal, 2009). Estudo feito por Cavalari *et al.*, (2006) observou o valor nutritivo de ingredientes proteicos em rações para cães adultos, como a soja integral extrusada e a farinha de vísceras de frango extrusada. Na avaliação de digestibilidade aparente dos ingredientes, utilizando 4 cães adultos com mesma oferta de quantidade de alimento por peso metabólico, presentes em rações comerciais destinadas a cães adultos, a soja integral extrusada apresentou coeficientes de digestibilidade aparente de matéria seca e de proteína bruta inferiores ao da farinha de vísceras de frango extrusada (80,0% e 83,7% x 88,1% e 88,9%, respectivamente). Carciofi *et al* (2006) demonstraram que dietas à base de farelo de soja apresentou menor coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca quando comparada a outras fontes como farinha de carne e ossos e glúten de milho, enquanto, a dieta com farinha de vísceras de frango apresentou maior valor ($p < 0,05$). Tortola *et al.* (2013), compararam a farinha de vísceras de frango e farelo de soja como fontes de proteínas presente nas rações de cães adultos e não

observaram diferença significativa para os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes.

Swanson *et al.* (2004) estudaram os parâmetros fecais de cães adultos e idosos utilizando duas dietas, uma com fonte de proteína animal (contendo 30% de FVC) e outra com fonte de proteína vegetal com farelo de soja e farinha de carne e ossos (20% e 10% de inclusão, respectivamente). O estudo demonstrou que ocorreu uma menor produção de fezes na matéria seca e menor porcentagem de matéria seca nas fezes em cães alimentados com farelo de soja, independentemente da idade. Carciofi *et al.* (2008) observaram que rações com FVC resultaram em fezes com intermediária umidade quando comparado ao farelo de soja, que produziu fezes com maior teor de umidade, o que pode ser justificado pelo coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica e extrativo não nitrogenado do ingrediente farelo de soja.

A grande maioria dos subprodutos de origem animal utilizados na indústria pet food, como as farinhas de origem animal, são ingredientes proteicos que resultam de materiais recuperados e reciclados do abatedouro, sendo dessa forma um modelo sustentável e de baixo custo para a indústria (Meeker e Meisinger, 2015). O processamento da farinha de vísceras de aves envolve um conjunto de etapas em que a qualidade do processamento está intimamente relacionada à qualidade do produto final, sendo fundamental que todas as etapas do processamento sejam feitas visando a composição qualitativa do produto. As vísceras devem ser processadas no mesmo dia ou no máximo em 24 horas (Instrução Normativa 34,2008). Dessa forma, o conteúdo de subproduto dos resíduos de abatedouro de aves que não serão destinados ao consumo humano é transportado ao digestor e armazenado até o início do processo. O material (contendo vísceras, cabeças, pele e outras partes não comestíveis, exceto penas) presente nos silos, será armazenado diretamente do frigorífico até o momento de ir ao digestor, sendo posteriormente transportado aos digestores para serem processados termicamente e ocorrer a produção da farinha. Os digestores terão como função a cocção e desidratação dos subprodutos, produzindo óleo e torta (Gooding e Meeker, 2016). Após o processo de cocção, o material segue para o percolador, que separa, através da gravidade, o óleo da torta. A torta que sai das prensas é triturada e formada em croquetes de acordo com a granulometria padrão da empresa. Este processo ocorre através de um eixo com martelos que gira em alta rotação (Ockeman e Hansen, 1994; Ferroli *et al.*, 2001; ABINPET, 2017).

Uma das desvantagens das fontes proteicas de origem animal é a inconstância na inclusão do tipo de matéria prima e composição final do ingrediente, que pode apresentar grandes variações e, dessa forma, influenciar na qualidade da farinha. A composição química, o processamento e a presença de contaminantes também são aspectos que afetam a qualidade e

digestibilidade das farinhas de vísceras de aves (Zarei *et al.*, 2014). Com relação ao processamento, os principais fatores que podem influenciar na qualidade são: umidade, alta temperatura e tempo em excesso no digestor, moagem, excesso de gordura, contaminações, tempo entre o sacrifício e processamento da farinha, proteína bruta, acidez, índice de peróxidos e contaminação microbiana.

No entanto, a maioria das empresas de *pet food* busca maior qualidade e padronização na composição química e qualidade do seu ingrediente, fazendo com que ocorra uma busca por desenvolvimento tecnológico no processamento da FVC. Novas tecnologias e processamentos que tragam mais qualidade ao ingrediente e, conseqüentemente, melhor produto para uso em *pet food*, com altas digestibilidade e palatabilidade e outros benefícios que melhorem o desempenho do ingrediente e aplicação na nutrição de cães.

2.2 Proteínas Hidrolisadas e Peptídeos Bioativos

Atualmente os hidrolisados proteicos estão sendo cada vez mais estudados devido aos seus atributos funcionais de fornecer peptídeos bioativos, que podem ser alcançados por meio da hidrólise enzimática. Por definição, peptídeos bioativos são sequências específicas de aminoácidos que, além do seu valor nutricional, possuem a capacidade de regular diversos processos fisiológicos que impactam a saúde de maneira benéfica (Möller *et al.*, 2008). As vísceras obtidas da indústria avícola normalmente são processadas de maneira convencional para obtenção da farinha de vísceras de aves. No entanto, a hidrólise enzimática desse material é uma alternativa para produção de um ingrediente com maior leque de aplicações, como também no fornecimento de peptídeos bioativos. Diferentemente do modo convencional, o processamento consiste na drenagem do material cru e trituração, transporte até o reator, aplicação da enzima e posterior hidrólise enzimática, separação das fases (fase solúvel, resíduo não solúvel e gordura), secagem por desidratação da fase solúvel, resfriamento e moagem.

A hidrólise enzimática consiste na clivagem das ligações peptídicas das proteínas pela ação das proteases, resultando na formação de peptídeos de diferentes tamanhos moleculares e aminoácidos livres (Clemente, 2000). A seleção de enzima a ser aplicada depende da fonte proteica (matéria prima) utilizada, o grau de hidrólise e as características adicionais (por exemplo, propriedades bioativas) desejadas no produto. As enzimas podem ser obtidas de diversas fontes, sendo de animais (ex.: pancreatina, tripsina, pepsina, carboxipeptidases e aminopeptidases), de vegetais (ex.: papaína e bromelina), de origem fúngica (*Aspergillus niger*, *Aspergillus melleus*, entre outros) e bacteriana (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, entre outras) (Rao *et al.*, 1998). Devido à maior facilidade de produção, rápido crescimento, pequeno

espaço necessário para o cultivo e grande variedade de atividade catalítica, as proteases bacterianas são as mais utilizadas pelas indústrias químicas e alimentícias (Giongo, 2006).

Inicialmente, os peptídeos bioativos são inativos dentro da proteína de origem e tornam-se ativos após sua liberação que é realizada internamente através das proteases do trato gastrointestinal (TGI) ou externamente pelo prévio tratamento ácido, alcalino ou enzimático da fonte proteica. A atividade das enzimas endógenas não pode ser controlada, já que possui sítios específicos de clivagem e fornece uma quantidade limitada de peptídeos bioativos. Portanto, outras formas de obtenção de peptídeos bioativos são requeridas (Lafarga e Hayes, 2014). Exemplos das propriedades e atributos funcionais incluem o aumento da atividade antioxidante, antimicrobiana, imunomoduladora, atividade inibitória da dipeptidil peptidase IV e atividade inibidora da ECA (Brandelli *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2020). No entanto, no campo da nutrição de animais de companhia, a utilização de hidrolisados proteicos é relativamente limitada, servindo principalmente para mitigar a natureza alergênica das proteínas em dietas hipoalergênicas e para formar aditivos palatabilizantes. Além disso, proteínas hidrolisadas são uma das opções recomendadas para pacientes com doença inflamatória intestinal (Cave, 2006).

Na indústria *pet food* as grandes marcas, cada vez mais estão desenvolvendo linhas de alimento que atendam integralmente os animais e suas patologias, no intuito de levar bem-estar e nutrição clínica de qualidade que auxilie e seja um complemento ao tratamento de diversas patologias. O uso de ingredientes hidrolisados na maioria das rações comerciais coadjuvantes é destinado a animais com algum tipo de alergia, como por exemplo, a dermatite alimentar ou animais com alguma doença intestinal como gastroenterite que podem ser avaliados e encaminhados a ingerir dietas comerciais hipoalergênicas. Segundo, De Araujo *et al.* (2021), as proteínas hidrolisadas, pelo baixo peso molecular, perdem sua antigenicidade, evitando reações de hipersensibilidade na pele dos animais. Além disso, a digestibilidade de uma proteína hidrolisada vai ser maior do que quando comparado a uma proteína intacta, pois os polipeptídios serão melhores absorvidos pelo TGI, favorecendo no caso de animais com alguma doença inflamatória intestinal.

2.3 Atividade Anti-Hipertensiva dos hidrolisados proteicos de origem animal

É demonstrado cientificamente que vários alimentos de origem animal como leite, ovos e carnes de diferentes espécies apresentam peptídeos capazes de auxiliar no controle da pressão arterial em função da sua atividade inibitória da ECA (Martínez-Maqueda *et al.*, 2012). Há evidências que peptídeos derivados de proteínas de aves têm o potencial de contribuir para o controle da pressão arterial. Estudos *in vitro* que avaliaram a digestão da carne de aves pelas

proteases de *Aspergillus spp*, proteases gástricas e simulações de digestão gastrointestinal observaram que a carne de frango libera peptídeos capazes de inibir a ECA (Saiga *et al.*, 2003; Saiga *et al.*, 2008; Terashima *et al.*, 2010; Sangsawad *et al.*, 2017). Por sua vez, um estudo *in vivo* em ratos espontaneamente hipertensos demonstrou que a administração oral (100mg de peptídeos/Kg de peso corporal) de hidrolisados obtidos pela digestão da proteína da pele de coxa de frango e a da proteína da pele de peito de frango pelas enzimas alcalase e pepsina foram capazes de reduzir a pressão arterial sistólica, após 6 horas da ingestão, em -32,67mmHg e -31,33mmHg, respectivamente, demonstrando o seu potencial hipotensor (Onuh *et al.*, 2015). Além disso, em modelos de hipertensão induzida em ratos, também se constatou que a ingestão de extrato de frango e de colágeno de frango hidrolisado foram eficazes na redução da pressão arterial e na atenuação de lesões cardiovasculares (Matsumura *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2010).

Em humanos, as principais drogas utilizadas para regularizar a pressão arterial (por exemplo, captopril, benazepril e enalapril) atuam inibindo a ECA, porém efeitos adversos são relatados como angioedema, tosse seca, distúrbios do paladar, reações cutâneas, entre outros (Sica, 2004). Esses efeitos colaterais, juntamente com a alta incidência de pacientes hipertensos e o fato da hipertensão ser um fator de risco conhecido para derrames e doenças cardiovasculares, contribuíram para a busca de peptídeos anti-hipertensivos derivados de alimentos (Ryan *et al.*, 2011). Em cães, o SRAA é um fator importante de nefrogênese e desenvolvimento renal, por isso o uso de iECA não é indicado para cadelas prenhes ou neonatos. Estes fármacos também podem causar hipotensão, sendo evitados em animais com hipotensão, hipovolemia, hiponatremia e insuficiência renal aguda. Na literatura já foi mencionado o risco de insuficiência renal aguda induzida pelos iECA, em animais tratados com captopril, enalapril e benazepril (Lefebvre *et al.*, 2007)

Os peptídeos bioativos são capazes de inibir a ECA por meio de dois mecanismos distintos. O primeiro envolve a ligação desses peptídeos ao seu sítio ativo e o segundo ocorre modificando sua conformação ao ligar-se a um sítio inibidor, impedindo a ligação da Ang I ao local ativo (Ryan *et al.*, 2011). Vários estudos foram conduzidos para explorar a capacidade de inibição da ECA *in vitro* por hidrolisados de diferentes subprodutos de aves: da crista e da “papada” (Bezerra *et al.*, 2019), dos pés (Mas-Capdevila *et al.*, 2018), de vísceras (Dos Santos Aguilar *et al.*, 2019; Mane & Jamdar, 2017), da pele (Onuh *et al.*, 2015; Yusop *et al.*, 2016), do colágeno comercial obtido de aves (Soladoye *et al.*, 2015), do extrato de osso (Nakade *et al.*, 2008), entre outros. É importante observar, entretanto, que embora estudos *in vitro* sejam uma ferramenta interessante para avaliar a atividade dos peptídeos bioativos, não necessariamente confirmam seu efeito fisiológico (Mas-Capdevila *et al.*, 2018).

Para exercer um efeito positivo *in vivo*, os peptídeos bioativos devem ser resistentes aos diferentes pH e enzimas do trato gastrointestinal, devem ser absorvidos pelos enterócitos para a circulação sistêmica, cheguem intactos ao sítio de ligação desejado e em quantidade suficiente (Lopez-Barrios *et al.*, 2014). Mane e Jamdar (2017) conduziram uma investigação envolvendo a resistência de três peptídeos bioativos obtidos de vísceras de frango à degradação por enzimas gastrointestinais (pepsina, tripsina e quimotripsina) e observaram atividade residual de 82% em relação à atividade inicial. Anna *et al.* (2016), por outro lado, avaliaram o efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre a atividade inibitória da ECA de peptídeos obtidos de proteína hidrolisada de frango e observaram um aumento de 2.23 vezes na inibição da ECA após a digestão. Diversos estudos também demonstraram a capacidade de absorção dos peptídeos bioativos pelo organismo (Ding *et al.*, 2016; Gallego *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2018; Sangsawad *et al.*, 2018).

A forma de oferta do ingrediente e seu processamento são fatores importantes na manutenção ou não dos peptídeos bioativos no ingrediente. No processo de extrusão, a temperatura, por exemplo, pode danificar ou diminuir os peptídeos bioativos, além de influenciar, conseqüentemente na atividade inibitória da ECA (BRF, 2020).

2.4 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

Um dos parâmetros mais fortemente controlados para garantir a função fisiológica e orgânica normal do animal é a pressão arterial (Duke *et al.*, 2011). O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) atua como um mecanismo de controle da normalidade da pressão arterial e está envolvido no desenvolvimento de condições clínicas como a hipertensão arterial e insuficiência cardíaca congestiva (Ribeiro *et al.*, 2000). Por definição, o SRAA é a cascata neuro-hormonal ativada em diferentes momentos fisiológicos ou patológicos no intuito de manter a homeostasia dos sistemas renal e cardiovascular. A ativação do SRAA inicia com a síntese de renina nas células epitelioides do aparelho justaglomerular, sendo armazenada em forma de grânulos que são liberados de forma controlada. Esta liberação acontece geralmente em situações de baixa pressão arterial sistêmica, hipovolemia, privação de sódio e estimulação simpática (Ames *et al.*, 2019). Por outro lado, o angiotensinogênio é liberado pelo fígado ficando livre na circulação sistêmica. No sangue, a renina, que é uma enzima proteolítica, metaboliza o angiotensinogênio, produzindo angiotensina I (AngI). Posteriormente, a ECA liberada pelas células endoteliais converte AngI em angiotensina II (AngII). As ações da AngII estão determinadas pelo tipo de receptor de AngII esteja involucrado. Os efeitos da AngII nos receptores de angiotensina tipo-1, levam ao aumento da retenção de sódio, vasoconstrição,

estimulação da sede e desejo por sal, além do aumento da atividade do sistema nervoso simpático e liberação de aldosterona pela glândula adrenal (Castrop *et al.*, 2005; Sztachman *et al.*, 2018). Por outro lado, as ações da estimulação dos receptores de angiotensina tipo-2 são contra regulatórias às do receptor tipo-1. A estimulação do receptor tipo 2 produz efeitos anti-inflamatórios, anti-fibróticos e vasodilatadores (Ames *et al.*, 2019). Nesta ordem de eventos, o principal metabólito final do SRAA é a aldosterona. A aldosterona é um regulador chave do equilíbrio de sódio, potássio e fluidos corporais (Hall e Guyton, 2010). Sua ação modula a expressão de canais iônicos, bombas e trocadores em tecidos epiteliais, especialmente nos rins, levando ao aumento na reabsorção transepitelial de Na^+ e água e excreção de K^+ (Ames *et al.*, 2019). Além da remodelação patológica dos tecidos cardíacos, vasculares e renais (Adin *et al.*, 2020). As ações da aldosterona a curto prazo são benéficas, porém a longo prazo tornam-se deletérias e contribuem para a progressão da insuficiência cardíaca (Schueller *et al.*, 2011). Outros efeitos deletérios incluem retenção excessiva de sódio com expansão do volume extracelular, favorecendo a perda de potássio e magnésio, diminuição da sensibilidade dos barorreceptores, contribuindo para a disfunção endotelial e inflamação vascular, e associação com remodelação renal, vascular e cardíaca (Ames *et al.*, 2019).

Embora a ativação da SRAA possa compensar os estágios iniciais da doença cardiovascular e renal, sua ativação prolongada é mal adaptativa (Ames *et al.*, 2019; Adin *et al.*, 2020). Portanto, atualmente, é necessário buscar novos protocolos terapêuticos para regular a ativação da SRAA.

2.4.1 SRAA e Função Renal

A renina é produzida pelas células justaglomerulares que estão localizadas entre as células da mácula densa e as arteríolas aferente e eferente, estruturas estas que formam o aparelho justaglomerular (Ames *et al.*, 2019). Alguns mecanismos são responsáveis pela liberação da renina pelas células justaglomerulares, incluindo baixa da pressão arterial sistêmica, hipovolemia, privação de sódio e estimulação simpática. (Ames *et al.*, 2019).

A liberação de renina é aumentada quando a pressão arterial baixa é detectada pelos barorreceptores intrarrenais, desencadeando a liberação de prostaglandinas (PGE_2 , PGI_2). Por outro lado, a diminuição da reabsorção de Na^+ e Cl^- detectada pela mácula densa, estimula a liberação de renina através de PGE_2 e PGI_2 . A liberação de renina também pode ser estimulada por um mecanismo extra-renal, estimulação nervosa simpática de receptores β_1 nas células justaglomerulares, ativando assim o sistema SRAA (Riviere e Papich, 2018).

Os principais efeitos da AngII no rim incluem vasoconstrição da artéria interlobular e arteríolas aferentes e eferentes, resultando em aumento da taxa de filtração glomerular (Ivy e Bailey, 2014). A vasoconstrição induzida por AngII na maioria dos casos diminui a taxa de filtração glomerular (TFG) por afetar a arteríola aferente mais do que a artéria eferente. No entanto, durante a hipotensão renal, a AngII afeta a artéria eferente em maior extensão do que a artéria aferente, resultando em aumento da TFG. (Riviere *et al.*, 2018).

A administração de iECA durante a hipotensão renal aumenta o risco de insuficiência renal aguda, pois estes fármacos provocam diminuição da resposta de vasoconstrição da arteríola eferente mediada pela AngII, o que resulta em redução da resistência arteriolar eferente, da pressão capilar glomerular e da TFG. Como consequência, ocorre azotemia aguda e possível lesão renal aguda. O potencial nefrotóxico de iECA pode ser aumentado em caso de depleção de sódio, uso de diurético ou insuficiência cardíaca congestiva, e agravado se houver, concomitantemente, doença renal crônica ou uso de AINEs (Cowgill *et al.*, 2011).

2.4.2 Escape de Aldosterona

O escape de aldosterona pode ser definido como uma condição na qual os iECA falham em suprimir efetivamente a atividade do SRAA, ou seja, o organismo cria maneiras alternativas de ativar a produção de aldosterona, sem necessidade ou participação da ECA. Os mecanismos pelos quais ocorrem a passagem da aldosterona ainda não são bem compreendidos e o fenômeno é provavelmente de origem multifatorial (Bomback e Klemmer, 2007; Nobakht *et al.*, 2011). A explicação mais aceita é que vias alternativas e enzimas para conversão de AngI em AngII são utilizadas, incluindo quimase e catepsina G. Estudos recentes têm demonstrado que outros tipos de angiotensina (1,12 e 1,25) encontrados em tecidos cardiovasculares e renais servem como precursores e podem ser responsáveis pela liberação de peptídeos de AngII (Nagata *et al.*, 2013). Além disso, a quimase, uma serino-protease, catalisa a formação de AngII a partir da AngI (Waanders *et al.*, 2011), permitindo a formação de AngII independente da ECA no tecido. Esta via é provavelmente o principal gerador AngII no tecido (Nagata *et al.*, 2006). Outros estudos recentes demonstraram que a ativação do SRAA induzido com a administração de amlodipina e furosemida e caracterizada por um aumento de duas a três vezes na relação das concentrações da aldosterona/creatinina na urina (UAldo:C), não foi controlado com o uso de iECA (Atkins *et al.*, 2007; Sayer *et al.*, 2009; Ames *et al.*, 2016).

Embora o benazepril suprima com sucesso a ECA, ele não reduz significativamente a excreção urinária de aldosterona induzida por furosemida, indicando escape de aldosterona (Lantis *et al.*, 2014). A presença de escape de aldosterona, apesar da supressão da ECA, levou

a várias hipóteses sobre o mecanismo, incluindo a geração de Ang II não mediada por ECA e a formação extra-adrenal de aldosterona. Um estudo com cães com degeneração da válvula mitral demonstrou que o escape de aldosterona apresentou uma prevalência de 32% em cães com insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e 30% em cães sem ICC, caracterizando o escape de aldosterona pela concentração $UAldo:C > 1.0 \text{ ug/g}$ (Ames *et al.*, 2017).

Em humanos, aproximadamente 50% dos pacientes com insuficiência cardíaca não apresentam escape de aldosterona e, portanto, contribuem para o efeito geral do benazepril na população na insuficiência cardíaca. Contudo, não há consenso sobre o tempo em que este fenômeno acontece, pois, estudos relatam escape de aldosterona entre 4 - 6 semanas após o início da terapia com iECA, já outros estudos apontam após 6 a 12 meses (Bomback e Klemmer, 2007; Waanders *et al.*, 2011).

Para cães, o uso de iECA é comprovadamente seguro, porém ocorre perda da eficácia a longo prazo ou no uso precoce pois o organismo encontra alternativas (escape de aldosterona) para conversão da AngI em AngII. Por isso, é importante ter cautela ao optar pelo uso desses fármacos (Ames *et al.*, 2017).

2.4.3 Avaliação do SRAA farmacologicamente ativado em cães clinicamente normais

A interrupção farmacológica do SRAA é estudada por um modelo de ativação do SRAA usando furosemida ou amlodipina (Lantis *et al.*, 2014; Lantis *et al.*, 2015, Ames *et al.*, 2016; Sakatani *et al.*, 2016; Konta *et al.*, 2018). Este modelo é muito útil porque os medicamentos usados para imitar a ativação do SRAA observada na insuficiência cardíaca também são usados no tratamento da insuficiência cardíaca em humanos e cães. A ativação do SRAA é avaliada pela medição da $UAldo:C$, usando amostras pontuais de urina e uma metodologia de radioimunoensaio, sendo correlacionado com 24h de excreção de aldosterona na urina no cão (Gardner *et al.*, 2007).

A administração de furosemida (2 mg/kg por via oral a cada 12h) ou amlodipina (0,5 mg/kg por via oral a cada 12h) levou a aumento significativo da $UAldo:C$, indicando ativação do RAAS (Lantis *et al.*, 2014; Lantis *et al.*, 2015; Ames *et al.*, 2016; Sakatani *et al.*, 2016; Konta *et al.*, 2018). Essa ativação parece estagnar no quinto dia de administração da medicação (Lantis *et al.*, 2011). A ativação do SRAA neste modelo é muito consistente e elimina a variação minuto a minuto observada com concentrações de aldosterona sanguínea (Ames *et al.*, 2016). Além disso, os estudos feitos com cães normais não apresentaram evidência de alterações clínicas ou hipotensão clínica durante o tempo do estudo, mostrando que é um método eficiente

e seguro para realização de estudos de avaliação do SRAA farmacologicamente ativado em cães clinicamente normais com duração 10 a 56 dias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local dos Experimentos

O experimento foi realizado nos canis Altos do Miramar e Quinta di Cani, localizados no estado da Paraíba, nas cidades de João Pessoa e Campina Grande, respectivamente.

Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB), com número de protocolo 3870020621.

3.2 Dietas Experimentais

Foram utilizadas duas dietas isonutrientes formuladas para atender as necessidades nutricionais de cães adultos (FEDIAF, 2020): 1) dieta 1 de manutenção com 32% de farinha de vísceras convencional (FVC) e 2) dieta 2 com substituição de 10% da FVC por proteína hidrolisada de frango (PHF), conforme a Tabela 1.

Ambas as dietas foram extrusadas usando uma extrusora de rosca simples na Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil. Depois da extrusão, os croquetes foram secos em secador tipo esteira. A gordura e os palatabilizantes das aves foram pulverizados nos croquetes sob mistura contínua imediatamente após a secagem. A densidade dos croquetes logo após a extrusão e antes da secagem ficou entre 320 e 350 g/L durante todo o processo de produção.

A FVC obtida comercialmente não foi totalmente divulgada pelo fabricante. A PHF é geralmente preparada a partir de vísceras, fígado e carne previamente hidrolisados em um reator enzimático; após a hidrólise, a fase solúvel é separada da fração gordurosa e dos resíduos insolúveis, seca e moída. A informação nutricional com as especificações físico-química da PHF (BRF S. A., Concórdia, Brasil), são: umidade (máx. 8%), proteína bruta (mín. 75%), gorduras (máx. 8%), matéria mineral (máx. 6%), digestibilidade (mín. 95%).

Tabela 1. Composição de ingredientes e química das dietas experimentais contendo proteína hidrolisada de frango e convencional.

Ingredientes (%)	FVC¹	PHF²
Milho	39,34	39,07
Farinha de aves convencional	31,91	20,76
Proteína hidrolisada de Frango	-	10,00
Quirera de Arroz	12,00	12,00
Óleo de vísceras de frango	7,49	8,70
Polpa de beterraba	4,00	4,00
Levedura de cerveja	1,00	1,00
Óleo de peixe	0,55	0,55
Palatabilizante	2,00	2,00
Suplemento mineral-vitamínico ³	0,40	0,40
Cloreto de potássio	0,39	0,37
Sal	0,30	0,30
Cloreto de colina	0,13	0,19
Fosfato bicálcico	-	0,17
DL-metionina	0,12	0,12
Antifúngico	0,10	0,10
AAM	0,10	0,10
Antioxidante	0,07	0,07
Composição química analisada (%)		
Umidade (%)	6,64	6,21
Proteína bruta (%)	26,63	26,90
Extrato etéreo hidrólise ácida (%)	13,74	14,99
Matéria mineral (%)	5,95	4,53
Matéria orgânica (%)	94,05	95,47
Energia bruta (kcal/kg)	4.681	4.759
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.780	3.810

¹ FVC: Farinha de vísceras de aves convencional; ²PHF: Proteína Hidrolisada de Frango - Ingrediente da farinha de vísceras hidrolisada foi concedido pela BRF (Proteína hidrolisada de frango, BRF S.A., Concórdia, Brasil); ³Quantidade por kg de Produto: vitamina A, 2.000.000 IU; vitamina B₁ (Mononitrato de Tiamina), 500 mg; vitamina B₁₂, 6250 mcg; vitamina B₂, 1000 mg; vitamina B₆ (Cloridrato de Piridoxina), 500 mg; vitamina D₃, 200.000 IU; vitamina E (DL-alfa tocoferol), 12.000 IU; ácido pantotênico (D- pantotenato de cálcio), 2500 mg; ácido fólico, 75 mg; biotina, 6 mg; sulfato de cobre, 1750 mg; colina, 100 g; ferro (sulfato de ferro), 20 g; iodo (iodeto de sódio), 375 mg; manganês (óxido manganoso), 1250 mg; niacina, 3750 mg; selênio (selenito de sódio), 40 mg; óxido de zinco, 30g.

3.3 Estudo 1: Proteína Hidrolisada de Frango em dieta para cães: Digestibilidade e efeito do consumo a longo prazo na atividade da ECA, função renal e cardíaca.

3.3.1 Animais, instalações, peso corporal e consumo alimentar

Foram selecionados 16 cães adultos (6 cães da raça American Pitbull Terrier, 2 cães da raça Dachshund Miniatura, 6 cães da raça Bulldog Francês e 2 cães da raça Shih Tzu), machos, com idade entre 1 a 6 anos e ECC entre 4 e 5 (LAFLAMME, 1997), que foram divididos igualmente em um delineamento inteiramente casualizado, considerando o peso corporal e as raças em dois tratamentos: farinha de vísceras convencional (FVC), com peso inicial médio $15,92 \pm 8,24$ e proteína hidrolisada de frango (PHF), com peso inicial médio $15,59 \pm 7,98$.

Todos os animais foram vacinados e vermifugados antes do início do período experimental e foram realizados exames laboratoriais para serem considerados saudáveis e aptos a participar do projeto. Os cães e seus respectivos pesos estão apresentados na Tabela 2. O ECC e o peso corporal ao longo do estudo estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Peso corporal inicial dos cães, em kg, dos tratamentos FVC e PHF.

Tratamento	Cão	Peso corporal inicial (kg)	Média de peso corporal (kg)
FVC	Dachshund Miniatura	4,5	15,92
	American Pitbull Terrier	28,1	
	American Pitbull Terrier	24,5	
	American Pitbull Terrier	20,25	
	Bulldog Francês	14,4	
	Bulldog Francês	15,6	
	Bulldog Francês	14,0	
	Shih Tzu	6,0	
	PHF	Dachshund Miniatura	
American Pitbull Terrier		22,4	
American Pitbull Terrier		19,35	
American Pitbull Terrier		27,5	
Bulldog Francês		13,7	
Bulldog Francês		16,8	
Bulldog Francês		15,6	
Shih Tzu		5,2	

PHF: Proteína Hidrolisada de Frango; FVC: farinha de vísceras de aves convencional

Tabela 3. Escores de condição corporal e peso corporal (médias \pm desvio padrão) dos grupos experimentais ao longo do estudo.

Tratamento	0 dias		30 dias		90 dias		120 dias	
	ECC	PC	ECC	PC	ECC	PC	ECC	PC
PHF ¹	3,75 \pm 0,5	18,3 \pm 10	4,5 \pm 0,41	18,8 \pm 10,5	5,3 \pm 0,5	19,7 \pm 11,1	5,3 \pm 0,5	21,2 \pm 12,4
FCV ²	4 \pm 0,40	18,9 \pm 10,3	4,9 \pm 0,85	19,3 \pm 10,7	5,3 \pm 0,5	20,3 \pm 11,2	5,2 \pm 0,5	21,1 \pm 11,5

¹PHF: Proteína Hidrolisada de Frango; ²FCV: Farinha de Vísceras de Aves Convencional; 3ECC: Escore de Condição Corporal; PC: Peso Corporal

Todos os cães foram mantidos em baias individuais com 2m² de área coberta e 4m² de solário, durante 120 dias, sendo permitido acesso diário no período de uma hora à área externa de 120 m² provida de enriquecimento ambiental para socialização e atividade física.

Inicialmente os cães foram alimentados de acordo a necessidade energética de manutenção (NEM) de cães de canil (NRC, 2006), NEM [kcal] = 110 \times kg peso corporal^{0,75}, sendo caracterizados como animais ativos com estímulo à realização de atividades físicas.

O alimento foi pesado diariamente e oferecido em uma refeição às 9h00 e a água foi fornecida *ad libitum* durante todo o estudo. Os cães foram pesados quinzenalmente em balança de plataforma digital e o consumo de alimento monitorado diariamente, sendo a quantidade de alimento ajustada, quando necessário, para manter o peso corporal dos animais constante.

3.3.2 Coeficiente de digestibilidade aparente das dietas e Características fecais

As análises laboratoriais de digestibilidade foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (LAANA – CCA/UFPB). Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes foram determinados pelo método de coleta total de fezes (sem coleta de urina) e procedimentos de cálculo de acordo com a *American Association of Feed Control Official* (AAFCO, 2014).

Após 15 dias de adaptação às dietas, o consumo de alimento e produção de fezes foram registrados e coletados durante 4 dias. Os cães foram condicionados a caminhar 3 vezes ao dia e defecar durante passeio guiado por um colaborador da pesquisa, em bandeja plástica. As amostras fecais foram identificadas, pesadas e colocadas em saco plástico por animal e congeladas (-15°C) para posterior análise. A consistência fecal foi pontuada de 0 a 5: 0 = fezes líquidas; 1 = pastosas e fezes sem forma; 2 = fezes moles e malformadas que tomam a forma do recipiente; 3 = fezes moles, formadas e úmidas que marcam o chão; 4 = bem formadas e fezes consistentes que não marcam o chão; 5 = fezes bem formadas, duras e secas. Os valores entre 3 e 4 foram considerados adequados (Carciofi *et al.*, 2008).

As amostras de fezes foram descongeladas, homogeneizadas, pesadas e encaminhadas para estufa com ventilação forçada a 55°C durante 72 horas para a pré-secagem das amostras, reduzindo, assim, a umidade destas para que não ocorresse a fermentação em curto período. As amostras secas de fezes e alimentos extrusados foram moídas em moinho de faca tipo Willey (Modelo MA 580, Marconi Ltd., Piracicaba, Brasil) com peneira de 1 mm para as análises laboratoriais. Foram determinados os teores de matéria seca, matéria mineral, proteína bruta e extrato etéreo em hidrólise ácida para as fezes e alimentos (AOAC, 1995). Para determinação da matéria seca as amostras foram moídas em moinho de faca, pesadas e secas na estufa à 105°C por 24h e a matéria seca determinada por diferença de peso. A matéria orgânica foi calculada pela fórmula: %Matéria orgânica = 100 - %Matéria mineral. Extrativo não nitrogenado (%) foi considerado pela fórmula: 100 - (proteína bruta + fibra bruta + matéria mineral + extrato etéreo hidrólise ácida). A matéria mineral foi determinada com utilização de mufla à 450 °C por 4h. A energia bruta (EB) foi determinada por bomba calorimétrica (Parr Instrument Co., Model 1341, Molina, IL, Estados Unidos da América). Todas as análises foram realizadas em duplicata, sendo repetidas quando variavam em mais de 5%.

3.3.3 Determinação do pH fecal e Produtos de fermentação intestinal nas fezes

A coleta de fezes frescas foi realizada durante 3 dias consecutivos, onde as fezes foram coletadas e processadas em no máximo 15 minutos após a defecação. Cada amostra fecal foi identificada por dia, tratamento e animal e mantidas em refrigeração (2°C) até o final do período de coleta. Após a coleta, foi feito um pool das amostras por cão para determinação dos produtos fecais. O pH fecal foi determinado no canil e imediatamente após a coleta, utilizando-se dois gramas de material fecal diluídos em 6 ml de água miliq (1:3 v/v) e o pH medido com pH-metro de precisão 0,01 pH (modelo Mpa-210, MS Tecnopon Equipamentos Especiais Ltda, São Paulo) e a média destes valores empregada no estudo.

As análises laboratoriais dos produtos de fermentação intestinal foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Instrumental no Departamento de Engenharia Química (DEQ-UFPE), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Para a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC: acético, propiônico e butírico), ramificada (AGCR: valérico, iso-valérico, iso-butírico) e ácido láctico, foram utilizados dez gramas de fezes, diluídos em 30 ml de ácido fórmico 16%; 4,2N (1:3, v/v). Os extratos foram centrifugados a 3.500 rpm por 15 minutos à 15°C, sendo este procedimento repetido por 3 vezes, onde em cada repetição os sedimentos eram descartados e os sobrenadantes coletados. Após centrifugação, as amostras foram acondicionadas em tubos

vacutainer e congeladas à -15°C para posterior análise. As concentrações de AGCC e AGCR foram determinadas por cromatografia gasosa em cromatógrafo (Ciola e Gregory, modelo CGMASTER) com detector de ionização de chama, com vazão de hidrogênio de 2mL/min, em modo split 1:20, e separação analítica em coluna carbowax 60 m, d.i. 0,53 mm e espessura da fase estacionária 1,0 μm , com volume de injeção de 2,0 μL . Padrão de AGV Supelco CRM46975 Mix de ácidos graxos voláteis, e ácido láctico P.A. VETEC Inc. Após homogeneização de cada amostra foi coletado 2 μl por amostra de animal através da seringa de microlitro e injetado na máquina de cromatografia gasosa. Após iniciada a análise, foi aguardado todo padrão de curvas referente aos ácidos surgirem para encerrar a análise de cada amostra.

Para análise de ácido láctico foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando uma solução 0,5mmol/L de ácido sulfúrico com vazão 0,6 ml/min e coluna cromatográfica HPX87H para separação analítica em um detector de arranjo de iodo com comprimento de onda com 220 nm. Padrão utilizado para cálculos: Ácido láctico da nuclear com 85% de pureza.

As concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foram realizadas seguindo metodologia adaptada de Vieira (1980). Foram utilizadas alíquotas de 2ml preparadas anteriormente para determinação de ácidos graxos, diluídas em 13 ml de água destilada (2:13 v/v) e submetidas à destilação em destilador de nitrogênio (Tecnal TE - 036/1, Tecnal, Piracicaba, Brasil) utilizando 5 ml de hidróxido de potássio 2N. O destilado foi recebido em Erlenmeyer contendo 10 ml de ácido bórico 2% até atingir o volume de 50 ou 100ml para os extratos preparados com amostras de fezes. Após destilação, foi realizada a titulação do destilado com solução de HCl 0,05N para estimar a quantidade de N-NH₃ presente na amostra.

3.3.4 Avaliação do SRAA e Função Renal

Para avaliação do SRAA e função Renal através de amostras de sangue e urina, as análises laboratoriais foram realizadas por um laboratório privado especializado em análises veterinárias (Nlab diagnóstico, João Pessoa, Brasil).

Antes do início das coletas, os cães foram condicionados através de trabalho comportamental a entrar na sala de coleta para ambientação do local e minimizar possível estresse por se tratarem de cães de canil. Para avaliação do SRAA, amostras de sangue (3 mL) foram coletadas da veia jugular por venopunção nos dias 0, 60 e 120 (12 horas após alimentação). Para este procedimento, os animais foram mantidos em decúbito lateral através

de contenção manual. Sangue (3mL) foi coletado com agulha 25x 0,5mm e imediatamente transferido para tubos de coagulação. A relação aldosterona: creatinina urinária (UAldo:C) foi determinada nos mesmos dias de coleta (0, 60 e 120), a partir da coleta de 5 mL de urina por cistocentese, uma vez ao dia. A determinação da atividade sérica da ECA e concentração de aldosterona foi realizada seguindo mesmo protocolo descrito no teste de eficácia.

Para função renal, as amostras de sangue (3mL) foram coletadas da veia jugular por venopunção com agulha 25x 0,5mm e imediatamente transferidos para tubos de dosagem bioquímica, sem anticoagulante e com gel separador, posteriormente centrifugadas durante 10 min a 1400 rpm a 4°C para a obtenção de soro. Posteriormente foram guardadas em tubos a -80°C, até o momento da análise. Foram realizadas as seguintes análises: perfil bioquímico incluindo creatinina, sódio e potássio.

A análise de urina incluiu gravidade específica da urina, exame de fita reagente, avaliação microscópica do sedimento urinário, uCr, eletrólitos urinários (sódio e potássio). A dimetilarginina simétrica (SDMA) foram mensuradas para a determinação alteração da função renal. Os bioquímicos foram medidos usando métodos colorimétricos comercialmente disponíveis.

A excreção fracionada (EF) de eletrólitos, incluindo sódio e potássio foram calculados de acordo com a equação relatada por Brown et al. (2015):

$$EFX = uX \text{ sCr} / uCr \text{ sX} \text{ (com base na amostra pontual de urina)}$$

Onde: uX e sX são as concentrações de um analito específico na urina e no soro, respectivamente. Além disto, foram realizadas mensurações da relação aldosterona:creatinina urinária (UAldo:C), com o intuito de mensurar ativação do sistema SRAA causada pela dieta.

3.3.5 Função Cardíaca

Ecocardiografia

Para estudo das possíveis alterações morfológicas e das funções sistólica e diastólica foi realizado exame ecocardiográfico por meio de sistema de ultrassom MyLab™Alpha [(Esaote), Gênova, Itália], optando-se por uma sonda de 3 - 8 MHz, que permitiu uma resolução suficiente, proporcionando a penetração necessária. Após realização de tricotomia da região torácica direita e esquerda, os cães foram contidos em decúbito lateral para a realização do estudo, sempre acompanhado por registro eletrocardiográfico. As imagens padrão foram obtidas seguindo recomendações previamente estabelecidas por Boon (2011) e pela Sociedade Americana de Ecocardiografia (Nagueh *et al.*, 2016) no que tange a ecocardiográfica convencional e tecidual.

Avaliação morfológica

As avaliações compreenderam os modos bidimensional, modo-M, Doppler pulsado, contínuo, fluxo em cores e tecidual. No corte transversal da janela paraesternal direita foi obtida imagem em modo-M, no plano cordal, posicionando o cursor perpendicularmente ao septo interventricular e equidistante dos músculos papilares. A partir desta imagem, durante a diástole e sístole, foram obtidas variáveis ecocardiográficas tais como diâmetro interno do ventrículo esquerdo no final da diástole (DIVED), dimensão interna do ventrículo esquerdo no final da sístole (DIVES), espessura da parede livre do ventrículo esquerdo (EPLVE) e septo interventricular (SIV) e, finalmente, fração de encurtamento (FS%) e fração de ejeção (FE%) pelo método de Teichholz. Os diâmetros do átrio esquerdo (AE) e aórtico (Ao) foram medidos a partir da imagem 2D ao nível da válvula aórtica, na imagem transversal da janela paraesternal direita, determinando-se a relação AE e Ao (LA:Ao). A DIVED com relação à aorta (DIVED:Ao), bem como a DIVES com relação à aorta (DIVES:Ao) foram determinadas. A velocidade de fluxo da artéria pulmonar foi determinada pelo uso do Doppler pulsado.

Avaliação da função diastólica

As velocidades Doppler do fluxo mitral e aórtico foram adquiridas nas janelas apicais paraesternal esquerda utilizando cortes de quatro e cinco câmaras, respectivamente. O fluxo mitral foi avaliado no corte apical de quatro câmaras com amostra colocada na altura das pontas do folheto mitral. As velocidades de enchimento ventricular esquerdo precoce (E) e tardio (A), da mesma maneira que a relação das velocidades de enchimento ventricular esquerdo precoce e tardio (E/A) foram determinadas. O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi medido como intervalo de tempo entre o final do fluxo aórtico e o início do influxo mitral pelo Doppler pulsado. Imagens de Doppler tecidual (TDI) foram obtidas no local de inserção septal e lateral do anel mitral e as velocidades de excursão sistólica (S'), velocidade de excursão diastólica precoce (E') e velocidade de excursão diastólica tardia (A') foram mensuradas (Boon, 2011).

3.4 Estudo 2: Eficácia da Proteína Hidrolisada de Frango na inibição da enzima conversora de angiotensina em cães com SRAA ativado.

Para o estudo 2, foram utilizadas as mesmas dietas descritas no estudo 1: 1) dieta de manutenção com 32% de FVC e 2) dieta 1 com substituição de 10% da FVC por PHF.

Para avaliar a eficácia da PHF em auxiliar na inibição do SRAA, esta precisa estar ativado no organismo, o que ocorre com animais acometidos por doenças e que, conseqüentemente precisariam de tratamento farmacológico. Uma vez que submeter animais

doentes a uma terapia alternativa de eficácia não comprovada pode representar uma infração à ética, o presente teste foi proposto como uma alternativa validada para investigar a eficácia do ingrediente, utilizando animais saudáveis.

Para a determinação da eficácia do ingrediente na inibição do SRAA, foi realizado teste utilizando 5 cães clinicamente saudáveis (idade $3,7 \pm 2,1$ anos; peso corporal $15,8 \pm 2,9$ kg; ECC $4,6 \pm 0,5$), atestados por exames bioquímicos de função renal e hepática, urinálise, hemograma, ecocardiografia e eletrocardiografia, com duração de 32 dias. Ao final do teste, todos os cães foram reavaliados, com o objetivo de determinar possíveis alterações nos sistemas renal e/ou cardíaco.

O protocolo foi adaptado de estudos feitos anteriormente em cães (Lantis *et al.*, 2015; Ames *et al.*, 2016; Sakatani *et al.*, 2016; Konta *et al.*, 2018). Antes do início do estudo e da ativação do SRAA (dia -12 ao dia 0), os cães receberam apenas uma dieta extrusada (FVC: 26,5% PB e 14% gordura, contendo 31,91% de FVC) em quantidade suficiente para atender sua necessidade energética de manutenção (95 kcal/kg PM), dividida em duas porções iguais oferecidas às 8h e às 20h. Esta fase serviu para adaptação dos cães à dieta, sem uso de fármaco. A partir do dia -6 até o dia 0 os cães consumiram FVC e foram medicados com furosemida (2 mg/kg, 12h, PO, 8h e 20h). Com o início do teste do dia 0 ao dia 20, o alimento teste foi fornecido, PHF (apresentava mesma composição da dieta FVC, porém com inclusão de 10% de PHF hidrolisada, em substituição à FVC convencional) além do uso continuado de furosemida. Para manter o SRAA ativado, cada cão recebeu furosemida por 26 dias (dia -6 ao dia 20).

A atividade sérica da ECA e concentração sérica de aldosterona foram determinadas em amostras de sangue (3 mL) coletadas da veia jugular por venopunção nos dias -6, 0, 2, 7 e 20, (sempre 6 horas após a primeira alimentação do dia, no pico de inibição da atividade de ECA nos inibidores da ECA), a fim de avaliar o tempo e a magnitude da resposta do SRAA. A UAldo:C foi determinada nos mesmos dias de coleta (-6, 0, 2, 7 e 20), a partir da coleta de 5 mL de urina por cistocentese no mesmo momento da coleta de sangue. Todas as amostras coletadas de sangue foram centrifugadas 10 minutos após a coleta, e o soro separado e armazenado a -80° C, assim como as amostras de urina, até posterior análise. A atividade da ECA sérica foi medida seguindo o método fluorométrico relatado por Yang e Neff (1972) e a aldosterona foi medida por quimioluminescência (Stabler e Siegel 1991) por um laboratório privado especializado em análises veterinárias (Nlab diagnóstico, João Pessoa, Brasil).

3.5 Análise Estatística

Todas as variáveis foram verificadas quanto à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Para a determinação do efeito da dieta em longo prazo nos sistemas orgânicos, ECA e aldosterona, os dados foram analisados usando ANOVA modelo misto com dois fatores [grupo (Duas dietas: FVC e PHF) x tempo (Três momentos: 0, 60, 120 dias de consumo das dietas)] com medidas repetidas do fator [tempo]. Os dados da digestibilidade e produtos de fermentação foram submetidos à análise de variância e teste de F. As análises estatísticas foram realizadas no software SigmaPlot v.12.0 com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo 1: Proteína Hidrolisada de Frango em dieta para cães: Digestibilidade e efeito do consumo a longo prazo na atividade da ECA, função renal e cardíaca.

4.1.1 Consumo, digestibilidade e Produtos de fermentação intestinal

Durante o período experimental, todos os animais permaneceram saudáveis com base na ausência de sinais clínicos e parâmetros sanguíneos normais. Todos os cães mantiveram peso e escore corporal adequados. As dietas foram bem aceitas pelos animais, os quais não apresentaram quadros de recusa, diarreia ou vômito. O consumo médio calórico de alimentos para ambas as dietas durante os 120 dias de consumo foi $30,94 \pm 3,38$ e $30,44 \pm 1,89$ g/kg^{0,75} por dia para as dietas FVC e PHF, respectivamente.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de ingestão dos nutrientes pelos cães durante o ensaio. Observou-se diferença na ingestão dos nutrientes entre os dois tratamentos. Esta diferença pode estar relacionada a composição química analisada das dietas FVC e PHF observado na Tabela 1.

Os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, extrato etéreo, proteína bruta, energia bruta, extrativos não nitrogenado e fibra bruta das dietas experimentais estão apresentados na Tabela 4. A digestibilidade aparente dos nutrientes foi semelhante entre os tratamentos FVC e PHF ($P > 0,05$), exceto para a FB ($p = 0,038$), que foi maior para o tratamento PHF.

Tabela 4. Ingestão de nutrientes e coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e energia metabolizável das dietas FVC e PHF.

Item	FVC	PHF	P valor ¹
	Consumo de alimento		
Matéria seca (g/kg ^{0,75} /dia)	$28,5 \pm 0,3$	$29,2 \pm 0,6$	<0,001
Energia metabolizável (kcal/kg ^{0,75} /dia)	$107 \pm 1,19$	$112 \pm 3,31$	0,013
	Coeficiente de digestibilidade aparente (%)		
Matéria seca	$82,43 \pm 1,23$	$82,57 \pm 1,85$	0,442
Matéria orgânica	$86,65 \pm 1,49$	$86,55 \pm 1,07$	0,902

Extrato Etéreo	93,57 ± 0,79	93,98 ± 0,77	0,134
Proteína Bruta	85,85 ± 1,61	86,10 ± 1,54	0,373
Energia Bruta	86,56 ± 0,88	85,67 ± 1,88	0,134
Extrato NN	87,63 ± 2,00	86,97 ± 1,49	0,238
Fibra Bruta	9,59 ± 17,26	28,22 ± 18,68	0,038
EM (kcal/kg) ²	3.780 ± 60	3.810 ± 80	0,230

¹ Foi estabelecido nível de significância de 5% (P<0,05) e tendências consideradas quando 0,05≤P≤0,010. ²Energia Metabolizável. Extrativo Não Nitrogenado³.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados de características fecais e produtos finais da fermentação. Não foram encontradas diferenças significativas (P>0,05) no escore fecal, no entanto o pH fecal dos cães que consumiram PHF foi menor em comparação à dieta FVC (P=0,048).

Não foi verificada diferença significativa entre as dietas para nenhum produto final de fermentação, embora para acetato (p=0,068), propionato (p=0,061), AGCC (p=0,079) e AGVs totais (p=0,079) verificou-se uma tendência a serem superiores na dieta PHF.

Tabela 5. Características fecais e produtos finais da fermentação de cães alimentados com FVC e PHF.

Item	FVC	PHF	P valor ⁵
Escore Fecal	3,9 ± 0,1	3,9 ± 0,1	0,694
pH	6,3 ± 0,2	6,1 ± 0,2	0,048
N-NH ₃ ¹ (mmol/g MS)	167 ± 29,7	161 ± 31,7	0,536
Ácido láctico (mmol/g MS)	88,3 ± 28,1	88,5 ± 30,3	0,364
AGCC ² (mmol/gMS)	471 ± 110	518 ± 87,6	0,079
<i>Acetato</i>	276 ± 116	302 ± 48,7	0,068
<i>Propionato</i>	143 ± 35,6	161 ± 32,8	0,061
<i>Butirato</i>	51,8 ± 15,8	56,5 ± 16,4	0,108
AGCR ³ (mmol/gMS) ²	6,33 ± 6,78	7,89 ± 6,67	0,613
<i>Isobutirico</i>	0,53 ± 0,32	0,44 ± 0,31	0,463
<i>Isovalerato</i>	4,56 ± 6,39	6,34 ± 6,25	0,119
<i>Valerato</i>	1,24 ± 0,71	1,15 ± 0,72	0,391
AGVs ⁴	477 ± 110	523,5 ± 90	0,079

¹Amônia. ²Ácidos graxos de cadeia curta. ³Ácidos graxos de cadeia ramificada. ⁴Ácidos graxos voláteis. ⁵ Foi estabelecido nível de significância de 5% (P<0,05) e tendências consideradas quando 0,05≤P≤0,010.

4.1.2 Parâmetros Bioquímicos

Na Tabela 6 encontram-se os hormônios relacionados ao sistema SRAA (ECA, aldosterona e UAld/Cr) e os parâmetros bioquímicos relacionados à função renal: creatinina, uréia, SDMA, Na⁺, K⁺, e excreção fracionada (EF) de Na⁺ e K⁺, dos cães durante o período experimental de 120 dias.

A creatinina, ureia, SDMA, K, EFNa e EFK apresentaram efeito com relação ao tempo ($p < 0,05$), sem efeito de dieta, mas permaneceram dentro dos intervalos de referência. A relação UAldo/C não foi alterada ao longo do tempo ou pelos tratamentos (grupo: $p = 0,916$; tempo: $p = 0,481$; interação: $p = 0,519$).

Os parâmetros ureia e SDMA apresentaram efeito do intervalo ($p = 0,013$ e $p = 0,009$ respectivamente).

A excreção fracionada de Na⁺ aumentou nos dois grupos nos dias 60 e 120 ($> 1\%$), ficando acima do limite superior de normalidade ao longo do tempo ($p < 0,001$). As concentrações de aldosterona apresentaram diminuição no dia 60 para os tratamentos FVC e PHF e efeito no intervalo (tempo) ($p < 0,001$), sem uma diminuição das concentrações de ECA para o mesmo período. No entanto, no momento 120 dias, as concentrações de ECA foram menores para as duas dietas, sugerindo um efeito a longo prazo ($p < 0,001$).

Tabela 6. Hormônios e parâmetros bioquímicos mensurados em cães durante os 120 dias de consumo de PHF e FVC.

	Valores de Referência	FVC			PHF			P ¹ grupo	P ¹ tempo	P ¹ interação
		Basal	60 dias	120 dias	Basal	60 dias	120 dias			
Creatinina (mg/dl)	0,5-1,5	0,96 ± 0,28 ^a	1,47 ± 0,38 ^b	1,33 ± 0,37 ^b	0,99 ± 0,26 ^a	1,43 ± 0,45 ^b	1,3 ± 0,33 ^b	0,601	<0,001	0,391
Ureia (mg/dl)	21-66	39,0 ± 16,54 ^a	55,36 ± 11,8 ^b	50,91 ± 14,9 ^{ab}	42,75 ± 12,03	52,50 ± 12,8	44,4 ± 11,9	0,689	0,013	0,96
SDMA (µg/dL) ²	< 14,0	9,71 ± 1,7 ^a	10,83 ± 1,94 ^{ab}	10,53 ± 1,78 ^b	10,25 ± 2,49	12,25 ± 1,98	12,1 ± 1,5	0,958	0,009	0,532
Na (mEq/L) ³	140- 152	146,9 ± 14,2	149,6 ± 12,5	149,2 ± 4,83	145,4 ± 6,7	151,6 ± 10,2	144 ± 6,4	0,711	0,282	0,511
K (mEq/L) ⁴	3,60 – 6,00	4,91 ± 0,80	5,64 ± 0,37	4,90 ± 0,55	4,89 ± 0,88 ^a	5,93 ± 0,68 ^b	4,9 ± 0,24 ^a	0,689	<0,001	0,701
EFNa (%) ⁵	<1	0,62 ± 0,28 ^a	2,72 ± 0,64 ^b	3,25 ± 2,06 ^b	0,54 ± 0,16 ^a	2,78 ± 1,26 ^b	2,7 ± 1,35 ^b	0,562	<0,001	0,735
EFK (%) ⁶	< 30	1,44 ± 0,68 ^a	2,61 ± 0,68 ^b	1,09 ± 0,66 ^a	0,92 ± 0,31 ^a	2,65 ± 0,99 ^b	0,91 ± 0,7 ^a	0,377	<0,001	0,451
ECA (u/L) ⁷	8,0 – 45,0	39,2 ± 10,0 ^a	31,3 ± 5,1 ^a	23,0 ± 7,4 ^b	34,8 ± 10,6 ^a	34,6 ± 6,02 ^a	21,7 ± 4,2 ^b	0,762	<0,001	0,281
Aldosterona (pg/ml) ⁸	6,7 - 253,6	44,2 ± 19,4 ^a	17,1 ± 1,6 ^b	39,2 ± 9,1 ^a	49,4 ± 20,6 ^a	18,8 ± 3,8 ^b	39,8 ± 18,1 ^a	0,505	<0,001	0,904
UAld/Creat (ug/g) ⁹	-	3,53 ± 2,37	3,76 ± 1,10	2,87 ± 1,34	3,84 ± 1,73	3,0 ± 0,48	3,19 ± 1,0	0,916	0,481	0,519

Letras diferentes (a,b,c) na linha indicam diferenças significativas entre as médias dos tratamentos. ¹ Foi estabelecido nível de significância de 5% (P<0,05) e tendências consideradas quando 0,05 ≤ P ≤ 0,010. ² Dimetilarginina Simétrica. ³ Sódio. ⁴ Potássio. ⁵ Excreção Fracionada de Sódio. ⁶ Excreção Fracionada de Potássio. ⁷ Enzima Conversora de Angiotensina. ⁸ Aldosterona. ⁹ Relação Aldosterona:Creatinina.

4.1.3 Função Cardíaca

Não foi possível mensurar e avaliar a pressão arterial sistólica de maneira fidedigna, uma vez que os cães se apresentaram estressados no momento da mensuração desta variável, gerando dados inconsistentes e que não puderam ser utilizados na avaliação.

Na Tabela 7 apresentam-se os parâmetros ecocardiográficos dos cães nos tempos 0, 60 e 120 dias de consumo das dietas FVC e PHF. A ecocardiografia permite a avaliação segura do coração e seu funcionamento. De acordo com os parâmetros observados no exame, houve efeito de interação para a E/TRIV ($p=0,031$). Para os demais parâmetros avaliados (LVDd, LVDs, EF%, AE/Ao, LVDdNN, E/A, E'A', E'A'(M), E'A'(L) e E'E'), não se verificou efeito significativo para grupo, intervalo ou interação. Não houve efeito de dietas sobre nenhum dos parâmetros cardíacos ($p>0,05$).

Tabela 7. Parâmetros Ecocardiográficos de cães alimentados com FVC e PHF.

	FCV			PHV			P valor ¹		
	Basal	60 dias	120 dias	Basal	60 dias	120 dias	grupo	tempo	interação
LVDd ²	34,5± 7,9	33,7 ± 7,1	34,8 ± 6,2	33,3± 5,8	34,3± 5,5	33,9 ± 7,4	0,875	0,76	0,31
LVDs ³	22,6± 4,8	22,2± 5,7	22,8 ± 5,2	21,6 ± 5,0	21,9 ± 4,6	9,4± 2,2	0,773	0,979	0,727
EF%, ⁴	65,0± 4,1	65,0 ± 6,3	65,1± 7,3	65,4 ± 8,0	66,6± 8,9	64,8± 9,6	0,888	0,877	0,849
AE/Ao ⁵	1,25 ± 0,1	1,26 ± 0,2	1,22 ± 0,08	1,25 ± 0,06	1,15± 0,08	1,18 ± 0,08	0,08	0,106	0,104
LVDdNN ⁶	1,58 ± 0,05	1,55 ± 0,1	1,59 ± 0,07	1,62 ± 0,12	1,60 ± 0,04	1,58 ± 0,05	0,299	0,652	0,652
E/A ⁷	1,42 ± 0,21	1,40 ± 0,19	1,66 ± 0,19	1,49 ± 0,25	1,38 ± 0,20	1,47 ± 0,23	0,587	0,501	0,18
E/TRIV ⁸	1,36 ± 0,22	1,37± 0,28	1,80 ± 0,52 ^a	1,46 ± 0,43	1,50 ± 0,33	1,48 ± 0,48	0,876	0,033	0,031
E'A'(M) ⁹	1,67 ± 0,49	1,46 ± 0,27	1,48 ± 0,22	1,45 ± 3,6	1,38 ± 0,27	1,31 ± 0,33	0,252	0,244	0,807
E'A'(L) ¹⁰	1,6 ± 0,24	1,7 ± 0,32	1,67 ± 0,17	1,53 ± 0,29	1,54 ± 0,45	1,48 ± 0,42	0,325	0,809	0,827
E/E' ¹¹	8,56± 1,53	9,6 ± 1,17	10,1 ± 1,48	9,13 ± 1,25	8,95 ± 2,63	8,88 ± 1,24	0,64	0,438	0,347

¹ Foi estabelecido nível de significância de 5% ($P<0,05$) e tendências consideradas quando $0,05\leq P\leq 0,010$. ²Diást-Diâmetro VE; ³ Diástole Parede Post; ⁴ Fração Ejeção; ⁵Diâm Atrio/AO Esq/Área Aortica (d); ⁶ Vel Pico Mitral Onda E; ⁷ Vel Pico Mit Ond A/ Temp Relax Isovol Mitral; ⁸Onda E' Septal; ⁹Razão E'/A' Septal; ¹⁰Razão E'/A' Lateral; ¹¹Razão E'/E' Lateral;

4.2 Estudo 2: Eficácia da Proteína Hidrolisada de Frango na inibição da enzima conversora de angiotensina em cães com SRAA ativado.

Na Tabela 8 encontram-se os valores de ECA, Aldosterona (Aldo) e a relação Aldosterona/Creatinina na urina (UAld/cr) obtidos durante o teste de ativação. A atividade sérica da ECA foi significativamente reduzida no dia 2 (2 dias após o início do consumo de PHF; $p=0,049$), em comparação ao dia -6 (antes do início do consumo da dieta PHF e uso de furosemida).

Com relação à aldosterona sérica ($p=0,036$), está também foi menor no dia 2, sendo que a diminuição das concentrações de aldosterona acompanharam a diminuição das concentrações de ECA. Contudo esta redução verificada no dia 2, também não foi mantida, e aumentou no dia 7 e 20, caracterizando um efeito rebote desta resposta fisiológica, por possível ativação de outros mecanismos. A UAld/cr ($p=0,080$) não apresentou alteração significativa durante o estudo, embora houve um aumento.

Tabela 8. Parâmetros bioquímicos do teste de eficácia da PHF.

Consumo		Dieta FVC		Dieta PHF				
Uso de fármaco	Fase de adaptação (sem uso de fármaco)	Uso de furosemida (2 mg/kg PC, BID)						p ¹
		Dia -12	Dia -6	Dia 0	Dia 2	Dia 7	Dia 20	
ECA	-	37,8 ± 10,36 ^a	34,0 ± 10,12 ^{ab}	20,25 ± 7,27 ^b	33,57 ± 4,50 ^{ab}	29,00 ± 1,41 ^{ab}	0,049	
Aldo (pg/ml) ²	-	51,72 ± 15,55 ^{ab}	52,00 ± 12,98 ^{ab}	42,50 ± 15,41 ^a	67,65 ± 7,30 ^b	65,97 ± 3,22 ^{ab}	0,036	
UAld/Cr (ug/g) ³	-	1,70 ± 0,49	2,75 ± 0,89	2,65 ± 0,86	3,24 ± 0,98	3,75 ± 0,69	0,080	

Letras diferentes (a,b,c) na coluna indicam diferenças significativas entre as médias dos tratamento.

5 DISCUSSÃO

A inclusão de 10% de PHF não afetou a digestibilidade dos nutrientes da dieta em estudo. Apesar de altos valores, a digestibilidade aparente dos nutrientes foi semelhante entre os tratamentos ($p>0,05$). A PHF é um ingrediente disponível no mercado e já utilizado pela indústria de *pet food* como fonte de proteína animal de alta digestibilidade e qualidade. Embora estudo feito por Akness *et al.* (2006) relate que o processo de hidrólise do ingrediente de origem animal, em que ocorre o rompimento das ligações peptídicas formando um produto com menor peso molecular, favoreça a absorção dos nutrientes, tornando-os mais digestíveis (Akness *et al.*, 2006), nas condições e inclusão do ingrediente utilizada no presente estudo, este efeito não foi observado. Esse resultado pode ser justificado pelo fato de a PHF ter sido incluída em apenas 10% em substituição da FVC. Outro fator pode ser relacionado à alta qualidade e digestibilidade da FVC empregado no estudo, e quando comparada com a dieta contendo PHF possui resultados equivalentes, podendo ser igualmente digeridos e absorvidos pelos cães, além do fato de ter sido empregado método para determinação da digestibilidade aparente dos nutrientes, e não digestibilidade verdadeira, o que pode não ter sido um limitante na identificação de diferenças. Estes resultados corroboram com os apresentados por Zóia *et al.*, (2021) em que avaliou a digestibilidade de dietas contendo FVC e PHF para gatos e verificou que as dietas tiveram valores semelhantes.

Estudos feitos por Adler-Nissen J., (1986), Giese, J., (1994) demonstram que a hidrólise enzimática proteica aumenta a digestibilidade do ingrediente, principalmente com relação à proteína bruta. Nas condições e inclusão do ingrediente utilizado no presente estudo, este efeito não foi observado. Numericamente, a proteína bruta da PHF foi superior a FVC ($p=0,373$), no entanto não foi significativo. Corroborando com os dados do estudo, Tjernsbekk *et al.* (2017) avaliaram a qualidade da proteína de carne de frango mecanicamente separada e proteína hidrolisada de salmão em substituição parcial à farinha de aves (25% da PB dietética) em alimentos extrusados para cães, a digestibilidade aparente do trato total, utilizando *Neovision vision*, mostrou que a PB da farinha de aves convencional foi superior a proteína hidrolisada de salmão (80,3% e 79,0 % respectivamente), possivelmente porque a extrusão afetou a digestibilidade aparente do trato total das dietas de forma diferente, devido às diferentes propriedades de processamento dos três ingredientes proteicos.

Com relação à ingestão de nutrientes, numericamente os valores foram semelhantes, porém teve diferença significativa entre as dietas ($p < 0,001$). Esta diferença pode ser justificada pelo teor de energia metabolizável diferente de cada dieta, diferença na quantidade de alimento fornecida no estudo para os cães de diferentes portes e pela diferença na composição química analisada das dietas, nos teores de: matéria orgânica, matéria mineral, extrato etéreo hidrólise ácida, proteína bruta, energia bruta e energia metabolizável. Apesar de diferente estatisticamente, as diferenças na ingestão dos nutrientes foram consideradas mínimas, sem provável impacto na avaliação aparente da digestibilidade do ingrediente e resposta fisiológica dos animais.

A funcionalidade e qualidade das dietas para cães também pode ser relacionada aos produtos da fermentação intestinal gerados em resposta ao seu consumo já que os nutrientes presentes nos alimentos serão fermentados e disponíveis para ação bacteriana, sendo substrato para fermentação intestinal (Drochner e Meyer, 1991). Para os produtos finais da fermentação fecal e as características fecais, pode-se observar no estudo que cães alimentados com FVC apresentaram pH fecal ligeiramente superior ao dos cães alimentados com PHF ($p = 0,048$). Fezes mais ácidas são resultado da presença de ácidos gerados no processo de fermentação microbiana. Verificou-se uma tendência a maior produção de ácidos graxos de cadeia curta, como acetato e propionato, nas fezes dos cães alimentados com PHF. Esta tendência pode estar relacionada ao cozimento das dietas e disponibilidade de substratos que chegaram para a microbiota intestinal durante a avaliação. A extrusão de dietas contendo ingredientes hidrolisados pode ser afetada pela higroscopicidade do ingrediente, o que requer ajuste nos parâmetros do processo como inclusão de água e vapor, podendo afetar seu cozimento. No presente estudo, a dieta PHF apresentou menor tempo de residência no canhão da extrusora e maior densidade (410 g/L), em relação a dieta FVC (340 g/L).

Os ingredientes hidrolisados proteicos vêm sendo cada vez mais estudados não apenas por conferirem propriedades nutricionais, mas também por serem fonte de peptídeos bioativos (Jamdar, Rajalakshmi e Sharma, 2012). Segundo Sangsawad et al. (2017), os peptídeos bioativos advindos da hidrólise provenientes da musculatura do frango, são capazes de inibir a ECA. Os peptídeos inibidores da ECA têm sido estudados e os resultados indicam sua eficácia na redução ou eliminação da hipertensão em pacientes humanos (Iwai et al., 2009) e ratos hipertensos (Yu et al., 2014). A ECA desempenha um papel importante no SRAA que faz parte do controle da pressão arterial

e da homeostase do sódio, através de processos integrados nos sistemas renal e cardiovascular (Araujo *et al.*, 2022). Na medicina veterinária os iECA (anti-hipertensivos) são utilizados como primeira opção no tratamento da hipertensão arterial sistêmica em cães (Brown *et al.*, 2007). Porém, efeitos adversos vêm sendo constatados no emprego desses agentes farmacológicos. Feijó *et al.*, (2016) em revisão de literatura sobre a fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica em pequenos animais, constatou que o uso desses fármacos pode proporcionar piora da função renal em pacientes desidratados, insuficientes cardíacos, em tratamento ou uso de anti-inflamatórios e/ou portadores de doença renal crônica (DRC), pois ocorre acionamento do mecanismo compensatório que aumenta a produção local de angiotensina II. Spiller (2014) relatou que os efeitos clínicos relacionados à ingestão de inibidores de ECA podem estar relacionados a sobredosagem, incluindo hipotensão com ou sem taquicardia e alterações nos níveis de consciência que são diretamente relacionados com alterações vasculares; além disso, os efeitos adversos podem ser observados em doses terapêuticas, sendo relatado angiodema, reações dérmicas e broncoespasmo. Dessa forma, a busca por terapias alternativas e/ou complementares aos medicamentos anti-hipertensivos se mostram fundamentais, principalmente como forma de evitar os efeitos adversos mencionados. Bechaux *et al.*, (2019) consideraram numa revisão abrangente de peptídeos bioativos que como a maioria dos medicamentos contra hipertensão no mercado induzem a efeitos colaterais significativos, os peptídeos bioativos anti-hipertensivos extraídos das proteínas alimentares irão construir moléculas naturais de interesse com efeitos colaterais limitados.

No que diz respeito a administração destes peptídeos bioativos, quando presentes em ingredientes e compoendo alimentos para animais, o processo de digestão e absorção destes ativos, devem ser levados em consideração. Para promover efeitos fisiológicos após seu consumo, os peptídeos bioativos dependem da capacidade efetiva de absorção e capacidade de atingir de forma ativa seus órgãos-alvo. Estudos demonstram que as moléculas de peptídeos devem ter resistência as enzimas gastrointestinais e da membrana da borda em escova no epitélio intestinal (Foltz, M *et al.*, 2008). Os peptídeos devem permanecer inalterados para serem entregues ao sitio ativo se forem usados no tratamento de hipertensão ou doença cardíaca. Devem ser resistentes a digestão por enzimas gastrointestinais, embora se pensasse apenas que os peptídeos eram rapidamente metabolizados em aminoácidos e absorvidos sem possíveis resistências aos diversos

processos fisiológicos do corpo (Ohsawa, K *et al.*, 2008). Segundo Hernández-Ledesma *et al.*, (2011) uma vez ingeridos, as proteínas submetidas a hidrólise ao chegar no organismo irão sofrer ação de diferentes enzimas presentes no trato gastrointestinal, como pepsina, tripsina, quimiotripsina e peptidases na superfície das células epiteliais, liberando peptídeos bioativos e alguns destes podem exercer função direta no TGI, no entanto, outros podem ser absorvidos para atingir órgãos ou tecidos alvos através da circulação sistêmica. Estes fatores também devem ser levados em consideração quando interpretamos a efetividade de peptídeos bioativos em inibir a ECA

No estudo 2, o teste de eficácia da PHF em inibir a ECA em cães com SRAA ativado, revelou que a atividade sérica da ECA foi significativamente reduzida no dia 2 (2 dias após o início do consumo de PHF; $P=0,049$), em comparação ao dia -6 (antes do início do consumo da dieta PHF e uso de furosemida). Estes resultados corroboram com estudo realizado por Jamdar *et al.* (2012), que demonstrou que as proteínas oriundas da hidrólise de vísceras de aves têm capacidade inibitória da ECA. Contudo, no presente estudo, este efeito não persistiu ao longo do tempo, no qual as concentrações de ECA voltaram a ser similares às medições iniciais (dia 7), voltando a reduzir no dia 20. De acordo com estes achados, a inclusão de 10% da PHF na dieta pode não ter sido suficiente para causar um efeito persistente na inibição da ECA ao longo do tempo. Estudo anterior utilizando gatos saudáveis, onde a inclusão do ingrediente foi maior (25%), observou efeito da dieta na inibição da ECA, após 6 dias de consumo do alimento (Zóia *et al.*, 2021). Quando comparado aos resultados de estudos que utilizaram o mesmo modelo de ativação do SRAA, utilizando furosemida e cães saudáveis, mas desafiados com o uso de enalapril e benazepril; verificou-se que os fármacos foram eficientes em bloquear a ECA e esse efeito se manteve com o tempo (Lantis *et al.*, 2015; Ames *et al.*, 2016). Medicamentos apresentam diferente cinética de absorção e excreção, além de doses já conhecidas para melhor eficácia, sendo necessário mais estudos para compreender as doses superiores da PHF apresentam maior eficácia no bloqueio da ECA. Outro fator pode estar atrelado a absorção ou falta de absorção pelos animais com relação aos peptídeos bioativos. Estudos, mostram que alguns peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina podem demonstrar fraca atividade anti-hipertensiva pela alteração da molécula antes de atingir a enzima ECA alvo no sistema circulatório (Fujita, H *et al.*, 1995). Os peptídeos bioativos são capazes de inibir a ECA por meio de dois mecanismos distintos. O primeiro envolve a ligação desses peptídeos ao seu sítio ativo e

o segundo ocorre modificando sua conformação ao ligar-se a um sítio inibidor, impedindo a ligação da Ang I ao local ativo (Ryan *et al.*, 2011). A composição dos peptídeos e sua estrutura molecular é uma possível causa da atividade anti-hipertensiva. Resíduos de aminoácidos hidrofóbicos com cadeias laterais alifáticas, como G, A, V, L e I, no terminal C foram associados a um aumento significativo na atividade inibitória da ECA devido à maior capacidade de ligação com a ECA do que no caso de outros aminoácidos (Lee, SY *et al.*, 2019). Zhang *et al.*, (2020) mostrou que a propriedade inibidora da ECA está associada ao triptofano no terminal C, que tem como função bloquear o sítio ativo na enzima por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas, de van der Waals e de ligações de hidrogênio. Ademais a massa molecular também irá determinar a eficácia na atividade inibitória da ECA em comparação com peptídeos maiores.

Durante a avaliação, a UAldo/cr não apresentou alteração durante o estudo, embora tendeu ao aumento. Esta tendência provavelmente aconteceu pelo aumento da liberação de aldosterona sérica verificada ao longo do tempo. Este resultado demonstra que o consumo de PHF não teve um efeito sobre o escape de aldosterona durante o teste (Lantis *et al.*, 2015; Ames *et al.*, 2016). Possivelmente, o baixo efeito no bloqueio da ECA não causou o mesmo escape de aldosterona visto em estudos anteriores utilizando Enalapril ou Benazepril como inibidores da ECA (Lantis *et al.*, 2015; Ames *et al.*, 2016).

Garay *et al.*, (2022) numa revisão de literatura, demonstraram que pesquisas existentes sobre os peptídeos bioativos oriundos de diferentes subprodutos de aves e sua atividade biológica demonstram viabilidade no aproveitamento e aplicação desse ingrediente funcional na indústria alimentícia e como agentes protetores da saúde na indústria farmacêutica, pois na sua atividade anti-hipertensiva, pesquisas demonstram que os peptídeos irão estar relacionados no controle da pressão arterial, muito além de somente inibir a ECA, seu consumo está sendo atrelado a expressão de genes envolvidos na alteração da função endotelial que estimula a produção de vasoconstritores e agentes pró-inflamatórios em um ambiente de estresse oxidativo.

Com relação ao consumo das dietas em longo prazo, com vistas a compreender efeito do consumo crônico de PHF por cães saudáveis, verificou-se que o consumo de PHF por 120 dias, não promoveu alterações significativas nos parâmetros bioquímicos avaliados e os animais permaneceram saudáveis e sem alterações clínicas durante todo o período de avaliação. Os hormônios ECA ($p < 0,001$) e aldosterona ($p < 0,001$) séricos,

tiveram efeito de tempo com flutuações durante o período de 120 dias, mas não foi identificado um efeito claro de dieta. Isto pode estar relacionado com a inclusão de apenas 10% do ingrediente hidrolisado no alimento ou pelo fato dos animais utilizados no estudo serem saudáveis e não terem o SRAA ativado. Estudo feito por Zóia *et al.*, (2021) onde a inclusão do ingrediente hidrolisado para gatos saudáveis foi maior (24,72%) foi possível verificar alteração na atividade sérica da ECA. Pode-se inferir que os valores de ECA e aldosterona obtidos estavam dentro do intervalo de referência, demonstrando que nesta concentração o ingrediente não altera estes parâmetros, sendo segura a oferta a longo prazo de PHF para cães. Cave (2006) em revisão de literatura, evidenciou o potencial de proteínas hidrolisadas de frango, fígado de aves e soja na alimentação de cães como coadjuvante no tratamento de doenças intestinais ou hipersensibilidade alimentar. Mandigers, *et al.*, (2010) testaram duas dietas na alimentação de 26 cães com doença crônica intestinal, a dieta teste tinha como fonte proteica proteína hidrolisada de soja e a controle continha uma mistura de proteínas, predominantemente de aves convencional, foi possível observar que a dieta com proteína hidrolisada pode ser eficaz no manejo a longo prazo da enteropatia crônica canina do intestino delgado. O presente estudo traz dados que indicam que a PHF é um ingrediente seguro e fundamenta seu uso em *petfood* para compor alimentos coadjuvantes, como alimentos hipoalergênicos, e que podem ser consumidos a longo prazo por cães sem comprometimento de sua saúde.

Nos rins, o SRAA atua gerando a Ang I em Ang II, através da ECA (Hagiwara, 2014). Não foram verificadas alterações na função renal após 120 dias de consumo, indicando que o ingrediente pode ser utilizado em dietas para cães saudáveis, sem efeitos adversos. A creatinina, ureia, SDMA, K, EFNa e EFK apresentaram alteração no tempo, sem efeito de dieta, mas ainda dentro dos parâmetros de referência. A relação UAldo/cr não foi alterada ao longo do tempo ou pelos tratamentos, indicando mais uma vez que consumo a longo prazo da PHF não promoveu alteração no SRAA ou escape de aldosterona. O SDMA é um indicador conhecido pela detecção precoce de alguma disfunção renal e quando comparado aos demais parâmetros, como por exemplo, a creatinina, demonstra de forma mais acurada a taxa de filtração glomerular (TGF) em cães (Nabity *et al.*, 2015). Quando se trata de prejuízos na função renal a SDMA é capaz de alertar precocemente e auxiliar no diagnóstico. Em um cão com disfunção renal, a SDMA aumenta quando há uma perda de 40% ou até mesmo 25% da função renal, enquanto a

creatinina só aumenta quando a perda da função renal atinge 75% (Hall *et al.*, 2014; Hall *et al.*, 2016), sendo por estes motivos, parâmetros importantes a serem avaliados.

A excreção fracionada de Na⁺ aumentou nos dois grupos nos dias 60 e 120 (> 1%), ficando acima do limite superior de normalidade. Este parâmetro é utilizado para determinação de disfunção tubular aguda em cães. Contudo, estudo recente concluiu que um EFNa⁺ > 1% pode não ser indicativo isolado de disfunção tubular aguda em cães, e uso do EFNa⁺ para avaliação da função renal em casos clínicos deve levar em conta a dieta do animal e consumo de Na (Lobetti, 2020). Fazendo avaliação conjunta dos demais parâmetros da função renal, estes apresentaram valores dentro da normalidade. Assim, especulamos que o aumento da EFNa⁺ pode ter sido um efeito ou influência da dieta que os animais estavam recebendo previamente ao período experimental.

O sistema cardiovascular faz parte do mecanismo de funcionamento do SRAA. A pressão arterial é um dos principais fatores que levam a doença cardiovascular, (Harris, *et al.*, 1985; Kannel, e Higgins, 1990). Para uma homeostase cardiovascular é necessário haver equilíbrio do SRAA, pois os efeitos do SRAA no sistema cardiovascular resultam em hipertensão, Farag *et al.*, (2015). Os peptídeos bioativos têm sido utilizados na inibição desses processos, com a inibição da ECA, sendo utilizados como agentes anti-hipertensivos.

Não houve efeito das dietas FVC e PHF sobre nenhum dos parâmetros cardíacos ($p > 0.05$), demonstrando que a inclusão de 10% da proteína hidrolisada, a curto e longo prazo, não levou a alterações cardiovasculares nos animais. Alguns estudos feitos com ratos hipertensos e humanos hipertensos, demonstram os efeitos anti-hipertensivos dos peptídeos, porém é possível verificar que os peptídeos em estudo têm pouco efeito sobre a pressão sanguínea em indivíduos normotensos, sugerindo que não exercem um grande efeito hipotensor. Dessa forma, os peptídeos bioativos advindos da hidrólise proteica, podem representar uma alternativa como tratamento de baixo custo para hipertensão, sem efeitos cardiovasculares e sem efeitos farmacológicos dos anti-hipertensivos, (FitzGerald *et al.*, 2004). Contudo, mais estudos são necessários para compreender doses efetivas e funcionais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inclusão de 10% da PHF em dieta extrusada para cães não afetou a digestibilidade dos nutrientes, promoveu discreta fermentação microbiana intestinal e não apresentou efeito sobre a ECA nas condições do estudo utilizando cães saudáveis. Não foram verificadas alterações na função renal e cardíaca após 120 dias de consumo, indicando que o ingrediente pode ser utilizado em dietas para cães saudáveis, sem efeitos adversos.

O protocolo de ativação da ECA foi bem sucedido porém a inclusão de 10% do ingrediente hidrolisado não promoveu inibição consistente da ECA. Mais estudos são recomendados para avaliar o efeito de maiores inclusões do ingrediente na dieta de cães e seus efeitos a longo prazo.

REFERÊNCIAS

ABINPET. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. MANUAL PET FOOD BRASIL. 10ª edição. 568 p. 2019.

MARK J. ACIERNO, SCOTT BROWN, AMANDA E. COLEMAN, ROSANNE E. JEPSON, MARCOS PAPICH, REBECCA L. STEPIEN, HARRIET M. SYME. Declaração de consenso ACVIM: Diretrizes para a identificação, avaliação e manejo da hipertensão sistêmica em cães e gatos . *J Vet Intern Med* . 2018; 32 : 1803-1822 .<https://doi.org/10.1111/jvim.15331>

ADIN, D., ATKINS, C., DOMENIG, O., DEFRANCESCO, T., KEENE, B., TOU, S., & MEURS, K. M. (2020). Renin-angiotensin aldosterone profile before and after angiotensin-converting enzyme-inhibitor administration in dogs with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. **Journal of veterinary internal medicine**, 34(2), 600-606.

ADLER-NISSEN J. Hidrólise enzimática de proteínas alimentares. Editores de ciência aplicada da

ANDERS AKSNES, BRITT ESPERANÇA, ØISTEIN HOSTMARK, SISSEL ALBREK TSENAL. Inclusion of size fractionated fish hydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, [s.l.], v. 261, n. 3, p.1102-1110, dez. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.038>.

ALDRICH, CG E L. DARISTÓTELES. 1998. Petfood e o impacto económico. Procedimentos: Conferência de Nutrição Animal da Califórnia, pp.

ALUKO, R. E. **Chapter 24 - Cardiovascular benefits of food protein-derived bioactive peptides**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128213896000091>>.

AMES MK, ATKINS CE, LANTIS AC, ZUM BRUNNEN J. Evaluation of subacute change in RAAS activity (as indicated by urinary aldosterone:creatinine, after pharmacologic provocation) and the response to ACE inhibition. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**. Mar 23;17(1):1470320316633897. doi: 10.1177/1470320316633897. PMID: 27009288; PMCID: PMC5843907.2016.

AMES, M. K., ATKINS, C. E., & PITT, B. (2019). The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. **Journal of veterinary internal medicine**, 33(2), 363-382.

ANNA, TORKOVA, KONONIKHIN ALEXEY, BUGROVA ANNA , KHOTCHENKOV VYACHESLAV , TSENTALOVICH MIKHAIL* E MEDVEDEVA ULIA. Effect of in vitro Gastrointestinal Digestion on Bioactivity of Poultry Protein Hydrolysate. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* 4: 77-86.2016.

ARAÚJO, T. S.; BRITO, L. P. DE .; DUARTE NETO, J. M. W.; WANDERLEY, M. C. DE A. .; ALBUQUERQUE, W. W. C. .; HERCULANO, P. N. .; PASTRANA , L. .; SOARES , M. T. C. V. .; PORTO, A. L. F. Hydrolysates and bioactive peptides generated from chicken protein hydrolysis: A systematic review of antihypertensive effects in rats. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 11, p.

e181111133353, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i11.33353. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/33353>.

Association of American Feed Control Officials (AAFCO). Official publication. Oxford. 2014.

ATLAS, S. A. 2007. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **Journal of managed care pharmacy** 13: 9-20.

BECHAUX, J., GATELIER, P., LE PAGE, JF, DRILLET, Y., & SANTE-LHOUTELLIER, V. (2019). Uma revisão abrangente de peptídeos bioativos obtidos de subprodutos animais e suas aplicações. *Alimentos e funções*, 10 (10), 6244-6266.

[Bezerra](#), T. K. A., Salu.B.R, Oliva, M.L.V Juliano., A.J., Pacheco, P.T.B, Madruga, M.S. 2019. Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory and Anticoagulant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Chicken Combs and Wattles. *Journal of Medicinal Food*.

BRF BIOACTIO HEALTH & PERFORMANCE (Proteína Hidrolisada de Frango).2022. Disponível em: <<https://www.brfindredients.com/pt-br/nutricao-animal/bioactio-health-performance/>>. Acesso em: 27 abr. 2023.

BRF Ingredients, peptídeos bioativos e proteínas animais hidrolisadas na aquicultura.2020. Disponível em: <<https://www.brfindredients.com/pt-br/blog/posts/peptideos-bioativos-proteinas-animais-hidrolisadas-na-aquicultura/>>.

Black, A.B., Guard, B.C, Honnefer, J.B, Lidbury, J.A, Steiner, J.M, Suchodolski J.S. Altered microbiota, fecal lactate, and fecal bile acids in dogs with gastrointestinal disease. **PLoS ONE**, v. 14, n. 10, 2019.

BOON, J. A. Evaluation of size, function and hemodynamics. **In: Manual of Veterinary Echocardiography**. 2. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 2011. P. 153-266.

BRANDELLI, A., L. SALA, E S. J. KALIL. 2015. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International** 73: 3-12.

BROWN N, [N marrom](#)¹, [G Segev](#), [T Francey](#), [P Kass](#), [LD Cowgill](#). Glomerular filtration rate, urine production and fractional clearance of electrolytes in acute kidney injury in dogs and their association with survival. **J Vet Intern Med**. 29:28–34; 2015.

BROWN SA, ATKINS C, BAGLEY A. 2007. Guidelines for the identification, evaluation, and management of hypertension in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 21(3):542-558.

CARCIOFI, A. C, [F S TAKAKURA](#), [L D DE-OLIVEIRA](#), [E TESHIMA](#), [J T JEREMIAS](#), [M A BRUNETTO](#), [F PRADA](#). Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and postprandial glucose and insulin response. **Journal of Animal Physiology Animal Nutrition** 92: 326-336. 2008.

CARCIOFI, A.C., PONTIERI, R., FERREIRA, C.F, Prada, F. Avaliação de dietas com diferentes fontes proteicas para cães adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 754-760, 2006.

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

CAVALARI, A. P. M., DOZELE, L.P, VIANA, J.A, LOBÃO, M. ABREU.T, OLIVEIRA, A.L.S, FREITAS, L.S., PEREIRA, A.A, CARCIOFI, A.C. Determinação do valor nutritivo de alimentos energéticos e protéicos utilizados em rações para cães adultos. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 35. n. 5, p.1985-1991, 2006.)

CAVE, N. J. 2006. Hydrolyzed Protein Diets for Dogs and Cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 36: 1251-1268.

CLEMENTE, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 11: 254-262.

COMPENDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. 2004. São Paulo. Sindrirações/Anfal. Campinas CBNA/SDR/MA. 298p.

DE ARAÚJO, A. P., DOS SANTOS, F. R., MARTINS, R. O., DE SOUZA FRANCO, E., & NEVES, M. L. M. W. (2021). Dermatite alérgica alimentar em cães food allergic dermatitis in dogs. **Brazilian Journal of Development**, 7(8), 76325-7633.

DEBORA V. S. FEIJÓ1*, MV. ROBERTA B. FINATO , FERNANDA M. LACERDA1 , JOCIANE P. KOWALCZIKI1 , STEPHANIE FERNANDEZI , CARLA D. DAN DE NARDO ,ROSANA L. DA CRUZ SALVADOR1 , MV. DR. ANDRÉ L. B. GALVÃO. Fisiopatologia da Hipertensão arterial sistêmica em pequenos animais. **Revista Investigação medicina veterinária**. ISSN 21774080. 2016.

DING, L., L. WANG, Z. YU, T. ZHANG, J. LIU. 2016. Digestion and absorption of an egg white ACE-inhibitory peptide in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 67: 111-116.

DL MEEKER, JL MEISINGER, SIMPÓSIO DE ANIMAIS DE COMPANHEIRO: Ingredientes renderizados influenciam significativamente a sustentabilidade, qualidade e segurança de alimentos para animais de estimação, **Journal of Animal Science** , Volume 93, Edição 3, março de 2015, páginas 835–847, <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8524>)

DOS SANTOS AGUILAR, J. G., A. K. S. DE SOUZA, AND R. J. S. DE CASTRO. 2019. Enzymatic Hydrolysis of Chicken Viscera to Obtain Added-Value Protein Hydrolysates with Antioxidant and Antihypertensive Properties. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**.

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

DUKE, T., EGNER, B., CARR, A.P. (2011). Além dos glucocorticóides. *Veterinary Medicine*. 13: 47-55.

FAN, H., Q. XU, H. HONG, AND J. WU. 2018. Stability and Transport of Spent HenDerived ACE-Inhibitory Peptides IWHHT, IWH, and IW in Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66: 11347-11354.

FARAG, EHAB MD, FRCA *†,§ ; MAHESHWARI, KAMAL MD *† ; MORGAN, JOSEPH MD ‡ ; SAKR ESA, WAEL ALI MD, PHD * ; DOYLE, D. JOHN MD, PhD § . Uma atualização do papel da renina angiotensina na homeostase cardiovascular. *Anesthesia & Analgesia* 120(2):p 275-292, fevereiro de 2015. | DOI: 10.1213/ANE.0000000000000528

FEDIAF | **Nutritional Guidelines**. Disponível em: <https://europeanpetfood.org/self-regulation/nutritional-guidelines/> v.2022.

FERROLI, P.C.M., FIOD NETO, M., CASAROTTO FILHO, N., CASTRO, J.E.E., 2000. Fábricas de subprodutos de origem animal: a importância do balanceamento das cargas dos digestores de vísceras. *Production* 10, 05-20.

FISCHER, M. M., KESSLER, s. , LRM DE SÁ , R.S, FOROBERTI, F., SPNOGUEIRA , O., CARCIOFI, A.C. (2012). Fiber fermentability effects on energy and macronutrient digestibility, fecal traits, postprandial metabolite responses, and colon histology of overweight cats. *Journal of Animal Science*, 90, 2233-2245. doi: <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4334>

FITZGERALD, R. J., MURRAY, B. A., & WALSH, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of nutrition*, 134(4), 980S-988S.

FOLTZ, M., CERSTIAENS, A., VAN MEENSEL, A., MOLS, R., VAN DER PIJL, PC, DUCHATEAU, GS, & AUGUSTIJS, P. (2008). Os tripéptidos inibidores da enzima de conversão da angiotensina Ile-Pro-Pro e Val-Pro-Pro apresentam permeabilidades crescentes com o aumento da relevância fisiológica dos modelos de absorção. *Peptídeos*, 29 (8), 1312-1320.

FUJITA, H., YOKOYAMA, K., YASUMOTO, R., & YOSHIKAWA, M. (1995). Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 22, S304-S305.

GALLEGO, M., GROOTAERT, C., ARISYOY, L.M.M.C., CAMP, J.V., TOLDRÁ, F. 2016. Transepithelial transport of dry-cured ham peptides with ACE inhibitory activity through a Caco-2 cell monolayer. *Journal of Functional Foods* 21: 388-395.

GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. *Food Technology*, Chicago, v.48, n.10, pp.50-60.1994.

GIONGO, J. L. 2006. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.

GOODING, C. H.; MEEKER, D. L. Review: Comparison of 3 alternatives for large-scale processing of animal carcasses and meat by-products. **The Professional Animal Scientist**, v.32, p.259–270, 2016.

GOODING, C. H.; MEEKER, D. L. Review: Comparison of 3 alternatives for large-scale processing of animal carcasses and meat by-products. **The Professional Animal Scientist**, v.32, p.259–270, 2016.

HAGIWARA, M. K. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. [Revisão Técnica]. Rio de Janeiro. Elsevier. 2014

HARRIS, T., COOK, E. F., KANNEL, W., SCHATZKIN, A., & GOLDMAN, L. (1985). Blood pressure experience and risk of cardiovascular disease in the elderly. *Hypertension*, 7(1), 118-124.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, BLANCA; DEL MAR CONTRERAS, MARIA; RÉCIO, ISIDRA. Peptídeos anti-hipertensivos: Produção, biodisponibilidade e incorporação em alimentos. **Avanços na ciência de colóides e interfaces**, v. 165, n. 1, pág. 23-35, 2011.

IWAI, K., ZHANG, Y., KOUGUCHI, T., SAIGA-EGUSA, A., SHIMIZU, M., OHMORI, T., & MORIMATSU, F. (2009). Blood Concentration of Food-Derived Peptides following Oral Intake of Chicken Collagen Hydrolysate and its Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity in Healthy Volunteers. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 56(6), 326–330.

JAMDAR, S.N., RAJALAKSHMI, V. E SHARMA, A. (2012), Antioxidant and ACE Inhibitory Properties of Poultry Viscera Protein Hydrolysate and its Peptide Fractions. **Journal of Food Biochemistry**, 36: 494-501. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00562.x>

KANG, N. J., SU JIN, H.S, JUNGKIM, H., KOH, H. LEE, D.W. 2020. New approaches towards the discovery and evaluation of bioactive peptides from natural resources. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology** 50: 72-103.

KANNEL, W. B., & HIGGINS, M. (1990). Smoking and hypertension as predictors of cardiovascular risk in population studies. **Journal of hypertension**. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension, 8(5), S3-8.

KIRKLAND, W.M. AND H.L. FULLER. 1971. The effect of ethoxyquin on the chemical and nutritional changes of poultry by-product meal and poultry offal fat during storage. *Pou. Sci.* 50:137-143.

KONTA, M., NAGAKAWA, M., SAKATANI, A., AKABANE, R., MIYAGAWA, Y., & TAKEMURA, N. (2018). Evaluation of the inhibitory effects of telmisartan on drug-induced renin-angiotensin-aldosterone system activation in normal dogs. **Journal of Veterinary Cardiology**, 20(5), 376-383.

LAFARGA, T., E M. HAYES. 2014. Bioactive peptides from meat muscle and byproducts: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science* 98: 227-239.

- LAFLAMME, D. RALSTON P. C. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine practice (Santa Barbara, Calif. : 1990) (USA)**, 1997.
- LANTIS AC, AMES MK, WERRE S, et al. The effect of enalapril on furosemide-activated renin–angiotensin–aldosterone system in healthy dogs. **J Vet Pharmacol Therap** 2015; 38: 513–517
- LEE, S. Y., & HUR, S. J. (2019). Purification of novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef myofibrillar proteins and analysis of their effect in spontaneously hypertensive rat model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 116, 109046.
- LEFEVRE, H.P.; BROWN, S. A.; CHETBOUL V.; KING, J. N.; POUCHELON, J.-L.; TOUTAIN, P. L. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Veterinary Medicine. *Current Pharmaceutical Design*, v. 13, p. 1347-1361, 2007.
- Lopez-Barrios, L., J. A. Gutierrez-Uribe, and S. O. Serna-Saldivar. 2014. Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. *J Food Sci* 79: R273-283.
- LOUIS, P., SCOTT, K.P, DUNCAN, S.H, FLINT, H.J. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p. 1197–1208, 2007.
- MANDIGERS, P.J.J., BIOURGE, V., VAN DEN INGH, T.S.G.A.M., ANKRINGA, N. AND GERMAN, A.J. (2010), A Randomized, Open-Label, Positively-Controlled Field Trial of a Hydrolyzed Protein Diet in Dogs with Chronic Small Bowel Enteropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 24: 1350-1357. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0632.x>
- MANE, S. S. N. JAMDAR. 2017. Purification and identification of Ace-inhibitory peptides from poultry viscera protein hydrolysate. **Journal of Food Biochemistry** 41: e12275.
- MARTÍNEZ-ALVAREZ, O., S. CHAMORRO, A. BRENES. 2015. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. **Food Research International**. 73:204–212. doi:10.1016/j.foodres.2015.04.005.
- MARQUES, C., AMORIM, M. M., PEREIRA, J. O., GUARDÃO, L., MARTINS, M. J., PINTADO, M. E., ... & PINHEIRO, H. (2015). In vitro ACE-inhibitory peptide KGYGGVSLPEW facilitates noradrenaline release from sympathetic nerve terminals: Relationship with the lack of antihypertensive effect on spontaneous hypertensive rats. **Peptides**, 71, 72-76.
- MAS-CAPDEVILA, A., Z. PONS, A. ALEIXANDRE, F. BRAVO, E B. MUGUERZA. 2018. DoseRelated Antihypertensive Properties and the Corresponding Mechanisms of a Chicken Foot Hydrolysate in Hypertensive Rats. *Nutrients* 10: 1295.
- MEEKER, D.L., MEISINGER, J.L. Companion Animals Symposium: Rendered ingredients significantly influence sustainability, quality, and safety of pet food1. **Journal of Animal Science**, v.93, p. 835-847, 2015.

MILTENBURG, T. Z, UANA DA SILVA, M., BOSCH, G., & VASCONCELLOS, R. S. (2021). Effects of enzymatically hydrolysed poultry byproduct meal in extruded diets on serum angiotensin converting enzyme activity and aldosterone in cats. **Archives of Animal Nutrition**, 75(1), 64-77.

MINISTERIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 34, DE 28 DE MAIO DE 2008**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-34-de-28-de-maio-de-2008.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

MOENS, F., ABBELE, P.V., BASIT, A.W., DODOO, C., CHATTERJEE, R., SMITH, B. GAISFORD, S. (2019) A four-strain probiotic exerts positive immunomodulatory effects by enhancing colonic butyrate production in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, 555, 1-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.020>

MOLLER, N., SCHOLZ-AHRENS, K., ROSS, N., & SCHREZENMEIR, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, 27, (4) 171-182.

NAGUEH, S. F., SMISETH, O. A., APPLETON, C. P., BYRD, B. F., DOKAINISH, H., EDVARDBSEN, T., FLACHSKAMPF, F.A., GILLEBERT, T.C., KLEIN, A.L., LANCELLOTTI, P., MARINO, P., OH, J.K., POPESCU, B.A., WAGGONER A.D., 2016. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. **J Am Soc Echocardiogr**. 29, 277-314.

NAKADE, K., KAMISHIMA, R., INOUE, Y., AHHMED, A., KAWAHARA, T.N., MARUYAMA, M., NUMATA, M., MUGURAMA, A., OTHA, K. 2008. Identification of an antihypertensive peptide derived from chicken bone extract. **Animal Science Journal** 79: 710-715.

OCKERMAN, H.W., HANSEN, C.L., 1999. Animal by-product processing & utilization. CRC Press.

OHSAWA, KAZUHITO, SATSU, H., MASASHI ENJOH., SHIMIZU, M. Producibility and digestibility antihypertensive beta-casein tripeptides, Val-Pro-pro and Ile-pro-pro, in the gastrointestinal tract: analyses using an in vitro model of mammalian gastrointestinal digestion. **Revista de química agrícola e alimentar**, v. 56, n. 3, pág. 854-858, 2008.

ONUH, J. O., A. T. GIRGIH, S. A. MALOMO, R. E. ALUKO, AND M. ALIANI. 2015. Kinetics of in vitro renin and angiotensin converting enzyme inhibition by chicken skin protein hydrolysates and their blood pressure lowering effects in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Functional Foods** 14: 133-143.

RAO, M. B., A. M. TANKSALE, M. S. GHATGE, AND V. V. DESHPANDE. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62: 597-635.

RIBEIRO, JOSÉ MÁRCIO; FLORÊNCIO, LEONARDO P. Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT1. **Rev Bras Hipertens**, v. 7, n. 3, p. 293-302, 2000.

ROMERO-GARAY, MG, MONTALVO-GONZÁLEZ, E., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, C., SOTO-DOMÍNGUEZ, A., BECERRA-VERDÍN, EM, & GARCÍA-MAGAÑA, MDL (2022). Bioatividade de peptídeos obtidos de subprodutos de aves: uma revisão. *Química Alimentar: X*, 13, 100181.

RYAN, J. T., R. P. ROSS, D. BOLTON, G. F. FITZGERALD, C. STANTON. 2011. Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. *Nutrients* 3: 765-791.

SAKATANI, A., MIYAGAWA, Y., & TAKEMURA, N. (2016). Evaluation of the effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor, alacepril, on drug-induced renin-angiotensin-aldosterone system activation in normal dogs. **Journal of Veterinary Cardiology**, 18(3), 248-254.

SANGSAWAD, P., CHOOWONGKOMON, K., CHEN, K.X.M, LI-CHAN, E.C., YONGSAWATDIGUL, J. 2018. Transepithelial transport and structural changes of chicken angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides through Caco-2 cell monolayers. **Journal of Functional Foods** 45: 401-408.

SANGSAWAD, PAPUNGKORN & ROYTRAKUL, SITTIRUK & YONGSAWATDIGUL, JIRAWAT. (2017). Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from the simulated in vitro gastrointestinal digestion of cooked chicken breast. **Journal of Functional Foods**. 29. 77-83. 10.1016/j.jff.2016.12.005.

SICA, D. A. 2004. Angiotensin-converting enzyme inhibitors side effects--physiologic and non-physiologic considerations. **Journal of clinical hypertension** (Greenwich, Conn.) 6: 410-416.

STABLER, T. V.; SIEGEL, A. L. Chemiluminescence immunoassay of aldosterone in serum. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 1987-1989, 1 nov. 1991.

SWANSON, K. S.; KUZMUK, K. N.; SCHOOK, L. B.; FAHEY JUNIOR, G. C. Diet affects nutrient digestibility, hematology, and serum chemistry of senior and weanling dogs. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 1713-1724, 2004.

TJERNSEBEKK MT, TAUSON AH, KRAUGERUD OF, AHLSTRØM Ø. Raw mechanically separated chicken meat and salmon protein hydrolysate as protein sources in extruded dog food: effect on protein and amino acid digestibility. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2017 Oct;101(5):e323-331. doi: 10.1111/jpn.12608. Epub 2017 Jan 3. PMID: 28045202.

TOLDRÁ, F., MORA, L., [TOLDRÁ-REIG](#), F., REIG, M. Bioactive Compounds from Animal Meat Byproducts. 18 nov. 2019.

TOLDRÁ, F.; MORA, L.; REIG, M. New insights into meat by-product utilization. **Meat Science**, v. 120, p. 54-59, out. 2016.

TORTOLA, L.; SOUZA, N. G.; ZAINI, L.; GOMES, M. O. S.; MATHEUS, L. F. O.; VASCONCELLOS, R. S.; PEREIRA, G. T.; CARCIOFI, A. C. Enzyme effects on extruded diets for dogs with soybean meal as a substitute for poultry by-product meal. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p.39-50, 2012.

YANG, H.-Y. T.; NEFF, N. H. Distribution and Properties of Angiotensin Converting Enzyme of Rat Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 19, n. 10, p. 2443–2450, out. 1972.

YU, Z., YIN, Y., ZHAO, W., CHEN, F., & LIU, J. (2014). Efeito anti-hipertensivo do peptídeo inibidor da enzima conversora de angiotensina RVPSL em ratos espontaneamente hipertensos por meio da regulação da expressão gênica do sistema renina-angiotensina. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(4), 912–917. <https://doi.org/10.1021/jf405189y>

YUSOP, S. M., NAALIAN, M., MUSTAPHA, W., FORGHANI, W., BABJI, A.S. 2016. Production of Antihypertensive Elastin Peptides from Waste Poultry Skin. **International Journal of Food Engineering 2**.

ZAREI, A. MOHAMMADI, M.; HEMMATI, B. Metabolizable Energy and Chemical Composition of Poultry by-Product Meal. Iranian **Journal of Applied Animal Science**, v.4. n.4. p. 849-853. 2014.

ZAREI, A. MOHAMMADI, M.; HEMMATI, B. Metabolizable Energy and Chemical Composition of Poultry by-Product Meal. Iranian **Journal of Applied Animal Science**, v.4. n.4. p. 849-853. 2014

ZHANG, P., CHANG, C., LIU, H., LI, B., YAN, Q., & JIANG, Z. (2020). Identification of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate by the protease of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Functional Foods**, 65, 103751.

ZÓIA MILTENBURG, T., UANA DA SILVA, M., BOSCH, G., E VASCONCELLOS, R. S. (2021). Effects of enzymatically hydrolysed poultry byproduct meal in extruded diets on serum angiotensin-converting enzyme activity and aldosterone in cats. **Archives of Animal Nutrition**.