UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIA ISABEL GONZALEZ URREGO

**DIGESTIBILIDADE, PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO E COMPOSTOS
VOLÁTEIS NAS FEZES DE CÃES BULLDOG FRANCÊS ALIMENTADOS COM
DIFERENTES FONTES PROTEICAS**

Pirassununga – SP

2017

MARIA ISABEL GONZALEZ URREGO

**DIGESTIBILIDADE, PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO E COMPOSTOS
VOLÁTEIS NAS FEZES DE CÃES BULLDOG FRANCÊS ALIMENTADOS COM
DIFERENTES FONTES PROTEICAS**

"Versão corrigida"

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Francelino Araújo

Pirassununga – SP

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

U81Urr
d Urrego, Maria Isabel Gonzalez
Digestibilidade, produtos da fermentação e
compostos voláteis nas fezes de cães Bulldog
francês alimentados com diferentes fontes proteicas
/ Maria Isabel Gonzalez Urrego ; orientador Lúcio
Francelino Araújo. -- Pirassununga, 2017.
72 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. cães braquicefálicos. 2. compostos orgânicos
voláteis. 3. gluten de trigo. 4. odor. 5. proteína.
I. Araújo, Lúcio Francelino, orient. II. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: URREGO, Maria Isabel Gonzalez

Título: **Digestibilidade, produtos da fermentação e compostos voláteis nas fezes de cães bulldog Francês alimentados com diferentes fontes proteicas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Rosario e Orlando

Ao Agustin Silva,

À Profa. Catarina Abdalla Gomide,

*que sempre acreditaram, participaram e apoiaram minhas tomadas de decisão,
meus pilares na luta por meus sonhos.*

AGRADECIMENTO

Ao meus pais, pelo apoio e longa espera. *Todos mis logros y esfuerzos son inspirados en ustedes dos, por que me enseñaron a ser fuerte y entender que encuancto crea en mi, todo es posible, este logro es todo para y por ustedes, los amo.*

Ao Agustin, pela força, carinho e paciência. *Todo camino es más facil de recorrer cuando tienes un compañero para andarlo, tu hiciste que este caminar fuera mas fácil, divertido, lleno de luz y de amor. Gracias por ayudarme a crecer y ser mejor ser humano. Sin ti nada de esto seria posible.*

À Professora Catarina, por ser minha mãe brasileira, as palavras ficam curtas para explicar meus sentimentos e gratidão por você, levarei no meu coração para o resto de minha vida.

Ao Professor Marcio pela oportunidade e a confiança, com suas ensinanças me tornei uma melhor profissional.

Ao Professor Lucio, com sua ajuda este sono se tornou uma realidade.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos pela oportunidade.e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal (FMVZ) pela utilização de sua estrutura para condução deste estudo.

À todos os funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal, em especial a Renata, Simi, Ana e Lucinéia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos

À Premier Pet, por possibilitar a produção das dietas e utilização de sua estrutura de pesquisa para condução deste estudo.

À toda equipe da Premier Pet: Cristiana Pontieri, Juliana Jeremias, Danilo Souza, Iris Kawauchi, Paula Takeara, Mariana Monti, Brown, Juliana, Suzana, Leda e Claudemir por todo auxílio e paciência na execução do experimento.

Aos membros do GENP (Grupo de Estudos em Nutrição Pet): Mariane, Patrícia Massae, Karine, Cláudio, Thiago, Mariana pela colaboração e conhecimentos compartilhados.

À Laura pela paciência, conhecimentos e auxílio na condução deste estudo.

A minha irma brasileira Karine, garota tem pessoas que mudam a vida, você mudo a minha, com sua amizade todo tornou-se mas simples, além de ter alguém que entende todo o que falo e minhas piadas, ame ter você nestes anos e espero que consigamos viajar juntas ao Caribe. *Amizade verdadeira não é ser inseparável... é estar separado e nada mudar.*

Muito Obrigada!

RESUMO

URREGO, M. I. G. **DIGESTIBILIDADE, PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO E COMPOSTOS VOLÁTEIS NAS FEZES DE CÃES BULLDOG FRANCÊS ALIMENTADOS COM DIFERENTES FONTES PROTEICAS.** 2017. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Benefícios na fermentação microbiana no cólon e as flatulências, em cães da raça Bulldog Francês, podem ser promovidos mediante mudanças nas quantidades e fontes proteicas da dieta. Este estudo avaliou os efeitos da inclusão de diferentes fontes de proteína em alimento seco para cães Bulldog Francês sobre a fermentação microbiana, a absorção de nutrientes e mudanças nas emissões dos componentes orgânicos voláteis mais prevalentes, ademais comparou os resultados com a técnica de teste sensorial. Quatro dietas de manutenção para cães adultos foram formuladas: T0, dieta com farinha de vísceras de frango; T1, dieta com glúten de trigo; T2, dieta com farinha de vísceras de frango e glúten de trigo; e T3, dieta com vísceras de frango, glúten de trigo e proteína hidrolisada. Foram utilizados oito cães da raça Bulldog Francês, com peso corporal médio de $11,3 \pm 0,21$ kg e $2,7 \pm 0,74$ anos de idade, distribuídos num delineamento em quadrado latino 4x4 e adaptados às dietas durante 20 dias. Fezes frescas foram coletadas para análise de digestibilidade aparente dos nutrientes, escore, ácidos graxos voláteis, pH, aminas biogênicas, compostos orgânicos voláteis, lactato, amônia, e análise sensorial. Não houve efeitos adversos nos animais. As médias foram comparadas por meio de contrastes pelo PROC MIXED do SAS, adotando um nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$). Os animais que foram alimentados com as dietas T1 e T2 apresentaram maior digestibilidade da matéria seca ($P < 0,05$), matéria orgânica ($P < 0,05$), proteína bruta ($P < 0,001$) e menor produção de fezes ($P < 0,02$). Foi observada menor ingestão da fibra bruta nos animais alimentados com a dieta T0 ($P < 0,001$). As dietas T1, T2 e T3 resultaram em menor escore e pH fecal ($P < 0,05$). Ao respeito aos compostos orgânicos voláteis, foi observada diferença estatística em dois dos 68 compostos observados, as fezes dos animais alimentados com dieta T0 e T1 apresentaram maior presença dos compostos fenol ($P = 0,04$) e indol ($P = 0,01$), respectivamente. O tratamento T0 apresentou maior percepção de odor durante a avaliação sensorial ($P = 0,01$). Não houve efeito das dietas nos produtos finais de fermentação. O uso complementar da proteína animal com a vegetal melhoraram a digestibilidade da proteína bruta, e em consequência, reduziram a percepção do mal odor das fezes de cães Bulldogs Francês. Mais estudos são necessários para entender a associação dos níveis de percepção de odor com as mudanças dos compostos orgânicos voláteis

Palavras-chave: Cães braquicefálicos. Compostos orgânicos voláteis. Glúten de trigo, Odor. Proteína.

ABSTRACT

URREGO, M. I. G. **DIGESTIBILITY, FERMENTATION PRODUCTS AND VOLATILE COMPOUNDS OF FECES OF FRENCH BULLDOG DOGS FED WITH DIFFERENT PROTEIN SOURCES.** 2017. 72 p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Benefits on colonic fermentation and flatulencies, in French bulldog dogs, can be promoted by changes on diet protein sources and quantities. The current study evaluated the effects of the inclusion of different protein sources to dog dry feed on microbial fermentation, nutrient absorption, and changes of the emission of most prevalent volatile organic compounds, and also compared the results with a sensorial test. Four maintenance diets for adult dogs were formulated: T0, diet with the inclusion of poultry entrails meal; T1, diet with the inclusion of wheat gluten; T2, diet with the inclusion of poultry entrails meal and wheat gluten; and T3, diet with the inclusion of poultry entrails meal, wheat gluten, and hydrolyzed protein. Eight adult French bulldog dogs, with a mean weight of 11.3 ± 0.21 kg and 2.7 ± 0.74 years old, were arranged in a 4x4 Latin square design and adapted to diets for 20 days. Therefore, fresh feces were collected for digestibility, fecal score, volatile fatty acids, fecal pH, biogenic amines, volatiles organic compounds, fecal lactate, ammonia, and sensorial test analyses. There were no adverse effects to the animals. Means were compared by contrast using PROC MIXED procedure of SAS software, choosing a significance level of 5% ($P \leq 0.05$). Animals fed with diets T1 and T2 showed higher dry matter ($P < 0.05$), organic matter ($P < 0.05$), and crude protein digestibility ($P < 0.001$), and lower feces production ($P < 0.02$). Lower ingestion of crude fiber was observed in animals fed with diet T0 ($P < 0.001$). Diets T1, T2, and T3 showed lower pH ($P < 0.05$) and score of the feces. In regard to volatile organic compounds, 2 from 68 observed compounds showed statistical difference. Animals fed with diet T0 and diet T1 had greater presence of phenol ($P = 0.04$) and indole ($P = 0.01$) on feces, respectively. Diet T0 showed greater odor perception during the sensorial test ($P = 0.01$). There were no effects of diets on fermentation final products. The reduction of protein level and the complementary use of animal and vegetal protein sources improved crude protein digestibility, and as a consequence, reduced the odor perception of the feces of French bulldog dogs. More studies are needed to understand the association between odor perception levels and changes on volatile organic compounds.

Key words: Brachycephalus dogs. Odor. Protein. Volatile Organic Compounds. Wheat Gluten.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimentos realizados em cada etapa dos períodos experimentais. AGCC, ácidos graxos de cadeia curta; AGCR, ácidos graxos de cadeia ramificada; COV, compostos orgânicos voláteis.	22
Figura 2. Canil individual.....	23
Figura 3. Representação gráfica da área dos picos dos compostos orgânicos voláteis.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis de inclusão das fontes proteicas nas dietas experimentais para cães da raça Bulldog Frances...	24
Tabela 2. Composição química analisada das dietas experimentais	25
Tabela 3. Visão geral de pesquisas relacionadas com o estudo atual	32
Tabela 4. Ingestão de nutrientes, coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e energia bruta das dietas experimentais para cães da raça Bulldog Francês com diferentes fontes de proteína.....	35
Tabela 5. Variáveis fecais em cães da raça Bulldog Francês mediante o consumo das dietas experimentais com diferentes fontes de proteína.....	36
Tabela 6. Concentração de ácido láctico, nitrogênio amoniacal, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada e aminas biogênica das fezes dos cães da raça Bulldog Francês alimentados com dietas experimentais com diferentes fontes de proteína.....	37
Tabela 7. Porcentagem de ocorrência dos Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) nas fezes de cães da raça Bulldog Francês alimentados com dietas experimentais com diferentes fontes de proteína	39
Tabela 8. Média percentual da área dos picos dos compostos orgânicos voláteis mais abundantes presentes nas fezes de cães da raça Bulldog Francês alimentados com dietas experimentais com diferentes fontes de proteína	40
Tabela 9. Valores médios atribuídos ao odor fecal de cães da raça Bulldog Francês alimentados com dietas experimentais com diferentes fontes de proteína.....	42

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1.	Natureza alimentar dos cães	15
2.2.	Fontes proteicas na alimentacao dos cães	15
2.2.1.	Fontes de proteina animal.....	16
2.2.1.1	<i>Farinha de vicerias de frango</i>	17
2.2.1.2.	<i>Proteina hidrolisada</i>	17
2.2.2.	Fontes de proteina vegetal.....	18
2.2.2.1.	<i>Glúten de trigo</i>	19
2.3.	Digestão e fermentação intestinal das proteínas em cães.....	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1.	Local de condução do ensaio.....	22
3.2.	Animais	22
3.3.	Delineamento experimental.....	22
3.4.	Dietas experimentais	23
3.5.	Parâmetros avaliados	25
3.5.1.	Digestibilidade aparente dos nutrientes e avaliação de escore fecal	25
3.5.2.	Determinação do pH fecal	26
3.5.3.	Determinação de ácidos graxos de cadeia curta e cadeia ramificada.....	27
3.5.4.	Determinação da concentração de ácido lático nas fezes.....	27
3.5.5.	Determinação da concentração de aminas biogênicas nas fezes	28
3.5.6.	Determinação de nitrogênio amoniacal nas fezes	28
3.5.7.	Determinação de compostos orgânicos voláteis nas fezes	29
3.5.8.	Análise sensorial das fezes	30
3.6.	Análises estatísticas.....	30
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

4.1.	Digestibilidade aparente dos nutrientes, ingestao de alimento e variáveis fecais.....	32
4.2.	Determinação de ácidos graxos de cadeia curta, ramificada, nitrogênio amoniacal, ácido láctico e aminas biogênicas	36
4.3.	Determinação de compostos orgânicos voláteis nas fezes	37
4.4.	Análise sensorial das fezes	42
5.	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44
	APÊNDICE A - Artigo I	50
	APÊNDICE B – Artigo II	60

1. INTRODUÇÃO

A integração dos cães como membros da família, apesar dos vários benefícios, trouxe uma série de problemas para os proprietários que adotaram esta forma de vida com seu animal de estimação. O forte odor das fezes e a produção excessiva de gases são alguns desses fatores, porém existem algumas raças que, por conhecimento popular, são famosas pelo odor de suas fezes e excesso de flatulências quando comparadas com outras. Dessa forma, a indústria precisa buscar produtos e tecnologias para se adaptar a este segmento de tutores com necessidades adicionais.

Embora a digestão e absorção pelo intestino delgado das proteínas seja um processo eficiente, quantidades substanciais de proteínas não digeridas, não são absorvidos pelo epitélio do intestino delgado, sendo transportadas até o intestino grosso (BLACHIER et al., 2007; BOYE; BETTONI; BURLINGAME, 2012), onde a fermentação bacteriana destes componentes resulta na produção de diversos compostos de putrefação, levando ao acúmulo de produtos da fermentação tais como a amônia, aminas, fenóis, indóis, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), gases (hidrogênio, dióxido de carbono e metano), aminas biogênicas, tais como putrescina, cadaverina, histamina, feniletilamina. Assim como também produtos intermediários da fermentação como o lactato. No entanto, estes produtos de fermentação responsáveis pelo mau odor constituem menos de 1,0% dos gases intestinais (ROUDEBUSH; DAVENPORT; REMILLARD, 2010), sendo que, na sua maioria, estão compostos por nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e dióxido de carbono, os quais são inodoros (CAVE, 2013).

Alguns destes compostos, por exemplo os AGCC, são benéficos para os enterócitos intestinais aportando energia para estes, no entanto, catabólitos como as aminas, os fenóis, indóis e o amoníaco, além de influenciarem no mau odor das fezes, podem ser tóxicos em altas concentrações (KUZMUK et al., 2005; NERY et al., 2012). Segundo Zentek et al. (2003), a ingestão de dietas com altas concentrações de proteínas favorece o crescimento de bactérias indesejáveis, como *Clostridium perfringens*, e diminui as contagens fecais de outras bactérias benéficas, o que resulta em desequilíbrio na microbiota intestinal e consequente aumento da excreção de enterotoxinas e outros produtos metabólicos relacionados ao aumento da decomposição das proteínas no colón.

Entre as raças que apresentam maior mau odor em suas fezes, encontram-se as braquicéfalas, que se caracterizam por apresentar crânio curto e trufa achatada. Estas

características anatômicas favorecem o processo de aerofagia, fator predisponente para a produção de gases no intestino, que associado com substratos não assimilados levam a maior fermentação bacteriana pelos microrganismos intestinais (CAVE, 2013; ROUDEBUSH; DAVENPORT; REMILLARD, 2010). Entre as raças braquicefálicas mais conhecidas estão o Bulldog inglês, Bulldog Francês, Boxer, Boston terrier e o Pug. Em relação ao Bulldog Francês, sua aceitação por parte dos tutores cresceu nos últimos 10 anos, fato que tornou a raça a mais popular do Reino Unido (LIU et al., 2015), a sexta nos Estados Unidos (AKC, 2016), a primeira na Argentina (CLARÍN, 2016) e segundo o ranking de registros genealógicos de 2015 da Confederação Brasileira de Cinofilia, é a segunda raça mais registrada no Brasil (PADOVANI, 2016).

Contudo, em animais com problemas de excesso de mau odor nas fezes e flatulências é recomendado fornecer alimentos com proteínas de alta qualidade que possuam digestibilidade superior a 85%. Além disso, a redução da quantidade porcentual da proteína na formulação possibilitaria a diminuição dos aminoácidos não digeridos disponíveis no colón e em consequência baixa fermentação por parte dos microrganismos desta região do intestino, resultando na redução do odor das fezes em cães com condição braquicefálica (CAVALARI et al., 2006; ROUDEBUSH; DAVENPORT; REMILLARD, 2010).

A presente dissertação tem como objetivo avaliar os efeitos da inclusão de diferentes fontes de proteína no alimento seco para cães Bulldog Francês sobre a fermentação microbiana, a absorção de nutrientes e identificação das mudanças nas emissões de componentes orgânicos voláteis e comparar os resultados com a técnica de teste sensorial em cães adultos da raça Bulldog Francês.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1. Natureza alimentar dos cães

Os cães pertencem a ordem taxonômica carnívora e são descendentes do lobo (*Canis lupus*) o qual é propriamente comedor de carne. No entanto, o cão é considerado onívoro, pois durante sua evolução e domesticação adaptou-se a uma alimentação oportunista, desenvolvendo características fisiológicas e anatômicas que permitiram a digestão e aproveitamento de dietas mais variadas (HAND et al., 2010; NRC, 2006). Estas afirmações podem ser verificadas segundo os achados genéticos que demonstram uma mudança de três genes no genoma dos cães comparado com o lobo, os quais são fundamentais na digestão de grãos e cereais, esta adaptação genética permitiu aos cães melhorar sua capacidade para sintetizar nutrientes a partir de precursores, respaldando a premissa de que os cães são onívoros (AXELSSON et al., 2013; HAND et al., 2010).

Os cães possuem um trato gastrointestinal monogástrico, compostos por: boca, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus. Possuir um trato digestivo curto é uma característica típica do sistema digestivo da ordem carnívora. Cães com uma longitude de corpo de 0,75 m, possuem uma longitude intestinal em média de 4,5 m (intestino delgado = 3,9 m; intestino grosso = 0,6 m) (NRC, 2006). Esta característica contribui para uma velocidade de passagem dos alimentos rápida que reflete na sua adaptação a fontes de alimentos com alta digestibilidade, tais como proteína de origem animal ou vegetal e gordura. Além disso, os cães tem um colón não sacular, um ceco pequeno e uma passagem rápida do alimento através da parede intestinal, características que demonstram sua necessidade em alimentar-se de dietas com alta densidade energética e alta digestibilidade (CASE et al., 2011).

2.2. Fontes proteicas na alimentação dos cães

As proteínas são componentes essenciais nas dietas dos animais, pois possuem papel essencial nos componentes estruturais e funcionais do organismo (BOYE; BETTONI; BURLINGAME, 2012). Entre as características nutricionais que são determinantes na escolha de uma fonte proteica na formulação de uma dieta, destaca-se o perfil de aminoácidos essenciais biodisponíveis e sua digestibilidade (MILLWARD et al., 2008). Assim, fontes de

alta qualidade proteica com valores altos na sua digestibilidade permitem estimativas mais baixas da necessidade da proteína na formulação de rações. Outro ponto seria a falta de capacidade dos cães em armazenar o excesso de aminoácidos, pois os aminoácidos excedentes são utilizados nas via gluconeogênicas para formação de energia ou transformada em gordura para o armazenamento como tecido adiposo (CASE et al., 2011). Por outro lado, alguns resíduos destes aminoácidos podem permanecer no intestino grosso contribuindo na formação de gases de putrefação. Desta forma, a qualidade da proteína é um aspecto importante a se considerar para o atendimento das necessidades aminoacídicas e manutenção da saúde nos cães (BOYE; BETTONI; BURLINGAME, 2012; MILLWARD et al., 2008).

As proteínas são um componente fundamental na alimentação do cão, porém numerosos ingredientes podem provir de fontes animais, como carne de frango, peru, pescado, carne bovina, cordeiro, vísceras, entre outros, e de fontes vegetais como são os grãos e cereais, sendo que os mais utilizados na alimentação para animais de companhia como fontes concentradas de proteínas vegetais estão representadas por a soja e glúten de milho (CASE et al., 2011; HAND et al., 2010). A qualidade das fontes proteicas utilizadas na alimentação de cães pode ser muito variada devido à disponibilidade de aminoácidos de cada fonte, sendo necessária uma complementação proteica na formulação. Isto significa que para que o alimento aproxime-se a um perfil de aminoácidos com o equilíbrio perfeito para atender os requerimentos da espécie, devem ser utilizadas diferentes fontes proteicas, tanto animal como vegetal, para complementar as falência do componente proteico principal e assim melhorar a qualidade final do alimento (MILLWARD et al., 2008).

2.2.1.1. Fontes de proteína animal

As proteínas de origem animal são consideradas de alto valor biológico, por apresentar maior qualidade de nitrogênio e mais completo perfil de aminoácidos (CASE et al., 2011). Entre as proteínas de origem animal, são encontradas proteínas muito complexas, que vão do tipo fibrosa, como são a miosina do músculo de fácil digestão, até o colágeno dos tendões, de difícil digestão. E as proteínas globulares como a caseína do leite e a albumina do ovo, que são facilmente digeridas. Porém, durante o processamento das farinhas, como a de carne e ossos e a farinha de vísceras de frango, estas podem possuir diferentes porções do corpo do animal abatido, interferindo na composição final das farinhas. Outros fatores, são a temperatura, pressão e tempo de processamento, os quais influenciam diretamente na qualidade final do produto. As proteínas de origem animal são mais propensas a ter presença

de contaminantes como também um maior valor de matéria mineral, principalmente pela composição de seus ingredientes como penas, ossos ou cascas de ovos. A presença de uma maior quantidade de matéria mineral no ingrediente, pode afetar a digestibilidade do alimento (CARCIOFI, 2008a; CARCIOFI et al., 2006).

As fontes de proteína animal das empresas de alimentos para animais de companhia, incluem farinha de carne e seu subprodutos, farinha de frango e subprodutos de frango, cordeiro e farinha de carne de cordeiro, ovo desidratado, peixe e farinha de peixe. Estas fontes também são bem utilizadas nos alimentos para animais de estimação como fontes para melhorar a palatabilidade dos mesmos (BADINA, 2012).

2.2.1.1.1. Farinha de vísceras de frango

A farinha de vísceras de frango é um produto que resulta do cozimento, prensado e moedura das vísceras de frango, podendo apresentar diferentes proporções de cabeça, pescoço, pés, não devendo apresentar contaminação com penas, exceto aquelas que podem ocorrer não intencionalmente, nem matérias estranhas à sua composição, como cascas de ovo (AAFCO, 2009; BELLAYER, 2005).

O processo básico de produção da farinhas de vísceras de frango consiste na retirada do excesso de água, posteriormente leva-se as vísceras aos digestores para cocção com pressão, por tempo variável dependendo do processo, a gordura é separada, diminuindo o teor de gordura a níveis de 7% a 9%. O resíduo sólido é moído na forma de farinha com especificações de granulometria variáveis (BELLAYER, 2005). No entanto, a qualidade do produto pode ser comprometida se a temperatura, pressão e tempo empregados forem incorretos. As farinhas de vísceras quando são devidamente processadas e acrescidas de um antioxidante que evite a oxidação e suas consequências, torna-se um produto de valor nutricional elevado com ampla utilização nos alimentos para cães (CARCIOFI et al., 2006; NASCIMENTO, 2000)

2.2.1.1.2. Proteína hidrolisada

A proteína hidrolisada é a proteína fracionada até peptídeos ou aminoácidos por ação de enzimas proteolíticas, possibilitando ao indivíduo a absorção diretamente no intestino sem prévia digestão no estômago (BENÍTEZ; IBARZ; PAGAN, 2008).

Pode ser utilizado como material de partida para a obtenção do hidrolisado proteico produtos de origem animal, vegetal ou bacteriano, sendo comum entre os vegetais a utilização de proteínas de soja, trigo e arroz. Entre os substratos de origem animal, são empregados o peixe, subprodutos do matadouro de aves, bovino, entre outros (BENÍTEZ; IBARZ; PAGAN, 2008). Além disso, podem ser utilizados os resíduos de carne, pois a hidrólise enzimática tem a capacidade de recuperar a qualidade deste tipo de proteínas menos digeríveis para o animal, tornando um produto de melhor qualidade e valor agregado partindo de dejetos (TAHERI et al., 2013).

Em comparação com os tratamentos mecânicos que podem alterar de forma negativa nutricionalmente o produto final, a proteólise enzimática tem a capacidade de melhorar as propriedades funcionais das proteínas, pois é um processo leve, rápido e controlável (KRISTINSSON; RASCO, 2000). A hidrólise proteica é realizada geralmente em um reator, com controle de agitação, pH, temperatura e tempo do processo. O substrato é dissolvido em água até estabilizar o pH e a temperatura, em seguida, é adicionada a protease dando início a hidrólise. Posteriormente, ocorre uma diminuição do pH devido à quebra de ligações peptídicas, sendo que, cada enzima tem um pH ótimo de ação, que deve ser mantido mediada com a adição de base diluída. Finalmente para terminar a hidrólise de proteínas, a enzima pode ser inativada pelo calor, pela diminuição do pH, ou uma combinação de ambos, ou podem ser removidas do meio por filtração do precipitado de proteína (BENÍTEZ; IBARZ; PAGAN, 2008).

2.2.1.2. Fontes de proteína vegetal

As proteínas de origem vegetal tem um menor valor biológico quando comparado com as proteínas animais, mas por outro lado apresentam composição mais uniforme com menor variação entre os fornecedores, além de ter maior disponibilidade no mercado. Em contraposição, as fontes vegetais possuem fatores antinutricionais, mas mediante o tratamento térmico e industrial que são submetidos durante seu processamento, melhora significativamente a qualidade destas matérias primas (CARCIOFI, 2008a; KAWAUCHI et al., 2014).

As fontes de proteína vegetal utilizadas nos alimentos para animais de companhia, incluem farinhas de glúten de milho, farinha de soja, proteína hidrolisada de soja e gérmen de trigo. Geralmente os alimentos para cães que contém grãos como principal fonte de proteína, incluem uma combinação de produtos de soja e farinha de glúten de milho (BADINA, 2012).

2.2.1.3. *Glúten de trigo*

O trigo é uma planta pertencente à família das gramíneas, cultivado em quase todo o mundo (EMBRAPA, 2016). O cultivo do trigo tem uma grande importância cultural, pois seu cultivo marcou o início da agricultura e o assentamento de algumas culturas de homínídeos (FERNÁNDEZ, 2013) e junto com isto, a possibilidade para que os primeiros cães se alimentassem com cereais, dando início a mudanças genéticas nos cães, o que resultou na capacidade em digerir amido (AXELSSON et al., 2013). O trigo é principalmente processado em forma de farinha, o qual é a base do pão, e empregada como a fonte importante de proteína vegetal na alimentação humana, da qual uma pequena porcentagem é destinada para alimentação animal (EMBRAPA, 2016; FERNÁNDEZ, 2013). Durante o ano de 2016 foram produzidas no mundo, 751,263 milhões de toneladas de trigo, sendo que o maior produtor neste mesmo ano foi a Austrália, com 33,000 milhões de toneladas. O Brasil por sua parte teve uma produção de 6,700 milhões de toneladas (USDA, 2016).

As proteínas do trigo são chamadas de glúten, as quais são produzidas exclusivamente no endosperma amiláceo dos grãos do trigo, é obtido como subproduto da produção do amido de trigo, sendo facilmente separado da farinha por ser insolúvel em água (FERNÁNDEZ, 2013; HOSENEY, 2010; SCHERF; KOEHLER; WIESER, 2016). O glúten de trigo tem como característica seu alto conteúdo de proteínas totais, ao redor de 80-90%, estas proteínas são classificadas em gliadinas e gluteninas, e estas são formadas por uma complexa mistura de aa, que podem ser separadas em mais de 50 componentes individuais (DE BLAS; MATEOS; GARCÍA, 2010; FERNÁNDEZ, 2013; SCHERF; KOEHLER; WIESER, 2016). O conteúdo de lipídeos está entre 5-10%, além de amido residual e carboidratos (EMBRAPA, 2016). O trigo apresenta uma digestibilidade elevada e boas propriedades físicas, como alta solubilidade, sabor e odor neutro, e alto conteúdo de glutaminas. Este é o aminoácido mais abundante no glúten, com importância dentro da nutrição animal, pois favorece o desenvolvimento da mucosa intestinal (DE BLAS; MATEOS; GARCÍA, 2010; FLORES, 2014)

Outra característica do glúten é o número relativamente alto de aminoácidos hidrofóbicos, aproximadamente 35% e escassez de aminoácidos básicos (FLORES, 2014). O perfil de aminoácidos essenciais do glúten de trigo comparado com outras fontes de proteína vegetal é desfavorável, pois possuem como aminoácidos limitantes a metionina, triptofano e lisina, os

quais correspondem a aminoácidos essenciais para os cães (DE BLAS; MATEOS; GARCÍA, 2010; FLORES, 2014; HOSENEY, 2010).

2.3. Digestão e fermentação intestinal das proteínas em cães

Os processos digestivos das proteínas começam na boca, com a sua hidratação e solubilização. Destas permanecem intactas no estômago, apenas algumas delas são desnaturadas pelo HCl segregado no estômago, neste ponto as ligações peptídicas são mais acessíveis à proteólise pelas enzimas digestivas. Além disso, a pepsina é ativada pelo HCl, que fragmenta a proteína em peptídeos. No duodeno são secretados, pelo pâncreas, enzimas tais como a tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase, collagenase e elastase para quebrar os peptídeos em fragmentos menores, os quais, finalmente no intestino delgado irá ser convertido em aminoácidos ou di e tri-peptídeos por parte das amino-peptidase, onde finalmente podem ser absorvidas pelas células da mucosa intestinal (KLEIN, 2013). Embora a absorção pelo intestino delgado é um processo eficiente, quantidades substanciais de compostos do nitrogênio, de origem exógena como endógena, tais como os produtos da secreção do pâncreas, a descamação dos enterócitos, entre outras (BLACHIER et al., 2007), não são absorvidos pelo epitélio do intestino delgado, permanecendo no lúmen intestinal, sendo transportadas até o intestino grosso (BLACHIER et al., 2007; BOYE; WIJESINHA-BETTONI; BURLINGAME, 2012).

Em contraste com o rápida passagem do material luminal pelo intestino delgado, o intestino grosso tem uma taxa de passagem mais lenta, o que contribui com o desenvolvimento de grandes populações bacterianas (BLACHIER et al., 2007). Estas bactérias realizam uma intensa proteólise, resultando na liberação de peptídeos e aminoácidos seguidos por uma série de reações de oxidação e redução. Adicionalmente, o pH do cólon ascendente e descendente é mais ácido que o do intestino delgado, o que possivelmente contribui ainda mais com a degradação proteica (BLACHIER et al., 2007) e a fermentação de compostos de putrefação nesta porção do intestino.

Na microbiota presente ao longo do trato gastrointestinal, encontram-se três principais domínios: reino Archaea, reino Bactérias e domínio Eukaria. As bactérias são o grupo mais abundante e metabolicamente ativo, representando 98% da microbiota fecal em cães e a maior parte delas localizam-se no intestino grosso ($\sim 10^{11}$ células bacterianas por grama de conteúdo intestinal) e uma grande diversidade de filos. Entre os principais filos mais prevalentes no intestino grosso estão o Firmicutes (*Clostridium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*,

Enterococcus, *Lactococcus lactis*) o qual corresponde a 47,7% do total; Proteobactérias (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*) em proporção de 23,3% e Bacteroidetes com 12,4%. Também tem sido identificado, porém em menor escala, os filos Actinobacteria, Fusobactérias, Espiroquetas, Verrucomicrobia, Cianobactérias e Tenericutes (CLAPPER; MEADE, 1963; DENG; SWANSON, 2015; GARCIA-MAZCORRO; MINAMOTO, 2013).

Segundo ZENTEK et al. (2003), a ingestão de dietas com altas concentrações de proteínas favorece o crescimento de bactérias indesejáveis, como *Clostridium perfringens*, e diminui as contagens fecais de outras bactérias benéficas, o que resulta em desequilíbrio na microbiota intestinal e consequente aumento da excreção de enterotoxinas e outros produtos metabólicos relacionados ao aumento da decomposição das proteínas. Cabe ressaltar que os produtos putrefativos originados a partir da proteína e mesmo a quantidade de bactérias do gênero *Clostridium* têm sua produção e contagem aumentadas em cães alimentados com dietas com alta proteína de origem animal (ZENTEK et al., 2003). Além disso, a fermentação microbiana de aminoácidos não digeridos, resulta na produção de diversos compostos de putrefação, tais como a amônia, ácidos graxos de cadeia ramificada, fenóis, indóis (produtos de descarboxilação de aminas aromáticas), aminas biogênicas, tais como putrescina, cadaverina, histamina, feniletilamina, hidrogeno, dióxido de carbono e metano (HENDRIKS; VAN BAAL; BOSCH, 2012). Estes catabólitos da proteína além de influenciarem no mau odor das fezes, podem ser tóxicos em altas concentrações (KUZMUK et al., 2005).

Dessa forma, a degradação das proteínas não digeridas no cólon podem ser as responsáveis pelo aumento do odor fecal em cães da raça Bulldog Francês. Portanto, estratégias nutricionais baseadas na alteração das concentrações e das fontes proteicas podem ser importantes para diminuir o impacto da atividade fermentativa no cólon e assim, modular a composição da microbiota intestinal, sua atividade metabólica e a formação de produtos de fermentação, efeitos que podem ser importantes para a redução do mau odor nas fezes dos cães braquicefálicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de condução do estudo

O presente estudo foi conduzido no Centro de Desenvolvimento Nutricional da Premier Pet (CDN Premier Pet), localizado na cidade de Dourado, São Paulo, com aprovação pelo “Comitê de Ética no Uso de Animais” da FZEA/USP (Protocolo n° 3596101116)

3.2. Animais

Foram utilizados oito cães da raça Bulldog Francês, machos e fêmeas, castrados e inteiros, com peso médio de $11,09 \pm 2,35$ kg, idade média de $2,75 \pm 1,98$ anos, procedentes do CDN Premier Pet. O estado de saúde foi confirmado previamente ao início do experimento por meio de exames físico, sanguíneo e coproparasitológico.

3.3. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento quadrado latino 4x4 replicado, incluindo cada um quatro tratamentos e quatro períodos, gerando oito repetições por tratamento. Cada período teve duração de 28 dias, divididos em três fases conforme descrito na Figura 1. Ao término de cada período de 28 dias, os animais eram pesados e tinham a quantidade de alimento reajustada de forma a assegurar a manutenção do peso inicial.

Figura 1. Procedimentos realizados em cada etapa dos períodos experimentais. AGCC, ácidos graxos de cadeia curta; AGCR, ácidos graxos de cadeia ramificada; COV, compostos orgânicos voláteis.

Fonte: Urrego, 2017

Na fase de adaptação (primeiros 20 dias) os cães foram alojados em duplas (conforme ao tratamento recebido) em canis medindo 2 x 5,60 m e solário de 2 x 4,90m, para um área total de 11,2 m², providos de cama, aquecedor e água (Figura 2). Os animais foram separados no fim desta etapa e a partir do dia 21 permaneceram em baias individuais durante as fases de digestibilidade e saúde intestinal. Os animais eram soltos individualmente durante uma hora todos os dias em baias maiores denominadas áreas de exercício.

Figura 2. Canil individual

Fonte: Urrego, 2017

3.4. Dietas experimentais

Foi formulada uma dieta controle, de modo a atender as exigências do NRC (2006) para cães adultos em manutenção, e a partir da mesma as inclusões de diferentes fontes proteicas (Tabela 1) foram desdobradas. Após a formulação, os ingredientes foram pesados, moídos, misturados e na sequência as dietas foram extrusadas. Esta etapa foi realizada na Unidade Fabril da Premier Pet, Dourado – SP.

As dietas experimentais corresponderam a inclusão de três diferentes fontes proteicas, obtendo quatro dietas distribuídas da seguinte forma:

T0 – Dieta controle com proteína de origem animal (farinha de vísceras de frango)

T1 – Dieta com proteína de origem vegetal (glúten de trigo)

T2 – Dieta com proteína de origem animal e proteína de origem vegetal (farinha de vísceras de frango + glúten de trigo)

T3 – Dieta com proteína de origem animal, proteína de origem vegetal e proteína hidrolisada (farinha de vísceras de frango + glúten de trigo + proteína hidrolisada)

Todos os ingredientes empregados na produção das dietas experimentais foram obtidos a partir de um único lote, de modo a não permitir variabilidade entre os tratamentos. A fórmula e a composição química das dietas encontram-se na Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente.

Tabela 1. Níveis de inclusão das fontes proteicas nas dietas experimentais para cães da raça Bulldog Frances

Ingredientes	Dietas			
	T0	T1	T2	T3
Farinha de vísceras de frango	13,00%	-	6,50%	4,33%
Glúten de Trigo	-	13,00%	6,50%	4,33%
Proteína hidrolisada	-	-	-	4,33%

T0, Dieta com farinha de vísceras de frango; T1, Dieta com glúten de trigo; T2, Dieta com farinha de vísceras de frango e glúten de trigo e T3, Dieta com farinha de vísceras de frango, glúten de trigo e proteína hidrolisada. Demais ingredientes: Quirera de arroz, polpa de beterraba, celulose, óleo de vísceras de frango, óleo de peixe, ovo integral em pó, levedura de cerveja, palatabilizante, cloreto de potássio, premix vitamínico mineral, óxido de magnésio, sal, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio e antioxidante.

Os animais receberam as quatro dietas experimentais, sendo que, os tratamentos foram balanceados pelo peso corporal dos animais. A quantidade de alimento fornecida aos animais foi baseada na equação de predição da necessidade energética do *National Research Council* – NRC (2006) para cães adultos em manutenção, calculada por $130 \times (PC)^{0,75} = \text{Kcal/dia}$. A quantidade total diária foi dividida em duas refeições iguais, oferecidas as 7:00 e 15:30 horas. Os comedouros foram removidos passados 30 minutos após o oferecimento das dietas. O consumo e as sobras de alimento foram mesurados e anotado durante todo o experimento. A água foi oferecida “ad libitum”.

Tabela 2. Composição química analisada das dietas experimentais

Item	Dietas			
	T0	T1	T2	T3
Matéria seca (%)	93,69	92,35	93,52	92,50
	Composição na MS			
Matéria Mineral (%)	5,57	4,71	4,57	4,70
Matéria orgânica (%)	94,44	87,64	95,43	95,24
Proteína bruta (%)	21,95	23,66	23,31	22,05
Proteína bruta dos ingredientes estudados (%)	13,00	13,00	13,00	13,00
Proteína bruta dos ingredientes comuns (%)	8,95	10,66	10,31	9,05
Extrato etéreo em hidrólise ácida (%)	16,55	15,03	17,28	17,24
Fibra bruta (%)	1,68	1,86	2,27	1,73
Energia bruta (Kcal/Kg)	4594	4637	4552	4615

n=2; CV < 5%; T0, Dieta com farinha de vísceras de frango; T1, Dieta com glúten de trigo; T2, Dieta com farinha de vísceras de frango e glúten de trigo e T3, Dieta com farinha de vísceras de frango, glúten de trigo e proteína hidrolisada.

3.5. Parâmetros avaliados

3.5.1. Digestibilidade aparente dos nutrientes e avaliação de escore fecal

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas foram determinados pelo método de coleta total de fezes, segundo recomendações da AAFCO (2009). Dessa forma, o consumo de alimento foi registrado diariamente, pesando-se as quantidades oferecidas e recusadas de alimento a cada refeição. As fezes foram coletadas integralmente após totalização de 24 horas do fornecimento do alimento, durante cinco dias. As fezes foram pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer (-15°C) para posterior análise. Ao final do período de coleta, estas foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra única por animal e período (*pool* de fezes). Na sequência foi pesadas e secas em estufa de ventilação forçada (320-SE, FANEM, São Paulo, Brasil) a 55°C durante 72 horas. As fezes pré-secas e as dietas foram então moídas em moinho tipo faca (MOD 340, ART LAB, São Paulo, Brasil), com peneira de 1mm para proceder-se às análises laboratoriais.

Nas fezes e nos alimentos foram determinados, segundo metodologias descritas pela Association of the Official Analytical Chemists (AOAC, 1995), os teores de matéria seca

(MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), matéria mineral (MM) e fibra bruta (FB).

A energia bruta (EB) dos alimentos e fezes foram determinadas em bomba calorimétrica (1281, PARR Instrument Company, Illinois, EUA). Para isto, as amostras de fezes e rações foram pesadas para se proceder a combustão. As análises foram realizadas em duplicata e repetidas quando variarem mais de 5%. Os extrativos não nitrogenados (ENN) foram calculados pela diferença entre 100 e a soma da PB, EEHA, FB e MM. Todas as análises bromatológicas foram realizadas no laboratório de bromatologia do Centro de Desenvolvimento Nutricional da Premier Pet (CDN Premier Pet), localizado na cidade de Dourado, no estado de São Paulo.

Baseado nos resultados obtidos no laboratório, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo hidrólise ácida, fibra bruta e extrativos não nitrogenados das rações. Estes cálculos foram realizados com a seguinte fórmula:

$$\text{CDAN (\%)} = \frac{\text{nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente excretado (g)}}{\text{nutriente ingerido (g)}} \times 100$$

O escore fecal foi avaliado ao longo do período de coleta de fezes para a digestibilidade, aos quais foram atribuídas notas de 0 a 5, sendo consideradas: 0 = fezes líquidas; 1, fezes pastosas e sem forma; 2, fezes macias, mal formadas e que assumem o formato do recipiente de colheita; 3, fezes macias, formadas e úmidas, que marcam o piso; 4, fezes bem formadas e consistentes que não marcam o piso; 5, fezes bem formadas, duras e secas, considerando-se normal valores entre 3 e 4 (CARCIOFI et al., 2008b). Também foram avaliadas, a produção e qualidade das fezes. A produção de fezes por cão por dia, foi determinada tanto em matéria seca como natural.

3.5.2. Determinação do pH fecal

Uma única amostra de fezes foi coletada para determinação do pH fecal, a coleta de fezes foi realizada em até 30 minutos após a defecação dos animais. Sua determinação foi realizada por um peagâmetro digital de bancada (Digimed, DM-20, Quimis do Brasil Ltda., São Paulo/SP). Para tanto, foi realizada introdução direta do eletrodo em uma solução de 9:1 de água destilada e fezes, sendo pesados 2 gramas de fezes, as quais foram diluídas em 18 mL de

água destilada e, posteriormente, mensurado pH da solução, conforme metodologia adaptada de Walter, Silva e Perdomo (2005).

3.5.3. Determinação de ácidos graxos de cadeia curta e cadeia ramificada

As amostras de fezes foram coletadas em até 30 minutos após a defecação. Após coletadas, foram homogeneizadas e pesadas, sendo que para a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada foram utilizadas três gramas das fezes acidificadas com 9mL de ácido fórmico a 16%. As misturas foram mantidas pelo período de sete dias em refrigerador, homogeneizadas diariamente, e posteriormente, centrifugadas por 15 minutos, à 15°C, em 5.000rpm, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento, sendo este procedimento repetido por três vezes. Após a extração, as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C).

A determinação dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada foi realizada por cromatografia gasosa (Shimadzu Corporation, Kioto, Japão) de acordo com Erwin, Marco e Emery (1961), com detector de ionização de chama, controlado pelo programa Shimadzu GC Solution e coluna de separação Stalbilwax de 30 metros e 0,53mm, gás hélio como carreador, nitrogênio como make up, oxigênio com regulagem manual e injetor e detector de chama à 250°C, e a temperatura da coluna mantida em 145°C. Para calibração foi utilizada solução de padrão externa com ácido acético, propiônico, butírico, valérico, isovalérico e isobutírico. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA /ZAZ/ USP).

3.5.4. Determinação da concentração de ácido láctico nas fezes

O ácido láctico foi mensurado segundo metodologia descrita por Pryce (1969), pelo método de espectrofotometria a 565nm (500 a 570nm), utilizando branco reagente a fim de calibrar o espectrofotômetro (QUICK-Lab, DRAKE Eletrônica Comércio LTDA, São José do Rio Preto – SP). Foram coletadas 3 gramas de fezes frescas coletadas até 30 min após a defecação, e posteriormente homogeneizadas e misturadas com 9mL de água destilada (1:3 p/v). As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0,08%. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP.

3.5.5. Determinação da concentração de aminas biogênicas nas fezes

Para realizar as análises do perfil de aminas biogênicas nas fezes dos animais, foram coletadas 0,5 grama de fezes frescas em duplicata, em até 30 minutos após a defecação, as quais foram conservadas em 7mL de ácido tricloroacético a 5% e refrigeradas. Na sequência, as amostras foram centrifugadas (MR23i, Jouan S.A., Saint Herblain, França) a 10.000G, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo, e o resíduo extraído por mais duas vezes, empregando-se 0,7mL e 0,6mL de ácido tricloroacético a 5%. Os sobrenadantes foram combinados para posterior determinação das aminas biogênicas. Estas foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência por pareamento de íons em coluna de fase reversa e quantificadas por fluorimetria após derivação pós-coluna com oftalaldeído, conforme metodologia descrita por Vale e Gloria (1997).

A identificação das aminas foi realizada por comparação entre o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminas da solução padrão. Os padrões de aminas empregados foram: dicloridrato de putrescina, dicloridrato de cadaverina, cloridrato de tiramina, dicloridrato de histamina, cloridrato de 5-hidroxitriptamina (serotonina), complexo sulfato creatinina agmatina, tricloridrato de espermidina, tetracloridrato de espermina, cloridrato de 2-feniletilamina e triptamina. A solução estoque foi preparada por diluição do padrão de cada amina separadamente em ácido clorídrico 0,1N, formando soluções padrão contendo 1mg/mL de cada amina. Em seguida, cada solução padrão foi transferida para balão volumétrico, formando uma solução com 10 aminas, conforme metodologia descrita por Figueiredo (2008). Todos os procedimentos para a determinação das aminas foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG.

3.5.6. Determinação de nitrogênio amoniacal nas fezes

Para quantificação do nitrogênio amoniacal fecal, as amostras de fezes foram coletadas em até 30 minutos após a defecação. Após coletadas as fezes, foram homogeneizadas e pesadas, sendo que para a quantificação do nitrogênio amoniacal fecal foram utilizadas 3 gramas das fezes acidificadas com 9mL de ácido fórmico a 16%. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 5.000rpm durante 15 minutos a 15°C por três vezes, aproveitando-se o

sobrenadante e desprezando-se o sedimento. Após a extração as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C).

Os extratos foram descongelados à temperatura ambiente e, em seguida alíquotas de 2mL foram diluídas em 13mL de água destilada e submetidas à destilação em destilador de nitrogênio. A destilação foi realizada com 5mL de solução 2N de hidróxido de potássio, e a titulação com ácido clorídrico 0,005mol/L, conforme Vieira (1980). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP.

3.5.7. Determinação de compostos orgânicos voláteis nas fezes

Foram coletadas fezes frescas dos animais em até 15 minutos após a defecação, as quais foram rapidamente homogeneizadas; posteriormente colocou-se 0,5 g de amostra dentro de um frasco de vidro de 20 mL, hermeticamente fechado, com tampa metálica vazada e septo de dupla face silicone/teflon. As amostras foram armazenadas e mantidas a -20°C até o envio para o laboratório. No laboratório os frascos foram aquecidos, incubados, a 80°C por um período de 20 min com agitação de 250 rpm. Após esse período tomou-se uma alíquota de 500 µL, com uma seringa gas-tight de 2,5 mL, aquecida a 100°C e imediatamente injetou-se na porta de injeção (PIRES; AUGUSTO, 2000; SILVA, 2007).

As amostras foram submetidas à análise por Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MSD) (Agilent Technologies, California, EUA) utilizando o equipamento constituído de um cromatografo de gás Agilent 7890A (GC) e um detector seletivo de massas Agilent 5975C (MSD) equipado com um injetor automático, liner split/splitless, MPS2 twister (Gerstel. Ing, Maryland, EUA) no modo de injeção SPME-HS com um fluxo constante de 1,0 mL/min-1. O GC foi equipado com uma coluna capilar Agilent J&W HP-5ms UI de fase estacionaria (CarborWax 19091S-433UI) (Agilent technologies, California, EUA) 30 m x 0.25 mm de diâmetro interior, espessura do filme 0.25 µm. Injeção sem divisão foi levada a cabo à temperatura de entrada de 250 °C. A separação dos componentes voláteis das amostras foi lograda com o seguinte programa de temperaturas do forno: a temperatura inicial da coluna foi de 40 °C e se manteve durante 2 min; foi aquecido a 280 a uma velocidade de 10 °C/min-1 durante 5 min. O MSD foi equipado com analisador monoquadrupolo com uma temperatura de 150°C, e a temperatura da fonte de iones foi de 230°C. O modo de aquisição scan na faixa de 10 a 400 Daltons e corte de solvente 0,5 min.

Para a identificação dos compostos detectados foi empregada a biblioteca de espectros de massas da NIST de 2008, selecionando-se um índice de similaridade $\geq$ a 75. Nos casos em que o índice de similaridade foi inferior procedeu-se a interpretação dos espectros de massas. As análises foram realizadas no Thomson Mass Spectrometry Laboratory do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/UNICAMP).

3.5.8. Análise sensorial das fezes

A análise sensorial foi realizada apenas no primeiro período experimental, já que o número amostral foram os avaliadores e não os animais. Este análises foi aprovado pelo “Comitê de ética em pesquisa com seres humanos” da FZEA/USP (protocolo n° 57616616.7.0000.5422).

Foram coletadas amostras de fezes frescas, em até 15 minutos após a defecação dos animais, que foram armazenadas em frascos de tampa rosqueável vedados com parafilme, as quais foram prontamente encaminhadas para análise sensorial. Para realização da avaliação foram convidados 68 avaliadores, proprietários ou não de cães, os quais avaliaram 15 gramas de material fecal à temperatura ambiente, colocados em cinco frascos, correspondentes a três tratamentos experimentais e dois com tratamento T0 (Dieta com farinha de vísceras de frango). A avaliação foi feita qualificando a intensidade do odor do material, e os tratamentos foram numerados de 1 a 5, sem identificação entre eles, e a utilização de um mesmo tratamento para duas numerações. As notas atribuídas às amostras seguiram uma escala de 1 a 5, sendo: 1 (odor muito forte), 2 (odor forte), 3 (odor normal), 4 (odor fraco) e 5 (odor muito fraco), conforme metodologia descrita por Maia (2008) e Roque et al. (2011).

3.6. Análises estatísticas

Os dados foram analisados considerando um delineamento em quadrado latino 4x4 duplicado. Os tratamentos foram comparados através da análise da variância usando contrastes.

$$Y1 = mT0 - mT1$$

$$Y2 = mT0 - mT2$$

$$Y3 = mT0 - mT3$$

$$Y4 = mT1 - mT2$$

$$Y5 = mT1 - mT3$$

$$Y6 = mT2 - mT3$$

As análises foram realizadas pelo PROC MIXED, versão 9.3 do SAS software (SAS, 2004). O modelo contemplou como efeito fixo o tratamento, e como efeitos aleatórios o animal e o período. A significância estatística foi determinada com valores de $P < 0,05$.

Os dados correspondentes ao compostos orgânicos voláteis (COV) foram analisados considerando um quadrado Latino 4x4. As frequências relativas por cada COV foram analisadas pelo Generalized Linear Mixed Model (GLMM), com função logística, tendo como efeito fixo o tratamento, e efeitos aleatórios o animal e o período. Estas análises foram realizadas com o PROC GLIMMIX da versão 9.3 do pacote estatístico SAS (SAS, 2004).

Os dados da análise sensorial de fezes foram analisados considerando um delinhamento experimental em blocos casualizado, com um modelo que teve como efeito fixo o tratamento, e como efeitos aleatórios os avaliadores e o erro. O PROC MIXED do SAS foi utilizado para estas análises. Os tratamentos foram comparados pelo análise da Variância, utilizando o Teste de Tukey quando houve efeito significativo. Para esta análise a significância estatística foi determinada com valor de $P < 0,10$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos da inclusão de diferentes fontes de proteína na digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas, produtos da fermentação fecal e emissões dos componentes orgânicos voláteis mais prevalentes e comparar os resultados com a técnica de teste sensorial em cães adultos da raça Bulldog Francês. No presente estudo foram estudados três aspectos que são pouco desenvolvidos na literatura: A digestão e metabolismo em cães da raça bulldog ou raças braquicefálicas, a utilização de glúten de trigo como fonte proteica nos alimentos para cães e a composição dos compostos orgânicos voláteis nas fezes dos cães.

Na literatura não foram achadas pesquisas que utilizaram cães de raças braquicefálicas em estudos relacionados com nutrição, portanto este trabalho é o primeiro em utilizar esta raça como modelo experimental. Por outro lado, foi achado um estudo (NERY et al., 2010, 2012) que utilizou o glúten de trigo e farinha de carne de frango em diferentes níveis de inclusão, para determinar se a má qualidade fecal em cães de porte grande com intestino sensível, estava associada ao aumento da fermentação proteica no intestino grosso. Entre os resultados achados, o mais relevantes para o atual estudo foi que a utilização de fontes de proteína altamente digeríveis, como o glúten de trigo, e a diminuição do teor de proteína dietética teve

efeitos benéficos sobre os fenômenos de fermentação no intestino posterior e, consequentemente, sobre a tolerância digestiva.

Em relação aos COVs, são relativamente poucas as pesquisas sobre a composição dos odores das fezes e das flatulências. Pesquisas em humanos têm sido mais desenvolvidas, já desde 1861. Ruge (RUGE, 1861) avaliou a composição das flatulências em humanos, e posteriormente outros autores (MOORE; JESSOP; OSBORNE, 1987; SUAREZ et al., 1997; TOMLIN; LOWIS; READ, 1991) continuaram com a quantificação dos gases mais abundantes nas flatulências, achando entre eles o hidrogênio, dióxido de carbono, metano e nitrogênio (GARNER et al., 2007). Como é relatado na revisão de NI et al. (2012), existem vários estudos sobre a composição de COVs nas fezes, ar e esgotos das granjas de produção de suínos, nos quais foram achados compostos tais como AGCC, AGCR, p-cresol, indol, fenol y escatol. No entanto, são escassas as informações sobre estes componentes nas excretas de cães e gatos e os compostos relacionados com o mau odor.

Na tabela 3 estão apresentados as principais pesquisas relacionadas com digestão e metabolismo em cães, a utilização de glúten de trigo como fonte proteica e a composição dos compostos orgânicos voláteis no intestino dos cães.

Tabela 3. Visão geral de pesquisas relacionadas com o estudo atual

Autores	Espécie – Raça	Técnica	Fontes e quantidades proteicas	Objetivo pesquisa
(NERY et al., 2010, 2012)	Cães - Miniature Poodles; Jack Russell; Schnauzer Miniatura; Schnauzers Standard; Schnauzers Gigante; Pastor Alemão	Digestibilidade, fermentação proteica	21,6-38,2% Glúten de trigo 21,4- 39,2% farinha de carne de frango 28,6 % farinha de carne de frango e glúten de trigo	Fermentação proteica em cães sensíveis
(HESTA et al., 2011)	Cães -Beagle	GC-MS	25% proteína bruta Royal Canin: Carne de frango desidratada, fígado de frango desidratado, proteína de carne desidratada, peixe desidratado	FOS, IMO, RS
(LOWE et al., 1997a, 1997b)	Cães - Beagle; Gatos - SRD	GC-MS	27% e 30% proteína, respectivamente. Farinha de carne	YSE

GC-MS, cromatografia de gases acoplada a espectrometria de massas; FOS, fruto-oligossacarídeos; IMO, isomalto-oligossacarídeos; RS, amido resistente; YSE, Yucca schidigera.

4.1. Digestibilidade aparente dos nutrientes, ingestão de alimento e variáveis fecais

Os valores de peso corporal, a média diária de ingestão dos nutrientes por Kg de peso corporal e os coeficientes de digestibilidade aparentes avaliados no presente estudo são apresentados na Tabela 4. Os valores de pH fecal, escore fecal e produção podem ser observados na Tabela 5.

O peso corporal dos animais não apresentou alteração ao longo do estudo ($p=0,98$). Na pesagem inicial os animais apresentaram peso médio de $11,6 \pm 0,79$ Kg, e escore corporal entre 4 e 5. Na pesagem final, foi observado um peso médio de $11,6 \pm 0,80$ Kg e foi mantido o escore corporal dos animais. Não apresentou diferença significativa ($P= 0,99$) dos pesos apresentados entre os tratamentos. As médias dos consumos não apresentaram diferença entre os tratamentos ($p=0,55$), o que sugere que não ocorreu preferência por algum dos alimentos, nem recusa dos mesmos. Os valores de consumo observados foram 81%, 88%, 89% e 90% da demanda energética diária para os tratamentos T0, T1, T2 e T3, respectivamente. Estes resultados podem explicar a manutenção do peso dos animais ao longo do período experimental, embora o tempo de consumo não fosse suficiente para causar uma diferença significativa neste parâmetro.

A ingestão dos nutrientes não diferiu entre as dietas ($p>0,05$), não tendo interferência com os resultados de digestibilidade. Não foram observadas diferenças na ingestão dos nutrientes com exceção da fibra bruta, que apresentou diferença significativa entre os tratamentos, sendo que a maior ingestão deste nutriente foi observado no tratamento T2 ($p<0,001$), valores intermediários para os tratamentos T3 e T1, e o tratamento T0 com menor valor apresentado. Estes valores concordam com os achados na composição das dietas, onde a maior porcentagem de FB foi achada no tratamento T2 (2,27%), intermediários para os tratamentos T3 e T1 (1,86% e 1,73%) e menor para o tratamento T0 (1,68%) (Tabela 2).

Não foi observado efeito das diferentes fontes proteicas no coeficiente de digestibilidade aparente do extrato etéreo em hidrólise ácida, dos extrativos não nitrogenados, fibra bruta, como da energia ($p>0,05$). As dietas com inclusão de glúten de trigo (T1) e farinha de vísceras de frango e glúten de trigo (T2) apresentaram efeito na digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica ($p<0,05$) e proteína bruta ($p<0,001$), observando-se valores maiores e iguais quando comparadas com T0 e T3 (Tabela 4).

Em geral, foram observados melhores valores de digestibilidade nas dietas que continham maiores proporções de glúten de trigo (T1 e T2), e menores nas dietas com inclusão de farinha de vísceras de frango (T0). Este resultado concorda com os dados obtidos por Nery et al. (2010), que avaliaram dietas contendo farinha de aves e glúten de trigo, em combinação ou não, em cães de diferentes raças. Além disso, avaliaram a digestibilidade destas fontes proteicas em diferentes concentrações, apresentando maiores coeficientes de digestibilidades aparente dos nutrientes com a inclusão de menos proteína (22% versus 39%) (NERY et al., 2010). No presente estudo, a dieta à base de glúten de trigo foi formulada com 22% de conteúdo proteico e 13% da quantidade total de proteína vinda do glúten. Estes resultados

foram semelhantes ou mesmo melhores em comparação com o estudo citado. Parcialmente, estes melhores resultados podem estar relacionados com a qualidade dos ingredientes utilizados na formulação de alimentos. Contudo, não foi esperado os resultados obtidos pelo tratamento T3, porém, isto ocorreu pela menor gelatinização do amido (77,7%) em comparação com T0, T1 e T2 (91%, 87,4% e 98,5%, respectivamente; dados não apresentados). As análises para determinação da digestibilidade da fibra bruta foram realizadas, mas não se obtiveram resultados por erro na técnica.

As dietas T0, T1 e T2 ($p < 0,05$) apresentaram maior escore fecal e pH fecal comparada com a dieta T3. Embora os resultados de escore fecal obtidos nos tratamentos T0, T1 e T2, não apresentaram diferença entre eles, foram similares aos observados em outro estudo com diferentes raças e tamanhos de cães (NERY et al., 2012), que acharam maior conteúdo de água nas fezes dos animais alimentados com dietas com inclusão de farinha de frango e menor umidade nas dietas que continham glúten de trigo.

Os dietas T1 e T2 ($p < 0,05$, Tabela 5) resultaram em menor produção de fezes (g na MS/100g de ração) quando comparados com T0 e T3. A maior produção de fezes por parte dos tratamentos T0 e T3 tem uma possível relação com o baixo coeficiente de digestibilidade aparente da proteína (83,98%, Tabela 3), além da baixa digestibilidade dos demais nutrientes. Alguns autores (HERNOT et al., 2005; WEBER et al., 2004) tem informado uma melhora na pontuação fecal e nos valores de pH quando os alimentos tem uma baixa inclusão de proteínas de melhor qualidade, produzindo uma menor fermentação no colón, o qual concorda com os achados do presente estudo.

Tabela 4. Ingestão de nutrientes, coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e energia bruta das dietas experimentais para cães da raça Bulldog Francês com diferentes fontes de proteína

Item	Dietas				EPM	CV (%)	Valor de <i>p</i>
	T0	T1	T2	T3			
Peso Corporal (Kg)	11,4	11,5	11,3	11,5			
	Ingestão (g/kg de peso corporal/dia)						
Matéria natural	16,93	17,84	18,10	19,39	0,76	22,91	0,22
Matéria seca	15,86	16,47	16,93	17,97	0,71	22,85	0,31
Matéria orgânica	14,98	15,63	16,16	17,12	0,68	22,91	0,26
Matéria mineral	0,88	0,83	0,77	0,85	0,04	22,86	0,28
Proteína bruta	3,48	4,17	3,95	3,96	0,17	23,54	0,09
Extrato etéreo hidrólise ácida	2,63	2,65	2,93	3,10	0,12	23,46	0,06
Fibra bruta	0,27 ^c	0,33 ^b	0,38 ^a	0,31 ^{bc}	0,02	26,45	<0,001
Extrativos não nitrogenados	8,63	8,29	8,90	9,56	0,38	22,95	0,21
Energia Bruta (Kcal/kg de peso corporal/dia)	72,86	76,37	77,07	82,95	3,28	22,85	0,29
	Coeficientes de digestibilidade (%)						
Matéria seca	85,22 ^{bc}	87,35 ^{ab}	88,77 ^a	86,16 ^b	0,37	2,31	0,02
Matéria orgânica	88,08 ^{bc}	89,61 ^a	90,44 ^{ab}	88,28 ^b	0,31	1,89	0,02
Matéria mineral	36,84	44,64	42,99	43,08	1,51	19,42	0,28
Proteína bruta	83,98 ^b	88,08 ^a	88,53 ^a	83,62 ^b	0,54	3,37	<0,001
Extrato etéreo hidrólise ácida	96,75	96,47	96,92	96,56	0,13	0,71	0,16
Extrativos não nitrogenados	91,71	92,09	93,28	91,78	0,27	1,61	0,17
Energia bruta	88,31	89,58	90,19	89,70	0,47	2,84	0,57

T0, Dieta com farinha de vísceras de frango; T1, Dieta com glúten de trigo; T2, Dieta com farinha de vísceras de frango e glúten de trigo e T3, Dieta com farinha de vísceras de frango, glúten de trigo e proteína hidrolisa; EPM, erro padrão da media; n = 8 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p>0,05$).

Tabela 5. Variáveis fecais em cães da raça Bulldog Francês mediante o consumo das dietas experimentais com diferentes fontes de proteína

Item	Dietas				EPM	CV (%)	Valor de <i>p</i>
	T0	T1	T2	T3			
pH fecal	6,37 ^a	6,39 ^a	6,44 ^a	6,14 ^b	0,05	4,21	0,02
Escore fecal	4,34 ^a	4,46 ^a	4,38 ^a	3,98 ^b	0,07	9,06	0,006
g fezes MN cão/dia	77,68	69,63	67,48	85,88	3,16	22,55	0,22
g fezes MS cão/dia	82,96	74,38	74,24	91,49	0,94	20,94	0,06
g fezes MN/100g de ração	42,34	35,60	35,44	40,04	1,18	16,60	0,11
g fezes MS/100g de ração	13,84 ^{ab}	11,68 ^{bc}	10,97 ^c	12,80 ^b	0,35	15,22	0,02

T0, Dieta com farinha de vísceras de frango; T1, Dieta com glúten de trigo; T2, Dieta com farinha de vísceras de frango e glúten de trigo e T3, Dieta com farinha de vísceras de frango, glúten de trigo e proteína hidrolisada; EPM, erro padrão da média; n = 8 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$).

4.2. Determinação de ácidos graxos de cadeia curta, ramificada, nitrogênio amoniacal, ácido láctico e aminas biogênicas

Os valores de ácido láctico, nitrogênio amoniacal, AGCC (ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico) AGCR (ácido valérico, ácido iso-valérico, ácido iso-butírico) e aminas biogênicas estão apresentados na Tabela 6.

Nenhum dos produtos da fermentação intestinal apresentou diferenças significativas entre as dietas. A baixa fermentação no presente estudo pode ser explicado pelo menor fluxo de proteínas não digeridas no intestino grosso, indicando uma quantidade constante de glucose como fonte de degradação dos microrganismos intestinais proveniente de carboidratos, e baixo conteúdo de aminoácidos e nitrogênio devido ao pouco conteúdo de proteínas nas dietas e a alta digestibilidade das mesmas (HWANG et al., 2016).

ZENTEK (1995) relata que os cães alimentados com proteínas mais digestíveis tinham menores quantidades de proteína no quimo ileal, o que permitiria a diminuição da putrefação no intestino posterior e, em consequência, a redução dos compostos envolvidos nos gases e mau odor fecal.

Tabela 6. Concentração de ácido láctico, nitrogênio amoniacal, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada e aminas biogênicas das fezes dos cães da raça Bulldog Francês alimentados com dietas experimentais com diferentes fontes de proteína

	Dietas				EPM	CV (%)	Valor de p
Item	T0	T1	T2	T3			
	mMol/kg em base na MS						
Ácido Láctico	11,38	11,65	16,59	12,82	1,14	47,06	0,23
Nitrogênio amoniacal	207,05	167,80	174,65	194,24	6,95	20,19	0,11
	AGCC (mMol/kg em base na MS)						
Ácido Acético	92,47	97,73	101,9	96,97	4,05	22,43	0,91
Ácido Propiônico	65,53	65,37	60,51	73,15	2,98	24,27	0,25
Ácido Butírico	3,56	3,17	2,91	3,31	0,21	34,52	0,29
AGCC Totais	141,37	167,82	165,33	151,75	6,56	21,21	0,83
	AGCR (mMol/kg em base na MS)						
Ácido Valérico	0,68	0,62	0,00	0,75	-	-	-
Ácido Iso-valérico	4,93	4,46	4,36	4,45	0,28	32,77	0,58
Ácido Iso-butírico	21,43	20,73	21,88	20,65	1,09	27,84	0,99
AGCR Totais	23,15	26,78	22,96	22,24	1,22	25,50	0,97
	mg/100g de fezes na matéria natural						
Tiramina	1,14	1,43	1,64	1,19	0,13	53,19	0,65
Putrescina	6,28	4,71	6,79	8,50	0,40	32,22	0,09
Cadaverina	0,75	0,90	0,77	1,00	0,10	61,46	0,75
Espermidina	2,67	2,28	2,95	2,60	0,14	28,24	0,22
Feniletilamina	0,23	0,00	0,48	1,35	-	-	-
Triptamina	0,23	0,22	0,20	0,21	0,02	53,40	0,92
Aminas totais	11,30	9,54	12,83	14,85	0,79	32,79	0,98

T0, Dieta com farinha de vísceras de frango; T1, Dieta com glúten de trigo; T2, Dieta com farinha de vísceras de frango e glúten de trigo e T3, Dieta com farinha de vísceras de frango, glúten de trigo e proteína hidrolisada; EPM, erro padrão da média; n = 8 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si (p>0,05); AGCC, ácidos graxos de cadeia curta;

4.3. Determinação de compostos orgânicos voláteis nas fezes

Na Tabela 7 são apresentados os compostos orgânicos voláteis (COVs) achados nas fezes e sua porcentagem de frequência em cada um dos tratamentos. Os compostos com maior ocorrência durante o experimento, foram selecionados com o objetivo de verificar a existência de diferenças estatística entre os tratamentos, os resultados podem ser observados na Tabela 8.

Foram identificados 68 COVs neste estudo, 17 compostos tiveram maior frequência nas 4 dietas (Tabela 8), mas apenas 2 compostos (indol e fenol) apresentaram diferenças entre as dietas. Além disso, foram detectados muitos compostos em menor frequência,

no entanto, por serem poucas as informações que se possui na literatura sobre COVs em cães, estes foram descritos pela importância do achado.

Entre os compostos achados, os mais comuns foram os ácidos graxos de cadeia curta, indol e o fenol. Estes compostos também apresentaram de forma geral os picos mais altos em todas as amostras, representando uma maior abundância quando comparado com os demais compostos (Figura 3)

Figura 3. Representação gráfica da área dos picos dos compostos orgânicos voláteis

Fonte: Urrego, 2017

Tabela 7. Porcentagem de ocorrência dos Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) nas fezes de cães da raça Bulldog Francês alimentados com dietas experimentais com diferentes fontes de proteína

COVs	T0	T1	T2	T3	COVs	T0	T1	T2	T3
Acetic acid ^a	100	100	100	100	Oleic acid	-	12,5	-	25
Acetoin	-	12,5	-	-	Oxime-, methoxy-phenyl-	-	37,5	-	-
Acetone ^a	62,5	62,5	50	75	Pentadecanoic acid	-	-	-	12,5
Alpha-Pinene	12,5	-	-	-	Pentanoic acid ^a	37,5	25	37,5	50
Benzaldehyde	12,5	25	12,5	37,5	Phenol ^a	100	87,5	100	100
Benzyl alcohol	-	-	-	12,5	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	12,5	-	25	25
Butanal, 3-methyl-	-	12,5	-	25	Phenylethyl alcohol ^a	50	50	50	62,5
Butanoic acid ^a	100	100	100	100	Phthalic acid, decyl isobutyl ester	-	-	12,5	-
Butanoic acid, 3-methyl - ^a	100	87,5	75	100	Phthalic acid, isobutyl nonyl ester	-	-	12,5	-
Butanoic acid, butyl ester	12,5	12,5	37,5	-	Phthalic acid, isobutyl octyl ester	-	12,5	-	-
Butanoic acid, ethyl ester	-	-	12,5	-	Propanoic acid ^a	100	100	100	100
Butanoic acid, hexyl ester	37,5	12,5	12,5	-	Propanoic acid, 2-methyl- ^a	100	100	100	100
Butanoic acid, methyl ester	-	12,5	-	-	Propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	-	-	25	12,5
Butanoic acid, propyl ester ^a	25	37,5	50	25	Propanoic acid, butyl ester	12,5	-	37,5	-
Butylated Hydroxytoluene	25	12,5	-	-	Quinoline, 1,2,3,4-tetrahydro-	37,5	50	12,5	37,5
Cholesta-3,5-diene	12,5	-	-	12,5	Quinoline, 2-methyl-	25	62,5	12,5	25
Cholesterol	25	12,5	-	-	Quinoline ^a	100	87,5	62,5	100
Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	25	12,5	-	12,5	Squalene	25	25	12,5	25
Cyclopentasiloxane, decamethyl-	25	12,5	12,5	-	Tetradecanoic acid	-	-	-	25
Cyclopropanamine, 2-phenyl-, trans-	-	-	25	-	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl	12,5	-	-	-
Diethyl Phthalate	12,5	-	-	-	1-Butanol ^a	75	62,5	62,5	75
Dimethyltrisulfide	12,5	-	-	-	1-Hexanol	-	12,5	-	-
Dimethyldisulfide,	25	-	-	-	1-propanol ^a	100	87,5	100	100
D-Limonene	12,5	-	12,5	-	1-Undecanol	25	-	-	-
Ethanol ^a	100	87,5	62,5	75	2(3H)-Furanone, dihydro-3-hydroxy-4,4-dimethyl-, (+/-)-	-	-	-	12,5
Ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-	-	-	12,5	-	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	12,5	-	-	-
Glycerin	25	12,5	-	-	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone	-	12,5	-	25
Indole ^a	87,5	100	100	100	2-Cyclopenten-1-one, 2-(2-butenyl)-3-methyl-, (Z)-	12,5	-	-	12,5
Methylamine, N,N-dimethyl-	12,5	-	-	-	2-Methoxy-4-vinylphenol	-	-	12,5	25
n-Hexadecanoic acid	25	25	12,5	50	2-piperidinone ^a	100	100	100	100
N-Hydroxymethylacetamide	-	12,5	-	12,5	2-Propanone, 1-hydroxy-	-	-	-	12,5
n-Propyl acetate	12,5	25	12,5	-	3-tert-butyl-4-hydroxyanisole ^a	87,5	100	87,5	100
Octadecanoic acid	12,5	12,5	12,5	50	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	-	12,5	-	25
o-Cymene	12,5	-	12,5	-	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	-	-	-	25

^a Compostos selecionados para análise discriminante

Tabela 8. Média percentual da área dos picos dos compostos orgânicos voláteis mais abundantes presentes nas fezes de cães da raça Bulldog Francês alimentados com dietas experimentais com diferentes fontes de proteína

Item	Dietas				EPM	CV (%)	Valor de p
	T0	T1	T2	T3			
Acetone	1,49	1,65	0,88	1,25	0,03	19,79	0,66
Ethanol	1,02	1,30	1,39	1,16	0,10	42,19	0,93
1-propanol	1,45	1,72	1,86	1,28	0,13	43,61	0,82
Butanoic acid	11,65	12,99	13,39	11,52	0,79	34,10	0,66
Butanoic acid, propyl ester	1,13	0,92	1,71	0,67	0,11	50,84	0,75
Butanoic acid, 3-methyl-	6,24	5,73	5,53	4,07	0,32	34,08	0,35
1-butanol	0,56	0,77	0,73	0,42	0,06	50,61	0,87
Acetic acid	8,23	11,14	11,41	11,48	0,98	48,98	0,18
Propanoic acid	11,53	14,16	13,57	15,32	1,11	42,37	0,25
Propanoic acid, 2-methyl-	1,26	0,97	1,10	1,09	0,05	25,65	0,96
Pentanoic acid	1,26	0,58	0,58	0,85	0,11	66,55	0,74
Phenelenthyl alcohol	1,54	2,07	1,61	1,38	0,11	35,43	0,87
Quinoline	2,14	2,75	1,70	1,53	0,23	65,56	0,63
Phenol	5,15 ^a	3,59 ^b	3,78 ^{ab}	3,61 ^b	0,69	96,38	0,04
2-piperidinone	2,61	1,87	2,08	2,53	0,19	46,06	0,74
Indole	14,53 ^b	18,11 ^a	18,22 ^a	14,14 ^b	2,41	78,91	0,01
3-tert-butyl-4-hydroxyanisole	4,73	3,39	3,32	3,57	0,42	58,99	0,54

T0, Dieta com farinha de vísceras de frango; T1, Dieta com glúten de trigo; T2, Dieta com farinha de vísceras de frango e glúten de trigo e T3, Dieta com farinha de vísceras de frango, glúten de trigo e proteína hidrolisa; EPM, erro padrão da media; n = 8 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si (p>0,05).

Os compostos orgânicos são qualquer composto químico que contenha pelo menos um átomo de carbono e um hidrogênio em sua estrutura. Os compostos orgânicos voláteis (COVs) segundo o Conselho Nacional de Pesquisa (NATIONAL RESERARCH COUNCIL (NRC), 2002) são compostos orgânicos que se vaporizam facilmente á temperatura ambiente. Em geral, os COVs são gerados pelo metabolismo dos microrganismos intestinais como produtos finais dos componentes ingeridos pelo animal, portanto os compostos voláteis refletem as diferenças da dieta, da flora intestinal, e da exposição à contaminantes químicos (GARNER et al., 2007).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são principalmente um resultado da fermentação dos carboidratos, enquanto que os ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) são produto da fermentação das proteínas (CHO; HWANG; PARK, 2015; HWANG et al., 2016; MACKIE; STROOT; VAREL, 1998). Neste estudo, os AGCC foram muito comuns, porém os AGCR não foram tão comuns. Este resultado pode

indicar uma maior disponibilidade de energia proveniente de carboidratos, e menor disponibilidade de aminoácidos e nitrogênio no intestino, embora não obteve diferença estatística nos tratamentos em relação a este resultado, concordando com os resultados obtidos dos produtos da fermentação intestinal anteriormente apresentados.

Além das proteínas serem precursores de AGCR, também é precursor dos compostos ofensivos do odor, tais como os fenóis, indóis, enxofres, amoníaco e aminas (CHO; HWANG; PARK, 2015). No presente estudo foi detectado a presença de dois componentes sulfurados em dois diferentes animais no tratamento T0, o dimetil trisulfide e o dimethyl disulfide. Este resultado concorda com o apresentado por Lowe et al. (1997b), o qual encontrou o dimetil trisulfide em uma única amostra de fezes de cão. Porém, Hesta et al. (2011) informou a presença de componentes sulfurados (butil metil sulfide, metil propil disulfide, e dimetil trisulfide) em quase todos os tratamentos com inclusão de prebióticos em fezes de cães.

As proporções de fenóis e indóis estão relacionadas com o pH fecal, sendo que os fenóis são produzidos em presença de pH baixos, enquanto os indóis em pH alto (HWANG et al., 2016). Em média o pH intestinal em cães é de 7,3 (LUI et al., 1986). A média de pH nas fezes deste estudo foi de 6,33, o que poderia indicar a maior presença de indóis pelos valores de pH obtidos. Fenóis e indóis, foram os únicos COVs que apresentaram diferenças pela presença das diferentes proteínas das dietas. Isto poderia ser explicado pela composição aminoacídica dos alimentos, já que estes compostos são produzidos durante o metabolismo bacteriano da tirosina e o triptofano, respectivamente (GARNER et al., 2007; MACKIE; STROOT; VAREL, 1998). É possível que os resultados do indol estejam relacionados às maiores proporções do triptofano presentes nos tratamentos T1 e T2 que apresentaram os maiores resultados. No entanto, o presente estudo não tem as informações da composição dos aminoácidos das dietas, por isso, são necessários mais estudos para chegar numa conclusão.

Neste estudo, não foi detectada a presença de metanol, skatol e p-cresol, componentes aos quais se atribui os odores mais fortes em fezes de diferentes espécies (LOWE et al., 1997a; MACKIE; STROOT; VAREL, 1998).

Foi encontrado etanol em todas as mostras, sem apresentar diferença significativa entre as dietas. Este resultado pode ser explicado pela presença de levedura de cerveja nas dietas experimentais, pois sua presença está relacionada com o etanol, além da síntese de bactérias pela via de Embden-Meyerhof (COSTELLO; RATCLIFFE, 2013; GARNER et al., 2007).

4.4. Análise sensorial das fezes

Foram avaliadas as notas atribuídas pelos 68 avaliadores, dos quais, 49 atribuíram notas semelhantes dos frascos com igual tratamento (T0). A partir destes dados foi realizado a análise da variância. Entre os grupos, foi achada diferença significativa, apresentando maior odor no tratamento T0 com inclusão unicamente de proteína de fonte animal. O tratamento T2 com inclusão de farinha de vísceras de frango como de glúten de trigo, apresentou menor pontuação de odor entre os tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9. Valores médios atribuídos ao odor fecal de cães da raça Bulldog Francês alimentados com dietas experimentais com diferentes fontes de proteína

Dietas				Valor de p
T0	T1	T2	T3	
2,69 ^a	2,57 ^{ab}	2,33 ^b	2,43 ^{ab}	0,06

T0, Dieta com farinha de vísceras de frango; T1, Dieta com glúten de trigo; T2, Dieta com farinha de vísceras de frango e glúten de trigo e T3, Dieta com farinha de vísceras de frango, glúten de trigo e proteína hidrolisada; Score de odor fecal: notas de 1 a 5; EPM, erro padrão da média; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,10$)

Existiu uma relação numérica quanto ao resultado do teste sensorial e a maior presença de fenol nas fezes, sendo que o tratamento T0 (Dieta com inclusão de fonte de proteína animal) apresentou o resultado maior nestas duas avaliações. Isto pode ser explicado pelos valores de atividade de odor (VAO) que apresenta cada componente, sendo que os compostos fenólicos representam um VAO mais baixos que outros compostos presentes nas fezes (CHO; HWANG; PARK, 2015; LOWE et al., 1997a; MACKIE; STROOT; VAREL, 1998).

CONCLUSÃO

A utilização de glúten de trigo como única fonte proteica ou em combinação com fontes de origem animal, aumentou a digestibilidade aparente da proteína bruta e melhorou a percepção de odor das fezes de cães da raça bulldog francês. Além disso, houve relação entre os resultados dos fenóis e o teste sensorial, apresentando maior percepção do odor das fezes de cães alimentados com farinha de vísceras de frango como única proteína.

REFERÊNCIAS

AMERICAN KENNEL CLUB (AKC). Labrador Retriever Is Once Again America's Most Popular Dog. **American Kennel Club**, 2016.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS (AAFCO). **Official Publication 2009**, Washington, 2009.

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official and tentative methods of analysis**. 16. ed. Arlington, Virginia: AOAC International, 1995.

AXELSSON, E. et al. The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 360–4, 2013.

BADINA, A. I. **Protein evaluation of dog food using mink (Neovison vison) as a model for ileal protein digestibility in dogs (Canis familiaris)**. 2012. 57 f. Masters of science (msc) in feed manufacturing technology - Department of animal and aquacultural sciences, Norwegian University of Life Sciences, 2012.

BELLAVER, C. Limitações e vantagens do uso de farinhas de origem animal na alimentação de suínos e de aves. **2º Simpósio Brasileiro Alltech da Indústria de Alimentação Animal**, Paraná, p. 1–16, 2005.

BENÍTEZ, R.; IBARZ, A.; PAGAN, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 42, n. 2, p. 227–237, 2008.

BLACHIER, F. et al. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. **Amino Acids**, v. 33, n. 4, p. 547–562, 2007.

BOYE, J.; BETTONI, R. W.; BURLINGAME, B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. S2, p. S183–S211, 2012.

CARCIOFI, A. C. et al. Avaliação de dietas com diferentes fontes protéicas 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, n. spe, p. 28–41, 2008a.

CARCIOFI, A. C. et al. Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post-prandial glucose and insulin response. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 326–336, 2008b.

CASE, L. P. et al. **Canine and feline nutrition**. A resource for companion animal professionals. 3ed. St. Louis: Mosby, 2011.

CAVALARI, A. P. D. M. et al. Determinação do valor nutritivo de alimentos energéticos e protéicos utilizados em rações para cães adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 1985–1991, 2006.

CAVE, N. Gastrointestinal Gas : Eructation , Borborygmus , and Flatulence. In: **Canine and Feline Gastroenterology**. 1st. ed. USA: Elsevier Saunders, 2013.

CHO, S.; HWANG, O.; PARK, S. Effect of dietary protein levels on composition of odorous compounds and bacterial ecology in pig manure. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 9, p. 1362–1370, 2015.

CLAPPER, W. E.; MEADE, G. H. Normal Flora of the Nose, Throat, and Lower Intestine of Dogs. **Journal of bacteriology**, v. 85, n. November 1961, p. 643–648, 1963.

CLARÍN. **El bulldog francés, la raza que seduce cada vez a más argentinos**. 2016.

COSTELLO, B. DE L.; RATCLIFFE, N. M. Volatile Organic Compounds (VOCs) Found in Urine and Stool. In: AMANN, A. S.; COSTELLO, B. DE L.; RATCLIFFE, N. M. **Volatile Biomarkers**. Frenchay; United Kingdom. Elsevier, 2013.

DE BLAS, C.; MATEOS, G. G.; GARCÍA, P. R. **Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos**. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid. FEDNA, 2010.

DENG, P.; SWANSON, K. S. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. **The British journal of nutrition**, v. 113 Suppl, n. S1, p. S6–17, jan. 2015.

EMBRAPA. **Embrapa Trigo**. Embrapa, 2016.

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

FERNÁNDEZ, A. C. **Estudio de la actividad metabólica de la microbiota intestinal asociada al consumo de gluten en humanos**. 2013. 227 H. Teses (Ph.D) en Biología molecular y biotecnología - Departamento de Biología Molecular, Universidad de León, 2013.

FIGUEIREDO, T. C. **Características físico-química e microbiológica aminas bioativas em ovos de consumo**. 2008. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

FLORES, R. V. El gluten del trigo y su rol en la industria de la panificación. **Ingeniería Industrial**, n. 32, p. 231–246, 2014.

GARCIA-MAZCORRO, J.; MINAMOTO, Y. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs : a brief review Microorganismos gastrointestinales en gatos y perros : una revisión breve. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 45, p. 111–124, 2013.

GARNER, C. E. et al. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. **FASEB Journal** v. 21, n. 8, p. 1675–88, 2007.

HAND, M. S. et al. **Small Animal Clinical Nutrition**. 5th. ed. Topeka Kansas, Mark Morris Institute, 2010.

HENDRIKS, W. H.; VAN BAAL, J.; BOSCH, G. Ileal and faecal protein digestibility measurement in humans and other non-ruminants - a comparative species view. **The British journal of nutrition**, v. 108, n. S2, p. 247–57, 2012.

HERNOT, D. C. et al. Relationship between total transit time and faecal quality in adult dogs differing in body size. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 89, n. 3-6, p. 189–193, 2005.

HESTA, M. et al. Fecal Odor Components in Dogs : Nondigestible Oligosaccharides and Resistant Starch Do Not Decrease Fecal H₂S Emission. **International journal of applied research in veterinary medicine**, v. 1, p. 2–7, 2011.

HOSENEY, R. C. Minor constituents. In: Delcour A. J.; Hoseney R. C. **Principles of Cereal Science and Technology (3rd Ed.)**. St. Paul, Minnesota, USA: AACC international, 2010.

HWANG, O. H. et al. Effect of Storage Period on the Changes of Odorous Compound Concentrations and Bacterial Ecology for Identifying the Cause of Odor Production from Pig Slurry. **Plos One**, v. 11, n. 9, p. e0162714, 2016.

KAWAUCHI, I. M. et al. Prediction of crude protein digestibility of animal by-product meals for dogs by the protein solubility in pepsin method. **Journal of nutritional science**, n. 3, p. 1–5, 2014.

KLEIN, G. B. **Cunningham's textbook of veterinary physiology**. 5th. ed. London: Elsevier Health Sciences, 2013.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43–81, 2000.

KUZMUK, K. N. et al. Diet and age affect intestinal morphology and large bowel fermentative end-product concentrations in senior and young adult dogs. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 8, p. 1940–1945, 2005.

LIU, N.-C. et al. Characterisation of Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome in French Bulldogs Using Whole-Body Barometric Plethysmography. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0130741, 2015.

LOWE, J. . et al. The effect of Yucca schidigera extract on canine and feline faecal volatiles occurring concurrently with faecal aroma amelioration. **Research in Veterinary Science**, v. 63, n. 1, p. 67–71, 1997a.

- LOWE, J. . et al. The ameliorating effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal aroma. **Research in Veterinary Science**, v. 63, n. 1, p. 67–71, 1997b.
- LUI, C. Y. et al. Comparison of Gastrointestinal pH in Dogs and Humans: Implications on the Use of the Beagle Dog as a Model for Oral Absorption in Humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 3, p. 271–274, mar. 1986.
- MACKIE, R. I.; STROOT, P. G.; VAREL, V. H. Biochemical Identification and Biological Origin of Key Odor Components in Livestock Waste. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 5, p. 1331–1342, 1998.
- MAIA, G. V. C. **Zeólitas (Clinoptilolita) e *Yucca schidigera* em rações para cães : palatabilidade , digestibilidade e redução de odores fecais**. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Lavras, 2008.
- MILLWARD, D. J. et al. Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. **The American journal of clinical nutrition**, v. 87, n. 5, p. 1576–1581, 2008.
- MOORE, J. G.; JESSOP, L. D.; OSBORNE, D. N. Gas-chromatographic and mass-spectrometric analysis of the odor of human feces. **Gastroenterology**, v. 93, n. 6, p. 1321–1329, 1987.
- NASCIMENTO, A. H. **Determinação do valor nutritivo da farinha de vísceras e da farinha de penas para aves, utilizando diferentes metodologias**. 2000. 106 f. Teses (Ph.D) Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. Washington, DC.: National Academy Press, 2006.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **The Scientific Basis for Estimating Emissions from Animal Feeding Operations**. Washington, DC.: National Academy Press, 2002.
- NERY, J. et al. Influence of dietary protein content and source on fecal quality, electrolyte concentrations, and osmolality, and digestibility in dogs differing in body size. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 1, p. 159–169, 2010.
- NERY, J. et al. Influence of dietary protein content and source on colonic fermentative activity in dogs differing in body size and digestive tolerance. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 8, p. 2570–2580, 2012.
- NI, J. Q. et al. Volatile organic compounds at swine facilities: A critical review. **Chemosphere**, v. 89, n. 7, p. 769–788, 2012.
- PADOVANI, C. Frescura ou particularidade? Anatomia do cão pequeno e a influência em seu apetite. **Revista cães e gatos**, v. 208, p. 48, 2016.
- PIRES, A. L.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n.4, p. 523–530, 2000.

PRYCE, J. D. A. Modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analist**, v. 94, p. 1121–1151, 1969.

ROQUE, N. C. et al. Increasing levels of zeolite and yucca schidigera in diets for adult cats. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 11, p. 2471–2475, 2011.

ROUDEBUSH, P.; DAVENPORT, D. J.; REMILLARD, R. L. Flatulence. In: HAND, M. S. et al. **Small Animal Clinical Nutrition**. 5th. ed. Topeka Kansas: Mark Morris Institute, 2010.

RUGE, E. Beitrag zur kennnuss der darmgase. **Sitzber Kaiser**, v. Aka 44, p. 739–762, 1861.

SAS INSTITUTE INC. **SAS statistics**. Cary, NC. USA, 2004.

SCHERF, K. A.; KOEHLER, P.; WIESER, H. Gluten and wheat sensitivities - An overview. **Journal of Cereal Science**, v. 67, p. 2–11, 2016.

SILVA, B. J. G. **Avaliação da técnica SPME/LC na análise de antidepressivos em amostra de plasma para fins de monitorização terapêutica**. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de São Paulo, 2007.

SUAREZ, F. et al. Insights into human colonic physiology obtained from the study of flatus composition. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 272, n. 5, 1997.

TAHERI, A. et al. Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 12, n. 1, p. 154–169, 2013.

TOMLIN, J.; LOWIS, C.; READ, N. W. Investigation of normal flatus production in healthy volunteers. **Gut**, v. 32, n. 6, p. 665–669, 1991.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Grain: World Markets and Trade**. 2016.

VALE, S. R.; GLORIA, M. B. Determination of biogenic amines in cheese. **Journal of AOAC International**, v. 80, p. 1006–1012, 1997.

VIEIRA, P. F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminantes**. 1980. 98 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1980.

WALTER, M.; SILVA, L. P.; PERDOMO, D. M. X. Biological response of rats to resistant starch. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. n. 2, p. 252–257, 2005.

WEBER, M. P. et al. Effect of size on electrolyte apparent absorption rates and fermentative activity in dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, n. 9-10, p. 356–365, 2004.

ZENTEK, J. Influence of diet composition on the microbial activity in the gastro-intestinal tract of dogs. II. Effects on the microflora in the ileum chyme. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**., v. 74, p. 53–61, 1995.

ZENTEK, J. et al. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 87, n. 11-12, p. 397–407, 2003.

APÊNDICE A - Artigo I

Effects of different protein sources on fermentative parameters and nutrient digestibility of adult dogs

Maria Isabel Gonzalez Urrego¹, Laura Fantucci de O. Matheus², Karine de Melo Santos², Mariane Ceschin Ernandes², Mariana Monti³, Danilo Ferreira de Souza³, Julio Balieiro², Lúcio Francelino Araújo¹, Cristiana F. Ferreira Pontieri³, Márcio Antonio Brunetto^{2*}

¹ *Faculty of Animal Science and Food Engineering (FZEA), University of São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brazil*

² *School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), University of São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brazil*

³ *Grandfood Indústria e Comércio LTDA, Dourado, São Paulo, Brazil*

*mabrunetto@usp.br; mailing address Av. Duque de Caxias Norte, 225 - City, Pirassununga, São Paulo, Brazil; zip code: 13.635.900; phone: (+55) 19 9926 2686; fax: (+55) 019 3565 4041.

Benefits to microbial fermentation on colon and as consequence less flatulence can be promoted in the health of adult dogs according to the amount and protein source. This study evaluated the combination of different protein sources in dry food for brachycephalic dogs on microbial fermentation and nutrient absorption. Four maintenance diets were formulated for adult dogs: T0, poultry meal diet; T1, wheat gluten diet; T2, poultry meal and wheat gluten diet; and T3, poultry meal, wheat gluten and hydrolyzed protein diet. Eight French bulldog adult young dogs, were arranged in a 4x4 Latin square design were adapted to diets for 20 days. Fresh feces were collected for digestibility, short chain fatty acids, fecal pH, biogenic amines, ammonia and fecal lactate. Means were compared by PROC MIXED procedure of SAS and by contrasts, considering $P \leq 0.05$. The animals fed T1 and T2 diets showed higher digestibility for dry matter ($P < 0.05$), organic matter ($P < 0.05$), crude protein ($P < 0.001$) and lower feces production ($P < 0.02$). Diets T1, T2 and T3 resulted in lower fecal score and pH ($P < 0.05$). The results regarding fermentation (short chain fatty acids, biogenic amines and lactate) were not different among the diets evaluated. Animal protein sources and wheat gluten improved protein and dry matter digestibility. Protein sources had no effect on final fermentation products.

Key words: Brachycephalic, Protein fermentation, Wheat gluten, Protein.

Running head: Protein Source of dogs foods.

Introduction

Several factors may influence the amount of protein that reaches the colon after feeding, such as the amount of DM ingested, the content and digestibility of protein sources included in the diet. Thus, the use of highly digestible protein sources may imply less need of inclusion of this nutrient in the diet and result in less flow of protein residues in the large intestine and possible reduction in the production of fermentative compounds and flatulence in dogs⁽¹⁾⁽²⁾.

Although digestion and absorption of proteins in the small intestine is an efficient process, substantial amounts of undigested proteins are directed to the large intestine⁽³⁾⁽⁴⁾, where the microbial fermentation of these components results in the production of various putrefaction compounds, such as ammonia, phenols, indols, short chain fatty acids (SCFA), branched chain fatty acids (BCFA), gases (hydrogen, carbon dioxide and methane), biogenic amines (putrescine, cadaverine, histamine, phenylethylamine) and lactate. Some of these compounds may influence feces bad odor and may be toxic if produced in high concentrations⁽⁵⁾⁽⁶⁾. Moreover, according to Zentek et al. (2003)⁽⁷⁾, the ingestion of diets with high concentrations of proteins favors the growth of undesirable bacteria, such as *Clostridium perfringens*, and decreases the fecal counts of other beneficial bacteria, resulting in imbalance in the intestinal microbiota and consequent increase in excretion of enterotoxins and other metabolic products related to the increase of the protein decomposition in colon.

Brachycephalic dog breeds such as French Bulldogs have been identified as having feces with a stronger odor and higher frequency of flatulence due to their anatomical characteristics that result in aerophagia, a possible predisposing factor for the increase of gas production in the intestine, which associated with a higher presence of non-assimilated substrates, results in the production of gases and foul-smelling feces⁽⁸⁾⁽⁹⁾. Thus, the degradation of undigested proteins in the colon may be responsible for the increase of fecal odor in brachycephalic dogs. Therefore, nutritional strategies based on sources and altered concentrations of protein may be important in reducing the impact of fermentative activity on the colon and thus modulate the composition of the intestinal microbiota. Its metabolic activity and the formation of fermentation products, are effects that can be important for the reduction of bad odor in brachycephalic dogs.

The objective of this study was to evaluate the effects of different protein sources inclusion in the dry dog diets on the digestibility of nutrients and fecal fermentation products in adult brachycephalic dogs.

Material and methods

The present study was conducted at the Nutrition Development Center of Premier Pet, Dourado, São Paulo, Brazil, jointly with the Department of Animal Production and Nutrition at the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil. All care procedures were approved by the Ethics Research Committee on Animal Use of Premier Pet (CEUA Premier Pet - Protocol n. 028-14).

Animals, facilities and experimental design

Eight healthy adult French Bulldog dogs (1 male and 7 female), mean weight of 11.09 ± 2.35 Kg, mean age of 2.75 ± 1.98 years old and body condition score between 4 and 5 were used. The health status was confirmed before the beginning of the experiment by physical, blood and coproparasitological exams, previously wormed and vaccinated. The dogs were housed individually in kennels with solarium (11.2 m^2). The animals were distributed in replicate 4x4 latin squares, four treatments (diets) and four periods, totaling eight replicates per treatment. The treatments were balanced by the animals' body weight. Each experimental period lasted 28 days. The animals were adapted to the diet during 20 days; followed by 5 days of fecal collection for apparent digestibility and fecal score; and 3 days of fresh feces collection to determine the fermentation products.

Diets

Four extruded isonutrient diets were produced to meet the requirements for adult dogs maintenance⁽¹⁰⁾, containing: brewers rice, beet pulp, cellulose, chicken fat, fish oil, egg powder, brewer yeast, palatability enhancer, potassium chloride, mineral vitamin premix, magnesium oxide, salt, dicalcium phosphate, calcium carbonate and antioxidant. The diets presented inclusion content of 13% of protein from different sources (T0 - poultry meal (PM); T1- wheat gluten (WG); T2- 50:50 PM and WG; T3 - PM, WG and liver hydrolyzed protein). The diets chemical composition mean were

approximately 23% protein, 16% fat, 6% ash, 7% moisture, 54% nitrogen-free extract, 3.9 kcal/kg and less than 3% crude fiber.

Food intake and digestibility experiment

The total fecal collection method was used to perform the apparent digestibility assay⁽¹¹⁾, consisting of an initial phase of 20 days of adaptation to the diet, preceded by 5 days of fecal collection. The animals were fed twice a day (7:00 am e 4:30 pm) and water *ad libitum*. The amount of food offered and refused at each meal was recorded daily. The amount of food supplied to the animals was calculated by formula: $130 \times (\text{BW})^{0.75} = \text{Kcal/day}$, based on the energy requirement prediction equation for maintenance of active adult dogs⁽¹⁰⁾.

The feces were individually collected, weighed and kept in a freezer (-20°C) for further analysis. At the end of the collection period, the fecal samples were thawed, homogenized, and pooled for each animal and period. Before laboratory analyses, fecal samples were dried in a forced-air oven (320SE, Fanem, São Paulo, Brazil) at 55° C for 72 hours. Pre-dried feces and feed were then ground in a cutting mill with a 1 mm screen sieve (MOD 340, ART LAB, São Paulo, Brazil). The qualitative analyzes of the feces were determined over the stool collection period for digestibility, and scores from 1 to 5 were assigned⁽¹²⁾.

Diets and feces were submitted to dry matter, crude protein, ether extract in acid hydrolysis, crude fiber and ash analyses according to AOAC⁽¹³⁾. The gross energy was determined in a bomb calorimeter (1281, Parr Instrument Company, Illinois, USA). All analyses were conducted in duplicate and were repeated when coefficient of variations was greater than 5%.

Fermentative parameters

The feces were collected up to 30 minutes after defecation. The fecal pH was determined by the digital pH meter (DM-20, Digimed, Sao Paulo, Brazil) in a solution of feces and distilled water (2 g/18mL)⁽¹⁴⁾. The lactic acid concentration was measured by spectrophotometry at 565 nm (QUICK-Lab, DRAKE Eletrônica Comércio LTDA, São José do Rio Preto – SP)⁽¹⁵⁾. The feces were diluted in distilled water (3 g/ 9 mL).

For short chain fatty acids and branched chain fatty acids (SCFA and BCFA) determinations, 3 g of feces were diluted in 9 mL of 16% formic acid, kept in a refrigerator, homogenized daily and centrifuged for 15 min, 15° C, 5.000 rpm. This

procedure was repeated three times using only the supernatant and stored in freezer (-15° C). The SCFA and BCFA were determined by gas chromatography, according to methodology described in the literature⁽¹⁶⁾.

The biogenic amines profile was determined using 0.5 g of feces preserved in 7 mL of 5% trichloroacetic acid. The samples were then centrifuged and filtered according to Vale and Glória (1997)⁽¹⁷⁾. The amines identification was performed by high performance liquid chromatography (Shimadzu Corporation, Kioto, Japan).

The ammonia concentration was determined using 3 g of feces acidified with 9 mL of 16% formic acid. The samples were centrifuged and stored according to the methodology described for SCFA determination. Aliquots of 2 mL were diluted in 13 mL of distilled water and distilled in nitrogen distillation. The distillation was carried out with 5 mL of 2N potassium hydroxide solution and the titration with hydrochloric acid 0.005 mol / L⁽¹⁸⁾.

Statistical Analysis

The sample size was calculated by PROC PAWER of SAS. The data were analyzed considering a duplicate 4x4 latin square design. Treatments were compared by analysis of variance using contrasts, as follow:

$$\begin{aligned} Y1 &= mT0 - mT1 \\ Y2 &= mT0 - mT2 \\ Y3 &= mT0 - mT3 \\ Y4 &= mT1 - mT2 \\ Y5 &= mT1 - mT3 \\ Y6 &= mT2 - mT3 \end{aligned}$$

The analyzes were performed by PROC MIXED, version 9.3 of SAS software⁽¹⁹⁾. The model contemplated as fixed effect to the treatment, and as random effects to the animal and the period. Statistical significance was determined to values of $P < 0.05$.

Results

The body weight of the animals did not change during the study. Food intake did not differ between diets ($P > 0.05$, Table 1). Animals fed T2 presented a greater total tract apparent digestibility (TTAD) for dry matter ($P < 0.01$) and organic matter ($P < 0.05$) and fed T1 and T2 present higher TTAD for crude protein ($P < 0.001$). The diets T0, T1 and T2 ($P < 0.05$) presented greater fecal scores and pH compared to the T3 treatment.

The treatments T1 and T2 ($P < 0.05$, Table 1) resulted in lower feces production (g DM / 100g of diet) when compared with T0 and T3. The products of the intestinal fermentation did not present significant differences between diets (Table 2).

Table 1. Nutrient intake, coefficient of apparent total tract digestibility, metabolizable energy and fecal traits of French bulldogs fed experimental diets with different protein sources.

Item	Diets*				SME †	CV (%)‡	P value
	T0	T1	T2	T3			
Body weight (Kg)	11.4	11.5	11.3	11.5			
	Nutrient intake (g/kg body weight/day)						
Natural matter	16.93	17.84	18.10	19.39	0.76	22.91	0.22
Dry matter (DM)	15.86	16.47	16.93	17.97	0.71	22.85	0.31
Organic matter	14.98	15.63	16.16	17.12	0.68	22.91	0.26
Ash	0.88	0.83	0.77	0.85	0.04	22.86	0.28
Crude protein	3.48	4.17	3.95	3.96	0.17	23.54	0.09
Fat	2.63	2.65	2.93	3.10	0.12	23.46	0.06
Nitrogen-free extract	8.63	8.29	8.90	9.56	0.38	22.95	0.21
Crude energy (Kcal/kg body weight/day)	72.86	76.37	77.07	82.95	3.28	22.85	0.29
	Apparent total tract digestibility (%)						
DM	85.22 ^a	87.35 ^b	88.77 ^b	86.16 ^c	0.37	2.31	0.02
Organic matter	88.08 ^a	89.61 ^b	90.44 ^b	88.28 ^c	0.31	1.89	0.02
Ash	36.84	44.64	42.99	43.08	1.51	19.42	0.28
Crude protein	83.98 ^a	88.08 ^b	88.53 ^b	83.62 ^a	0.54	3.37	<0.001
Fat	96.75	96.47	96.92	96.56	0.13	0.71	0.16
Nitrogen-free extract	91.71	92.09	93.28	91.78	0.27	1.61	0.17
Crude energy (Kcal/kg body weight/day)	88.31	89.58	90.19	89.70	0.47	2.84	0.57
	Fecal traits						
Fecal pH	6.37 ^a	6.39 ^a	6.44 ^a	6.14 ^b	0.05	4.21	0.02
Fecal score	4.34 ^a	4.46 ^a	4.38 ^a	3.98 ^b	0.07	9.06	0.006
g feces/day (as fed)	77.68	69.63	67.48	85.88	3.16	22.55	0.22
g feces/day (DM basis)	82.96	74.38	74.24	91.49	0.94	20.94	0.06
g feces/ 100 g food (as fed)	42.34	35.60	35.44	40.04	1.18	16.60	0.11
g feces/ 100 g food (DM basis)	13.84 ^a	11.68 ^c	10.97 ^b	12.80	0.35	15.22	0.02

* T0, poultry meal diet; T1, wheat gluten diet; T2, poultry meal and wheat gluten diet; T3, poultry meal, wheat gluten and hydrolyzed protein diet.

†SME, standard error of mean

‡CV, coefficient of variation

§ ^{a,b,c} Means of different letters on the same line are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2. Fermentation products: lactic acid, fecal ammonia, short-chain fatty acids, branched-chain fatty acids and biogenic amines of French bulldogs fed experimental diets with different protein sources.

Item	Diets*				SEM†	CV (%)‡	P value
	T0	T1	T2	T3			
	mMol/kg of fecal DM						
Lactic acid	11.38	11.65	16.59	12.82	1.14	47.06	0.23
Fecal ammonia	207.05	167.80	174.65	194.24	6.95	20.19	0.11
	Short-chain fatty acids (mMol/kg of fecal DM)						
Acetic	92.47	97.73	101.9	96.97	4.05	22.43	0.91
Propionic	65.53	65.37	60.51	73.15	2.98	24.27	0.25
Butyric	3.56	3.17	2.91	3.31	0.21	34.52	0.29
Total SCFA	141.37	167.82	165.33	151.75	6.56	21.21	0.83
	Branched-chain fatty acids (mMol/kg of fecal DM)						
Valeric	0.68	0.62	0.00	0.75	-	-	-
Iso-valeric	4.93	4.46	4.36	4.45	0.28	32.77	0.58
Iso-butyric	21.43	20.73	21.88	20.65	1.09	27.84	0.99
Total BCFA	23.15	26.78	22.96	22.24	1.22	25.50	0.97
	mg/100g feces NM						
Tiramine	1.14	1.43	1.64	1.19	0.13	53.19	0.65
Putrescine	6.28	4.71	6.79	8.50	0.40	32.22	0.09
Cadaverine	0.75	0.90	0.77	1.00	0.10	61.46	0.75
Spermidine	2.67	2.28	2.95	2.60	0.14	28.24	0.22
Feniletilamine	0.23	0.00	0.48	1.35	-	-	-
Triptamine	0.23	0.22	0.20	0.21	0.02	53.40	0.92
Total amines	11.30	9.54	12.83	14.85	0.79	32.79	0.98

* T0, poultry meal diet; T1, wheat gluten diet; T2, poultry meal and wheat gluten diet; T3, poultry meal, wheat gluten and hydrolyzed diet; †SME, standard error of mean; ‡CV, coefficient of variation; § ^{a,b,c} Means of different letters on the same line are significantly different (P< 0.05) (Tukey test).

Discussion

The consumption averages were 81%, 88%, 89% and 90% of the daily energy requirement for treatments T0, T1, T2 and T3, respectively. This data was reflected in the constant weight of the dogs throughout the experimental period, as a result of the time, not enough to cause a significant difference in this parameter. The apparent digestibility coefficients (ADC) in the four experimental diets (Table 1) were high, indicating good utilization of the protein sources evaluated in the study. However, higher ADCs were observed in the diets formulated with wheat gluten (T1 and T2) and lower ADCs in the diets based in poultry meal (T0 and T3). The stool production was greater in the T0 treatment, having a possible relation with the low ADC of the protein, besides the other nutrients. Nery et al. (2014)⁽²⁾ evaluated diets formulated with wheat flour and wheat gluten, together and separated and in different concentrations. These authors found higher coefficients of apparent digestibility of nutrients with the inclusion

of less protein (22% versus 39%). In the present study, the wheat gluten-based diet was formulated with 21% protein content and 13% of the total protein amount comes from gluten. These results were similar or even better compared to the study cited. Partially, these best results may be related to the quality of the ingredients used in food formulation. However, the lower apparent digestibility coefficients of the T3 diet, which were not expected, may be due to lower starch gelatinization (77.7%). The diets T0, T1 and T2 presented respectively 91.0%; 87.4%; and 98.5% gelatinization of the starch. The influence of starch gelatinization on protein digestibility had already been studied by Loureiro et al. (2014)⁽²⁰⁾.

Some authors⁽²¹⁾⁽²²⁾ have reported that an improvement in fecal score and pH values is expected when there is low inclusion of better quality proteins, as it results in lower fermentation in the colon, similar to that observed in the present study. Regarding the fecal scores obtained in the T0, T1 and T2 treatments, although they did not present any difference between them, these were similar to those observed in other studies with several breeds and sizes of dogs⁽⁶⁾, which found a higher water content in the diet with chicken meal and lower moisture in the diets containing WG.

A marker for the fermentation of proteins in the colon can be the concentration of SCFA in feces⁽³⁾. Although the results of SCFA observed in the present study did not present statistical differences (Table 2), the T3 diet had the lowest values of the 4 diets (22.24 mMol / kg of DM), that differs from the other diets as it presents hydrolyzed protein in its composition, possibly influenced in lower fermentation and, consequently, resulted in lower values of fecal score and fecal pH. Despite the effect of the diet had altered significantly pH, it was not enough to cause changes in the fermentative parameters, which can be explained by the low amount of protein included in the diets.

The low protein fermentation in the present study is probably related to the lower flow of undigested proteins in the large intestine, due to the low protein content in the diets and the high digestibility of the same ones. Authors report that dogs fed with more digestible proteins had lower amounts of protein in the ileal chyme⁽²³⁾ which would allow the decrease in putrefaction in the posterior intestine, and consequently reduction of the compounds involved in the gases and bad fecal odor.

Conclusion

The wheat gluten used as the sole source of protein or in combination with chicken meal increased protein digestibility. However, this effect was not able to alter the fermentation parameters measured.

Acknowledgements

The first author acknowledges the scholarship granted by CAPES (Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education).

Funding and conflict of interest

Grandfood Ltda provided the animals, raw materials and facilities used in this study. Grandfood Ltda played no role in the study design, sample collection, data analysis and interpretation, and in the decision to submit the manuscript for publication.

Authorship

Maria Isabel Gonzalez Urrego was responsible for planning the study, conducting the analysis, writing and editing the manuscript. Laura Fantucci and Danilo F. Souza were responsible for planning the study and manufacturing the diets. Mariana Monti, Karine de Melo Santos and Mariane Ceschin Ernandes were responsible for composing the datas and reviewing the manuscript. Julio Balieiro was responsible for data analysis. Márcio Antonio Brunetto, Cristiana F.F. Pontieri and Lúcio F. Araújo were responsible for planning study and compsing and reviwewing the manuscript.

References

1. Hand MS, Thatcher CD, Remirlard RL *et al.* (2010) *Small Animal Clinical Nutrition*. 5th ed., pp. 1314. Topeka: Mark Morris Institute.
2. Nery J, Biourge V, Tournier C *et al.* (2010) Influence of dietary protein content and source on fecal quality, electrolyte concentrations, and osmolarity, and digestibility in dogs differing in body size. *J Anim Sci.* **88**, Suppl. 1, 159–169.
3. Blachier F, Mariotti F, Huneau JF *et al.* (2007) Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids.* **33** Suppl. 4, 547–562.
4. Boye J, Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B (2012) Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *Br J Nutr.* **108** Suppl. 2, 183–211.
5. Kuzmuk KN, Swanson KS, Tappenden K *et al.* (2005) Diet and age affect intestinal morphology and large bowel fermentative end-product concentrations in senior and young adult dogs. *J Nutr.* **135** suppl. 8 1940–1945.
6. Nery J, Goudez R, Biourge V *et al.* (2012) Influence of dietary protein content and source on colonic fermentative activity in dogs differing in body size and digestive tolerance. *J Anim Sci.* **90** Suppl. 8, 2570–2580.
7. Zentek J, Marquart B, Pietrzak T *et al.* (2003) Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. *J Anim Physiol Anim Nutr* (Berl). **87** Suppl. 11-12, 397–407.

8. Roudebush P, Davenport DJ, Remillard RL (2010) Flatulence. In: *Small Animal Clinical Nutrition*. 5th ed., pp. 1127–33. [Hand MS, Thatcher CD, Remirllard RL, Roudebush P, Novotni BJ, editors]. Topeka: Mark Morris Institute.
9. Cave N (2013) Gastrointestinal Gas: Eructation , Borborygmus and Flatulence. In: *Canine and Feline Gastroenterology*. 1st ed., pp. 124. USA: Elsevier Saunders.
10. National Research Council (2006). Nutrient Requirements of Dogs and Cats. Washington, DC.: National Academies Press.
11. Association Of American Feed Control Officials (AAFCO) (2004) Official Publication. Oxford.
12. Carciofi AC, Takakura FS, De-Oliveira LD *et al.*(2008) Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post-prandial glucose and insulin response. *J Anim Physiol Anim Nutr* (Berl). **92** Supple 3, 326–336.
13. Association Of The Official Analitical Chemists (AOAC) (1995) Official and tentative methods of analysis. 16th ed. Virginia: AOAC International.
14. Walter M, Silva LP, Perdomo DMX (2005) Biological response of rats to resistant starch. *Rev Inst Adolfo Lutz*. **64** Supple. 2, 252–257.
15. Pryce JDA (1969). Modification of the Barker-Summerson method for the determination of latic acid. *Analist*. **94**, 1121–1151.
16. Erwin ES, Marco GJ, Emery EM (1961) Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J Dairy Sci*. **44**, 1768–1771.
17. Vale SR, Gloria MB (1997) Determination of biogenic amines in cheese. *J AOAC Int*. **80**, 1006–1012.
18. Vieira PF (1980) Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lípidios em rações para ruminantes. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
19. SAS Institute Inc (2004). SAS statistics. North Carolina, USA.
20. Loureiro BA, Roberti FFO, Pacheco PDG *et al.* (2014) Starch gelatinization degree and nutrient digestibility of extruded diets for dogs. In: Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition. 18th ed. Utrecht, Netherlands. Proceedings.
21. Weber MP, Hernot D, Nguyen PG *et al.* (2004) Effect of size on electrolyte apparent absorption rates and fermentative activity in dogs. *J Anim Physiol Anim Nutr* (Berl). **88** Supple. 9-10, 356–365.
22. Hernot DC, Biourge VC, Martin LJ *et al.* (2005) Relationship between total transit time and faecal quality in adult dogs differing in body size. *J Anim Physiol Anim Nutr* (Berl). **89** Supple, 3-6, 189–193.
23. Zentek J (1995) Influence of diet composition on the microbial activity in the gastro-intestinal tract of dogs. II. Effects on the microflora in the ileum chyme. *J Anim Physiol Anim Nutr* (Berl). **74**, 53–61.

APÊNDICE B – Artigo II

Diet protein sources, feces odor and fecal composition of volatiles organic compounds in French Bulldog dogs

Maria Isabel Gonzalez Urrego¹, Karine de Melo Santos², Mariane Ceschin Ernandes², João Paulo Fernandes Santos², Mariana Monti⁴, Danilo Ferreira de Souza⁴, Marcos Nogueira Eberlin³, Lúcio Francelino Araújo¹, Júlio Cesar de Carvalho Balieiro², Cristiana F. Ferreira Pontieri⁴, Márcio Antonio Brunetto²

¹ College of Animal Science and Food Engineering (FZEA), University of São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brazil

² College of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), University of São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brazil

³ Thomson Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, State University of Campinas–UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

⁴ Grandfood Indústria e Comércio LTDA, Dourado, São Paulo, Brazil

* Corresponding author: mabrunetto@usp.br; mailing address Av. Duque de Caxias Norte, 225 - City, Pirassununga, São Paulo, Brazil; zip code: 13.635.900; phone: (+55) 19 9926 2686; fax: (+55) 019 3565 4041.

Abstract

The strong odor of feces and the excessive production of gases in some dog breeds has long been a major concern of tutors, for which a pet food industry uses nutritional alternatives such as high quality nutrients and additives that improve the odor of feces. But there are still some dog breeds, like French Bulldog, that continue to present this problem, due to the remaining protein not digested in the large intestine. In this way, appears the importance of a deeper understanding of the volatile compounds involved in the odor of dog feces. This study aimed to identify changes in the emissions of fecal odor compounds most prevalent in French Bulldog dogs through diets with different protein sources, and to compare the results with the sensory analysis. Four maintenance diets with different protein sources were formulated for adult dogs: T0, poultry meal diet; T1, wheat gluten diet; T2, poultry meal and wheat gluten diet; and T3, poultry meal, wheat gluten and hydrolyzed protein diet. Eight adult French Bulldog, mean body weight 11.3 ± 0.21 Kg and 2.7 ± 0.74 years old, were arranged in a 4x4 Latin square design and adapted to diets for 28 days. Fresh feces were collected for analysis of volatile organic compounds (VOCs) and sensory analysis of feces. No adverse effects

were observed in the animals. Means were compared by PROC MIXED procedure of SAS and by contrasts, considering $P \leq 0.05$. Regarding to volatile organic compounds, a statistical difference was observed in two of the 68 compounds identified. The animals fed T0 diet had a higher concentrations of phenol in the feces ($P=0.04$). The indole compound presented greater concentration during the consumption of T1 diet ($P=0.01$). The T0 treatment showed higher odor perception during sensory evaluation. The protein content of the diets changed the VOCs, indicating a greater perception of the odor using the sensory analysis, in the treatment with animal protein inclusion.

Keywords Canine; Protein diet; Malodorous compounds; Indole; Phenol

Abbreviations: BCFA, Branched chain fatty acid; GC-MSD, Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry; OAV, Odor activity value; PM, Poultry meal; SCFA, Short chain fatty acid; T0, Poultry meal; T1, Wheat gluten; T2, 50:50 Poultry meal and wheat gluten; T3, Poultry meal, wheat gluten and liver hydrolyzed protein; VOCs, Volatile organic compounds; WG, Wheat gluten.

Introduction

Feeding may determines the production of odors in feces, so the pet diets formulations should consider the impact of nutrients on the fermentation products of the intestinal microorganisms. Several studies have shown that changes in protein sources (Zentek, 1995; Rolfe et al., 2002; Nery et al., 2012) and concentration (Jha and Leterme, 2012; Nery et al., 2012) affect the intestinal health and as a result, generate changes in the odor and fecal consistency. Although absorption by the small intestine is an efficient process, substantial amounts of nitrogenous compounds, of exogenous and endogenous origin, are not absorbed by the epithelium of the small intestine, remaining in the intestinal lumen. There they are transported to the large intestine (Blachier et al., 2007; Boye; Wijesinha-bettoni; Burlingame, 2012) where the bacteria perform an intense proteolysis, resulting in the release of peptides and amino acids followed by a oxidation reactions and reduction of these components, resulting in the production and accumulation of various putrefaction compounds, such as ammonia, amines, branched chain fatty acids, indole, phenol and sulfur compounds. These components are responsible for the strong smell in the feces of dogs and indicators of decreasing animal gastrointestinal health (Hussein and Sunvold, 2000; Roudebush et al., 2010).

For an understanding of odor change in feces of dogs and cats, several studies propose the use of sensorial analyzes (Maia, 2008; Roque et al., 2011). In general, this analysis is very useful to know the organoleptic properties of foods, as well as many other products of the industry, through the senses (Barda, 2012). One of the fundamental principles of this analysis is not to generate holistic errors of interpretation (Ibañez and Barcina, 2000), despite the fact the protocols used during the test decrease errors, the use of stools goes against this principle, due the feces tend to generate greater discomfort, rejection and disgust among some of the evaluators, resulting in greater variation in the odor perception scores. On the other hand, there are no other accepted manners for naming and describing odors (Harel, 2016) hindering an objective consensus on the degree of bad odor in feces. In addition to these factors, the difficulty of recruiting evaluators is compounded, making it challenge to obtain data. All these difficulties have a greater variation of the data, hampering an objective statistical evaluation.

Due to the complexity of intestinal chemistry, human medicine has been studying technologies for detection of volatile organic compounds (VOCs), which offers a simplified image of the chemical soup in the intestine (Costello and Ratcliffe, 2013), and it is possible to isolate and characterize the chemicals responsible for fecal odors which may not be detected by human olfaction (Moore et al., 1987). Taking as an example the studies already developed in the area of intestinal chemical composition in humans, it is possible to be applied in the field of pet nutrition. Since there are few studies that have investigated the complete (Hesta et al., 2011) or partial (Lowe et al., 1997a) composition of VOCs in dogs and cats related to odors. Therefore, this study aimed to identify the changes in the emissions of fecal odor compounds most prevalent in dogs, according to dietary protein sources, and to compare the results with the sensory analysis.

Material and methods

The present study was conducted at the Nutrition Development Center of Premier Pet, Dourado, São Paulo, Brazil, jointly with the Department of Animal Production and Nutrition at the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil and Thomson Mass Spectrometry Laboratory of the Institute of Chemistry at the State University of Campinas

(IQ/UNICAMP). All care procedures were approved by the Ethics Research Committee on Animal Use of the College of Animal Science and Food Engineering (Protocol n. 3596101116).

Animals

The French Bulldog dogs was selected for this research, due stronger odor in their feces, present among the brachycephalic dogs breeds. Eight healthy adult French Bulldog dogs (1 male and 7 female), mean weight of 11.09 ± 2.35 Kg, mean age of 2.75 ± 1.98 years old and body condition score between 4 and 5 (Laflamme, 1997) were used. The health status was confirmed before the beginning of the experiment by physical, blood and parasitological exams. The animals were previously wormed and vaccinated. The dogs were housed individually in kennels with solarium (11.2 m^2). The animals were distributed in replicate 4x4 Latin squares, four treatments (diets) and four periods, totaling eight replicates per treatment. The treatments were balanced by the animals body weight. Each experimental period lasted 28 days. On the last 3 days, the fresh feces were collected to determine the volatile organic compounds and the sensory analysis.

Diets

Four extruded isonutrient diets were produced to meet the requirements for adult dogs maintenance (NRC 2006), containing: brewers rice, beet pulp, cellulose, chicken fat, fish oil, egg powder, brewer yeast, palatability enhancer, potassium chloride, mineral vitamin premix, magnesium oxide, salt, dicalcium phosphate, calcium carbonate and antioxidant. The diets presented inclusion content of 13% of protein from different sources (T0 - poultry meal (PM); T1- wheat gluten (WG); T2- 50:50 PM and WG; T3 - PM, WG and liver hydrolyzed protein). The diets chemical composition is presented in the Table 1.

Table 1. The experimental diets chemical composition analyzed.

Item	Diets			
	T0	T1	T2	T3
Dry matter (%)	93.69	92.35	93.52	92.5
	DM basis			
Ash (%)	5.57	4.71	4.57	4.7
Organic matter (%)	94.44	87.64	95.43	95.24
Crude protein - Total (%)	21.95	23.66	23.31	22.05
Crude protein from studied ingredients(%)	13.00	13.00	13.00	13.00
Crude protein from common ingredients (%)	8.95	10.66	10.31	9,05
Ether extract (hydrolysis) (%)	16.55	15.03	17.28	17.24
Crude fiber (%)	1.68	1.86	2.27	1.73
Gross energy (Kcal/Kg)	4594	4637	4552	4615

n=2; CV, coefficient of variation < 5%; T0, poultry meal diet; T1, wheat gluten diet; T2, poultry meal and wheat gluten diet; T3, poultry meal, wheat gluten and hydrolyzed diet.

Determination of volatile organic compounds in feces

Fresh feces were collected from the animals within 15 minutes after defecation, which were quickly homogenized, then 0.5 g of sample was placed into a 20 mL hermetically sealed glass vial with a leak-proof metal cap and double-sided septum silicone/teflon. The samples were stored and maintained at -20°C. In the laboratory, the vials were heated, incubated at 80°C for a period of 20 min and shaking speed of 250 rpm. After this time, a 500 µL aliquot was taken with a 2.5 mL gas-tight syringe, heated to 100°C and immediately injected into the injection port (Pires and Augusto, 2000; Silva, 2007).

The samples were submitted to analysis by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MSD) (Agilent Technologies, California, EUA) using the equipment consisting of a gas Chromatograph Agilent 7890A (GC) and a selective mass detector Agilent 5975C (MSD) equipped with an automatic injector, liner split/splitless, MPS2 twister (Gerstel. Ing, Maryland, EUA) in the SPME-HS injection mode with a constant flow of 1.0 mL/min-1. The GC was equipped with a capillary column Agilent J&W HP-5ms UI of stationary phase (CarborWax 19091S-433UI) (Agilent technologies, California, EUA) 30 m x 0.25 mm of inner diameter, film thickness of 0.25 µm. No division injection was performed at the inlet temperature of 250°C. The separation of the volatile compounds of the samples was achieved with the following oven temperature program: the initial temperature of the column was 40°C and remained for 2 min; heated until it reached 280°C at a rate of 10°C/min-1 during 5 min.

The MSD was equipped with a mono-quadrupole analyzer with a temperature of 150°C, and the temperature of the source of ions was 230°C. The acquisition mode scans in the range of 10 to 400 Daltons and solvent cutting 0.5 min.

For the identification of the detected compounds, the mass spectra library used was NIST of 2008, selecting a similarity index ≥ 75 . In cases where the index of similarity was lower, the mass spectra was interpreted. The analyses were carried out in the Thomson Mass Spectrometry Laboratory of Institute of Chemistry at the University of Campinas (IQ/UNICAMP).

Sensory analysis of feces

Sensory analysis was performed only in the first experimental period, since the sample number was the evaluators and not the animals. This analysis was approved by the "Ethics Committee on Research with Human Beings" of the College of Animal Science and Food Engineering (FZEA/USP) (Protocol n° 57616616.7.0000.5422). Fresh feces samples were collected within 15 minutes after defecation of the animals, stored in screw cap flasks sealed with parafilm, which were promptly sent for sensory analysis. In order to assess the odor, 68 evaluators were invited, both owners and non-owners of dogs, who evaluated 15 grams of fecal material at room temperature, placed into five flasks, corresponding to the three experimental treatments and two with treatment T0 (poultry meal diet). Treatment T0 was repeated in order to analyze the accuracy of each evaluator. Data belonging to those evaluators (49) who gave the same score to treatment T0 in different flasks were used. The evaluation was made by qualifying the odor intensity of the material, and the treatments were numbered. The grades attributed to the samples followed a score range of 1 to 5, being: 1 - very strong odor; 2 - strong odor; 3 - normal odor; 4 - weak odor and 5 - very weak odor, according to methodology described by Maia (2008) and Roque et al. (2011).

Statistical Analysis

The data for volatile organic compounds (VOCs) were analyzed considering a duplicate contemporary 4x4 Latin squares design. The relative frequencies for each VOC were analyzed by Generalized Linear Mixed Model (GLMM), with a logit link function and contemplated as fixed effect to the treatment, and as random effects to the animal and the period. These analyzes were performed by PROC GLIMMIX, version 9.3 of SAS software (SAS Institute Inc, 2004).

The data sensory analysis of feces were analyzed considering a randomized block design, with a model that contemplated as fixed effect to the treatment, and as random effects, panelists and error. These analyzes were performed by PROC MIXED, of the same software above described. In both cases, the treatments were compared by analysis of variance and, when significative effect was observed, the Tukey Test were applied.

Results

Determination of volatile organic compounds in feces

Table 2 shows the volatile organic compounds (VOCs) found in feces and their relative frequency in each of the treatments. The compounds with the highest occurrence during the experiment were selected with the objective of verifying the existence of statistical differences between treatments (Table 3).

A total of 68 VOCs were identified in this study, 17 compounds had higher frequency in the 4 diets, only two compounds (indole and phenol) presented differences between diets. In addition, numerous compounds were detected at a lower frequency, however, since there is a lack of information in the literature on VOCs in dogs, these were described by the importance of the finding.

Table 2. Percentage of occurrence of Volatile Organic Compounds (VOCs) in feces of French Bulldogs fed experimental diets with different sources of protein.

VOCs	T0	T1	T2	T3	VOCs	T0	T1	T2	T3
Acetic acid ^a	100	100	100	100	Oleic acid	-	12,5	-	25
Acetoin	-	12,5	-	-	Oxime-, methoxy-phenyl-	-	37,5	-	-
Acetone ^a	62,5	62,5	50	75	Pentadecanoic acid	-	-	-	12,5
Alpha-Pinene	12,5	-	-	-	Pentanoic acid ^a	37,5	25	37,5	50
Benzaldehyde	12,5	25	12,5	37,5	Phenol ^a	100	87,5	100	100
Benzyl alcohol	-	-	-	12,5	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	12,5	-	25	25
Butanal, 3-methyl-	-	12,5	-	25	Phenylethyl alcohol ^a	50	50	50	62,5
Butanoic acid ^a	100	100	100	100	Phthalic acid, decyl isobutyl ester	-	-	12,5	-
Butanoic acid, 3-methyl - ^a	100	87,5	75	100	Phthalic acid, isobutyl nonyl ester	-	-	12,5	-
Butanoic acid, butyl ester	12,5	12,5	37,5	-	Phthalic acid, isobutyl octyl ester	-	12,5	-	-
Butanoic acid, ethyl ester	-	-	12,5	-	Propanoic acid ^a	100	100	100	100
Butanoic acid, hexyl ester	37,5	12,5	12,5	-	Propanoic acid, 2-methyl- ^a	100	100	100	100
Butanoic acid, methyl ester	-	12,5	-	-	Propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl -1,3-propanediyl ester	-	-	25	12,5
Butanoic acid, propyl ester ^a	25	37,5	50	25	Propanoic acid, butyl ester	12,5	-	37,5	-
Butylated Hydroxytoluene	25	12,5	-	-	Quinoline, 1,2,3,4-tetrahydro-	37,5	50	12,5	37,5
Cholesta-3,5-diene	12,5	-	-	12,5	Quinoline, 2-methyl-	25	62,5	12,5	25
Cholesterol	25	12,5	-	-	Quinoline ^a	100	87,5	62,5	100
Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	25	12,5	-	12,5	Squalene	25	25	12,5	25
Cyclopentasiloxane, decamethyl-	25	12,5	12,5	-	Tetradecanoic acid	-	-	-	25
Cyclopropanamine, 2-phenyl-, trans-	-	-	25	-	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl	12,5	-	-	-
Diethyl Phthalate	12,5	-	-	-	1-Butanol ^a	75	62,5	62,5	75
Dimethyltrisulfide	12,5	-	-	-	1-Hexanol	-	12,5	-	-
Dimethyldisulfide,	25	-	-	-	1-propanol ^a	100	87,5	100	100
D-Limonene	12,5	-	12,5	-	1-Undecanol	25	-	-	-
Ethanol ^a	100	87,5	62,5	75	2(3H)-Furanone, dihydro-3- hydroxy-4,4-dimethyl-, (+/-)-	-	-	-	12,5
Ethanone, 1-(2-hydroxy-5- methylphenyl)-	-	-	12,5	-	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	12,5	-	-	-
Glycerin	25	12,5	-	-	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)- furanone	-	12,5	-	25
Indole ^a	87,5	100	100	100	2-Cyclopenten-1-one, 2-(2-butenyl)-3-methyl-, (Z)-	12,5	-	-	12,5
Methylamine, N,N- dimethyl-	12,5	-	-	-	2-Methoxy-4-vinylphenol	-	-	12,5	25
n-Hexadecanoic acid	25	25	12,5	50	2-piperidinone ^a	100	100	100	100
N-Hydroxymethylacetamide	-	12,5	-	12,5	2-Propanone, 1-hydroxy-	-	-	-	12,5
n-Propyl acetate	12,5	25	12,5	-	3-tert-butyl-4-hydroxyanisole ^a	87,5	100	87,5	100
Octadecanoic acid	12,5	12,5	12,5	50	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro -3,5-dihydroxy-6-methyl-	-	12,5	-	25
o-Cymene	12,5	-	12,5	-	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	-	-	-	25

^a Selected compounds for discriminant analysis

Among the compounds observed, the most common were short chain fatty acids, in addition to indole and phenol. These compounds also generally presented the highest peaks in all samples, representing a greater abundance when compared to the other compounds. Regarding to phenol, it had a higher presence in the T0 and T2 ($P = 0.04$). However, between T1, T2 and T3, no difference was verified. Moreover, indole presented higher presence in treatments T1 and T2 ($P = 0.01$) and lower in treatments T0 and T3.

Table 3. Mean percentage of the peak area of the most abundant volatile organic compounds present in feces of French Bulldog fed experimental diets with different protein sources.

Item	Diets				SEM	CV (%)	P-value
	T0	T1	T2	T3			
Acetone	1,49	1,65	0,88	1,25	0,03	19,79	0,66
Ethanol	1,02	1,30	1,39	1,16	0,10	42,19	0,93
1-propanol	1,45	1,72	1,86	1,28	0,13	43,61	0,82
Butanoic acid	11,65	12,99	13,39	11,52	0,79	34,10	0,66
Butanoic acid, propyl ester	1,13	0,92	1,71	0,67	0,11	50,84	0,75
Butanoic acid, 3-methyl-	6,24	5,73	5,53	4,07	0,32	34,08	0,35
1-butanol	0,56	0,77	0,73	0,42	0,06	50,61	0,87
Acetic acid	8,23	11,14	11,41	11,48	0,98	48,98	0,18
Propanoic acid	11,53	14,16	13,57	15,32	1,11	42,37	0,25
Propanoic acid, 2-methyl-	1,26	0,97	1,10	1,09	0,05	25,65	0,96
Pentanoic acid	1,26	0,58	0,58	0,85	0,11	66,55	0,74
Phenelenthyl alcohol	1,54	2,07	1,61	1,38	0,11	35,43	0,87
Quinoline	2,14	2,75	1,70	1,53	0,23	65,56	0,63
Phenol	5,15 ^a	3,59 ^b	3,78 ^{ab}	3,61 ^b	0,69	96,38	0,04
2-piperidinone	2,61	1,87	2,08	2,53	0,19	46,06	0,74
Indole	14,53 ^a	18,11 ^b	18,22 ^{ab}	14,14 ^a	2,41	78,91	0,01
3-tert-butyl-4-hydroxyanisole	4,73	3,39	3,32	3,57	0,42	58,99	0,54

T0, poultry meal diet; T1, wheat gluten diet; T2, poultry meal and wheat gluten diet; T3, poultry meal, wheat gluten and hydrolyzed diet; SEM, standard error mean ; CV, coefficient of variation; n = 8 dogs per diet; ^{a,b,c} Means in the rows followed by the same letters do not differ by the Tukey test ($P > 0.05$).

Sensory analysis of feces

The scores attributed by the 68 evaluators were compared, of which 49 assigned similar scores from the flasks with the same treatment (T0). Among the groups, a significant difference was found, showing a greater odor in the T0 treatment with only animal source protein ($P < 0.07$). The treatment T2 with inclusion of poultry meal and wheat gluten presented a lower odor score between the treatments (Table 4).

Table 4. Mean values attributed to fecal odor of French Bulldogs fed experimental diets with different sources of protein

Diets				P-value
T0	T1	T2	T3	
2,69 ^a	2,57 ^{ab}	2,33 ^b	2,43 ^{ab}	0,06

T0, poultry meal diet; T1, wheat gluten diet; T2, poultry meal and wheat gluten diet; T3, poultry meal, wheat gluten and hydrolyzed diet; Fecal odor scores - scores from 1 to 5; SEM, standard error mean; n = 8 dogs per diet; ^{a,b,c} Means in the rows followed by the same letters do not differ by the Tukey test (P>0.10).

Discussion

The volatile organic compounds (VOCs) according to the National Research Council (NRC, 2002) are organic compounds that easily vaporize at room temperature. There is relatively little research on the composition of stool odors and flatulence. Research on humans has been more developed since 1861. Ruge (Ruge, 1861) reported the composition of flatulence in humans, and later other authors (Moore et al., 1987; Tomlin et al., 1991; Suarez et al., 1997) continued with the quantification of the most abundant gases in flatulence, among them hydrogen, carbon dioxide, methane and nitrogen (Garner et al., 2007). As reported in the review by NI et al. (2012), there are several studies on the composition of VOCs in feces, air, and sewage from swine production farms, which found some compounds such as SCFA, BCFA, p-cresol, indole, phenol and skatole. However, there is little information on these compounds in dog and cat feces and their relation to bad odor.

VOCs are generated by the metabolism of intestinal microorganisms as final products of the components ingested by the animal, therefore the volatile compounds reflect the differences in diet, intestinal microbiota and exposure to chemical contaminants (Garner et al., 2007).

Short chain fatty acids (SCFA) are mainly a result of carbohydrate fermentation, whereas branched chain fatty acids (BCFA) are the product of the fermentation of proteins (Mackie et al., 1998; Cho et al., 2015; Hwang et al., 2016). In this study SCFAs were very common, however, the BCFAs were not frequent, this result may indicate a greater availability of energy from carbohydrates, and less availability of amino acids and nitrogen in the intestine, although there was no statistical difference in the treatments in relation to this result.

In addition to the proteins being precursors of BCFA, it is also a precursor to the offensive odors compounds such as phenols, indoles, sulfur, ammonia and amines (Cho;

Hwang; Park, 2015). In the present study, the presence of two sulfide compounds were detected in two different animals in the T0 treatment, the dimethyl trisulfide and dimethyl disulfide, this result agrees with that observed by Lowe et al. (1997b), who found dimethyl trisulfide in a single sample of dog feces. However, Hesta et al. (2011) reported the presence of sulfur compounds (butyl methyl sulfide, methyl propyl disulfide, and dimethyl trisulfide) in dog feces, in almost all treatments with prebiotic inclusion.

The phenol and indole proportions are related to fecal pH, being that phenols are produced in the presence of low pH, while the indole at high pH (Hwang et al., 2016). The canine pH intestinal average is 7.3 (Lui et al., 1986). The mean pH in the feces of this study was 6.33 (data not showed), which could indicate the higher presence of indole by the pH values obtained. Otherwise, phenols and indoles were the only VOCs that showed differences due to the presence of the different dietary proteins. This fact could be explained by the amino acid composition of the food, since these compounds are produced during the bacterial metabolism of tyrosine and tryptophan, respectively (Mackie et al., 1998; Garner et al., 2007). It is possible that the results of indole are related to the higher proportions of tryptophan present in treatments T1 and T2, the ones that presented the highest results. However, the present study does not have the information on amino acid composition of the diets, and more studies are needed to arrive at a conclusion.

There was a numerical relationship in both results of the sensory test and the greater presence of phenol in the feces, and the T0 treatment (diet with inclusion of source of animal protein) presented the highest result in these two evaluations. This can be explained by the odor activity value (OAV) which represents the odor nuisance for each person according to the compound. The phenolic compounds seems to represent a greater OAV than other compounds present in feces (Lowe et al., 1997b; Mackie et al., 1998; Cho et al., 2015).

In this study the presence of methanol, skatole and p-cresol were not detected. They are compounds that were attributed the strongest odors in feces of different species (Lowe et al., 1997b; Mackie et al., 1998). It was found the presence of ethanol in all the samples, without presenting significant difference between the diets. This result can be explained by the presence of yeast in the experimental diets, as there is a relationship of it with ethanol, besides the synthesis of bacteria via the Embden-Meyerhof (Garner et al., 2007; Costello and Ratcliffe, 2013).

Conclusion

The indole and phenol concentrations were influenced by protein content of the diets in the VOCs analysis. This fact may have been responsible for perception of the odor using the sensory analysis, in the treatment with animal protein inclusion. More research is needed to clarify key points for the complete understanding of the formation of the odors in dog feces.

Acknowledgements

The first author acknowledges the scholarship granted by CAPES (Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education) and Grandfood Ind. Com. LTDA for the provided animals, raw materials and facilities used in this study.

References

- Barda, N., 2012. Análisis sensorial de los alimentos. *Fritucultura y Divers.* 34–37.
- Boye, J., Bettoni, R.W., Burlingame, B., 2012. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *Br. J. Nutr.* 108, 183–211.
- Cho, S., Hwang, O., Park, S., 2015. Effect of dietary protein levels on composition of odorous compounds and bacterial ecology in pig manure. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 28, 1362–1370.
- Costello, B. de L., Ratcliffe, N.M., 2013. Volatile Organic Compounds (VOCs) Found in Urine and Stool, in: Amann, A.S., Costello, B. de L., Ratcliffe, N.M. (Eds.), *Volatile Biomarkers*. Elsevier, Coldharbour Lane; Frenchay; UK, pp. 405–462.
- Garner, C.E., Smith, S., de Lacy Costello, B., White, P., Spencer, R., Probert, C.S.J., Ratcliffe, N.M., 2007. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *FASEB J.* 21, 1675–88.
- Harel, D., 2016. Niépce– Bell or Turing : how to test odour reproduction. *J. R. Soc. interface* 13: 201605.
- Hesta, M., Janssens, G.P.J., Debraekeleer, J., Millet, S., DE Wilde, R., 2011. Fecal Odor Components in Dogs : Nondigestible Oligosaccharides and Resistant Starch Do Not Decrease Fecal H₂S Emission. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 1, 2–7.
- Hussein, H., Sunvold, G., 2000. Dietary strategies to decrease dog and cat faecal odour components, in: Reinhart, G., Carey, D., *Recent Advances in Canine and Feline Nutrition*. Orange Frazer Press, pp. 153–168.

- Hwang, O.H., Cho, S.B., Han, D.W., Lee, S.R., Kwag, J.H., Park, S.K., 2016. Effect of Storage Period on the Changes of Odorous Compound Concentrations and Bacterial Ecology for Identifying the Cause of Odor Production from Pig Slurry. *PLoS One* 11, e0162714.
- Ibañez, F.C., Barcina, Y., 2000. *Análisis sensorial de los alimentos: métodos y aplicaciones*. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, España.
- Jha, R., Leterme, P., 2012. Feed ingredients differing in fermentable fibre and indigestible protein content affect fermentation metabolites and faecal nitrogen excretion in growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 6, 603–611.
- Lowe, J., Kershaw, S., Taylor, A., Linforth, R.S., 1997a. The ameliorating effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal aroma. *Res. Vet. Sci.* 63, 67–71.
- Lowe, J., Kershaw, S., Taylor, A., Linforth, R.S., 1997b. The effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal volatiles occurring concurrently with faecal aroma amelioration. *Res. Vet. Sci.* 63, 67–71.
- Lui, C.Y., Amidon, G.L., Berardi, R.R., Fleisher, D., Youngberg, C., Dressman, J.B., 1986. Comparison of Gastrointestinal pH in Dogs and Humans: Implications on the Use of the Beagle Dog as a Model for Oral Absorption in Humans. *J. Pharm. Sci.* 75, 271–274.
- Mackie, R.I., Stroot, P.G., Varel, V.H., 1998. Biochemical Identification and Biological Origin of Key Odor Components in Livestock Waste. *J. Anim. Sci.* 76, 1331–1342.
- Maia, G.V.C., 2008. Zeólitas (Clinoptilolita) e *Yucca schidigera* em rações para cães : palatabilidade , digestibilidade e redução de odores fecais.
- Moore, J.G., Jessop, L.D., Osborne, D.N., 1987. Gas-chromatographic and mass-spectrometric analysis of the odor of human feces. *Gastroenterology* 93, 1321–1329.
- Nery, J., Goudez, R., Biourge, V., Tournier, C., Leray, V., Martin, L., Thorin, C., Nguyen, P., Dumon, H., 2012. Influence of dietary protein content and source on colonic fermentative activity in dogs differing in body size and digestive tolerance. *J. Anim. Sci.* 90, 2570–2580.
- Pires, A.L., Augusto, F., 2000. Microextração por fase sólida. *Quim. Nova* 23, n.4, 523–530.
- Rolfe, V., Adams, C., Butterwick, R., Batt, R., 2002. Relationships between fecal consistency and colonic microstructure and absorptive function in dogs with and without nonspecific dietary sensitivity. *Am J Vet Res* 63, 617–622.
- Roque, N.C., de Oliveira Borges Saad, F.M., dos Santos, J.P.F., Ebina, F.S., Chizzotti, A.F., Silva, R.C., Aquino, A.A., Maia, G.V.C., 2011. Increasing levels of zeolite and yucca schidigera in diets for adult cats. *Rev. Bras. Zootec.* 40, 2471–2475.