

FERMENTABILIDADE IN VITRO COM INÓCULO FECAL DE GATOS DE DERIVADOS PROTEICOS INDIGERÍVEIS

ELOISE C. DE RAMOS, BEATRIZ P. BOTELHO¹, CLAUDIA A. S. NOGUEIRA¹, LUCAS B. SCARPIM¹, LETICIA G. PACHECO¹, RICARDO S. VASCONCELLOS², AULUS C. CARCIOFI¹

¹Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/Unesp, Jaboticabal – SP. ² Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – PR.
Contato: eloise.ramos@unesp.br / Apresentador: ELOISE C. DE RAMOS

Resumo: Métodos in vitro podem favorecer avanços na compreensão de aspectos fisiológicos, metabólicos e da saúde intestinal de felinos. Considerando que na evolução alimentar de gatos os materiais proteicos indigeríveis são matéria orgânica base para a atividade microbiana no cólon, foram avaliados 8 ingredientes proteicos de baixa digestibilidade ileal quanto a sua degradabilidade enzimática (DE) in vitro e sua fermentabilidade in vitro (FIV) com inóculo fecal de gatos, simulando assim o efeito desta matéria orgânica no cólon dos animais. A DE foi feita em quadruplicata e comparada pelo teste de Tukey. A FIV foi avaliada nos resíduos insolúveis à DE nos tempos 4h, 8h e 24h de incubação em anaerobiose. Seis gatos doaram inóculo por defecação espontânea, alimentados com dieta de manutenção por no mínimo 21 dias. Resíduos insolúveis da hidrólise de proteína de frango (PHF) e da hidrólise de penas (HEP) demonstraram maior DE, seguidos por pena in natura e farinha de penas, enquanto o pelo de gatos demonstrou muito baixa DE ($P < 0,05$). O resíduo indigerível de PHF e as penas de aves in natura apresentaram as maiores produções de gás à FIV. Os demais substratos apresentaram fermentações intermediárias, com produção de gás maior do que a verificada para fibra de cana (controle negativo).

PalavrasChaves: penas; polpa de beterraba; pelos de gato; resíduos proteicos

IN VITRO FERMENTABILITY WITH CATS FECAL INOCULUM OF INDIGESTIBLE PROTEIN DERIVATIVES

Abstract: In vitro methods can promote advances in the understanding of physiological and metabolic aspects of the intestinal health in felines. Considering that in the dietary evolution of cats, indigestible protein materials are the organic matter basis for microbial activity in the colon, eight protein ingredients of low ileal digestibility were evaluated for their enzymatic degradability (ED) in vitro and their in vitro fermentability (IVF) with fecal inoculum from cats, thus simulating the effect of this organic matter in the animals' colon. The ED was performed in quadruplicate and compared using the Tukey test. IVF was evaluated in ED-insoluble residues at 4h, 8h and 24h of incubation in anaerobiosis. Six cats donated the inoculum by spontaneous defecation, fed a maintenance diet for at least 21 days. Insoluble residues from chicken protein hydrolysis (PHF) and feather hydrolysis (HEP) demonstrated the highest ED, followed by feather in natura and feather meal, while cat hair demonstrated very low ED ($P < 0.05$). The indigestible PHF residue and feather in natura presented the highest gas production at IVF. The other substrates showed intermediate fermentations, with gas production greater than that observed for sugarcane fiber (negative control).

Keywords: feather; beet pulp; cat hair; protein residues

Introdução: Métodos in vitro simulam a digestibilidade ileal e a fermentabilidade no cólon, parâmetros que não podem ser obtidos in vivo em gatos pelas questões éticas envolvidas na aplicação de fístulas intestinais. Na evolução alimentar de gatos os materiais proteicos indigeríveis, constituídos por penas, pelos, tendões e outros tecidos proteicos de baixa digestibilidade de suas presas são matéria orgânica base para a atividade microbiana no cólon (DEPAUW et al., 2012). Para melhor compreensão da fermentação destas proteínas no intestino grosso de gatos, foram avaliadas a degradabilidade enzimática (DE) in vitro e a fermentabilidade in vitro (FIV) com inóculo fecal de gatos de: penas de aves in natura, farinha de penas comercial, resíduo da hidrólise enzimática das penas (HEP), resíduo da hidrólise da proteína de vísceras de frango (PHF) e pelos de gatos, que foram comparados com a fibra de cana (controle negativo vegetal) e a polpa de beterraba (controle positivo vegetal).

Material e Métodos: A DE da matéria orgânica (MO) foi realizada em quadruplicata, de acordo com HERVERA et al. (2007). Este foi repetido sem a queima na mufla, para se obter amostra de MO não degradável enzimaticamente, considerada como resíduo indigestível (RI) dos ingredientes em estudo. Esta etapa teve por objetivo simular a digestibilidade ileal enzimática. Os RI foram, na sequência, submetidos a FIV, realizada em anaerobiose a 39 °C, em meio de fermentação descrito por WILLIAMS et al. (2005). O inóculo fecal foi obtido de 6 gatos, mantidos no mesmo ambiente e com mesma dieta por 21 dias. Fezes foram coletadas assim que eliminadas espontaneamente e diluídas em NaCl a 0,9% (1:9; g/mL). Meio de cultura, inóculo fecal e 350 mg de RI foram incubados em triplicata em frascos tipo penicilina de 100mL por 4h, 8h e 24h, em 3 repetições no tempo (semanas). Para cada tempo foram utilizados 3 frascos sem substratos (apenas inóculo e meio de cultura), cujos resultados foram descontados dos demais. Foi avaliada a pressão (PSI) interna dos frascos com transdutor (PXM409-3.5 BGUSBH, Ômega, CT, USA) e calculado o volume de gás (mL) [y (mL) = (1,8684*PSI) - 1,4653; $R^2 = 0,993$]. O resíduo não fermentável foi filtrado após fermentação e calculada a porcentagem de desaparecimento da MO ([MO incubada - MO recuperada] / MO incubada * 100). O pH foi medido na fase líquida com pHmetro digital (DM20, Digimed Analítica Ltda., SP, Brasil). Os resultados de DE foram submetidos a ANOVA e Tukey e os de FIV submetidos a ANOVA em análise fatorial 8 (substratos) x 3 (tempo de incubação) ($P < 0,05$). CEUA: 7676/2022.

Resultado e Discussão: Os ingredientes em teste apresentaram mais de 60% PB. Elevadas DE da MO foram verificadas para

os resíduos de PHF, HEP e polpa de beterraba, valores intermediários para penas de aves, farinha de penas e resíduo do decanter e muito baixo para fibra de cana e pelos de gatos (Tabela 1; $P < 0,05$). Já a DE da PB foi maior para o resíduo de PHF, intermediária para resíduo do HEP e baixa nos demais ingredientes estudados. Efeito de tempo de incubação foi observado para todos os parâmetros obtidos à FIV ($P < 0,01$). Os resultados médios dos três tempos indicam menor valor de pH para a polpa de beterraba (mais fermentada) e maior valor para os pelos de gatos (menos fermentado; $P < 0,05$). O volume de gás por g MO foi maior para polpa de beterraba e menor para fibra de cana ($P < 0,05$), indicando que estes foram bons controles de fermentação (Tabela 2). Os RI do resíduo de PHF e das penas de aves apresentaram maiores produções de gás por g MO, seguido pelo RI da farinha de penas, resíduo do decanter e pelos de gatos ($P < 0,05$). Poucos são os estudos de fermentação *in vitro* com ingredientes de origem animal (DEPAUW et al., 2012, BUTOWSKI et al., 2022) e estes utilizam métodos distintos. Verifica-se que a abordagem metodológica proposta foi capaz de simular a degradação enzimática e classificar os RI quanto à sua FIV com inóculo fecal de gatos.

Tabela 1: Caracterização química e degradabilidade enzimática *in vitro* da matéria orgânica (MO) e proteína bruta (PB) dos ingredientes (média \pm erro padrão médio)

INGREDIENTE	COMPOSIÇÃO QUÍMICA			RESÍDUO NÃO DEGRADÁVEL <i>IN VITRO</i>			Degradabilidade <i>in vitro</i> MO (%)	Degradabilidade <i>in vitro</i> da PB (%)
	% MS	% MO	% PB MO	% MS	% MO	% PB MO		
Resíduo PHF	94,65 \pm 0,14	68,91 \pm 0,41	62,07	97,13 \pm 0,29	48,05 \pm 0,20	47,20	73,05 \pm 0,02 a	46,97
Resíduo HEP	93,55 \pm 0,44	88,62 \pm 0,35	85,41	97,39 \pm 0,03	72,67 \pm 0,01	80,78	48,78 \pm 0,37 b	22,45
Polpa de beterraba	90,85 \pm 0,41	80,61 \pm 0,24	6,72	95,98 \pm 0,12	63,45 \pm 0,22	2,68	35,29 \pm 0,26 c	68,63
Penas de aves	92,31 \pm 0,06	91,16 \pm 0,18	75,00	96,32 \pm 0,08	74,65 \pm 0,38	90,34	27,87 \pm 0,40 d	1,36
Farinha de penas	94,84 \pm 0,07	91,62 \pm 0,11	80,71	97,16 \pm 0,02	78,48 \pm 0,16	86,48	27,57 \pm 0,27 d	8,22
Resíduo decanter	92,07 \pm 0,12	89,43 \pm 0,25	86,83	96,99 \pm 0,05	75,45 \pm 0,05	86,35	21,64 \pm 0,02 e	16,10
Fibra de cana	94,52 \pm 0,19	92,30 \pm 0,18	2,47	96,19 \pm 0,03	76,58 \pm 0,12	2,86	8,62 \pm 0,08 f	3,95
Pelos de gatos	92,17 \pm 0,29	90,74 \pm 0,10	91,75	95,35 \pm 0,54	94,39 \pm 0,56	85,69	1,65 \pm 0,20 g	2,92

Degradabilidade *in vitro* MO n = 4. PHF – Proteína hidrolisada de frango. HEP – Hidrólise enzimática de penas. MS – Matéria seca. MO – Matéria orgânica. PB – Proteína bruta. a, b, c, d, e, f, g Médias na coluna sem uma letra em comum diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 2: Parâmetros de fermentabilidade *in vitro* dos ingredientes em estudo. Valores médios dos três tempos de fermentação (média \pm erro padrão médio).

INGREDIENTE	FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>				
	pH	Pressão (PSI)*	% Desaparecimento Matéria Orgânica	Volume de gás (mL)	Volume de gás (mL/g MO)
Resíduo PHF	6,94 \pm 0,01	1,437 \pm 0,072	5,41 \pm 0,44	1,20 \pm 0,13	4,13 \pm 0,48
Resíduo HEP	6,98 \pm 0,02	1,157 \pm 0,057	5,80 \pm 0,41	0,69 \pm 0,11	2,29 \pm 0,34
Polpa de beterraba	6,85 \pm 0,01	2,470 \pm 0,226	3,84 \pm 0,40	3,12 \pm 0,42	10,44 \pm 1,59
Penas de aves	6,98 \pm 0,02	1,458 \pm 0,061	3,76 \pm 0,19	1,24 \pm 0,11	3,97 \pm 0,36
Farinha de penas	6,93 \pm 0,01	1,122 \pm 0,048	5,10 \pm 0,27	0,62 \pm 0,09	2,01 \pm 0,30
Resíduo decanter	6,93 \pm 0,01	1,142 \pm 0,046	2,20 \pm 0,25	0,65 \pm 0,09	1,94 \pm 0,25
Fibra de cana	6,95 \pm 0,01	0,934 \pm 0,025	1,15 \pm 0,11	0,27 \pm 0,05	0,80 \pm 0,15
Pelos de gatos	7,03 \pm 0,03	1,223 \pm 0,084	3,78 \pm 0,22	0,81 \pm 0,16	2,21 \pm 0,51
Erro padrão médio	0,01	0,046	0,15	0,09	0,31
Valor de P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Ingrediente	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Tempo	<0,001	0,006	<0,001	0,003	<0,001
Ingrediente x Tempo	0,009	<0,001	<0,003	<0,001	<0,001

n = 27 (3 repetições, 3 tempos, 3 semanas). PHF – Proteína hidrolisada de frango. HEP – Hidrólise enzimática de penas. MS – Matéria seca. MO – Matéria orgânica.

Conclusão: Com base nos parâmetros obtidos e nos controles vegetais utilizados, o resíduo de PHF e as penas de aves *in natura* foram os derivados proteicos com maior FIV. Os demais substratos avaliados apresentaram fermentações intermediárias, com produção de gás maior do que a verificada para fibra de cana, aqui usada como controle negativo.

Agradecimentos: A Capes ProEx pela bolsa de estudos concedida, BRF Ingredients pela parceria técnica, financiamento e doação dos ingredientes, BRF Pet food, ADIMAX Pet e ADM Pet Food pelo suporte ao laboratório.

Referências Bibliográficas: BUTOWSKI, C. F., THOMAS, D. G., CAVE, N. J et al. In Vitro Assessment of Hydrolyzed Collagen Fermentation Using Domestic Cat (*Felis catus*) Faecal Inocula. *Animals*, v. 12, n. 4, 2022. DEPAUW, S., BOSCH, G., HESTA, M., et al. Fermentation of animal components in strict carnivores: A comparative study with cheetah fecal inoculum. *Journal of Animal Science*, v. 90, n. 8, p. 2540–2548, 2012. HERVERA, M., BAUCCELLS, M. D., BLANCH, F. CASTRILLO, C. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by *in vitro* analyses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 91, n. 5–6, p. 205–209, 2007. WILLIAMS, B. A., BOSCH, M. W., BOER, H., et al. An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Animal Feed Science and Technology*. v. 123–124, Part 1, p. 445–462, 2005.