

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

CAMILA ELIAS

**Qualidade nutricional de rações para cães: influência de Zn na
absorção de Cu e na prevenção de doença hepática**

Piracicaba

2015

CAMILA ELIAS

**Qualidade nutricional de rações para cães: influência de Zn na
absorção de Cu e na prevenção de doença hepática**

**Tese apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Química na
Agricultura e no Ambiente**

**Orientadora: Profa. Dra. Elisabete A. De
Nadai Fernandes**

Co-orientador: Prof. Dr. Peter Bode

Piracicaba

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Elias, Camila

Qualidade nutricional de rações para cães: influência de Zn na absorção de Cu e na prevenção de doença hepática / Camila Elias; orientadora Elisabete A. De Nadai Fernandes; co-orientador Peter Bode. - - Piracicaba, 2015.

140 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise alimentos para animal 2. Análise por ativação neutrônica 3. Animais domésticos 4. Biodisponibilidade 5. Minerais (Química inorgânica) 6. Urânio I. Título

CDU 591.53 : 543.522

*Aos meus pais, Aparecida e Francisco, por todo o amor eternamente dedicado
Ao meu marido, Rodrigo, pelo companheirismo e por nunca me deixar desistir
À minha irmã Samira, pela presença em todos os momentos*

Sem vocês eu nunca teria voado tão alto e tão distante de casa

Dedico

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus mais nobres e sinceros agradecimentos a todos aqueles que me ajudaram, incentivaram e torceram por mim ao longo destes anos.

- A Deus, por permitir mais essa conquista em minha vida
- À Universidade de São Paulo – USP
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA
- Ao Laboratório de Radioisótopos – LRi, pelo suporte técnico-científico
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo suporte financeiro
- Especialmente à Profa. Dra. Elisabete A. De Nadai Fernandes, pela orientação, pelas oportunidades oferecidas, pelos desafios que me fizeram amadurecer, pela confiança, incentivo e grande amizade. Muito obrigada por acreditar em mim!
- Ao Dr. Márcio Arruda Bacchi, pela dedicação ao longo de todo o trabalho, pelos valiosos ensinamentos, pelo constante incentivo para meu crescimento pessoal e profissional e pela grande amizade
- Ao Prof. Dr. Peter Bode, pela oportunidade inesquecível do Doutorado Sanduíche na Delft University of Technology (TUDelft), Delft, Holanda, pelo incentivo e pela amizade. Foram os melhores seis meses vividos!
- À Anneke Koster-Ammerlaan, por me acolher carinhosamente em sua casa, por me ajudar nas análises e por me mostrar tudo sobre a Holanda. Como valeu a pena!
- Ao Prof. Dr. Gabriel Adrián Sarriés e à graduanda Laís Vicino Sarriés, pela contribuição fundamental na análise estatística e pela amizade
- Às minhas amigas Gabriela de Matuoka e Chiocchetti e Maria Isabel Vega Martinez, pela essencial ajuda durante os experimentos, pelo constante companheirismo e pela amizade
- Aos amigos do Laboratório de Radioisótopos: Adriana de Angelis Fogaça, Cláudio Luiz Gonzaga, Felipe Almeida Biguzzi, Gabriela da Silva, Jéssica Caroline Gonzaga, Lilian Seiko Kato, Luís Gustavo Cofani dos Santos, Natalia Protti, Nathália Caroline Luccas, Simone Cofani dos Santos, pela convivência de vários anos, pela cumplicidade e pela amizade
- Aos amigos da Delft University of Technology: Baukje Terpstra, Delia van Rij, Folkert Geurink, Jan Willem van Dorp, Mehmet Sarilar, Thea van Meerten e Yvonne Weijgertse, pela receptividade, pela fundamental ajuda nas análises e pelos momentos memoráveis de alegria vividos na Holanda

- À técnica Maria Regina Santos Rodeiro Peçanha e à Dra. Patricia Pimentel dos Santos, do Laboratório de Nutrição Animal, do CENA/USP, pelo auxílio na parte experimental
- Ao técnico Carlos Eduardo do Laboratório de Nutrição Animal, da Embrapa Agropecuária Sudeste, pelo auxílio na leitura das amostras por ICP OES
- A todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação do CENA, pela disposição e constante ajuda
- À bibliotecária Sra. Marília R. Garcia Henyei, pelo auxílio na revisão
- Às queridas amigas Gisele Gonçalves Bortoleto e Silvana Regina Vicino Sarriés, por estarem sempre dispostas a ajudar, pelo incentivo e pela amizade
- À família Alves, pelos anos de amizade e convivência
- Às minhas queridas amigas da ONG Vira Lata Vira Vida: Ana Giuliani, Cassia Pupim, Giuliana Del Nero Velasco, Leila Choairy, Maria Cecília Pizzinato e Vanessa Paulete Roveri, pelas horas de diversão e trabalho intenso, pela grande amizade, pelo incentivo e, principalmente, por fazerem a diferença na vida de muitos animais. Vocês estarão sempre em meu coração.
- Aos meus amigos: Felipe Fonseca, Jair Fidelis Júnior, Marcio Barretto Rubino, Michele Stenico Fidelis, Tatiane Batista e Viviane Alves Dias, pelos momentos de lazer na companhia de pessoas tão maravilhosas.
- Às minhas pequenas Sandy (*in memoriam*), Surya e Sophie, por todos os momentos de alegria, carinho e diversão. Com vocês, a vida fica tão mais leve.

A jornada

“Quando você traz um animal de estimação em sua vida, você começa uma viagem – uma viagem que vai lhe trazer mais amor e devoção do que imagina, mas também testar a sua força e coragem.

Se você permitir, a jornada ensinará muitas coisas, sobre a vida, sobre si mesmo e, acima de tudo, sobre o amor.

Você sairá mudado para sempre, pois uma alma não pode tocar a outra sem deixar sua marca...

... Devo advertí-lo que esta viagem não é sem dor. Como todos os caminhos do verdadeiro amor, a dor faz parte de amar...”

*Crystal Ward Kent**



* Tradução de trecho do “The Journey”, escrito por Crystal Ward Kent em 2007. Figura extraída de Desktop Nexus “Friends in sunset”.

RESUMO

ELIAS, C. **Qualidade nutricional de rações para cães: Influência de Zn na absorção de Cu e na prevenção de doença hepática.** 2015. 140 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

As rações comerciais devem ser um alimento balanceado que supra todas as exigências nutricionais nas diferentes fases da vida do animal. Sua formulação deve conter ingredientes de qualidade, em proporções adequadas. É de fundamental importância o conhecimento do valor nutricional das rações, para assegurar que o cão esteja ingerindo diariamente quantidades corretas dos nutrientes. O desbalanço de elementos essenciais e a presença de elementos tóxicos podem causar desequilíbrios nutricionais, doenças e, até mesmo, consequências fatais aos cães. O cobre é um dos vários elementos de importância a ser estudado quanto aos defeitos metabólicos nos cães. O acúmulo de cobre no fígado pode ocasionar lesões progressivas nas organelas dos hepatócitos, resultando em hepatite crônica e cirrose. Diante disso, este trabalho teve como objetivos (I) quantificação dos elementos químicos com função nutricional e com potencial tóxico presentes nas rações para cães adultos e filhotes, (II) avaliação da composição centesimal das rações amostradas, (III) avaliação da variação dos elementos químicos entre as amostras de ração de um mesmo lote de produção (IV), estudo da representatividade de pequenas porções-teste, (V) avaliação da bioacessibilidade de cobre em rações, com experimento *in vitro*. Os elementos químicos Al, As, Br, Ca, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, I, K, La, Mg, Mn, Na, P, Rb, Sb, Sc, Se, Ti, U e Zn foram determinados pela análise por ativação neutrônica instrumental (INAA). A composição centesimal foi avaliada de acordo com os métodos recomendados da AOAC. A homogeneidade de distribuição dos elementos químicos nas rações foi avaliada pela análise de amostras grandes (LS-NAA). A bioacessibilidade de cobre nas rações foi estimada por meio da simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*. Foi possível determinar por INAA todos os nutrientes minerais, isto é, Ca, P, K, Na, Cl, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I e Se, com limites estabelecidos pela Association of American Feed Control Officials. Foram notadas em algumas rações altas concentrações de Al, Sb e U, elementos com grande potencial tóxico. Cerca de 16 % das amostras de ração apresentaram, pelo menos, um parâmetro não conforme quanto à composição centesimal. Os resultados obtidos por LS-NAA e NAA convencional mostraram variação na composição entre os sacos de ração para Br, Ca, Na e Zn, com boa concordância entre ambos os métodos. O emprego da LS-NAA combinada com NAA convencional permitiu observar que pequenas porções-teste (350 mg) de ração são representativas comparadas com aquelas de 1 kg para Br, Ca, K, Na e Zn. Em todas as rações para cães, 50 % do cobre presente estava sob a forma bioacessível.

Palavras-chave: Minerais. Composição química. Bioacessibilidade. Amostras grandes.

SUMMARY

ELIAS, C. **Nutritional quality of dog food: influence of zinc in the absorption of copper and in the prevention of hepatic disease.** 2015. 140 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Commercial dog foods should be a balanced diet that meets all nutritional requirements at different stages of the animal's life. Its formulation should contain quality ingredients in suitable proportions. The knowledge of the nutritional value of dog food is fundamental to ensure that the animal is ingesting daily right amounts of nutrients. The imbalance of essential elements and the presence of toxic elements can cause nutritional problems, diseases, and even fatal consequences for dogs. Copper is one of several important factors to be studied for metabolic defects in dogs. Copper accumulation in the liver may cause progressive lesions in the organelles of hepatocytes, resulting in chronic hepatitis and cirrhosis. Thus, this study aimed to (I) determine essential and potentially toxic chemical elements in the dog food for puppies and adults, (II) assess the proximate composition of the sampled dog food, (III) evaluate the between-bag variation of chemical elements in dog food within the same production lot of one brand, (IV) study the representativeness of small test portions of dog food collected from regular 1 kg packed bags, (V) assess the in vitro bioaccessibility of copper in dog food. The chemical elements Al, As, Br, Ca, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, I, K, La, Mg, Mn, Na, P, Rb, Sb, Sc, Se, Ti, U and Zn were determined by instrumental neutron activation analysis (INAA). The proximate composition was evaluated by AOAC recommended methods. The homogeneity of chemical elements distribution in the dog food was evaluated by analysis of large samples (LS-NAA). The bioaccessibility of copper was estimated by in vitro simulated gastrointestinal digestion. INAA was a suitable analytical tool for characterizing the profile of mineral nutrients, i.e., Ca, P, K, Na, Cl, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I and Se in dog food with reference values set by Association of American Feed Control Officials. High concentrations of the toxic elements Al, Sb and U were observed in some dog food samples. Approximately 16% of dog food samples presented, at least, one value outside the reference limits from proximate composition. The results obtained by LS-NAA and conventional NAA showed between-bag compositional variability for Br, Ca, Na and Zn, with a good agreement between both methods. The use of LS-NAA combined with conventional NAA allowed to observe that the small 350 mg portions of dry dog food taken for analysis is representative of one kilogram bag for Br, Ca, K, Na and Zn. In all dog foods, 50 % of the copper was present in bioaccessible form.

Keywords: Minerals. Chemical composition. Bioaccessibility. Large sample.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Ração para cães.....	13
2.2 Histórico das rações para animais de companhia.....	14
2.3 Qualidade e segurança das rações para cães	15
2.4 Composição nutricional das rações para cães	17
2.4.1 Carboidratos e fibras	17
2.4.2 Gorduras.....	18
2.4.3 Proteínas	18
2.4.4 Minerais	19
2.5 Cobre	20
2.6 Zinco	22
2.7 Doença hepática associada ao acúmulo de cobre	24
2.8 Influência de zinco na absorção de cobre e na prevenção de doença hepática	25
2.9 Bioacessibilidade de minerais pela simulação da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> ...	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Amostragem de rações para cães.....	28
3.2 Preparo das amostras	32
3.3 Determinação de elementos químicos nas rações.....	33
3.4 INAA – Radionuclídeos de meias-vidas longas.....	36
3.5 INAA – Radionuclídeos de meias-vidas curtas.....	38
3.6 LS-NAA.....	40
3.6.1 Comparação LS-NAA e NAA convencional.....	44
3.7 Composição centesimal.....	44
3.7.1 Determinação de umidade.....	45
3.7.2 Determinação de proteína bruta	46
3.7.3 Determinação de extrato etéreo com hidrólise ácida	48
3.7.4 Determinação de extrato etéreo	49
3.7.5 Determinação de fibra bruta	50
3.7.6 Determinação de resíduo mineral (cinzas).....	51
3.8 Bioacessibilidade de cobre nas rações	52
3.8.1 Determinação de cobre por ICP OES.....	54

3.9 Controle da qualidade do procedimento analítico	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Controle da qualidade do procedimento analítico	59
4.2 Determinação de elementos químicos nas rações	62
4.2.1 Elementos nutricionais para os cães	63
4.2.2 Outros elementos químicos quantificados nas rações	79
4.2.3 Comparação de uma marca comercial de ração adquirida no Brasil e Holanda.....	91
4.3 LS-NAA.....	91
4.4 Composição centesimal.....	95
4.4.1 Qualidade da determinação analítica	95
4.4.2 Umidade	97
4.4.3 Proteína bruta.....	99
4.4.4 Extrato etéreo com hidrólise ácida	101
4.4.5 Extrato etéreo	103
4.4.6 Fibra bruta	107
4.4.7 Matéria mineral (cinzas)	109
4.4.8 Energia metabolizável	110
4.5 Análise estatística.....	113
4.5.1 Comparação da composição química elementar dos diferentes segmentos de rações para cães	113
4.6 Bioacessibilidade de cobre nas rações	118
4.7 Absorção e metabolismo de cobre e zinco em cães saudáveis	119
5 CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS	125

1 INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente 35,7 milhões de cães no Brasil, sendo o segundo país com maior número de animais, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (MAPS OF WORLD, 2013). Esse contingente de animais equivale a um consumo anual de 1,98 milhões de toneladas de ração, colocando o Brasil como o sexto maior do mundo em faturamento nesse setor (LUIZ, 2012). Os principais fabricantes da categoria também continuam a investir na segmentação dos produtos para animais de companhia, desenvolvendo rações específicas para raças, tamanhos, idades e problemas de saúde (EUROMONITOR, 2014). Estão disponíveis nos mercados varejistas mais de 500 marcas de rações para cães e gatos, de 85 fabricantes (CARCIOFI et al., 2009).

A formulação e o balanceamento de ração para cães consistem na mistura de vários ingredientes com a finalidade de atender plenamente as exigências nutricionais para uma vida saudável, uma vez que pode ser a única fonte de alimentação para os animais. Atualmente, existem várias normas internacionais que estabelecem limites de alguns valores de propriedades nutricionais que devem ser obrigatoriamente seguidos pelos fabricantes de rações para cães. No Brasil, o órgão regulamentador para alimentação animal é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Além dos nutrientes essenciais à saúde dos cães, uma variedade de contaminantes, incluindo elementos químicos potencialmente tóxicos, pode ser encontrada nas rações (GIRIO, 2007), principalmente pelo uso de matérias primas de qualidade inferior. Adicionalmente, muitos desses ingredientes nem são absorvidos pelo animal, não agregando qualquer valor nutricional à ração. Desse modo, é imprescindível o conhecimento da composição química das rações (ALVARADO et al., 2008), pois a presença de elementos tóxicos pode causar doenças e, até mesmo, consequências fatais aos cães. No caso dos nutrientes, embora participem de várias funções vitais no organismo, sua avaliação é um modo de assegurar que o cão esteja ingerindo diariamente quantidades corretas recomendadas pela legislação, sem risco de subnutrição ou supernutrição.

Dentre os vários micronutrientes, cobre e zinco, participam como co-fatores de uma série de reações enzimáticas (TAKASE et al., 2003). Esses micronutrientes

podem se apresentar sob diversas formas químicas na natureza, como sais ou compostos orgânicos, complexados com aminoácidos e proteínas, sendo a forma de compostos organo quelados mais biodisponível ao organismo (ANDRADE et al., 2003).

Além de micronutriente, cobre é um dos vários elementos de importância a ser estudado quanto aos defeitos metabólicos nos cães, podendo causar sérias complicações, principalmente, no fígado (BODE et al., 2005). O acúmulo de cobre no fígado ocasiona lesões progressivas nas organelas dos hepatócitos, resultando em hepatite crônica e cirrose. Todavia, a administração de zinco na dieta tem sido altamente recomendada para o tratamento dessa doença, devido ao papel passivo do zinco que induz a formação de metalotioneína e impede o transporte de cobre na circulação (HOFFMANN et al., 2009).

Considerando o exposto, este trabalho teve como principal objetivo avaliar a qualidade nutricional de rações para cães, de diferentes segmentos comerciais, verificando a conformidade com os limites estabelecidos pela legislação brasileira e por outros organismos reguladores internacionais.

Para o cumprimento do objetivo geral, foram estabelecidos cinco objetivos específicos, a saber:

- ❁ Realizar amostragem abrangente dos diferentes tipos e marcas comerciais de rações secas para cães, disponíveis no mercado local de Piracicaba, SP;
- ❁ Determinar elementos químicos com função nutricional e com potencial tóxico presentes nas rações amostradas;
- ❁ Avaliar a composição centesimal das rações amostradas, pela determinação de matéria seca, proteína bruta, fibra bruta, extrato etéreo e matéria mineral (cinzas);
- ❁ Avaliar a variação dos elementos químicos entre as amostras de ração de um mesmo lote de produção
- ❁ Estudar a representatividade de pequenas porções-teste;
- ❁ Estimar a bioacessibilidade de cobre em amostras de ração, com experimento *in vitro*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ração para cães

As rações para cães são classificadas como econômicas, *premium* e *super-premium* e diferem com relação a qualidade dos ingredientes e custo do produto. As rações econômicas possuem teores nutricionais geralmente menores e ingredientes de baixo custo, as rações *premium* apresentam melhor seleção dos ingredientes, enquanto as rações *super premium* são formuladas com ingredientes de alta qualidade, propiciando uma melhor nutrição ao animal (CARCIOFI et al., 2009). Esses autores verificaram teores mais elevados de proteína e gordura e menor quantidade de matéria mineral nas rações *super premium* quando comparadas com *premium* e econômicas. Por sua vez, as rações *premium* demonstraram melhor formulação nutricional e seleção de ingredientes do que as rações econômicas, uma vez que apresentaram mais proteína e gordura e menos fibra e matéria mineral.

A produção de alimentos destinados a animais de companhia deve seguir requisitos legais exigidos a todos os fabricantes de ração (CASE et al., 2011). O órgão controlador da alimentação animal no Brasil é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), conforme previsto no Decreto nº 6296, de 11 de dezembro de 2007. Este decreto veio regulamentar a Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974, que dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatória dos produtos destinados à alimentação animal.

Padrões de identidade e qualidade de alimentos completos e de alimentos especiais destinados a cães e gatos estão dispostos na Instrução Normativa nº 09, de 09 de julho de 2003 (BRASIL, 2003), que traz a quantidade mínima ou máxima para diversos componentes nutricionais em rações para cães (Tabela 2.1). É importante ressaltar que essa norma foi revogada pela Instrução Normativa nº 30, de 5 de agosto de 2009 (BRASIL, 2009), que extinguiu os valores estabelecidos para os componentes nutricionais. A norma em vigência estabelece critérios e procedimentos para o registro de produtos destinados à alimentação de animais de companhia, bem como as regras para sua elaboração, importação e comercialização.

Tabela 2.1 - Valores nutricionais para alimentos completos destinados a cães de acordo com a Instrução Normativa n° 09, publicada em 2003

Níveis de garantia (%)	Alimento seco	
	Cães em crescimento	Cães adultos
Umidade (máximo)	12,0	12,0
Proteína Bruta (mínimo)	22,0	16,0
Extrato Etéreo (mínimo)	7,0	4,5
Fibra Bruta (máximo)	6,0	6,5
Matéria Mineral (máximo)	12,0	12,0
Cálcio (máximo)	2,0	2,4
Fósforo (mínimo)	0,8	0,6

Existem também as agências reguladoras de outros países ou blocos, tais como a Association of American Feed Control Officials (AAFCO), sediada em Atlanta, Estados Unidos, o National Research Council (NRC), sediado em Washington, Estados Unidos, e a Fédération Européenne de L'Industrie des Aliments Pour Animaux Familiers (FEDIAF), sediada em Bruxelas, Bélgica. Essas agências reguladoras estabelecem guias nutricionais com uma grande variedade de informações baseadas na literatura científica, devendo ser obrigatoriamente seguidos pelos fabricantes de rações para cães (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012).

2.2 Histórico das rações para animais de companhia

De acordo com Case et al. (2011), a primeira ração comercializada para cães foi sob a forma de um biscoito, criado na Inglaterra em 1860 por James Spratt. Após a Primeira Guerra Mundial, a ração enlatada para cães foi introduzida nos Estados Unidos e, a partir da década de 1930, rações enlatadas para gatos e rações secas para cães foram comercializadas (BARNES, 2005).

Em 1957, a Purina Dog Chow lançou seu primeiro produto no mercado que, após um ano, foi considerada a ração para cães mais vendida nos Estados Unidos (CASE et al., 2011). A década de 1960 foi marcada pela grande diversificação dos

tipos de alimentos disponíveis para os proprietários de animais de companhia, com a introdução de rações secas para gatos, e muito mais variedades de produtos enlatados e produtos semi-úmidos (BARNES, 2005). Em meados da década de 1970, foram criadas rações diferenciadas para filhotes e adultos, e também foi introduzido pelos fabricantes o alimento *premium* (CASE et al., 2011).

Recomendações nutricionais surgiram apenas em 1974 para cães e em 1978 para gatos, a partir de estimativas de outras espécies, publicadas pela National Academy of Sciences, EUA. Essas recomendações foram utilizadas pelos fabricantes de rações até o início da década de 1980 (BUTTERWICK et al., 2011). Na década de 1990, a AAFCO formou os subcomitês *Feline Nutrition Expert* e *Canine Nutrition Expert* para a elaboração de guias nutricionais visando a formulação de rações para animais de companhia (BUTTERWICK et al., 2011). Em 2006, e em vigência até hoje, o NRC publicou uma atualização das recomendações nutricionais para cães e gatos (BUTTERWICK et al., 2011).

Na Europa, os guias nutricionais foram introduzidos para cães e gatos em 2000 pela FEDIAF, pois os padrões nutricionais bem como a sua interpretação divergem daqueles estabelecidos pela AAFCO (BUTTERWICK et al., 2011). Versão recente do guia foi publicada em setembro de 2014 (FEDIAF, 2014).

2.3 Qualidade e segurança das rações para cães

Existe uma preocupação mundial em relação à segurança dos alimentos para animais de companhia, especialmente devido ao aumento do número desses animais sendo alimentados exclusivamente com rações comerciais (CUSTÓDIO et al., 2005).

Em 2007, um grande recall de rações ocorreu nos Estados Unidos, ocasionando problemas renais irreversíveis nos animais e diversas mortes, pela presença intencional de melamina nas rações (DZANIS, 2008; BUCHANAN et al., 2011), adicionada para dar a falsa aparência de um alto teor de proteínas, sendo a molécula de melamina constituída aproximadamente de 67% de nitrogênio (ROSA, 2008). No entanto, Dzanis (2008) considera as rações como alimentos seguros, sendo que somente 1,7 % das intoxicações ocorrentes em cães e gatos podem ser atribuídas às fontes alimentares.

Na composição das rações, estão presentes subprodutos de origem animal, como farinhas de carne, de osso e de vísceras de frango, produtos minerais, como fosfatos, produtos e subprodutos da agricultura, como farinhas e farelos de cereais, e os aditivos alimentares, denominados acidulantes, antioxidantes e aromatizantes, adicionados nas rações para modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais (BELLAYER, 2001; CASACUBERTA et al., 2009; VELOSO, 2010; GOES et al., 2013).

Dependendo da qualidade dos ingredientes adicionados na formulação, as rações podem apresentar uma variedade de contaminantes (GIRIO, 2007), incluindo elementos químicos potencialmente tóxicos. Também, os componentes dos materiais de embalagens são considerados fonte potencial de contaminação, por serem possivelmente transferidos para os alimentos (ANVISA, 2010; JIANG et al., 2010). Na verdade, a contaminação de rações ocorre de várias formas e por diferentes fontes.

A ocorrência de contaminantes químicos em alimentos pode ocasionar desequilíbrios nutricionais, doenças e, até mesmo, consequências fatais aos cães (NEVES, 2006). Por outro lado, essas contaminações de origem química podem não ser manifestadas de forma aguda, mas sim ao longo do tempo, como resultado de acumulação no organismo dos animais (ZHU et al., 2009). Em alguns casos, os limites entre essencialidade e toxicidade de um elemento químico são muito estreitos, até para os nutrientes essenciais à saúde dos cães, como nos casos do Cu e Se, o que torna difícil estabelecer quais são essenciais e quais são tóxicos, sendo certo que todos tornam-se tóxicos em quantidades elevadas (TAGLIAFERRO, 2003).

Dada a crescente importância no setor de segurança alimentar, muitos estudos têm sido realizados em vários países (ALVARADO et al., 2008; DURAN et al., 2010; ATKINS et al., 2011; KELLY et al., 2013) para assegurar a qualidade das rações através do conhecimento da sua composição nutricional e química (ALVARADO et al., 2008), uma vez que podem ser a única fonte de alimentação para os cães. Além disso, é um modo de garantir que o cão esteja ingerindo diariamente quantidades corretas dos nutrientes recomendados pela legislação, sem risco de subnutrição ou supernutrição.

2.4 Composição nutricional das rações para cães

A ração deve ser um alimento balanceado que supra todas as exigências nutricionais nas diferentes fases da vida do animal (NRC, 2006). Sua formulação deve conter ingredientes de alta qualidade e que sejam misturados de modo proporcional, contendo em doses específicas fontes de carboidrato, proteína, gordura e minerais, otimizando, desse modo, o aproveitamento dos nutrientes pelos animais (NUNES et al., 2001; NRC, 2006; CHANDLER, 2008; THOMPSON, 2008).

Tanto a falta como o excesso de qualquer nutriente em uma dieta podem comprometer a saúde dos cães em vários aspectos, como alterações na pelagem, ganho ou perda de peso, imunidade baixa, problemas hepáticos, cardíacos e renais, aumento da quantidade de matéria fecal e distúrbios ósseos e articulares (CARREIRA, 2013).

2.4.1 Carboidratos e fibras

Os carboidratos são os componentes mais abundantes e amplamente distribuídos entre os alimentos (CECCHI, 2013), predominantemente de origem vegetal (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012). Não são considerados essenciais aos cães, mas são usados em rações como fontes de energia e fibra (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012). Em geral, rações secas contêm em torno de 60 % de carboidratos, enquanto nas rações úmidas os teores variam entre 0 e 30 % (CASE et al., 2011). O amido é a principal fonte de carboidrato da dieta, sendo essencial para o processo de extrusão usado na preparação da maioria das rações secas (CASE et al., 2011).

As fibras consistem de formas complexas de carboidratos (FORTES, 2005) que não são digeríveis pelo organismo animal (CECCHI, 2013). A função das fibras no organismo depende da sua natureza (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012). As fibras solúveis (pectina) são altamente fermentáveis e desempenham um papel importante na saúde e no equilíbrio da microbiota intestinal (GRANDJEAN, 2006). Em contrapartida, as fibras insolúveis (celulose e lignina), não-fermentáveis, servem para formar o bolo intestinal, estimulando os movimentos peristálticos (GRANDJEAN, 2006), além de favorecer a saciedade em animais com tendência à

obesidade (CASE et al., 2011). Embora as fibras não sejam essenciais aos animais, o excesso ou falta na dieta podem comprometer o trânsito intestinal e a qualidade das fezes (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012).

2.4.2 Gorduras

Gorduras são componentes importantes na dieta de animais de companhia, sendo os ácidos graxos (saturados e insaturados) os principais constituintes (NRC, 2006). A ingestão dietética de gorduras, principalmente aquelas de origem animal, e de óleos de sementes de diversas plantas promove a maior fonte de energia na dieta dos animais (NRC, 2006), fornecendo 2,25 vezes a energia metabolizável de proteínas e carboidratos (HAND et al., 2010, CASE et al., 2011). Adicionalmente, as gorduras melhoram a palatabilidade das rações (NRC, 2006). Também, é pela dieta que se fornecem os ácidos graxos essenciais que não são sintetizados pelo organismo e servem como carreadores para vitaminas lipossolúveis (NRC, 2006). Os ácidos graxos saturados são importantes para o fornecimento rápido de energia aos cães de esporte, bem como ao animal diabético e aos filhotes recém-nascidos, enquanto os ácidos graxos poliinsaturados são precursores das séries ômega 3 e ômega 6 (GRANDJEAN, 2006; GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012). O excesso de gordura na dieta é armazenado nos adipócitos na forma de triacilgliceróis (HAND et al., 2010).

2.4.3 Proteínas

As proteínas são polímeros constituídos por aminoácidos (ARAÚJO, 2012) que contêm cerca de 16 % de nitrogênio (CASE et al., 2011). São conhecidos dez aminoácidos classificados como essenciais para os cães, que não são sintetizados pelo organismo em quantidades suficientes, tornando necessária a suplementação através da dieta (HAND et al., 2010). A qualidade da proteína é proporcional à eficiência com que os aminoácidos provenientes da dieta são convertidos no tecido e, por sua vez, dependem da fonte de proteína, da concentração de aminoácidos essenciais e da sua biodisponibilidade (HAND et al., 2010). Proteínas que fornecem proporções adequadas de todos os aminoácidos essenciais são consideradas proteínas de alta qualidade (HAND et al., 2010).

As proteínas de origem vegetal apresentam, geralmente, menor digestibilidade do que as proteínas de origem animal, pois fibras vegetais e hidratos de carbono não são digeridos e nem absorvidos no intestino delgado (NRC, 2006). A quantidade de proteína adicionada na dieta irá depender da necessidade do animal, ou seja, existe um consumo maior de fontes proteicas nas fases de crescimento, gestação, lactação e para cães com atividade física mais intensa (GRANDJEAN, 2006).

2.4.4 Minerais

Os minerais essenciais são elementos inorgânicos que possuem função fisiológica definida nos animais (GIBNEY et al., 2002; NRC, 2006). Formam as cinzas dos materiais biológicos após completa oxidação da matéria orgânica (GONSALVES, 2001), representando de 5 % a 8 % do total da matéria seca (GRANDJEAN, 2006).

Os elementos essenciais devem ser fornecidos pela dieta e podem variar de gramas por dia, no caso dos macrominerais, até miligramas por dia, para os microminerais (GIBNEY et al., 2002). Os macrominerais são representados por Na, K, Ca, Mg, P e Cl, enquanto os microminerais são compostos pelo Fe, Zn, Cu, Mn, I e Se (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012).

Em rações, os minerais podem ser incluídos sob a forma de sais purificados como sulfato de ferro, óxido de zinco, óxido de magnésio, sulfato de cobre, selenito de sódio e iodato de cálcio (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012). A ração é, a princípio, um alimento completo, não sendo necessário adicionar na dieta qualquer suplemento mineral, pois o excesso dos minerais pode afetar a digestibilidade do alimento e até produzir efeito contrário ao pretendido (GRANDJEAN, 2006).

Dentre algumas funções dos minerais descritas por Case et al. (2011) incluem-se participação em diversas reações catalisadas enzimaticamente, constituição do esqueleto, auxílio na condução de impulsos nervosos e contração muscular, além de composição de várias proteínas e hormônios, e manutenção do equilíbrio iônico celular. Devido à grande relevância especificamente de cobre e zinco neste estudo, as funções desses elementos foram descritas mais detalhadamente a seguir.

2.5 Cobre

Em cães, o cobre está presente somente em pequenas quantidades (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012). A NRC (2006) recomenda a ingestão diária de 1,5 mg de cobre para cães adultos pesando 15 kg e consumindo 1000 calorias/dia. Em rações, o cobre é normalmente adicionado na forma de sulfato de cobre ou cloreto de cobre (CASE et al., 2011).

Funções metabólicas e essencialidade do cobre

O cobre possui funções orgânicas específicas por ser constituinte de várias enzimas, com atividade de oxidação e redução (KLAASSEN, 2008), cofatores e proteínas no organismo (GIBNEY et al., 2002). Essas enzimas e proteínas são importantes nos processos fundamentais para a saúde do organismo, incluindo o funcionamento adequado dos sistemas imunológico, nervoso e cardiovascular, para a saúde óssea, para o metabolismo do ferro e formação da hemoglobina, e para a regulação da expressão gênica (GIBNEY et al., 2002). O cobre também participa da síntese de melanina, envolvida na pigmentação do pelo (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012).

Absorção, metabolismo e excreção de cobre

Normalmente, cerca de 55 % a 75 % do cobre alimentar são absorvidos (KLAASSEN, 2008). O cobre é absorvido por mecanismo mediado por carreador, ligando-se à metalotioneína dentro da célula da mucosa do duodeno (COZZOLINO, 2005). Após a absorção, é transportado ligado principalmente à albumina e à transcupreína (AMANCIO, 2011). Pode também estar presente no plasma quelatado a aminoácidos (COZZOLINO, 2005). O excesso de cobre se acumula no fígado, onde é encontrado em maior proporção (CASE et al., 2011), e é, então, liberado para a circulação ligado à ceruloplasmina (GIBNEY et al., 2002). O cobre é excretado principalmente através das fezes (HAND et al., 2010) e normalmente menos de 0,1 mg/dia do cobre absorvido pela dieta é eliminado pela urina (OTTEN et al., 2006).

Biodisponibilidade do cobre

A biodisponibilidade do cobre é afetada por vários fatores (MENEZES, 2010). No processamento dos alimentos, devem ser considerados tratamentos químicos que envolvam oxidação e redução, os quais podem diminuir e afetar a biodisponibilidade do mineral (WAPNIR, 1998; COZZOLINO, 2005).

Zinco em excesso prejudica a absorção de cobre (STOREY; GREGER, 1987), pois ambos os minerais competem pelo mesmo transportador nas células intestinais, a metalotioneína (AMANCIO, 2011). Nesse caso, o zinco exerce um efeito antagônico nos níveis de cobre por meio da indução da síntese de metalotioneína nas células da mucosa intestinal (GIBNEY et al., 2002), causando aumento na retenção intracelular de cobre e consequente redução de transporte pelo plasma (COZZOLINO, 2005).

Suplementos de cálcio também podem prejudicar a absorção de cobre por aumentar o pH do conteúdo intestinal, tornando os sais de cobre menos solúveis (COZZOLINO, 2005). A biodisponibilidade do cobre será comprometida também pela interação com outros elementos como cádmio, chumbo, ferro, molibdênio, selênio e manganês (GIBNEY et al., 2002).

Deficiência e excesso de cobre

Por conta da importância do cobre no metabolismo de ferro e na formação da hemoglobina, a deficiência de cobre causará anemias microcíticas e hipocrômicas (CASE et al., 2011).

Para cães, cobre em excesso pode interferir na absorção de ferro e zinco (HAND et al., 2010). Em certos casos, o cobre se tornará tóxico para algumas raças caninas (GRANDJEAN, 2006) com predisposição genética à doença autossômica recessiva do metabolismo desse elemento, resultando em hepatotoxicose (HAND et al., 2010).

2.6 Zinco

O mineral zinco está amplamente distribuído em muitos tecidos do corpo (CASE et al., 2011). É um componente essencial para a atividade de mais de 200 enzimas (HAND et al., 2010) e estabilizador de estruturas conformacionais de proteínas e ácidos nucleicos (HENRIQUES et al., 2003). Em rações, o zinco é adicionado na forma de óxido de zinco, sulfato de zinco, cloreto de zinco e carbonato de zinco (HAND et al., 2010). A NRC (2006) recomenda a ingestão diária de 15 mg de zinco para cães adultos pesando 15 kg e consumindo 1000 calorias/dia.

Funções metabólicas e essencialidade do zinco

O zinco é crucial para o crescimento e desenvolvimento, participando de vários processos enzimáticos relacionados com o metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios, além de estar envolvido na regulação da expressão gênica (OTTEN et al., 2006). É um componente de várias metaloenzimas, incluindo a anidrase carbônica, desidrogenase láctica, fosfatase alcalina, carboxipeptidase e aminopeptidase (CASE et al., 2011).

O zinco está envolvido na estabilização de membranas estruturais e na proteção celular, prevenindo a peroxidação lipídica (MAFRA; COZZOLINO, 2004). Atua como cofator na síntese de DNA, RNA e proteínas e é essencial para a imunidade celular e na reprodução (CASE et al., 2011). Também, o zinco está relacionado com a síntese do colágeno e queratina, sendo, portanto, um elemento fundamental no processo de cicatrização (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012). Além disso, é importante para a síntese de vários hormônios, incluindo testosterona, corticosterona e insulina (HAND et al., 2010).

Absorção, metabolismo e excreção de zinco

Durante a digestão, o zinco é absorvido no intestino delgado, sendo o jejuno o maior sítio de absorção (OTTEN et al., 2006). Somente uma pequena quantidade é absorvida pelo estômago (HAND et al., 2010). Aproximadamente 20 % a 30 % do zinco ingerido é absorvido (KLAASSEN, 2008). O zinco absorvido é ligado à albumina e transferido para o intestino via circulação portal (OTTEN et al., 2006),

mas apenas cerca de 0,1 % do zinco é encontrado no plasma (GIBNEY et al., 2002). O fígado é o primeiro órgão envolvido no metabolismo do zinco (HAND et al., 2010). Quando o conteúdo do zinco hepático está acima dos níveis normais, ocorre a síntese da metalotioneína (HAND et al., 2010). Em períodos de baixa ingestão de zinco, sua absorção é regulada e o transporte de zinco endógeno no lúmen intestinal é suprimido (GIBNEY et al., 2002). Zinco é excretado principalmente pelas fezes, enquanto a urina contribui com menos de 10 % (OTTEN et al., 2006) para a eliminação de zinco.

Biodisponibilidade do zinco

Vários componentes da dieta podem interagir com o zinco, ora favorecendo, ora dificultando sua absorção (COZZOLINO, 2005; OTTEN et al., 2006). Com relação aos inibidores da absorção de zinco na dieta, têm-se os fitatos, cálcio, fosfatos, cobre, ferro, cádmio e cromo (COZZOLINO, 1997; HAND et al., 2010).

A maioria das proteínas de origem animal não contém constituintes que interfiram na absorção de zinco (NRC, 2006). Em produtos que contêm fontes alimentares de origem animal e vegetal, pode ser esperada uma absorção de 20 % a 30 % do zinco, enquanto para dietas baseadas em cereais e legumes com alto teor de fitato, essa absorção reduz para 10 % a 15 % (GIBNEY et al., 2002).

O processo de extrusão pode inibir a degradação do ácido fítico dietético no intestino, comparado aos outros métodos de cozimento, resultando em uma menor absorção de zinco em rações extrusadas (NRC, 2006).

Deficiência e excesso de zinco

A deficiência de zinco está associada com o retardo do crescimento em animais jovens, alterações na pelagem e problemas de pele (CASE et al., 2011; GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012). Outros sinais clínicos incluem anorexia, atrofia testicular, dificuldade de reprodução e disfunção no sistema imune (CASE et al., 2011).

2.7 Doença hepática associada ao acúmulo de cobre

O fígado desempenha um importante papel na manutenção da hemostasia (PRINS et al., 2010). Desse modo, as doenças inflamatórias crônicas que afetam cães e comprometem as funções relacionadas com o fígado são consideradas entre as mais difíceis de serem tratadas na prática clínica (BRUNETTO et al., 2007). Também, é um órgão importante na regulação das concentrações corporais de cobre, sendo que 80% do cobre absorvido da dieta é excretado pela bile (SILVA, 2005). Assim, o acúmulo de cobre no fígado pode ocorrer por um defeito primário no metabolismo do elemento (MANDIGERS et al., 2007) ou secundário, devido à diminuição da excreção do cobre biliar associado a doenças colestáticas (MERRILL, 2012). Para evitar acúmulo, recomenda-se que os níveis de cobre na dieta devam ser mantidos entre 5 mg/kg a 10 mg/kg (GUERRA, 2008).

O acúmulo de cobre ocorre nos lisossomos hepáticos dos cães até esgotar sua capacidade de armazenamento (GUERRA, 2008). A partir disso, causa lesões progressivas nas organelas dos hepatócitos, resultando em hepatite aguda, hepatite crônica e cirrose (HONECKMAN, 2003; POLDERVAART et al., 2009). Em estudos realizados por Bode et al. (2008) com cães acometidos pela hepatite, demonstraram elevadas concentrações de cobre hepático na ordem de 1000 - 2000 mg/kg, comparadas com os valores normais < 200 - 500 mg/kg de peso seco.

A doença hepática associada ao acúmulo de cobre é uma hepatite crônica que algumas raças caninas como Bedlington Terrier, Doberman e Labrador Retriever, entre outras, parecem apresentar uma predisposição genética para desenvolver (HONECKMAN, 2003; BODE et al., 2005; HOFFMANN et al., 2006; MANDIGERS et al., 2007; BODE et al., 2008). Hoffmann et al. (2006) verificaram em cães da raça Labrador Retriever, afetados pela toxicose de cobre, que a acumulação do elemento no fígado está sempre localizada na região centrolobular, podendo ser um indicativo de acumulação primária de cobre. Sluis et al. (2002) identificaram uma deleção do gene MURR1 em cães da raça Bedlington Terrier, que causa redução da excreção biliar de cobre devido ao sequestro de metalotioneína hepática pelo cobre nos lisossomos hepáticos, resultando na hepatite crônica (HONECKMAN, 2003; MERRILL, 2012).

Os sintomas da hepatite crônica são bastante variáveis, mas os sinais mais comuns são letargia, anorexia, vômitos, perda de apetite e diarreia (CASE et al., 2011). Conforme a evolução da doença, muitos cães podem desenvolver icterícia e ascite (CASE et al., 2011). Também em decorrência da doença hepática, pode ocorrer necrose dos túbulos renais, desenvolvendo poliúria e polidipsia (CASE et al., 2011). A doença pode progredir para convulsões, seguida de coma e morte (MANDIGERS, 2005; BODE et al., 2008). Os sinais clínicos da doença se manifestam em cães entre 4 a 8 anos de idade (CASE et al., 2011), acometendo geralmente as fêmeas (MANDIGERS, 2005), mas podem ocorrer em alguns casos antes do animal completar 1 ano ou em idade mais avançada, por volta dos 11 anos de idade (CASE et al., 2011).

A hepatite crônica em cães é uma doença altamente agressiva (MERRILL, 2012). Seu diagnóstico é histológico e caracteriza-se pela presença de fibrose, intensa inflamação (com predominância de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos), necrose e apoptose das células hepáticas (HOFFMANN et al., 2006; BODE et al., 2008; MERRILL, 2012), sendo as mitocôndrias hepáticas o principal alvo intracelular na intoxicação do cobre (HAND et al., 2010).

2.8 Influência de zinco na absorção de cobre e na prevenção de doença hepática

Para prevenir a evolução e o desenvolvimento da doença hepática associada ao acúmulo de cobre na população de risco, diversos estudos têm sido realizados com raças caninas Bedlington Terrier (SLUIS et al., 2002), Doberman (BODE et al., 2005, MANDIGERS et al., 2007) e Labrador Retriever (HOFFMANN et al., 2006; BODE et al., 2008), na tentativa de diminuir a absorção de cobre por esses cães, ora pela restrição de cobre na dieta, ora pelo aumento de zinco.

O zinco, como um cátion bivalente, interage com o cobre podendo se tornar mais biodisponível e, portanto, a absorção de cobre será parcialmente inibida (WAPNIR, 1998; MERRILL, 2012). Nesses casos, o zinco induz a produção de metalotioneína na mucosa intestinal, a qual liga o cobre às células epiteliais intestinais, impedindo o seu transporte na circulação (HONECKMAN, 2003; BRUNETTO et al., 2007; HOFFMANN et al., 2009).

A administração de zinco na dieta tem sido bastante utilizada para a toxicose do cobre em cães (HOFFMANN et al., 2009). De acordo com Honeckman (2003), a dose de zinco varia para cada sal empregado, ou seja, zinco encontra-se biodisponível como acetato de zinco (35 % de zinco elementar), sulfato de zinco (23 % de zinco elementar), metionina de zinco e gluconato de zinco (14,3 % de zinco elementar). Brewer et al. (1992) verificaram em cães das raças Bedlington Terriers e West Highland White Terriers que uma dose de 200 mg/dia de zinco elementar (acetato de zinco), duplicou a concentração plasmática de zinco e suprimiu a absorção do cobre. Após dois anos de tratamento, realizaram uma biópsia do fígado que revelou uma redução na concentração de cobre e na progressão da doença.

2.9 Bioacessibilidade de minerais pela simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*

Como visto anteriormente, os minerais cobre e zinco são essenciais no metabolismo do animal, por participarem de funções vitais no organismo. Dentre algumas funções, o cobre age na prevenção e tratamento da anemia, enquanto o zinco é o elemento traço mais abundante no corpo humano e componente de várias metaloenzimas envolvidas diretamente com a síntese de DNA (CASE et al., 2011; McDONALD et al., 2011). Além dessas funções, são bem conhecidas também as interações entre cobre e zinco no organismo (REYNOLD et al., 2008), bem como na doença hepática associada ao acúmulo de cobre em cães.

Na composição das rações, esses minerais estão presentes naturalmente nos ingredientes ou, então, devem ser adicionados na forma de sais purificados, como óxido de zinco, sulfato de zinco, sulfato de cobre, entre outros (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012). Desse modo, a disponibilidade dos minerais pode variar entre os sais, tornando um fator importante a ser considerado nas rações caninas (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012).

Durante o processo digestivo, somente uma fração dos nutrientes presentes em um alimento é liberada, constituindo assim a fração bioacessível, da qual apenas uma parte é efetivamente absorvida pelo organismo, sendo então chamada fração biodisponível (TOGNON, 2012). A bioacessibilidade pode ser quantificada através de testes *in vitro* que simulam as condições fisiológicas que ocorrem durante a digestão (TOGNON, 2012).

Segundo o NRC (2006), a biodisponibilidade é definida como a fração de qualquer nutriente ingerido que é absorvida, tornando-se disponível para o uso no metabolismo do animal. No entanto, ainda hoje não existe um consenso na definição precisa de biodisponibilidade de nutrientes (CHIOCCHETTI, 2013). De acordo com COZZOLINO (1997), os métodos utilizados para determinação da biodisponibilidade de nutrientes procuram quantificar a porcentagem do nutriente ingerido que tem potencial de suprir as demandas fisiológicas do organismo.

O conhecimento da bioacessibilidade ou da biodisponibilidade de minerais é de suma importância na nutrição, uma vez que estabelece as recomendações de ingestão destes elementos em função das necessidades (COZZOLINO, 1997). Sabe-se que o metabolismo pode variar conforme as condições gastrointestinais, os diferentes tipos de alimentos e os compostos neles presentes (KOPLÍK et al., 2004; REYNOLD et al., 2008, ROMARIS-HORTAS et al., 2011). Apenas a concentração total do nutriente no alimento não fornece informação suficiente sobre a sua fração biodisponível (COZZOLINO, 1997). Bontempo (2005) destaca a falta de conhecimento sobre a disponibilidade de nutrientes nas formulações de rações.

Existem várias metodologias validadas para a estimativa da disponibilidade de nutrientes, dentre elas estão estudos biológicos *in vivo*, diálises *in vitro*, modelos aritméticos e métodos *in vitro* utilizando linhagens celulares (CHIOCCHETTI, 2013). A diálise *in vitro* consiste na simulação da digestão gastrointestinal pela ação da pepsina seguida da pancreatina (HERVERA et al., 2009; DALLA DEA et al., 2010).

Especificamente com cães, alguns estudos *in vitro* vêm sendo feitos simulando a digestão gastrointestinal, tais como, bioacessibilidade de selênio em rações para animais de companhia (ZELSLT et al., 2013), avaliação da composição elementar de rações (KELLY et al., 2013), níveis de proteína digestível em rações extrusadas (HERVERA et al., 2009), níveis de energia digestível (HERVERA et al., 2007) e efeito da dieta na viscosidade intestinal (DIKEMAN et al., 2007). Os métodos *in vitro* são não-invasivos e, portanto, alternativas de pesquisa que excluem o uso de animais em experimentação, assunto que tem sido debatido cada vez mais de forma intensa (SMEETS-PEETERS, 1998; TRÉZ, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem de rações para cães

No mercado varejista de Piracicaba, São Paulo, foram adquiridas 95 amostras de rações do tipo seca (Tabela 3.1), abrangendo diferentes marcas comerciais (Figura 3.1) e diferentes granulometrias, destinadas a cães de pequeno, médio e grande porte. Segundo estudo de Carciofi et al. (2006), foram encontradas diferenças consideráveis na composição nutricional das rações classificadas como econômicas, *premium* e *super premium*. Por esse motivo, a amostragem compreendeu os três tipos de ração. Devido às variações nas exigências nutricionais de acordo com a idade dos cães (NRC, 2006), são esperadas diferenças significativas na composição de rações para filhotes e adultos. Assim, a amostragem também incluiu rações para as diferentes faixas etárias. Desse modo, a amostragem permitiu caracterizar de maneira ampla a composição das rações disponíveis no mercado e a variabilidade dessa composição. Não houve intenção de fazer uma avaliação representativa das rações disponíveis no mercado brasileiro, porque a obtenção de representatividade exigiria amostragem abrangente, inclusive incluindo diversas regiões geográficas.

Preferencialmente, foram adquiridas embalagens de 1 kg. Porém, as rações classificadas como econômicas estavam disponíveis apenas em embalagens de 15 kg. Nesses casos, as amostras foram misturadas manualmente, com a finalidade de homogeneização, e foi retirado 1 kg de cada amostra, sendo o restante doado a um abrigo de cães localizado na cidade de Piracicaba, São Paulo.

Tabela 3.1. Lista das rações adquiridas no mercado varejista de Piracicaba, São Paulo

(continua)

	Marca Comercial	Código Irradiação	Faixa Etária
1	Alpo	II01	Adulto
2	Beneful	IE13	Adulto
3	Big Boss	IA03	Adulto
4	Champ	IA04	Adulto
5	Club Performance	IE02	Adulto
6	Deli Dog	IA07	Adulto
7	Dog Chow +7 Anos	IA12	Adulto
8	Dog Chow - Cães de porte médio e grande	IG09	Adulto
9	Dog Chow - Raças Pequenas	IA09	Adulto
10	Dog Chow Raças Pequenas	IG08	Adulto
11	Dog Chow Light	La11	Adulto
12	Dog Chow +7 Anos	IG10	Adulto
13	Dog Excellence Super Premium	IA13	Adulto
14	Equilibrio Natural +7 Anos	II08	Adulto
15	Equilibrio Natural	IG04	Adulto
16	Equilibrio Natural - Raças Pequenas	IG03	Adulto
17	Equilibrio Natural - Sênior	IG05	Adulto
18	HILL'S - Raças Pequenas	IC03	Adulto
19	Nukys - Raças Pequenas	IC12	Adulto
20	Pedigree - Carne de Ovelha e Cereais	IG01	Adulto
21	Royal Canin Indoor	IG12	Adulto
22	Royal Canin Indoor - Sênior	IG13	Adulto
23	Dog Excellence - Raças Médias	IB01	Adulto
24	Dog Excellence - Light	IB03	Adulto
25	Dog Show	IB04	Adulto
26	Dunga	IB05	Adulto
27	Eukanuba - Raças Pequenas	IB06	Adulto
28	Faro Premium	IB08	Adulto
29	Faro Premium - Super Macio	IB09	Adulto
30	Fri-Dog Premium - Vegetariana	IB11	Adulto

Tabela 3.1. Lista das rações adquiridas no mercado varejista de Piracicaba, São Paulo

(continuação)

	Marca Comercial	Código Irradiação	Faixa Etária
31	Frolic - Raças Pequenas	IB12	Adulto
32	Golden	IE07	Adulto
33	Gran Plus	IB14	Adulto
34	Herói	IC02	Adulto
35	K&S	IE09	Adulto
36	Kanina	IC05	Adulto
37	Kazuu	IC06	Adulto
38	Lester	IC07	Adulto
39	Lider Chips	IC08	Adulto
40	Max	IE11	Adulto
41	Natural	IF05	Adulto
42	Natural - Sênior	IF06	Adulto
43	Naturalis	IC09	Adulto
44	Naturalis - Raças Pequenas	IC10	Adulto
45	Nero	IC11	Adulto
46	Pedigree - Raças Pequenas	ID05	Adulto
47	Pedigree - Raças Pequenas	IF11	Adulto
48	Pedigree - Carne e Marroubone	II06	Adulto
49	Pedigree - Carne e Vegetais	IF13	Adulto
50	Equilibrio Natural - Raças Pequenas	IC14	Adulto
51	Pedigree Expert - Raças Pequenas	ID03	Adulto
52	Premiatta - Raças Pequenas	ID07	Adulto
53	Premier	ID09	Adulto
54	Pro Plan	IF08	Adulto
55	Pro Plan - Sênior	IF09	Adulto
56	Royal Canin - Dental Small	ID11	Adulto
57	Royal Canin - Digestive Low Fat	ID12	Adulto
58	Royal Canin - Hypoallergenic	ID13	Adulto
59	Royal Canin - Intestinal	ID14	Adulto
60	Royal Canin - Renal	IE01	Adulto

Tabela 3.1. Lista das rações adquiridas no mercado varejista de Piracicaba, São Paulo

(continuação)

	Marca Comercial	Código Irradiação	Faixa Etária
61	Sabor E Vida	IE04	Adulto
62	Total Equilíbrio	IF02	Adulto
63	Total Equilíbrio - Sênior	IF03	Adulto
64	Alpo	II02	Filhote
65	Beneful	IE12	Filhote
66	Champ	IA05	Filhote
67	Club Performance	IE03	Filhote
68	Croc Baby	IA06	Filhote
69	Deli Dog	IA08	Filhote
70	Dog Chow - Papita	IG06	Filhote
71	Dog Chow	IG07	Filhote
72	Dog Chow - Raças Pequenas	La10	Filhote
73	Dog Excellence - Raças Pequenas	IB02	Filhote
74	Dog Excellence - Super Premium	IA14	Filhote
75	Equilíbrio Natural	IG02	Filhote
76	Equilíbrio Natural	II03	Filhote
77	Eukanuba - Raças Pequenas	IB07	Filhote
78	Faro Premium - Super Macio	IB10	Filhote
79	Frolic	IB13	Filhote
80	Golden	IE06	Filhote
81	Gran Plus	IC01	Filhote
82	HILL'S - Raças Pequenas	IC04	Filhote
83	K&S	IE08	Filhote
84	Max	IE10	Filhote
85	Natural	IF04	Filhote
86	Nukys	IC13	Filhote
87	Pedigree	II05	Filhote
88	Pedigree	ID06	Filhote
89	Pedigree Expert - Raças Pequenas	ID04	Filhote
90	Premiatta	ID08	Filhote

Tabela 3.1. Lista das rações adquiridas no mercado varejista de Piracicaba, São Paulo

(conclusão)

	Marca Comercial	Código Irradiação	Faixa Etária
91	Premier	ID10	Filhote
92	Pro Plan	IF07	Filhote
93	Royal Canin Indoor	IG11	Filhote
94	Special Dog Vegetais	IE05	Filhote
95	Total Equilíbrio	IF01	Filhote

3.2 Preparo das amostras

O preparo de amostras é também uma etapa importante dentro do processo analítico, pois qualquer problema de contaminação, alteração da composição, degradação ou decomposição/dissolução do material influenciará o resultado final (KRUG, 2008; CECCHI, 2013). Por isso, desde 1997, o Laboratório de Radioisótopos (CENA/USP) segue os requisitos da norma ISO/IEC 17025, com procedimentos documentados e registros de atividades, garantindo rastreabilidade do processo analítico em todas as suas etapas.

Após registro das amostras no laboratório, 350 g de cada material tiveram o tamanho de partículas reduzido (< 0,5 mm) em moinho de facas Retsch Grindomix GM 200. Foi utilizada faca de titânio e recipiente de polietileno para evitar contaminação com elementos químicos de interesse analítico, tais como Cr, Fe e Sb, presentes no aço inoxidável.

Para adequada preservação, as amostras moídas foram acondicionadas em frascos de polietileno de alta densidade organizados em caixas plásticas cobertas por sílica, sendo armazenadas em temperatura aproximada de 20 °C. Nesse ponto, as amostras estavam prontas para dar continuidade às diversas análises.



Figura 3.1 - Marcas comerciais de ração para cães, disponíveis no mercado local da cidade de Piracicaba - SP, amostradas para análise

3.3 Determinação de elementos químicos nas rações

Fundamentos

A análise por ativação neutrônica (NAA), reconhecida pelo CCQM (Comitê Consultivo para Quantidade de Matéria, Metrologia em Química e Biologia) por suas características de método primário de medição (BODE et al., 2009; GREENBERG et al., 2011), foi escolhida para avaliação da composição química das rações para cães

por sua sensibilidade na detecção e determinação simultânea de um grande número de elementos químicos. A NAA consiste no bombardeamento da amostra com nêutrons para a produção de radionuclídeos artificiais a partir dos elementos químicos presentes no material, sendo que a medição da atividade induzida, normalmente por espectrometria de raios gama, permite a determinação dos elementos químicos que geraram os radionuclídeos (ALFASSI, 1994; EHMANN; VANCE, 1991). Neste trabalho, foi utilizada a análise por ativação neutrônica instrumental (INAA), modalidade que não envolve tratamento químico das amostras.

Preparo das amostras para irradiação

Porções analíticas de 350 mg das amostras previamente moídas foram envasadas diretamente em cápsulas de polietileno de alta densidade e de elevada pureza, fabricadas pela Posthumus Products, Beverwijk, Holanda, especialmente para irradiação com nêutrons. Foram utilizadas cápsulas do tipo W, com 12 mm de altura (Figura 3.2). No total, treze lotes analíticos foram compostos, identificados como OZ, PA, RT, RU, RV e RW para INAA medindo radionuclídeos de meias-vidas longas (com mais de 12 horas) e IA, IB, IC, ID, IE, IF e IG para INAA medindo radionuclídeos de meias-vidas curtas.

Para o controle da qualidade do procedimento analítico, foram incluídos pelo menos dois materiais de referência certificados em cada lote de amostras, dentre os seguintes materiais: IAEA V-10 *Hay Powder*, produzido pela International Atomic Energy Agency (IAEA), Áustria; INCT MPH-2 *Mixed Polish Herbs* e INCT OBTL-5 *Oriental Basma Tobacco Leaves*, produzidos pelo Institute of Nuclear Chemistry and Technology (INCT), Polônia; e SRM 1577c *Bovine Liver*, produzido pelo National Institute of Standards and Technology (NIST), Estados Unidos. Esses materiais de referência foram selecionados com base na composição da matriz e nos elementos certificados, garantindo assim a avaliação da qualidade da determinação do maior número possível de elementos químicos de interesse.



Figura 3.2. Cápsulas de polietileno (tipo W) com 12 mm de altura, especialmente fabricadas para irradiação com nêutrons, utilizadas para acondicionamento das porções analíticas

Em cada lote de irradiação, cápsulas vazias (branco analítico) também foram irradiadas conjuntamente às amostras, de modo a detectar elementos químicos interferentes presentes na sua composição. Elementos químicos como Br, Cr, Na e Zn são encontrados nas cápsulas (FRANÇA, 2006), sendo necessária a correção dos seus valores nas amostras.

Para reportar os resultados em massa seca, a umidade de cada amostra de ração foi medida em porções de 1 g em estufa com circulação forçada à 105°C, por um período aproximado de 12 h. As porções das amostras foram retiradas concomitantemente ao encapsulamento. Já os materiais de referência requerem temperaturas e tempos diferenciados para a medição de umidade, conforme os respectivos certificados:

- ☒ IAEA V-10 *Hay Powder*: secagem em estufa a 85°C até peso constante;
- ☒ INCT MPH-2 *Mixed Polish Herbs*: secagem em estufa a 70 °C por 30 h;
- ☒ INCT OBTL-5 *Oriental Basma Tobacco Leaves*: secagem em estufa a 75°C por 30 h;
- ☒ SRM 1577c *Bovine Liver*: secagem em dessecador usando sulfato de cálcio por um tempo aproximado de 10 dias.

A cooperação científica entre o Laboratório de Radioisótopos do CENA/USP e a Reactor Institute Delft, da Delft University of Technology (TUDelft), Delft, Holanda,

permitiu que parte das análises relativas às determinações multielementares por INAA fossem desenvolvidas no instituto holandês. Dessa forma, as amostras preparadas e acondicionadas no Brasil, além de serem analisadas no CENA/USP, também foram levadas à Holanda para outras análises complementares.

3.4 INAA - Radionuclídeos de meias-vidas longas

Para a determinação de elementos que geram radionuclídeos de meias-vidas longas (aqui consideradas maiores que 12 h), as 95 amostras e materiais de referência foram irradiados com fluxo de nêutrons térmicos da ordem de $10^{13} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por período de 4 h no reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, da Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN/CNEN), São Paulo, SP. Como monitores de fluxo de nêutrons térmicos, foram empregados fios de uma liga de Ni-Cr com composição conhecida (FRANÇA et al., 2003) e massa aproximada de 10 mg (Figura 3.2), intercalados entre as cápsulas de polietileno.

A medição da atividade induzida por espectrometria gama de alta resolução foi realizada no Laboratório de Radioisótopos (LRi/CENA/USP) por meio de detectores de germânio hiperpuro do tipo coaxial com 45% e 50% de eficiência relativa (1332 keV, ^{60}Co), que podem ser observados nas Figura 3.4. A detecção da radioatividade das amostras e materiais de referência ocorreu em quatro momentos distintos: aproximadamente 4, 7, 15 e 30 dias de decaimento, com tempos de contagem de 15 min, 30 min, 1 h e 2 h, respectivamente. As amostras foram posicionadas a 20, 7, 3 e 0,5 cm de distância do detector para cada contagem. Para os monitores de fluxo, as medições ocorreram em duas ocasiões, ou seja, aproximadamente 30 e 45 dias após a irradiação.

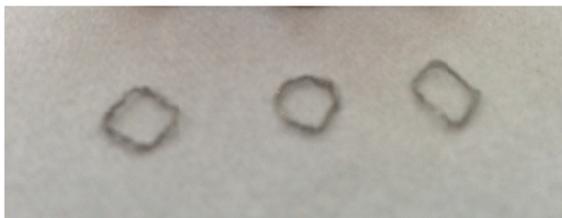


Figura 3.3. Monitores de fluxo de nêutrons, com diâmetro aproximado de 8 mm, gerados a partir de fios de NiCr com composição conhecida (FRANÇA et al., 2003)



Figura 3.4 - Espectrômetros de radiação gama utilizados para detecção da atividade induzida, A. Detector modelo GEM45190, Ortec; B. Detector modelo GMX50220, Ortec

Em seguida à análise dos espectros de radiação gama, foram calculadas as concentrações dos elementos químicos nas amostras e nos materiais de referência certificados por método de padronização k_0 (BACCHI et al., 2000), a partir do pacote computacional Quantu (BACCHI; FERNANDES, 2003), ilustrado na Figura 3.5. O método k_0 utiliza apenas um elemento químico como comparador, eliminando o trabalho e os problemas envolvidos na preparação de padrões para os diversos elementos de interesse (DE CORTE, 2001). Os resultados foram corrigidos para

emissão de relatório em massa seca. Com esse procedimento foram determinados os elementos As, Br, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, K, La, Na, P, Rb, Sb, Sc, Se, U e Zn.

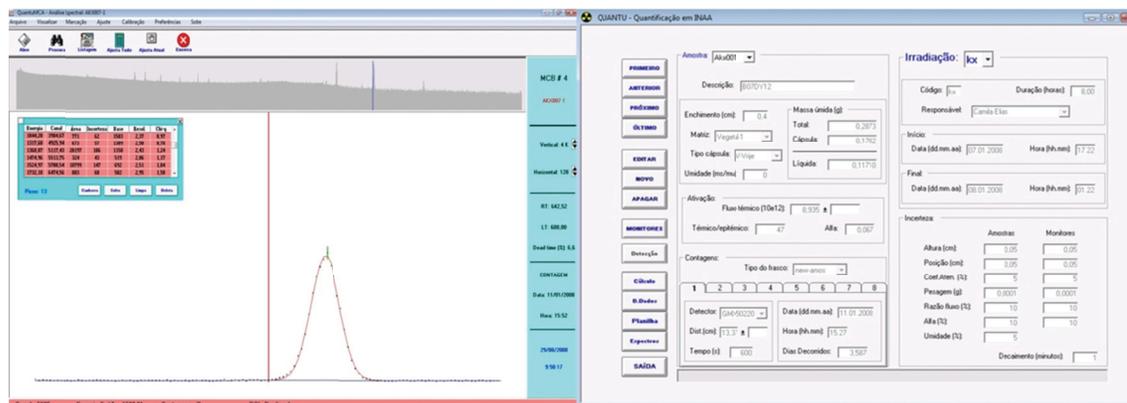


Figura 3.5 - Pacote computacional Quantu (BACCHI; FERNANDES, 2003) desenvolvido para INAA pelo método k_0 . À esquerda, tela do programa Quantu-MCA, destinado à avaliação dos espectros de radiação gama. À direita, tela do programa Quantu-INAA, destinado aos cálculos para obtenção de resultados dos elementos químicos

3.5 INAA – Radionuclídeos de meias-vidas curtas

A INAA utilizando radionuclídeos de meias-vidas curtas (aqui consideradas menores que 12 h) foi realizada na TUDelft, Holanda, durante o doutorado-sanduíche de outubro de 2011 a abril de 2012. Após treinamento nas áreas de segurança e proteção radiológica, envolvendo conceitos gerais sobre radiações ionizantes, monitoração pessoal e de área, normas de segurança, equipamentos de proteção individual e prevenção de acidentes de trabalho, foi concedida autorização para trabalhar nas dependências do reator nuclear de pesquisa Hoger Onderwijs do RID (Reactor Institute Delft), que opera a uma potência de 2 MW ao ritmo de 100 h contínuas por semana. O laboratório de INAA desse instituto segue um sistema da qualidade, acreditado pelo *Raad voor Accreditatie* (RvA), com número L049, por trabalhar de acordo com a norma ISO/IEC 17025.

Em todas as 95 amostras preparadas no Brasil, foram determinados os elementos químicos que geram radionuclídeos de meias-vidas curtas (consideradas menores que 12 h). As amostras foram irradiadas individualmente durante 30 s sob um fluxo de nêutrons térmicos da ordem de $10^{13} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Com cada amostra foi incluído um monitor de fluxo de nêutrons, constituído por solução padrão de zinco pipetada em filtro colocado dentro de uma cápsula. Foi utilizado o sistema pneumático conhecido por *Fast Rabbit System* (Figura 3.6), que emprega gás nitrogênio de alta pureza (3 bar) e permite enviar uma amostra até às proximidades do núcleo do reator e trazê-la de volta para detecção da atividade induzida em 3 s após o final da irradiação.



Figura 3.6. Reator nuclear de pesquisa Hoger Onderwijs do RID/TU Delft, Holanda

A atividade das amostras e materiais de referência foi medida em detector semiconductor de germânio hiperpuro do tipo coaxial (12% de eficiência relativa no fotopico 1332 keV do ^{60}Co) durante 3 min, a uma distância de 5 cm entre a amostra e o topo do detector. A atividade de $^{69\text{m}}\text{Zn}$ dos monitores de fluxo foi medida por 1 min intercaladamente à medição da atividade das amostras correspondentes. O protocolo de irradiação foi otimizado em função do ^{66}Cu , radionuclídeo de grande importância nesse estudo, cuja meia-vida é de 5,1 min (BLAAUW, 1996). O tempo de decaimento inicialmente planejado era de 1 min, porém, devido à elevada atividade de ^{28}Al , a maioria das amostras foi medida 5 min após o término da irradiação, permitindo diminuição da atividade desse radionuclídeo.

A quantificação dos elementos químicos presentes nas amostras e nos materiais de referência certificados foi feita por método paramétrico k_{zn} a partir do software Apollo, usando avaliação holística dos espectros gama (BLAAUW, 1994). O método k_{zn} , desenvolvido na TUDelft, é muito semelhante ao método k_0 , compartilhando a principal vantagem de não depender da análise de padrões para todos os elementos de interesse. Os resultados foram corrigidos para emissão de relatório em massa seca. Com esse procedimento foi possível determinar os elementos Al, Cl, Cu, I, Mg, Mn e Ti.

3.6 LS-NAA

Fundamentos

A análise por ativação neutrônica de grandes amostras (LS-NAA) é um método multielementar, com capacidade não destrutiva, e que permite a análise de um grande volume de amostra (BODE; OVERWATER, 1993; VASILOPOULOU et al., 2011). Assim como a NAA convencional (pequenas amostras), a LS-NAA é basicamente dividida em irradiação com nêutrons das amostras e subsequente medição da atividade induzida por espectrometria de raios-gama (BODE; OVERWATER, 1993; ACHARYA et al., 2010). Apesar do alto poder penetrante dos nêutrons e dos raios-gama, tornam-se necessárias correções do efeito de auto blindagem dos nêutrons e da auto atenuação de raios-gama nas amostras (OVERWATER et al., 1993; OVERWATER; HOOGENBOOM, 1994) sendo estas as principais diferenças entre a LS-NAA e NAA convencional (BODE; OVERWATER, 1993; GWOZDZ; GRASS, 2006). Contudo, a análise de grandes amostras pode ser especialmente vantajosa quando homogeneização é complicada ou quando grandes objetos não podem ser danificados para fins de amostragem (VASILOPOULOU et al., 2011). Além disso, LS-NAA pode proporcionar uma melhor representatividade analítica, pois uma grande quantidade de amostra é analisada ao invés de usar porções muitas vezes menores que 500 mg (SWAIN et al., 2012).

Ração para cães é uma combinação de vários ingredientes, provenientes de fontes orgânicas e inorgânicas, de modo a fornecer todos os nutrientes necessários. Nesse caso, a homogeneidade da composição da ração é importante, uma vez que cada porção oferecida ao animal deverá conter as mesmas quantidades dos

nutrientes para atender as necessidades alimentares diárias (TEIXEIRA et al., 2012). No entanto, para análise química de alimentos, geralmente são tomadas pequenas porções para representar um lote inteiro de produção, e considerando a ração uma matriz bem complexa, que requer uma mistura completa do material, a amostragem poderá ser uma fonte de erro que comprometerá a confiabilidade dos resultados finais.

Preparo das amostras para irradiação

Sendo assim, para avaliar a homogeneidade da distribuição dos elementos químicos nas rações para cães, 24 sacos de 1 kg da marca comercial Eukanuba – adultos raças pequenas foram adquiridos em um pet-shop em Delft, Holanda, com o devido cuidado de escolher todos de um mesmo lote de fabricação (Figura 3.7). O conteúdo de cada saco de ração foi transferido integralmente para garrafa de polietileno com capacidade de 1 L (Figura 3.8). Para irradiação com nêutrons, as amostras foram divididas em cinco séries (IK, IL, IM, IN e IO), com cinco amostras cada uma.



Figura 3.7 - Ração Eukanuba de um mesmo lote de fabricação utilizadas para a avaliação de homogeneidade por LS-NAA

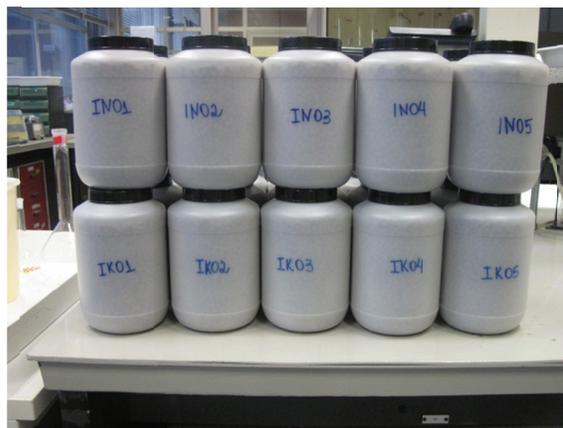


Figura 3.8 - Garrafas de polietileno, com capacidade de 1 L, utilizadas no acondicionamento de ração para LS-NAA

Primeiramente, foi necessário medir a radioatividade natural das amostras durante 1 h em detector de germânio hiperpuro (Figura 3.9) com 97% de eficiência relativa no fotopico 1332 keV do ^{60}Co , para a correção do *background*. Em seguida,

uma fonte radioativa colimada de ^{152}Eu e ^{154}Eu foi colocada atrás da amostra para a medição da transmissão de raios gama, com a finalidade de determinar os coeficientes de auto atenuação de raios gama de diversas energias nas amostras (OVERWATER, 1994a). A distância entre o detector e a amostra foi de 20 cm.

Irradiação

Finalizada a etapa de medição de *background* e de transmissão de raios gama, as amostras foram colocadas, em séries de cinco, no dispositivo para irradiação (Figura 3.10), sendo cercadas por 80 monitores de fluxo com 99,99% de Zn (Figura 3.11), inseridos na estrutura de grafite do dispositivo, que tem 100 cm de altura e 13 cm de diâmetro (Figura 3.12). Os monitores permitem determinar o fluxo de nêutrons em várias posições, com base em uma geometria completamente conhecida (OVERWATER, 1994b), possibilitando a correção de auto absorção de nêutrons nas amostras. As amostras e monitores de fluxo foram irradiados por 24 h sob um fluxo de nêutrons térmicos de aproximadamente $5,0 \times 10^8 \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no Big Sample Neutron Irradiation System (BISNIS) do RID (Figura 3.13).



Figura 3.9 - Detector de germânio hiperpuro, posicionado horizontalmente, utilizado para LS-NAA



Figura 3.10 - Dispositivo para irradiação contendo cinco amostras de 1 kg cada

Medição da atividade induzida por espectrometria gama de alta resolução

Após 48 h de decaimento radioativo, as amostras foram retiradas do reator para a medição da atividade induzida. A medição de cada amostra foi realizada por 2 h, utilizando o detector de germânio hiperpuro com 97% de eficiência relativa, posicionado horizontalmente (Figura 3.8). Uma segunda contagem, também por 2 h, ocorreu 7 dias após a irradiação. As amostras foram rotacionadas durante a medição. A atividade induzida nos monitores de fluxo de nêutrons foi medida pela atividade do ^{69m}Zn (meia-vida de 14 h), utilizando um detector de germânio hiperpuro de tipo poço por 30 min (Figura 3.14).

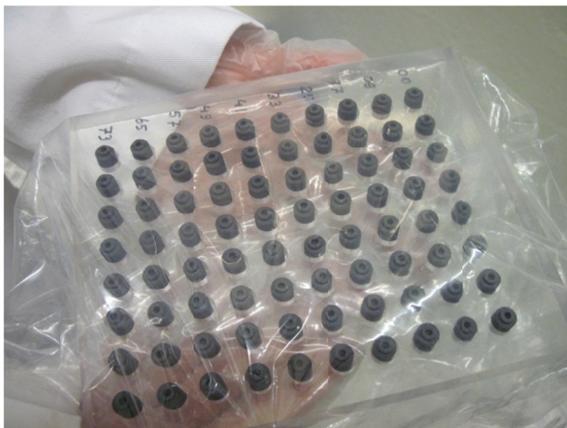


Figura 3.11 - Monitores de fluxo com 99,99% de Zn utilizados no procedimento de LS-NAA



Figura 3.12 - Monitores de fluxo sendo colocados na estrutura de grafite do dispositivo para irradiação



Figura 3.13 - Estrutura para irradiação do reator Hoger Onderwijs utilizada para LS-NAA, conhecida como BISNIS



Figura 3.14 - Detector de germânio hiperpuro de tipo poço, utilizado para medição da atividade dos monitores de fluxo

Os fatores de correção para os fluxos de nêutrons integrados e coeficientes de auto atenuação de raios gama foram calculados usando os algoritmos desenvolvidos por Overwater (1994b). A deconvolução dos espectros de radiação gama foi feita por método paramétrico k_{Zn} a partir do software Apollo, usando avaliação holística dos espectros gama (BLAAUW, 1994), resultando em concentrações dos elementos químicos e suas respectivas incertezas. O procedimento permitiu a determinação dos elementos Br, Ca, Co, Cr, Fe, K, Na, Sc e Zn.

3.6.1 Comparação LS-NAA e NAA convencional

Porções das 24 amostras analisadas por LS-NAA (Seção 3.6), da marca comercial Eukanuba – adultos raças pequenas, foram trazidas da Holanda para comparar os resultados obtidos na TUDelft com os resultados obtidos no CENA, utilizando NAA convencional, isto é, empregando porções analíticas pequenas (350 mg). O preparo das amostras para a irradiação seguiu os procedimentos descritos na Seção 3.2 e na Seção 3.3, enquanto a análise das rações foi realizada por INAA conforme a Seção 3.4.

3.7 Composição centesimal

A composição centesimal foi determinada de acordo com os métodos propostos pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2006), com exceção de fibra bruta. Os componentes avaliados foram os teores de umidade (método 934.01), proteína bruta (método 954.01), extrato etéreo (método 920.39), extrato etéreo com hidrólise ácida (método 954.02), e cinzas (método 942.02). A fibra bruta foi determinada seguindo o método da American Oil Chemists' Society (AOCS) Ba 6a-05, *Crude fibre analysis in feeds by filter bag technique* – ANKOM Technology.

Aleatoriamente foram escolhidas 49 amostras do total de 95 rações adquiridas, sendo 29 rações para cães adultos e 20 destinadas a cães filhotes. A composição centesimal de cada amostra foi determinada em triplicata. Para o controle da qualidade analítica, foi incluído um material de referência de soja (IAEA-361 *Soya Flour*) preparado no CENA/USP, em parceria com a Agência

Internacional de Energia Atômica (IAEA). Esse material foi recentemente revalidado (2010) quimicamente, por meio da participação de laboratórios integrantes do Centro Colaborador em Defesa Agropecuária: Produção de Materiais de Referência Certificados e Organização de Ensaio de Proficiência para Resíduos e Contaminantes Inorgânicos, da Rede MAPA/SDA, em várias rodadas de ensaios de proficiência.

3.7.1 Determinação de umidade

O método empregado para determinação de umidade baseia-se na perda de peso da amostra após a remoção da água por evaporação (GOMES; OLIVEIRA, 2013). O método por secagem em estufa é o mais utilizado para alimentos (CECCHI, 2013) e, devido à sua maior confiabilidade, ajuda na validação de outros procedimentos (PARK; ANTONIO, 2006).

Para obter-se a quantidade de água, foi pesado 1 g de amostra de ração e colocado em estufa com circulação forçada à 105°C, por um período aproximado de 12 h, até peso constante. Em seguida, as amostras foram colocadas em dessecador para resfriamento. Após 30 min, ocorreu novamente a pesagem das amostras. O teor de umidade foi obtido por diferença entre as massas medidas antes e depois da secagem, conforme a Equação 3.1:

$$Umidade(\%) = \left(1 - \frac{Ms}{Mu}\right) \times 100 \quad (3.1)$$

na qual,

Ms = massa seca

Mu = massa úmida

3.7.2 Determinação de proteína bruta (PB)

Para a determinação de proteína nas amostras de ração, foi empregado o método de Kjeldahl adaptado, caracterizado como micro-Kjeldahl, em função da quantidade de amostra que é empregada nas determinações (CHIOCCHETTI, 2013). O método foi proposto por Johan Kjeldahl em 1883 e ainda é muito usado por ser bastante confiável (PARK; ANTONIO, 2006). Atualmente é reconhecido como um método primário para medição de nitrogênio (GOMES; OLIVEIRA, 2013).

Baseia-se na medição do nitrogênio total, considerando que todo o nitrogênio presente provém de proteínas (GOMES; OLIVEIRA, 2013). A determinação de nitrogênio compreende três etapas, ou seja, digestão, destilação e titulação (PARK; ANTONIO, 2006). Consiste na decomposição da matéria orgânica através da digestão pelo ácido sulfúrico concentrado, em presença de catalisador, até que todo o carbono e hidrogênio sejam oxidados a CO_2 (CECCHI, 2013; GOMES; OLIVEIRA, 2013).

Após a digestão, é adicionado hidróxido de sódio e aquecido, ocorrendo a liberação da amônia, seguida de titulação com ácido diluído (MARTINS; REISSMANN, 2007; CECCHI, 2013).

As reações químicas envolvidas no processo estão descritas na Figura 3.15.

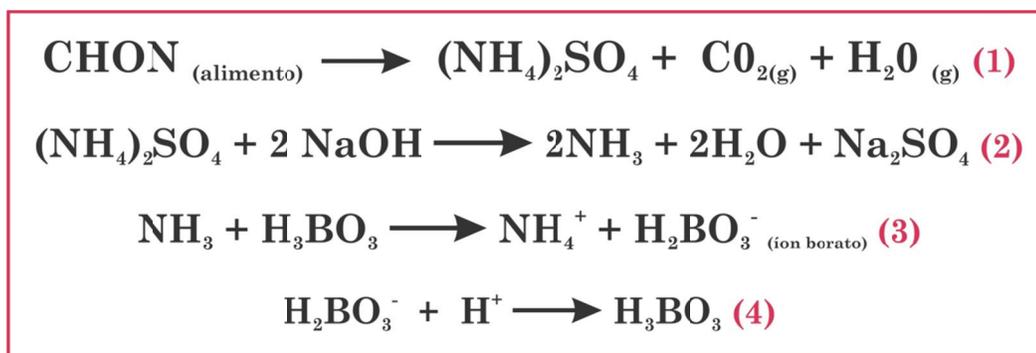


Figura 3.15 - Reações químicas envolvidas na determinação de proteínas pelo método de Kjeldahl. (1) Digestão, (2) Neutralização, (3) Destilação e (4) Titulação. Adaptado de Vieira (2010)

Digestão

Foi pesada uma porção de 0,1 g de amostra de ração em tubos de digestão e adicionados 5 mL de solução digestora. Incluiu-se um branco analítico em cada rodada de amostras. A solução digestora foi preparada previamente contendo ácido sulfúrico, mistura catalisadora composta por selenito de sódio e sulfato de cobre e sulfato de sódio, para aumentar o ponto de ebulição do ácido sulfúrico.

A digestão foi realizada em bloco digestor, dentro de capela, nas seguintes condições: 30 min à 100 °C, 30 min à 200 °C e 2 h à 350 °C. Durante a digestão, todo o carbono e hidrogênio contido na amostra foram oxidados a gás carbônico (CO₂) e água. O nitrogênio da proteína foi transformado em amônia (NH₃), a qual, na presença do H₂SO₄, converteu-se em bissulfato de amônio (CECCHI, 2013).

Destilação

Após resfriamento dos tubos com o material digerido, adicionaram-se 10 mL de água destilada, agitando-se até dissolver o resíduo. Em um erlenmeyer, adicionaram-se 5 mL de ácido bórico e indicador misto de vermelho de metila e verde de bromocresol, elevando-se a temperatura do destilador. Por fim, seguiu-se a etapa da destilação por arraste de vapor. O bissulfato de amônio (não-volátil) foi destilado na presença de NaOH 11 N, ocorrendo a liberação da amônia (NH₃). A amônia (volátil) foi recolhida em solução de ácido bórico (H₃BO₃) de volume conhecido, até que esse volume tenha dobrado. Inicialmente, a solução contendo ácido bórico e o indicador misto apresentava coloração rosa, e à medida que o borato de amônia vai se formando (NH₄H₂BO₃), adquire coloração azulada.

Titulação

Finalmente, o borato de amônia formado foi titulado com ácido sulfúrico 0,02 N, até a viragem do indicador. Utilizou-se do ácido sulfúrico para recolher a amônia liberada, pois há um menor risco de perdas da amônia quando comparado com o ácido bórico (GOMES; OLIVEIRA, 2013). Para obter o teor de proteína bruta, multiplicou-se o valor do nitrogênio total encontrado por um fator que converte o

nitrogênio em proteína (CECCHI, 2013). Esse fator é específico e depende da porcentagem de nitrogênio encontrada na composição de cada proteína (SANCHES, 2010). Em amostras de alimentos para animais, o fator de transformação de nitrogênio para proteína é 6,25, considerando que a maioria das proteínas contém nas suas moléculas aproximadamente 16% de nitrogênio (GALVANI; GAERTNER, 2006). O teor de proteína foi obtido, conforme a Equação 3.2:

$$PB(\%) = \text{titulação}(mL) \times 0,02 \times 14 \times 6,25 \quad (3.2)$$

3.7.3 Determinação de extrato etéreo com hidrólise ácida (EEHA)

O método de extrato etéreo determina o total de substâncias solúveis em solventes orgânicos (geralmente éter etílico, éter de petróleo e suas combinações), compreendendo os acilgliceróis, os ácidos graxos livres, o colesterol, a lecitina, a clorofila, os álcoois voláteis, os óleos e as resinas (BRASIL, 2009).

Na avaliação do teor de extrato etéreo de um alimento extrusado, como a ração, deve-se realizar a hidrólise ácida previamente à extração com éter, caso contrário, resultará em subestimação no teor de extrato etéreo obtido (NRC, 2006). Isso ocorre pois a hidrólise ácida rompe as ligações entre lipídeos e carboidratos formadas durante o tratamento térmico (CARCIOFI, 2013), e os lipídeos ficam livres para a extração com solvente (GOMES; OLIVEIRA, 2013).

Para a hidrólise ácida, balões de fundo chato foram secos em estufa à 105 °C por 12 h, resfriados em dessecador e tarados. Foram pesados 2 g de amostra em tubo Falcon, adicionando-se 2 mL de álcool etílico. Em seguida, foram colocados 10 mL de solução de ácido clorídrico 70%, deixando-se em banho-maria à 80 °C por 40 min e agitando a cada 10 min. Após resfriamento, foram adicionados 10 mL de álcool etílico, e misturou-se vigorosamente.

A extração foi realizada acrescentando-se 25 mL de mistura de éter (éter etílico e éter de petróleo) e colocando-se na centrífuga por 8 min à 800 rpm. O sobrenadante foi filtrado sobre os balões e levado para estufa à 60 °C por 12 h. Após resfriamento em dessecador, pesaram-se os balões com o extrato etéreo. A

quantidade de lipídeos foi obtida pela diferença do peso do balão tarado previamente e após a extração. O cálculo é demonstrado pela Equação 3.3:

$$EEHA(\%) = \frac{(P_1 - P_2)}{P_0} \times 100 \quad (3.3)$$

onde,

P_0 = peso da amostra

P_1 = peso do balão com a gordura

P_2 = tara do balão

3.7.4 Determinação de extrato etéreo (EE)

A extração de lipídeos sem hidrólise ácida também foi realizada, a fim de comparar os resultados com a determinação de extrato etéreo com hidrólise ácida. O método escolhido foi a extração com solvente a quente, dividido basicamente em três etapas, ou seja, extração da gordura da amostra com solvente, eliminação do solvente por evaporação e quantificação da gordura por pesagem (PARK; ANTONIO, 2006; CECCHI, 2013). Baseia-se na extração da fração lipossolúvel por meio de um solvente orgânico, o éter etílico, entre outros (GOMES; OLIVEIRA, 2013). Deste modo, após extração da gordura e remoção do solvente, o teor de extrato etéreo é determinado pela diferença de massas.

Foi empregado o extrator tipo Soxhlet, que utiliza o refluxo de solvente em processo de extração intermitente (PARK; ANTONIO, 2006). Como solvente, utilizou-se do éter etílico, com o devido cuidado por se tratar de um produto altamente inflamável. O éter etílico é um solvente de ampla extração e pode extrair também vitaminas, esteroides, resinas e pigmentos, constituindo assim um erro no final na análise. Contudo, como esses compostos aparecem em pequenas quantidades, o erro gerado é aceitável (CECCHI, 2013).

Para a extração, pesou-se 1 g de amostra em papel filtro e inseriu no cartucho extrator. Em seguida, adicionou-se 50 mL de éter etílico em cada tubo, previamente seco em estufa à 105 °C e pesado, e conectou-se ao condensador. As amostras foram deixadas em refluxo contínuo por 4 h à temperatura de 45-50 °C, e por 30 min

à temperatura de 60 °C. Após recuperação do éter, os tubos foram retirados e colocados em estufa por 12 h à 105 °C, deixando-os resfriar em dessecador. Por último, pesaram-se os tubos com extrato etéreo. O teor de lipídeos foi obtido pela diferença do peso do tubo tarado previamente e após a extração, de acordo com o cálculo mostrado na Equação 3.4:

$$EE(\%) = [(tubo + gordura) - (tara)] \times 100 \quad (3.4)$$

3.7.5 Determinação de fibra bruta (FB)

Para obter o teor de fibra bruta, as amostras foram submetidas à digestão ácida, seguida de digestão básica e calcinação do resíduo em mufla. A percentagem de fibra foi, então, calculada pela diferença de pesagem antes e após o processo.

Pesou-se 1 g de cada amostra diretamente em saquinhos, específicos para análise de fibras, com porosidade de 25 µm (F57, ANKOM) e, em seguida, os saquinhos foram selados nos primeiros 4 mm, com o devido cuidado de não haver perda de material. Um branco analítico foi adicionado no processo em todas as rodadas.

Por ser um material rico em gordura, foi necessário o desengorduramento das amostras para evitar excesso de saponificação durante a digestão básica. Para isso, os saquinhos foram mergulhados em um béquer contendo éter de petróleo durante 30 min. Retirados do solvente, os saquinhos foram secos em temperatura ambiente.

Durante a digestão, todo o material indigerível é dispensado (EURACHEM, 2002). Dando início ao processo, os saquinhos foram acomodados em bandejas e inseridos no equipamento modelo SL-118 da SOLAB. Em seguida, adicionou-se solução de ácido sulfúrico a 1,25 % (na proporção de 100 mL por saquinho), onde permaneceram por 40 min à 100 °C, sob agitação constante. Após isso, os saquinhos foram lavados com água destilada, a uma temperatura entre 50 °C e 90 °C, durante 5 min, por duas vezes.

Finalizada a digestão ácida e a lavagem, adicionou-se solução de hidróxido de sódio a 1,25 % sobre os saquinhos, na mesma proporção de 100 mL por saquinho, onde permaneceram também por 40 min à 100 °C, sob agitação constante. Novamente, os saquinhos foram lavados com água destilada, a uma

temperatura entre 50 °C e 90 °C, durante 5 min por três vezes. Após a lavagem, o suporte com as bandejas foi retirado do equipamento e toda a água dos saquinhos foi removida. Posteriormente, os saquinhos foram mergulhados em acetona e transferidos para uma bandeja, até evaporar completamente. A seguir, os saquinhos foram inseridos em estufa à 105 °C por 4 h e colocados em dessecador até esfriar. Pesaram-se os saquinhos em seguida.

Finalmente, os saquinhos foram colocados em cadinhos de porcelana, previamente secos e tarados, e, então, calcinados em mufla por 2 h à 600 °C. O material orgânico é calcinado a cinzas, ficando um resíduo inorgânico (EURACHEM, 2002). Transferiram-se os cadinhos para um dessecador, até atingir a estabilidade, sendo novamente pesados. A diferença entre peso de resíduo orgânico/inorgânico após a secagem e o peso do resíduo calcinado a cinzas é o conteúdo de fibras (EURACHEM, 2002), podendo ser calculado, conforme a Equação 3.5:

$$FB(\%) = \frac{P_3 - (P_1 \times C)}{P_2} \times 100 \quad (3.5)$$

onde,

P_1 = tara do saquinho

P_2 = peso da amostra

P_3 = peso da matéria orgânica

C = correção para o teor de cinzas na amostra

3.7.6 Determinação de resíduo mineral (cinzas)

A quantificação das cinzas totais nas amostras de ração foi realizada pelo método gravimétrico, após calcinação do material em mufla. O método baseia-se na queima da fração orgânica com o oxigênio atmosférico, obtendo-se um resíduo inorgânico, na forma de cinza (KRUG, 2008). Para isso, pesou-se 1 g das amostras em cadinhos de porcelana, previamente secos e tarados, com o cuidado de distribuir uniformemente as amostras nos cadinhos.

Os cadinhos com amostras foram colocados em mufla e carbonizados à 200 °C por 30 min, aumentando gradativamente a temperatura a cada 30 min, até

que atingisse a temperatura de 600 °C, onde as amostras permaneceram por 2 h, queimando toda a matéria orgânica. A queima excessivamente rápida deve ser evitada, por haver perda de material por projeção ou ignição (JORHEM, 1995). Além disso, por se tratar de uma matriz rica em gordura, deve também ser aquecida inicialmente a temperaturas mais baixas para decompor a gordura, evitando assim que o material seja projetado para fora do cadinho (CECCHI, 2013; GOMES; OLIVEIRA, 2013).

Finalizada essa etapa, os cadinhos com as cinzas foram transferidos para dessecador até alcançarem o equilíbrio e, em seguida, foram pesados. O cálculo do percentual de cinzas foi feito pela Equação 7:

$$Cinzas (\%) = \frac{(CM - TC)}{P} \times 100 \quad (3.6)$$

onde,

CM = cadinho pós mufla

TC = tara cadinho

P = peso amostra

3.8 Bioacessibilidade de cobre nas rações

Esse método foi proposto por Hervera et al. (2007), porém algumas modificações foram necessárias para determinar o elemento nutricional de interesse, no caso Cu. A simulação da digestão do trato gastrointestinal foi realizada usando soluções de fluido gástrico e fluido intestinal.

Aleatoriamente, foram escolhidas 14 amostras de um total de 49 rações analisadas na composição centesimal, sendo 12 rações para cães adultos e 2 destinadas a cães filhotes. As amostras foram analisadas em triplicata.

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal do CENA/USP, sob a supervisão do Prof. Dr. Helder Louvandini, que gentilmente cedeu às dependências do laboratório e uso de equipamentos. O experimento foi conduzido em três etapas, descritas a seguir.

Simulação da digestão gástrica

Pesou-se 1 g de cada amostra em frascos de vidro de 100 mL (Figura 3.16). A seguir, adicionaram-se 25 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 6) e 10 mL de HCl 0.2 M. Depois, ajustou-se o pH até 2, adicionando soluções de HCl 1 M e NaOH 1 M (Figura 3.17). Para evitar o crescimento bacteriano durante a incubação, acrescentou-se 0,5 mL de solução de cloranfenicol Sigma - C0378 (0.5 g em 100 mL de etanol 96%) nas amostras. Em seguida, foi realizada a digestão com a adição de 1 mL de solução de pepsina fresca (10 mg de pepsina Sigma - P7012 dissolvida em 1 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 6). Os frascos foram tampados e colocados na incubadora à 39 °C por 2 h, sob agitação constante (Figura 3.18). Em cada série foi incluído um branco analítico.

Simulação digestão pós-gástrica

Após 2 h de incubação, os frascos foram resfriados em água fria para interromper a atividade enzimática. Em seguida, foram adicionados 10 mL de tampão fosfato (0,2 M, pH 6,8) e 5 mL de NaOH 0,6 M. Na sequência, o pH foi ajustado para 6,8, adicionando soluções de HCl 1 M e NaOH 1 M (Figura 3.17). Por último, pipetou-se 1 mL de solução de pancreatina (100 mg de pancreatina Sigma P-1750) suspensa em 1 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,8. Os frascos foram novamente tampados e levados para a incubadora à 39 °C por 4 h, sob agitação constante (Figura 3.18).

Filtração

Na última etapa, após 4 h da segunda incubação, os frascos foram retirados e resfriados. Todo o conteúdo do frasco foi filtrado em cadinhos filtrantes de vidro (3 cm de diâmetro, com placa porosa nº 2) e lavados com água destilada (Figura 3.19), com o devido cuidado de remover toda a fração digerida. Finalmente, o conteúdo foi transferido para balões volumétricos e o volume completado com água destilada até 100 mL.

A leitura das amostras digeridas foi realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) no Laboratório de Nutrição Animal, da Embrapa Agropecuária Sudeste, em São Carlos-SP, sob a supervisão da Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira.



Figura 3.16 - Amostras moídas e pesadas

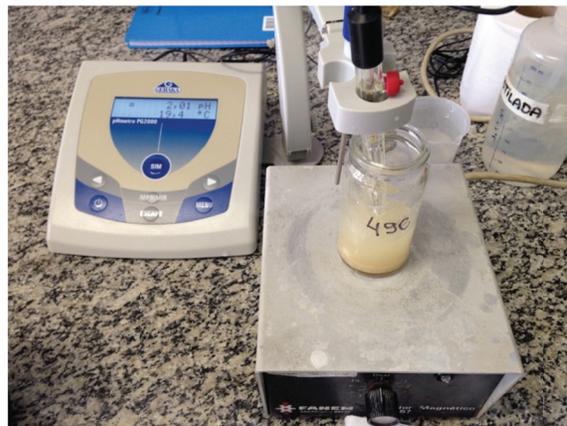


Figura 3.17 - Medição do pH das amostras

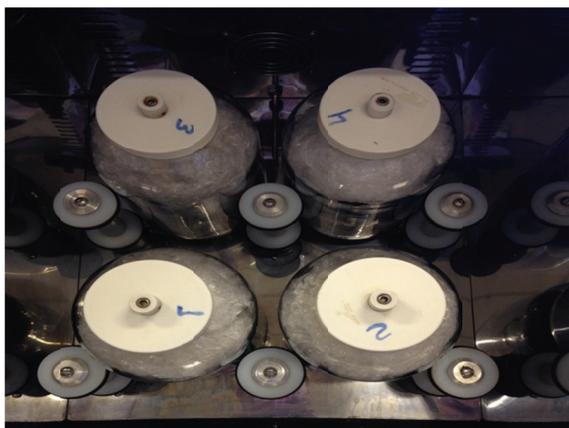


Figura 3.18 - Incubadora *in vitro*



Figura 3.19 - Filtragem dos cadinhos, adaptado ao kitassato

3.8.1 Determinação de cobre por ICP OES

Curva de calibração

Para a preparação da curva de calibração analítica, foi utilizada solução estoque de referência de Cu (I) 1000 mg/L (Fluka). Foram preparadas oito soluções padrões por diluições sucessivas das soluções estoques contendo 1000 mg/L e avolumados com solução tampão fosfato (0,2 M, pH= 6,8). Esta última foi preparada

da mesma maneira que foi utilizada para o experimento descrito na Seção 3.8. As soluções estoque preparadas, foram transferidas para tubos falcon devidamente identificados, para posterior análise por ICP OES. Os pontos de curva de calibração analítica estabelecidos foram:

- ✿ P1) 0 = branco
- ✿ P2) 0,1 = 50 μ L da solução estoque
- ✿ P3) 0,25 = 125 μ L da solução estoque
- ✿ P4) 0,5 = 250 μ L da solução estoque
- ✿ P5) 1,0 = 500 μ L da solução estoque
- ✿ P6) 2,5 = 1250 μ L da solução estoque
- ✿ P7) 5,0 = 2500 μ L da solução estoque
- ✿ P8) 10 = 5000 μ L da solução estoque

Instrumentação

O ICP OES é uma técnica multielementar, sensível e apresenta pouca interferência química devido às altas temperaturas alcançadas durante o processo para a determinação dos elementos químicos (SKOOG et al., 2007). Além disso, elementos em baixas concentrações e compostos refratários podem ser determinados, mesmo aqueles que são altamente resistentes à decomposição térmica (SKOOG et al., 2007).

Em ICP OES, a amostra é introduzida no equipamento geralmente em solução (ROBINSON et al., 2004). A amostra é transformada em aerossol no nebulizador e transportada para o plasma (HOU; JONES, 2000; ROBINSON et al., 2004). Ao atingir a tocha, em elevadas temperaturas, é rapidamente vaporizada e energizada, através de excitação colisional dos átomos da amostra (HOU; JONES, 2000). Após os processos de atomização, ionização e excitação, a radiação emitida pelos átomos e íons gerados no plasma é separada em comprimentos de onda específicos e utilizada para determinar a concentração dos elementos de interesse (MACAROVCHA, 2011; RAINONE, 2011).

Após a construção da curva analítica, o cobre foi determinado por ICP OES

(Varian, Vista RL, Mulgrave, Austrália) com configuração radial equipado com um sistema óptico do tipo Echelle e detectores CCD, como mostra a Figura 3.20. O gás de formação de plasma utilizado foi argônio 99,998 % v/v, responsável por gerar um plasma estável e quimicamente inerte (PETRY, 2005). Os parâmetros instrumentais aplicados são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Parâmetros instrumentais para a determinação de cobre em rações de cães por ICP OES (vista radial)

Potência de radio frequência	1000 (W)
Nebulizador	V-Groove
Fluxo de gás externo	15 L.min ⁻¹
Fluxo de gás intermediário	1,5 L.min ⁻¹
Fluxo de gás de nebulização	0,75 L.min ⁻¹
Comprimentos de onda (nm)	Cu (I) = 324,754



Figura 3.20 - ICP OES com vista radial (Varian, Vista RL, Mulgrave, Austrália) usado na determinação de cobre

3.9 Controle da qualidade do procedimento analítico

Exatidão dos resultados obtidos

A avaliação da exatidão alcançada nos resultados do procedimento analítico de rações para cães foi calculada a partir do índice En para os elementos químicos determinados nos materiais de referência analisados, conforme a equação abaixo:

$$En = \frac{(x - X)}{\sqrt{I_x^2 + I_X^2}} \quad (3.7)$$

onde,

x = valor obtido na amostra (mg/kg)

X = valor de referência extraído do certificado (mg/kg)

I_x = incerteza expandida do resultado obtido em nível de 95% de confiança

I_X = incerteza expandida do valor de referência em nível de 95% de confiança

O índice En permite comparar os resultados obtidos com os valores constantes nos certificados, considerando suas incertezas expandidas, o que favorece uma avaliação bastante realista da exatidão alcançada pelo método analítico. Os valores En considerados satisfatórios estão entre -1 e 1.

Reprodutibilidade no decorrer dos experimentos

A reprodutibilidade é a expressão da precisão, quando o método é realizado nas mesmas condições, mas em ocasiões diferentes (CECHI, 2013). No contexto da metrologia mundial, o Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia (ISO VIM) define o conceito reprodutibilidade como “o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando efetuadas sob condições variadas de medição” (INMETRO, 2007), sendo que as possíveis condições de reprodutibilidade incluem: diferentes localidades para a realização do ensaio, operadores variados e por diversas medições em um mesmo

objeto ou de matriz similar (BIPM, 2008). Desse modo, a reprodutibilidade foi avaliada quanto às condições analíticas (operador e equipamento) e de tempo (dados coletados em diferentes épocas), fornecendo uma estimativa da precisão dos resultados obtidos ao longo do estudo realizado, que compreendeu o período entre maio de 2011 e janeiro de 2013.

Repetições realizadas nos materiais de referência, em diversos lotes analíticos, tiveram seus valores individuais das concentrações dos elementos químicos comparados com os valores médios obtidos de todas as repetições, levando-se em consideração as respectivas incertezas expandidas. Resultados admissíveis são aqueles em que os desvios obtidos em relação ao valor médio sejam menores do que as respectivas incertezas expandidas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Controle da qualidade do procedimento analítico

Exatidão dos resultados obtidos

A Figura 4.1 mostra os valores En calculados a partir da média dos resultados de concentração dos elementos químicos para os três materiais de referência analisados nos diversos lotes de irradiação. O En permite comparar o valor obtido com o valor certificado, considerando as incertezas expandidas de ambos os valores. Assim, En entre -1 e 1 são considerados admissíveis.

Em cada lote foram utilizados, no mínimo, dois materiais de referência, ou seja, IAEA V-10 juntamente com INCT MPH-2 ou NIST SRM 1577c. O IAEA V-10 foi irradiado em todos os seis lotes, sendo dois em duplicata ($n = 8$), enquanto INCT MPH-2 e NIST SRM 1577c foram irradiados em quatro lotes ($n = 4$). Alguns elementos determinados estão apenas em um dos gráficos, pois os valores não estão disponíveis nos certificados dos materiais de referência.

Observando-se os três gráficos da Figura 4.1, percebe-se que os valores En estão dentro do limite admissível, entre -1 e 1, para a maioria dos elementos avaliados, demonstrando um bom nível de concordância entre os valores obtidos e os valores certificados. Entretanto, Cr no material IAEA V-10 ($En = 1,08$), Se no material NIST SRM 1577c ($En = 1,38$) e Br no material INCT MPH-2 ($En = 1,08$) apresentaram alguma deficiência na exatidão, pois os valores En estão ligeiramente acima do limite. Cabe ressaltar que esses valores foram calculados para a média de todas as repetições dos materiais de referência realizadas ao longo do trabalho. Considerando-se os resultados individuais para cada análise, Br e Se ficaram acima do limite apenas em uma das quatro repetições, enquanto Cr ficou acima do limite em três das oito repetições.

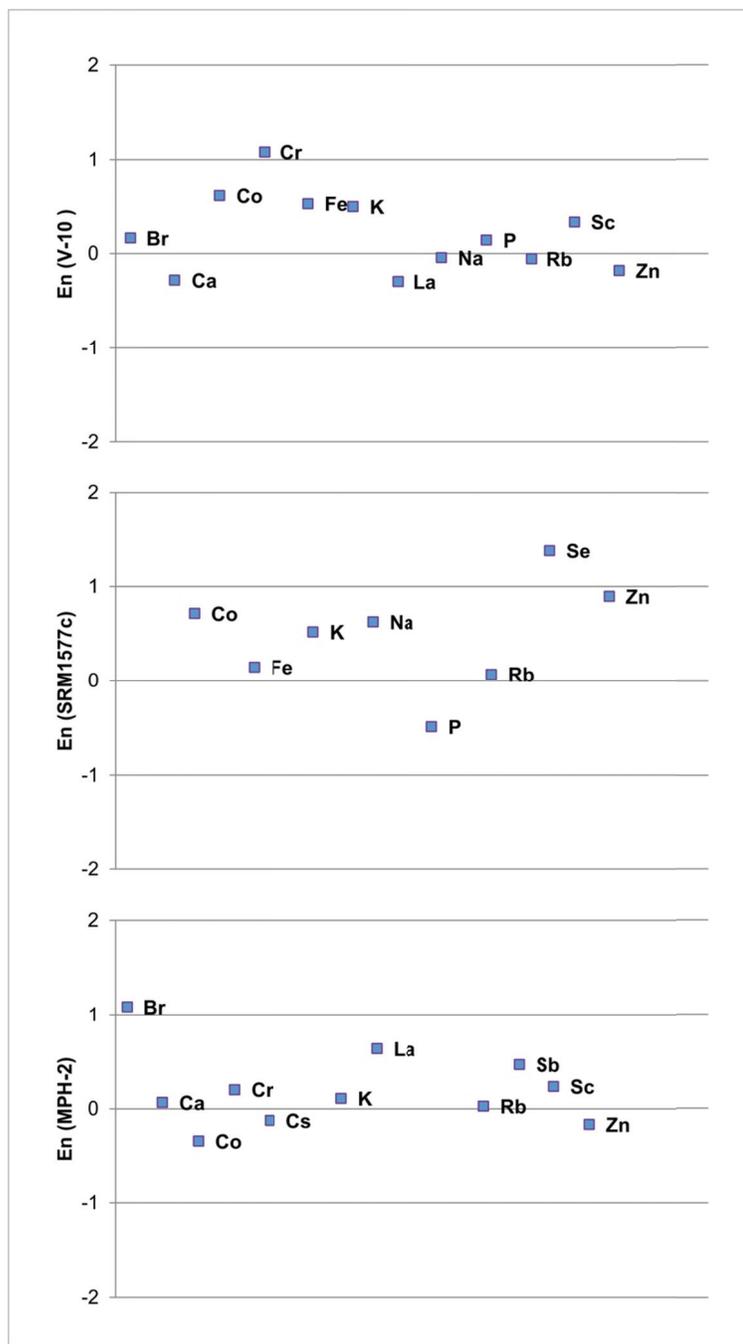


Figura 4.1 - Valores En obtidos a partir dos resultados médios de concentração dos elementos químicos para os materiais de referência IAEA V-10 ($n = 8$), INCT MPH-2 ($n = 4$) e NIST SRM 1577c ($n = 4$)

Reprodutibilidade no decorrer dos experimentos

O material de referência IAEA V-10, utilizado em todos os lotes analíticos, permitiu avaliar a reprodutibilidade dos resultados de concentração de doze elementos químicos ao longo do trabalho. A Figura 4.2 ilustra os dados obtidos, mostrando gráficos de controle dos valores individuais de quatro elementos químicos nas oito repetições realizadas.

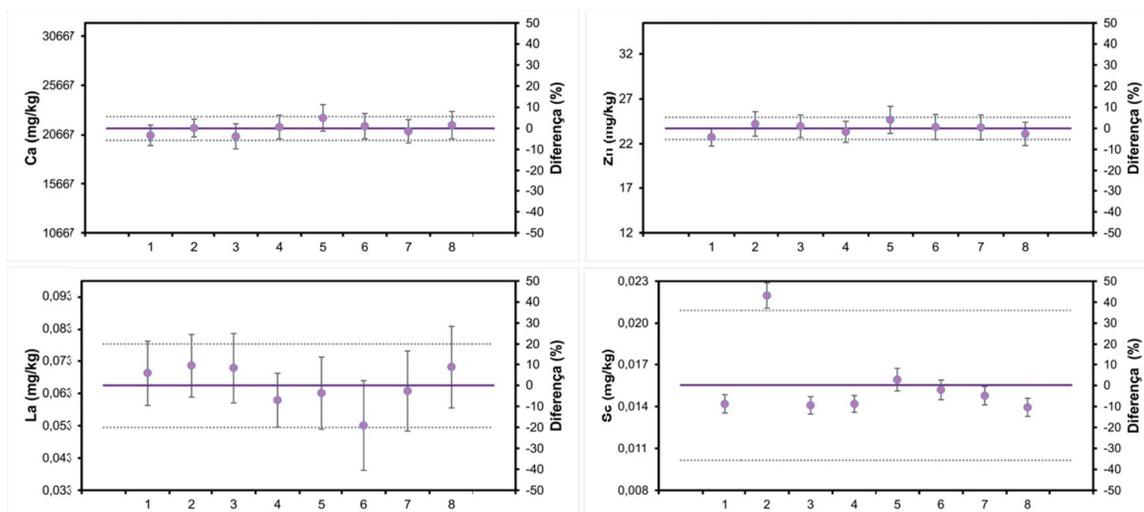


Figura 4.2 - Resultados de concentração de Ca, La, Sc e Zn no material de referência IAEA V-10 em oito repetições, respectivas incertezas expandidas ($k=2$), média e limites de mais ou menos dois desvios padrão ($n=8$). O eixo à direita mostra a diferença percentual dos valores individuais com relação à média

Para Ca e Zn, os desvios padrões relativos das oito repetições foram menores do que 5 %, demonstrando baixa dispersão dos resultados obtidos. Além disso, as diferenças entre os valores individuais e as médias foram cobertas pelas incertezas expandidas dos resultados. Outros oito elementos, ou seja, Br, Co, Cr, Fe, K, Na, P e Rb, apresentaram comportamento similar, demonstrando a reprodutibilidade dos resultados ao longo do trabalho.

Para La, observa-se que o desvio padrão das oito repetições foi da ordem de 10%, uma vez que o intervalo de dois desvios padrões na Figura 4.2 vai de -20% a 20%. Entretanto, esse desvio maior é completamente explicado pela incerteza de medição, uma vez que consideradas as incertezas expandidas nenhum dos

resultados difere da média. Assim, pode-se dizer que a reprodutibilidade dos resultados de La está dentro do esperado, não havendo qualquer evidência de problema analítico.

O gráfico de controle para Sc mostra uma grande dispersão dos resultados, com intervalo de dois desvios padrões variando entre -36% e 36%. Nesse caso, a elevada variação não é explicada pela incerteza de medição, observando-se, na Figura 4.2, que pelo menos cinco resultados diferem da média, considerando os intervalos das incertezas expandidas. Boa parte da variação pode ser atribuída ao resultado da amostra 2, porém, mesmo com sua exclusão, ainda resta um desvio padrão relativo da ordem de 5%, quando a expectativa projetada pelas incertezas de medição seria de desvio padrão relativo da ordem de 2,5%. Portanto, a avaliação aponta para um problema de reprodutibilidade na determinação de Sc ou, então, de homogeneidade do material de referência IAEA V-10 para esse elemento químico.

4.2 Determinação de elementos químicos nas rações

Os resultados apresentados a seguir referem-se às rações do tipo seca, escolhidas por serem as mais consumidas no mercado pet, considerando-se facilidade dos proprietários em alimentar seu animal, necessidades nutricionais e custo (CASE et al., 2011). Animais que consomem ração seca de boa qualidade tendem a levar uma vida mais saudável pelo atendimento mais completo das necessidades nutricionais (NRC, 2006). Por outro lado, na alimentação com ração úmida, há dificuldade de atender plenamente as necessidades nutricionais (CASE et al., 2011).

Aqui estão apresentados os resultados de concentração obtidos por INAA, medindo radionuclídeos de meias-vidas curtas, médias e longas, o que permitiu englobar os elementos Al, As, Br, Ca, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, I, K, La, Mg, Mn, Na, P, Rb, Sb, Sc, Se, Ti, U e Zn. Cabe destacar que foi possível com a INAA avaliar todos os nutrientes minerais com valores limites estabelecidos em rações para cães, tais como, os macrominerais Ca, P, K, Na, Cl e Mg e os microminerais Fe, Cu, Mn, Zn, I e Se (AAFCO, 2008), demonstrando que o método é adequado a essa finalidade.

Ainda mais, deve ser ressaltado que em INAA a amostra é analisada diretamente, sem necessidade de etapas de dissolução, que podem gerar dificuldades e desvios significativos nos resultados de concentração de alguns elementos, principalmente considerando uma matriz complexa, como é o caso das rações.

4.2.1 Elementos nutricionais para os cães

As Tabelas 4.1 e 4.2 mostram todos os nutrientes minerais com seus valores de referência estabelecidos pela Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 2008), que devem ser atendidos pelos fabricantes de rações. Também estão inseridos os valores máximo e mínimo obtidos para as 95 rações analisadas, sendo 63 amostras de rações para cães adultos e 32 amostras de rações destinadas a cães filhotes.

Tabela 4.1 - Nutrientes minerais (mg/kg) determinados nas rações para cães adultos (n=63) e valores de referência estabelecidos pela AAFCO (2008). Resultados expressos em matéria seca

Elemento	Valores obtidos		Valores de Referência	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Ca	4900	28600	6000	25000
P	3000	20300	5000	16000
Ca:P	0,7	2,8	1:1	2:1
K	3110	12290	6000	-
Na	2060	8360	600	-
Cl	3180	16500	900	-
Mg	300	4100	400	3000
Fe	177	862	80	3000
Cu	9,0	60	7,3	250
Mn	6,0	111	5,0	-
Zn	44	554	120	1000
I	0,9	14	1,5	50
Se	0,24	1,94	0,11	2,0

Tabela 4.2 - Nutrientes minerais (mg/kg) determinados nas rações para cães filhotes (n=32) e valores de referência estabelecidos pela AAFCO (2008). Resultados expressos em matéria seca

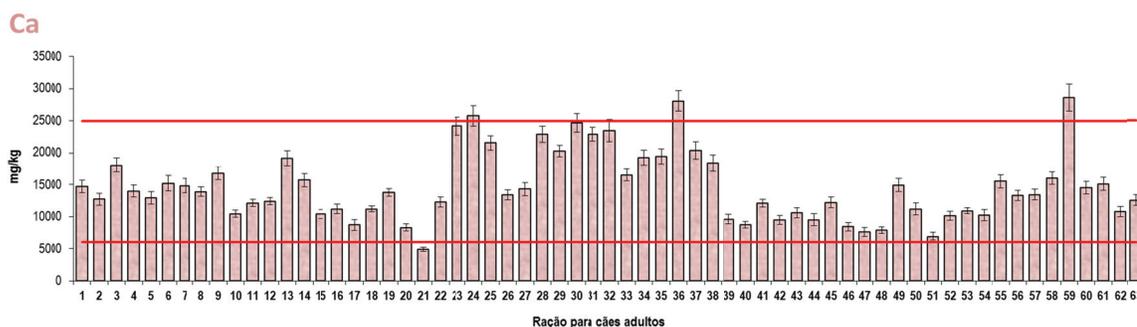
Elemento	Valores obtidos		Valores de Referência	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Ca	6400	21100	10000	25000
P	8500	15900	8000	16000
Ca:P	0,74	1,86	1:1	2:1
K	4960	11140	6000	-
Na	3320	7900	3000	-
Cl	4750	16000	4500	-
Mg	580	2190	400	3000
Fe	198	675	80	3000
Cu	15	64	7,3	250
Mn	16	149	5,0	-
Zn	46	614	120	1000
I	0,7	14	1,5	50
Se	0,30	2,14	0,11	2,0

Cálcio

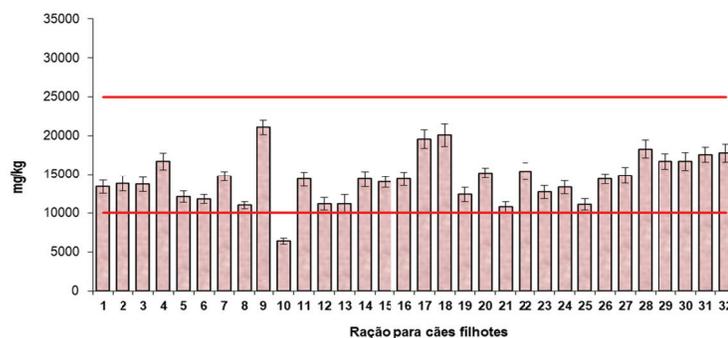
As concentrações de cálcio permaneceram acima dos limites mínimos em todas as amostras, tanto nas rações para adultos (6000 mg/kg) como nas rações para filhotes (10000 mg/kg), com exceção de duas, uma para cães adultos classificada inclusive como *super premium* (4900 mg/kg) e a outra para filhote (6400 mg/kg), como mostram as Figuras 4.3a e 4.3b. Também, houve amostras de rações para adultos que apresentaram valores acima do limite máximo de 25000 mg/kg (Figura 4.3a), corroborando os resultados de Carciofi et al. (2006), em que cerca de 11% das rações do segmento econômico estavam com excesso de cálcio.

Embora cálcio seja um elemento essencial necessário em elevadas quantidades, valores acima do limite podem prejudicar a absorção de outros nutrientes, principalmente fósforo, manganês e zinco, e comprometer o

desenvolvimento do esqueleto (SCHOULTEN et al., 2003; CASE et al., 2011). Segundo Grandjean (2006), nos últimos anos, verificou-se o aumento de casos de distúrbios de ossificação em filhotes de cães de porte grande que consomem alimentos industrializados de qualidade inferior, devido ao excesso desses minerais contidos na formulação. Contudo, todas as 32 amostras de rações para cães filhotes avaliadas neste trabalho estiveram abaixo do limite máximo (Figura 4.3b).



(a)

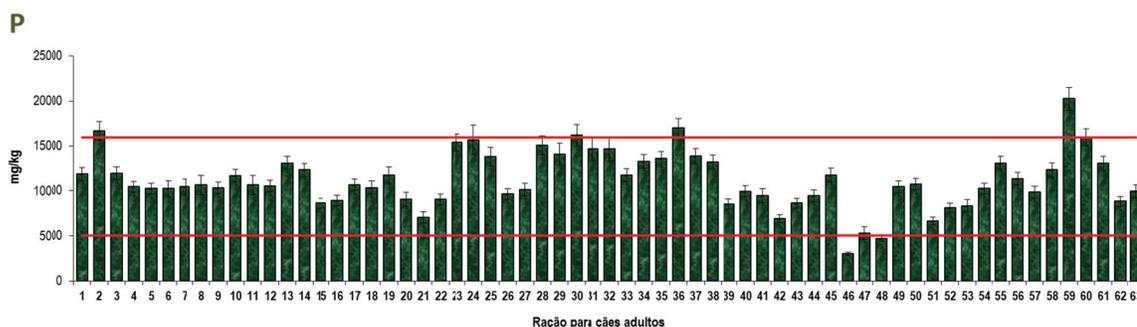


(b)

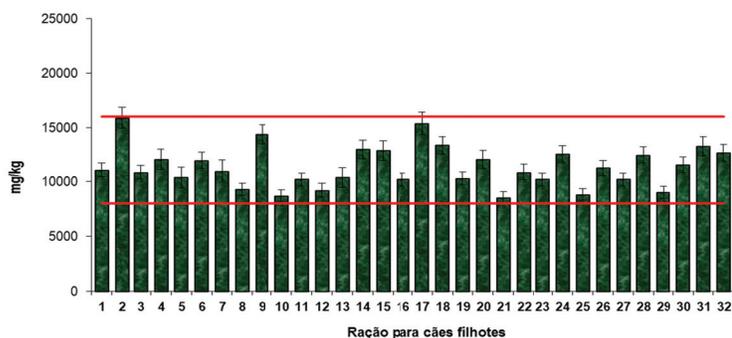
Figura 4.3 - Concentração de cálcio nas rações para cães adultos (a) e rações para cães filhotes (b), onde as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). Limites mínimo (6000 mg/kg) e máximo (25000 mg/kg) na ração do tipo seca para cães adultos e limites mínimo (10000 mg/kg) e máximo (25000 mg/kg) na ração do tipo seca para cães filhotes, estabelecidos pela AAFCO (2008)

Fósforo

Nas rações para cães adultos, fósforo variou de 3000 mg/kg a 20300 mg/kg (Figura 4.4a). O menor valor foi encontrado em uma ração auxiliar ao tratamento de doença renal. Esse tipo de ração deve conter um teor reduzido do elemento, pois o baixo consumo de fósforo é essencial para ajudar na função renal dos cães que apresentam insuficiência renal crônica (CASE et al., 2011).



(a)



(b)

Figura 4.4 - Concentração de fósforo nas rações para cães adultos (a) e rações para cães filhotes (b), onde as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). Limites mínimo (5000 mg/kg) e máximo (16000 mg/kg) na ração do tipo seca para cães adultos e limites mínimo (8000 mg/kg) e máximo (16000 mg/kg) na ração do tipo seca para cães filhotes, estabelecidos pela AAFCO (2008)

Por outro lado, as rações de número 2 (16700 mg/kg), 36 (17000 mg/kg) e 59 (20300 mg/kg) apresentaram valores superiores ao limite máximo (16000 mg/kg). Do mesmo modo, Costa et al. (2013) verificaram valores elevados de fósforo nas rações para cães, variando de 22000 mg/kg a 24000 mg/kg. Em todas as rações para filhotes, os valores estiveram dentro da faixa de normalidade para fósforo, variando de 8500 mg/kg a 15900 mg/kg (Figura 4.4b).

O excesso de fósforo diminui a concentração plasmática do elemento, reduzindo a liberação de creatinina e a absorção de magnésio, podendo, assim, comprometer as funções renais (HAND et al., 2010). Normalmente, fontes inorgânicas de fósforo são adicionadas às rações para atender as exigências do elemento nos animais, sendo a principal delas o fosfato bicálcico (VIERA, 2010).

Razão Ca:P

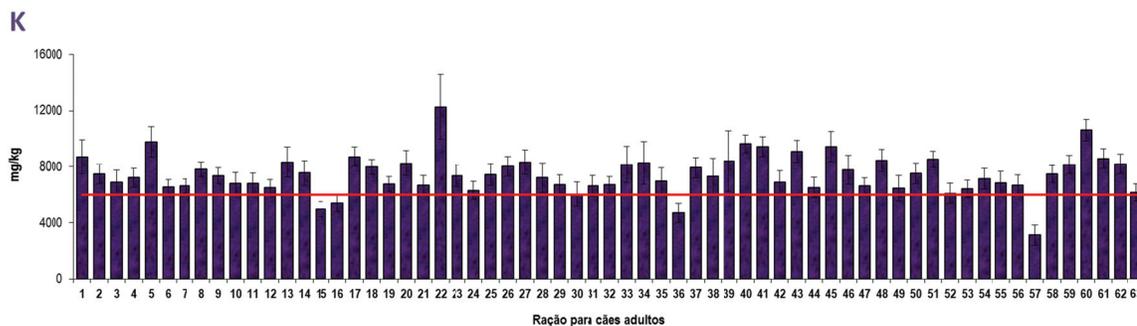
A razão Ca:P nas rações para cães adultos e filhotes, respectivamente, foi de 0,70 a 2,80 e de 0,74 a 1,86. Esses minerais são recomendados na dieta de cães na proporção Ca:P de 1:1 (mínimo) e 2:1 (máximo) de acordo com a AAFCO (2008). O aumento da razão Ca:P sugere maior concentração de cálcio na ração, promovendo o efeito inibitório sobre a absorção do fósforo (MIRANDA et al., 2000). Contudo, a redução da absorção de fósforo também ocorre quando a concentração de cálcio é baixa, o que pode ser atribuído ao desequilíbrio da relação Ca:P na ração (SCHOULTEN et al., 2002).

Ambos os elementos, cálcio e fósforo, estão intimamente relacionados no organismo do cão, principalmente na mineralização da matriz óssea (TRYFONIDOU et al., 2002; PINHEIRO et al., 2011). Por outro lado, o uso da farinha de carne e ossos, que leva em sua composição elevada concentração desses minerais em proporções balanceadas, causa sua menor digestibilidade, não assegurando uma nutrição ótima do animal (CARCIOFI et al., 2006).

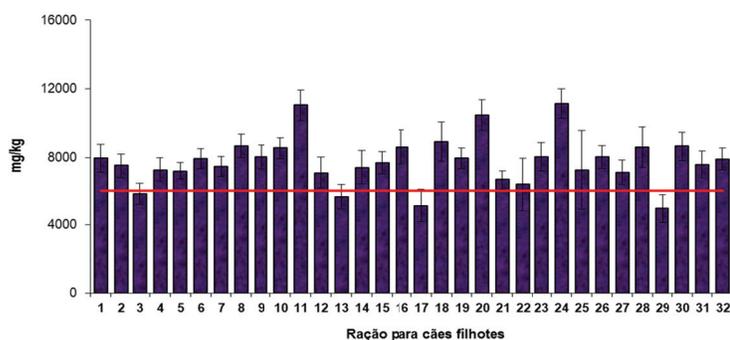
Potássio

Potássio apresentou valores de concentração abaixo do limite (6000 mg/kg) em quatro rações para cães adultos, bem como em quatro rações para cães filhotes (Figuras 4.5a e 4.5b). Duas dessas rações (adulto e filhote) são do segmento *super premium* e da mesma marca comercial.

Esse mineral é o principal cátion intracelular no organismo, necessário para a função celular normal (OTTEN et al., 2006). Nos animais, sódio e potássio atuam sobre as membranas celulares transmitindo impulsos eletroquímicos para as fibras musculares e para os nervos (NRC, 2006).



(a)



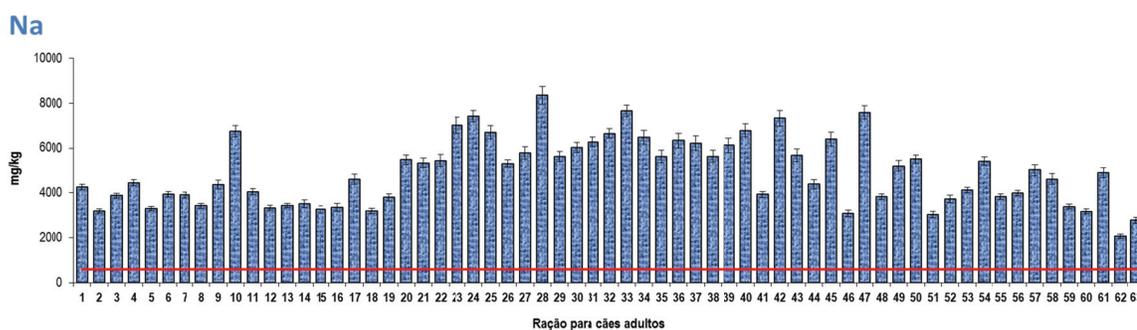
(b)

Figura 4.5 - Concentração de potássio nas rações para cães adultos (a) e rações para cães filhotes (b), onde as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). Limite mínimo (6000 mg/kg) na ração do tipo seca para cães adultos e filhotes, estabelecidos pela AAFCO (2008)

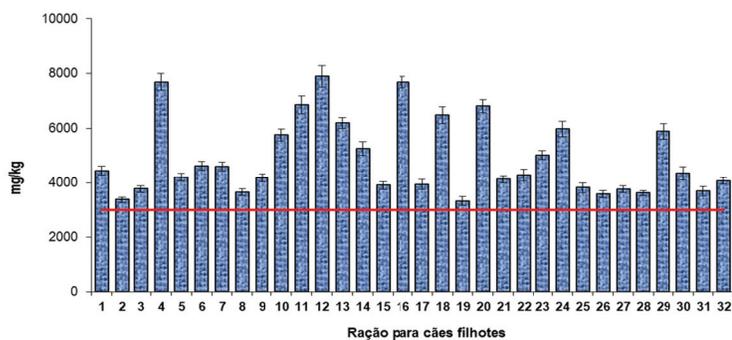
Embora o elemento esteja abaixo do limite requerido em algumas amostras, devido à sua abundância na maioria dos alimentos, a deficiência de potássio é bem rara nos cães e gatos (CASE et al., 2011).

Sódio

Para sódio, todas as rações para cães adultos e filhotes (Figura 4.6) obedeceram aos limites mínimos exigidos que são, respectivamente, de 600 mg/kg e 3000 mg/kg. A maior parte do sódio do organismo do animal encontra-se nos tecidos e fluidos corporais, estando relacionado com a regulação do equilíbrio ácido-base e manutenção da pressão osmótica (McDONALD et al., 2011).



(a)



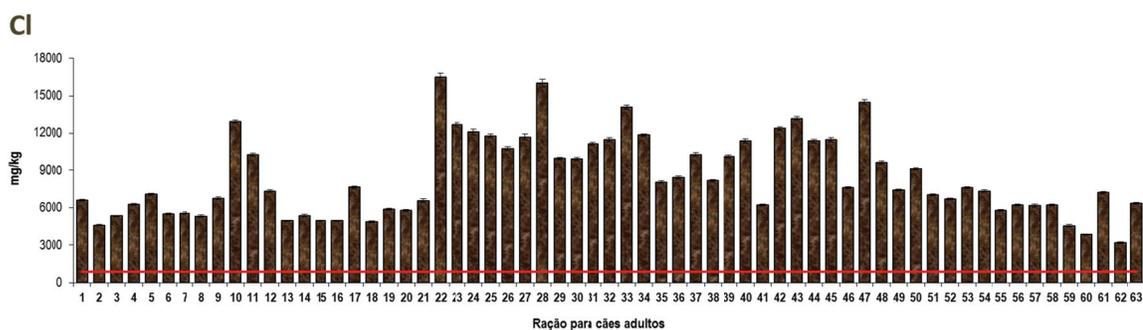
(b)

Figura 4.6 - Concentração de sódio nas rações para cães adultos (a) e rações para cães filhotes (b), onde as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). Limite mínimo (600 mg/kg) na ração do tipo seca para cães adultos e limite mínimo (3000 mg/kg) na ração do tipo seca para filhotes, estabelecidos pela AAFCO (2008)

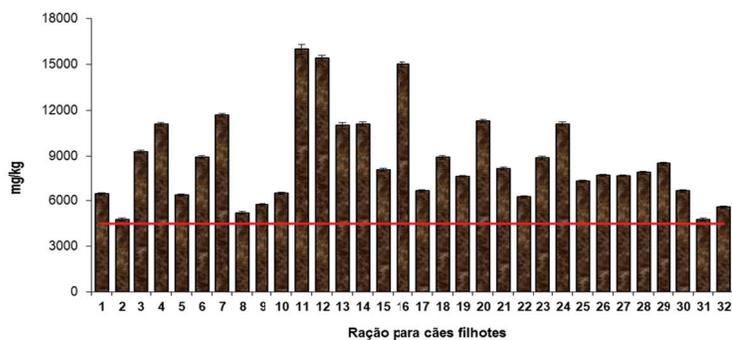
Cães são fisiologicamente capazes de se adaptarem a grandes ingestões de sódio (CASE et al., 2011). Apenas algumas doenças requerem redução da ingestão alimentar desse elemento (GRANDJEAN, 2006). Presume-se que, por conta dessa habilidade, sódio não apresenta um valor máximo recomendado pela AAFCO (2008) em ambos os tipos de ração.

Cloro

Cloro permaneceu acima dos limites mínimos em todas as amostras de rações para cães adultos (900 mg/kg) e para cães filhotes (4500 mg/kg), conforme a Figura 4.7.



(a)



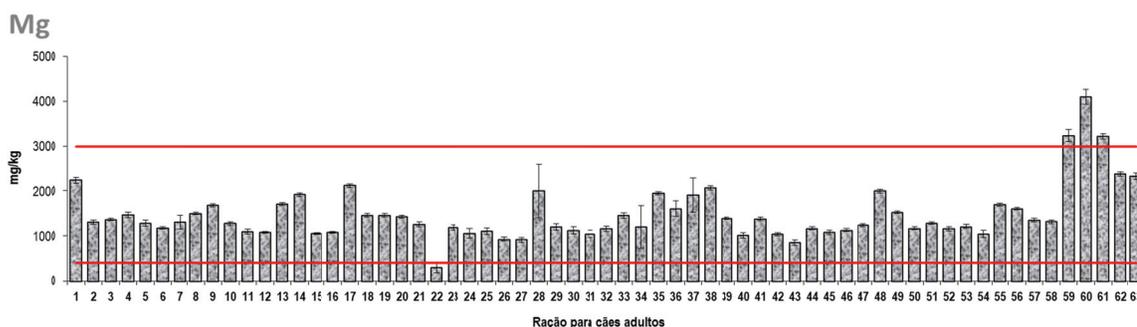
(b)

Figura 4.7 - Concentração de cloro nas rações para cães adultos (a) e rações para cães filhotes (b), onde as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). Limite mínimo (900 mg/kg) na ração do tipo seca para cães adultos e limite mínimo (4500 mg/kg) na ração do tipo seca para filhotes, estabelecidos pela AAFCO (2008)

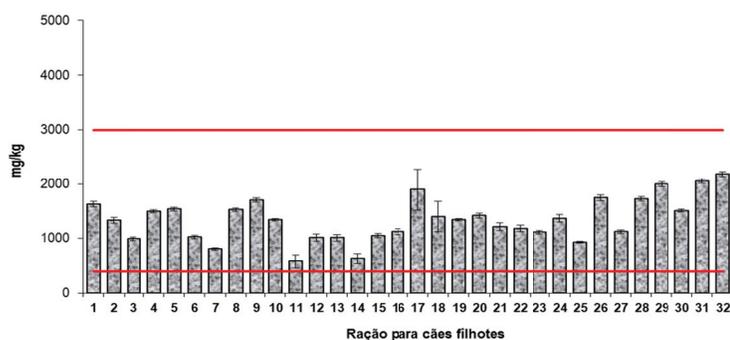
Assim como sódio, cloro também não possui um valor máximo de referência recomendado pela AAFCO (2008). Cloro desempenha várias funções no organismo dos animais, entre elas estão regulação da pressão osmótica, balanço hídrico, balanço ácido-base e formação do ácido clorídrico no estômago (NRC, 2006; CASE et al., 2011).

Magnésio

As concentrações de magnésio estiveram acima do limite mínimo, cujo valor de referência é de 400 mg/kg, em todas as rações para cães adultos, com exceção de uma amostra (Figura 4.8a). Por outro lado, três amostras excederam o valor máximo referenciado (3000 mg/kg).



(a)



(b)

Figura 4.8 - Concentração de magnésio nas rações para cães adultos (a) e rações para cães filhotes (b), onde as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). Limites mínimo (400 mg/kg) e máximo (3000 mg/kg) nas rações do tipo seca para cães adultos e filhotes, estabelecidos pela AAFCO (2008)

Nas rações para filhotes, os valores de magnésio permaneceram dentro das faixas normais de referência (Min=400 mg/kg e Max=3000 mg/kg) da AAFCO (2008) nas 32 amostras (Figura 4.8b).

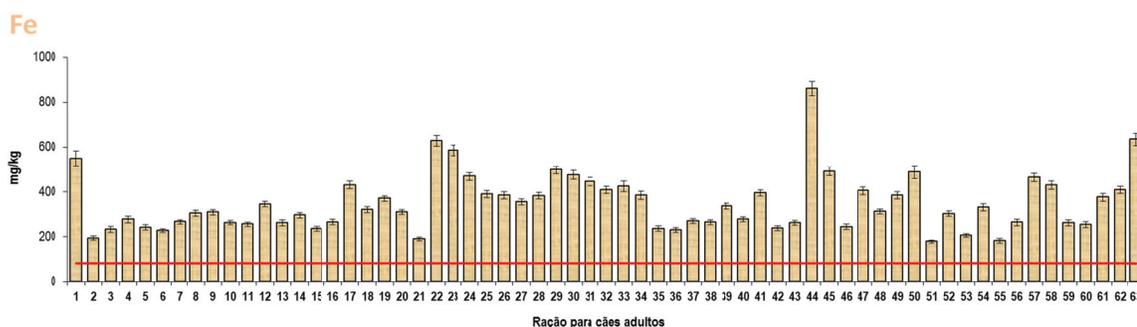
Costa et al. (2013) encontraram nas rações para cães faixa de concentração variando de 140 mg/kg a 250 mg/kg, valores bem abaixo dos limites estabelecidos pela AAFCO (2008). Cães ativos necessitam de aportes mais elevados de magnésio (GRANDJEAN, 2006). A absorção de magnésio nos cães é regulada de acordo com a necessidade do organismo (CASE et al., 2011), porém, fontes naturais de água contendo altas concentrações de sais desse elemento podem causar complicações à saúde dos cães (NRC, 2006).

Ferro

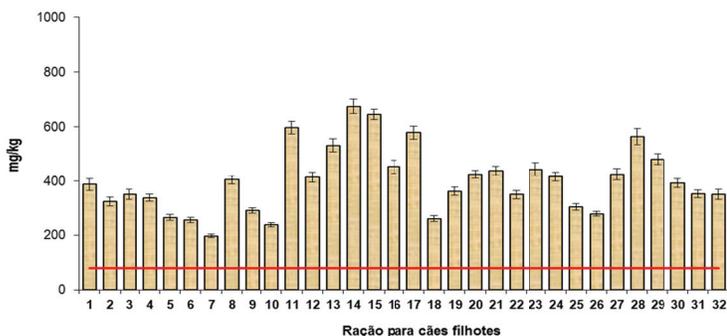
Ferro variou de 177 mg/kg a 862 mg/kg e de 198 mg/kg a 675 mg/kg, respectivamente, nas rações para cães adultos (Figura 4.9a) e filhotes (Figura 4.9b), o que corrobora os resultados (197 mg/kg a 701 mg/kg) obtidos por Alvarado et al. (2008) nas rações para cães avaliadas no Chile. Em todas as amostras, as concentrações de ferro ficaram entre os limites máximo e mínimo requeridos pela AAFCO (2008).

Ferro é um elemento essencial para cães e gatos (NRC, 2006). No entanto, a forma em que o elemento se encontra influencia o mecanismo de absorção (GERMANO; CANNIATTI-BRAZACA, 2002). O ferro heme é encontrado em carnes, aves e peixes, sendo geralmente muito bem absorvido pelo organismo (OTTEN et al., 2006). Em contrapartida, a absorção do ferro não heme é fortemente influenciada pela solubilidade e interação com outros componentes da dieta, que tanto podem promover ou inibir a sua absorção (OTTEN et al., 2006).

O ferro combina com o cobre e algumas proteínas para a formação da hemoglobina e é necessário para certas enzimas no funcionamento normal do organismo (NRC, 2006; OTTEN et al., 2006). Em estudo de toxicidade de ferro, foram administradas doses letais em cães e gatos, respectivamente, 600 mg e 500 mg por kg de peso, sob a forma de sulfato ferroso (NRC, 2006).



(a)



(b)

Figura 4.9 - Concentração de ferro nas rações para cães adultos (a) e rações para cães filhotes (b), onde as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). Limites mínimo (80 mg/kg) e máximo (3000 mg/kg) nas rações do tipo seca para cães adultos e filhotes, estabelecidos pela AAFCO (2008)

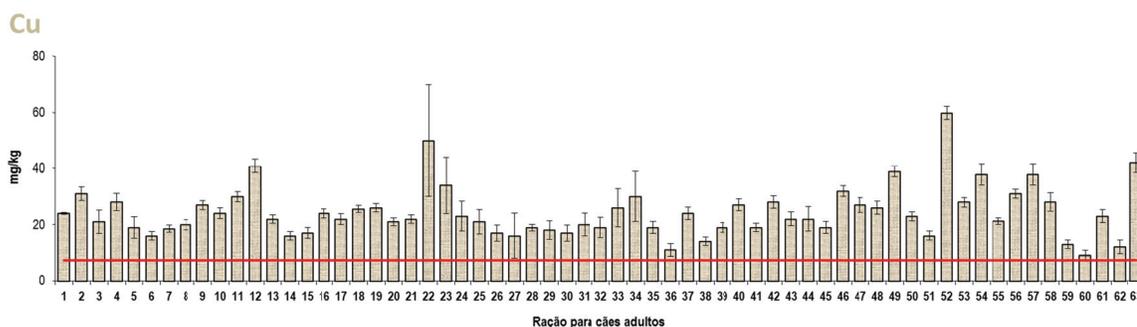
Cobre

Nas 95 amostras avaliadas, cobre apresentou valores de concentração (Figura 4.10) dentro da faixa normal de referência, entre 7,3 mg/kg e 250 mg/kg, estabelecida para as rações para cães adultos e filhotes (AAFCO, 2008). Observa-se, ainda, que os maiores valores encontrados ficaram bem abaixo do limite máximo estabelecido, atingindo valores máximos de 60 mg/kg e 64 mg/kg, respectivamente, nas rações para adultos e filhotes. Esses resultados são similares com aqueles obtidos por Alvarado et al. (2008), e estiveram na faixa de 8,9 mg/kg a 54 mg/kg, empregando ICP-MS.

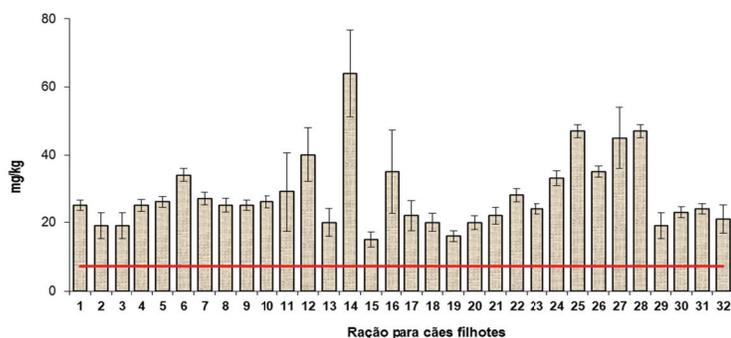
Costa et al. (2013) analisando rações para cães utilizando ICP OES, encontraram valores de concentração de cobre entre 15,5 mg/kg e 34,1 mg/kg.

Duran et al. (2013) também determinaram cobre em um intervalo estreito, entre 3,33 mg/kg a 16,6 mg/kg, em rações para cães e gatos por AAS.

Cobre é de especial relevância neste trabalho, uma vez que seu acúmulo no fígado de cães com predisposição genética está associado ao desenvolvimento de hepatopatia (HOFFMANN et al., 2009). No entanto, cabe ressaltar que os efeitos tóxicos provenientes da ingestão excessiva de cobre são influenciados pela sua forma química, espécies e interação com outros minerais (WHO, 2011).



(a)



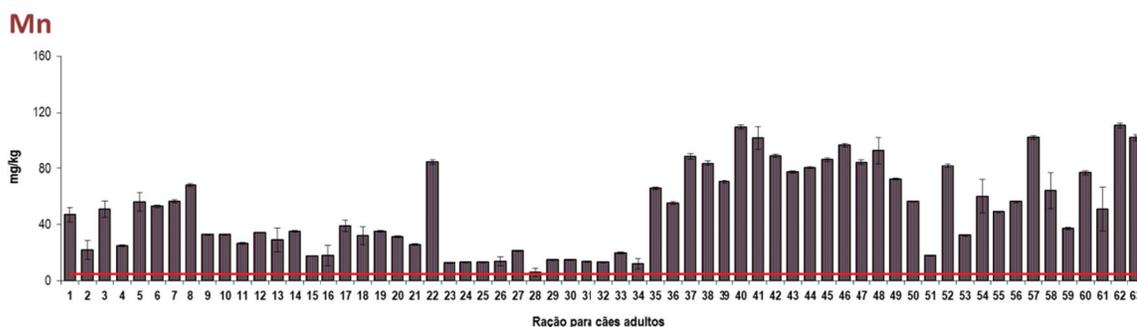
(b)

Figura 4.10 - Concentração de cobre nas rações para cães adultos (a) e rações para cães filhotes (b), onde as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). Limites mínimo (7,3 mg/kg) e máximo (250 mg/kg) nas rações do tipo seca para cães adultos e filhotes, estabelecidos pela AAFCO (2008)

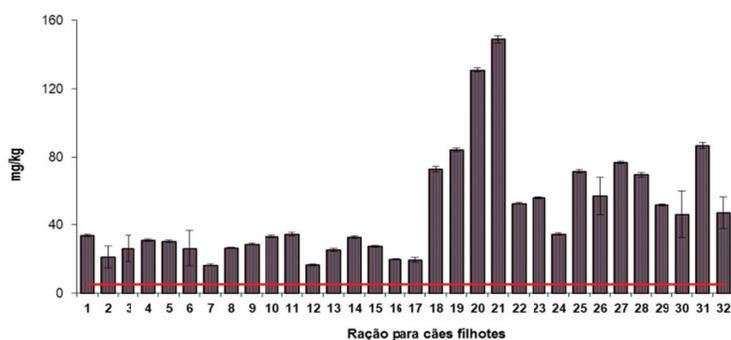
Manganês

Em todas as rações, manganês também mostrou valores de concentração em concordância com a AAFCO (2008) para o limite mínimo de referência, que é de 5,0 mg/kg em ambas as faixas de idade (Figuras 4.11). Não há um valor máximo recomendado para esse elemento (AAFCO, 2008).

O manganês contribui para a qualidade dos ossos e das cartilagens, devendo ser monitorado em filhotes, no animal idoso ou animais com artrose (GRANDJEAN, 2006). Sinais de deficiência são pouco comuns em cães e gatos, mas em aves é bastante relevante, uma vez que o elemento é requerido de 10 a 12 vezes mais do que a ingestão para humanos, porcos, cães e gatos (HAND et al., 2010).



(a)



(b)

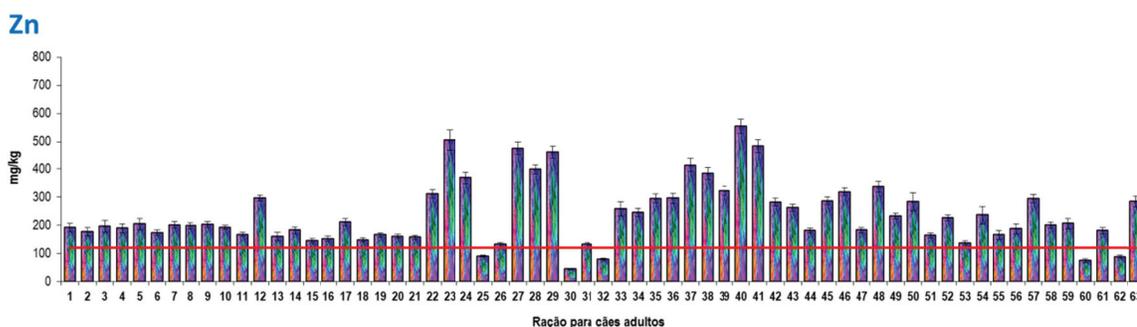
Figura 4.11 - Concentração de manganês nas rações para cães adultos (a) e rações para cães filhotes (b), onde as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). Limite mínimo (5,0 mg/kg) nas rações do tipo seca para cães adultos e filhotes, estabelecido pela AAFCO (2008)

Zinco

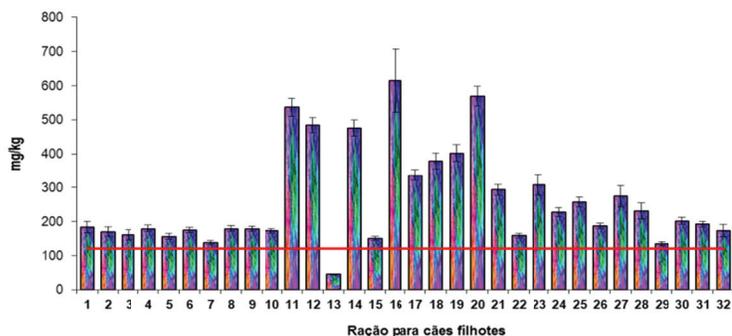
Zinco mostrou valores de concentração variando de 44 mg/kg a 554 mg/kg nas rações para cães adultos, como pode ser visualizado na Figura 4.12a, enquanto nas rações para filhotes foram obtidos valores entre 46 mg/kg e 614 mg/kg (Figura 4.12b).

O elemento esteve abaixo do limite mínimo recomendado de 120 mg/kg, estabelecido pela AAFCO (2008), em cinco amostras de rações para cães adultos e uma para filhote, sendo quatro rações de uma mesma marca comercial. Alvarado et al. (2008) observaram concentrações variando de 75 mg/kg a 317 mg/kg nas rações para cães, enquanto Costa et al. (2013) encontraram valores variando de 106 mg/kg a 419 mg/kg.

Zinco é um elemento essencial e o segundo mais abundante presente nos tecidos celulares (CASE et al., 2011). É componente de várias metaloenzimas envolvidas diretamente com a síntese de DNA (MACDONALD, 2000). Para cães, zinco é considerado atóxico, sendo mais frequente verificar os efeitos de deficiência (NRC, 2006). Adicionalmente, evidencia-se que o organismo pode se adaptar à redução na ingestão de zinco, diminuindo sua excreção fecal e urinária, não ocorrendo com frequência sinais de deficiência (OTTEN et al., 2006).



(a)

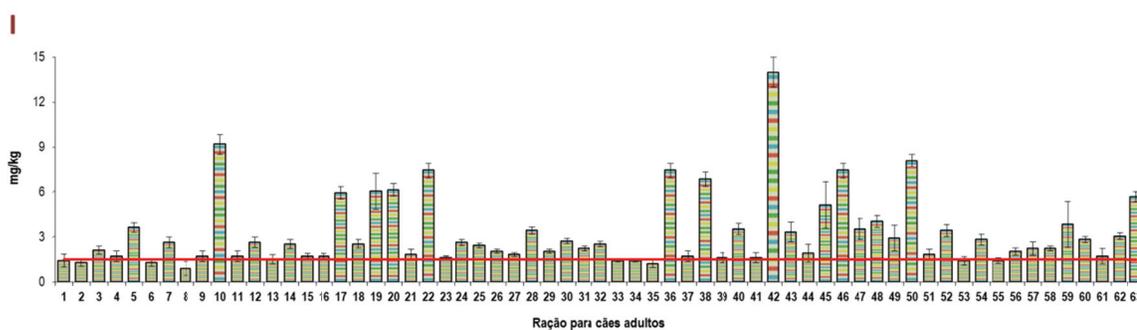


(b)

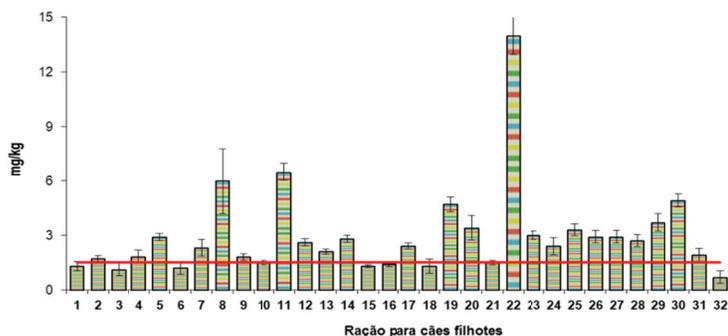
Figura 4.12 - Concentração de zinco nas rações para cães adultos (a) e rações para cães filhotes (b), onde as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). Limites mínimo (120 mg/kg) e máximo (1000 mg/kg) nas rações do tipo seca para cães adultos e filhotes, estabelecidos pela AAFCO (2008)

Iodo

As concentrações de iodo estiveram abaixo do limite máximo (50 mg/kg) em todas as rações para cães adultos e filhotes, variando até 14 mg/kg em ambas (Figura 4.13). Foram obtidos resultados ligeiramente menores do que o limite mínimo de 1,5 mg/kg em algumas rações. Iodo é requerido nos animais na composição dos hormônios da tireoide, porém, somente em baixas concentrações (GRANDJEAN, 2006; NRC, 2006). Em cães, há poucos relatos de casos clínicos de deficiência do elemento (CASE et al., 2011).



(a)



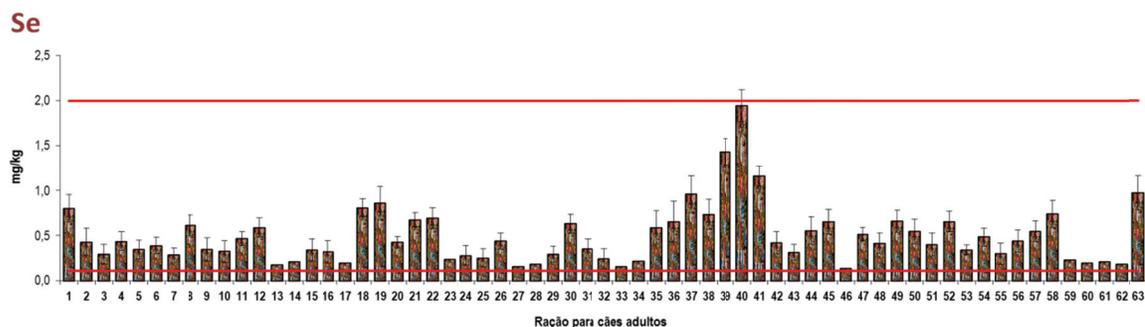
(b)

Figura 4.13 - Concentração de iodo nas rações para cães adultos (a) e rações para cães filhotes (b), onde as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). Limites mínimo (1,5 mg/kg) e máximo (50 mg/kg) nas rações do tipo seca para cães adultos e filhotes, estabelecidos pela AAFCO (2008)

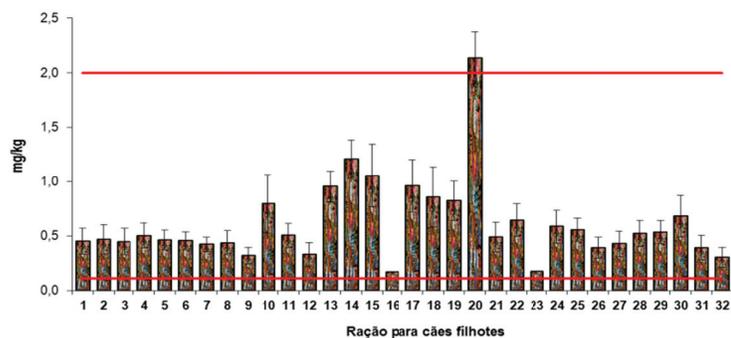
Selênio

As concentrações de selênio variaram nas rações para cães adultos de 0,24 mg/kg a 1,94 mg/kg (Figura 4.14a) e para filhotes de 0,30 mg/kg a 2,14 mg/kg (Figura 4.14b), enquanto o limite máximo recomendado é de 2 mg/kg (AAFCO, 2008). Algumas amostras apresentaram valores abaixo do limite de detecção (entre $< 0,07$ mg/kg e $< 0,30$ mg/kg). O selênio possui ação antioxidante atuando sinergicamente com a vitamina E (GRANDJEAN, 2006), além de ser importante na resposta imune (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012).

Devido à abundância natural de selênio nos alimentos, a deficiência em cães é bem rara. Por outro lado, a sua ingestão excessiva pode ser considerada tóxica aos animais (CASE et al., 2011).



(a)



(b)

Figura 4.14 - Concentração de selênio nas rações para cães adultos (a) e rações para cães filhotes (b), onde as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). Limites mínimo (0,11 mg/kg) e máximo (2,0 mg/kg) nas rações do tipo seca para cães adultos e filhotes, estabelecidos pela AAFCO (2008)

4.2.2 Outros elementos quantificados nas rações

As Tabelas 4.3 e 4.4 mostram os resultados de concentração mínimos e máximos obtidos para os elementos químicos Al, As, Br, Co, Cr, Cs, La, Rb, Sb, Sc, Ti e U, que não apresentam essencialidade comprovada para os cães. Cabe ressaltar que, embora não tenham limites máximos estabelecidos, alguns desses elementos são considerados potencialmente tóxicos, como é o caso do Al, Sb e U.

Como se observa nas tabelas, algumas amostras apresentaram valores abaixo dos limites de detecção para determinados elementos químicos.

Tabela 4.3 - Valores de concentração mínimo e máximo (mg/kg) dos elementos químicos determinados nas rações para cães adultos (n=63). Resultados expressos em matéria seca

Elemento	Valores obtidos		Elemento	Valores obtidos	
	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>		<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Al	< 21	11900	La	< 0,02	3,32
As	< 0,13	0,43	Rb	5,67	25,04
Br	2,05	16,90	Sb	< 0,01	5,04
Co	0,08	0,82	Sc	0,01	1,41
Cr	< 0,20	4,33	Ti	< 9,0	2300
Cs	0,02	0,17	U	< 0,13	2,25

Tabela 4.4 - Valores de concentração mínimo e máximo (mg/kg) dos elementos químicos determinados nas rações para cães filhotes (n=32). Resultados expressos em matéria seca

Elemento	Valores obtidos		Elemento	Valores obtidos	
	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>		<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Al	49	8500	La	< 0,02	3,14
As	< 0,14	0,56	Rb	6,50	22,96
Br	3,10	15,42	Sb	< 0,01	5,14
Co	0,08	0,75	Sc	0,01	0,78
Cr	< 0,20	8,27	Ti	< 9,0	2140
Cs	0,02	0,19	U	< 0,13	3,99

Alumínio

As concentrações de alumínio variaram desde 48 mg/kg a até 11900 mg/kg nas rações para cães adultos e de 49 mg/kg a 8500 mg/kg nas rações para filhotes. Apenas uma amostra de ração para adultos apresentou-se abaixo do limite de detecção (< 21 mg/kg). De um total de 95 amostras, 24 % apresentaram resultados de concentração de alumínio igual ou acima de 1000 mg/kg. Curiosamente, observam-se os maiores valores para as rações de uma mesma marca comercial, incluindo rações dos segmentos econômico e *super premium* (Figura 4.15). Em estudo realizado no Nordeste do Brasil com rações para cães, Costa et al. (2013) determinaram o elemento por ICP OES obtendo valores entre 54 mg/kg e 2835 mg/kg. Portanto, o maior valor foi cerca de ¼ do valor máximo obtido por INAA no presente estudo.

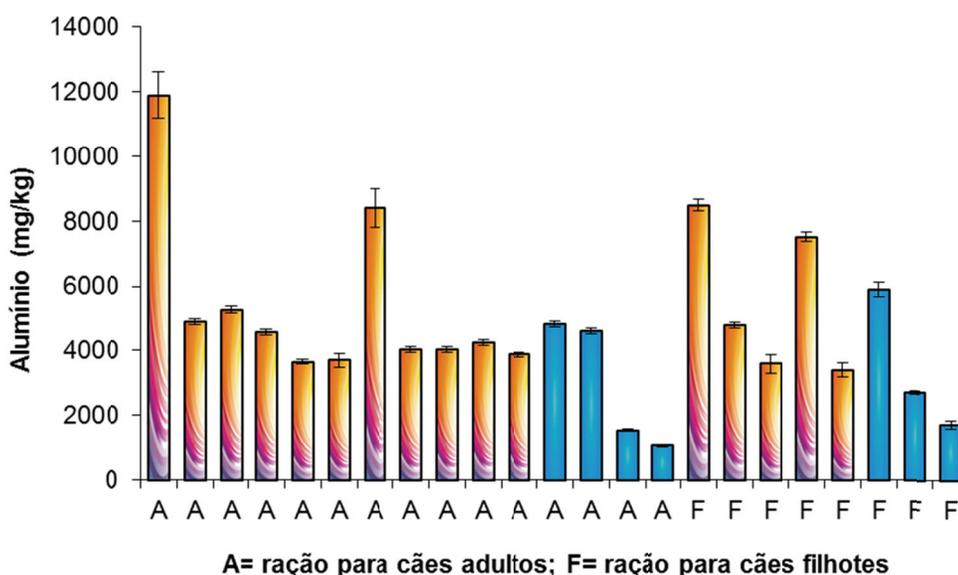


Figura 4.15 - Valores de Al nas amostras de ração que apresentaram resultados de concentração ≥ 1000 mg/kg. As barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). As cores das barras indicam uma mesma marca comercial

Alguns aditivos usados na alimentação animal possuem alumínio na composição (SINDIRAÇÕES, 2012). Embora não tenham sido encontrados limites máximos estabelecidos para alumínio em ração para cães, o Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) estabeleceu o limite de ingestão diária para

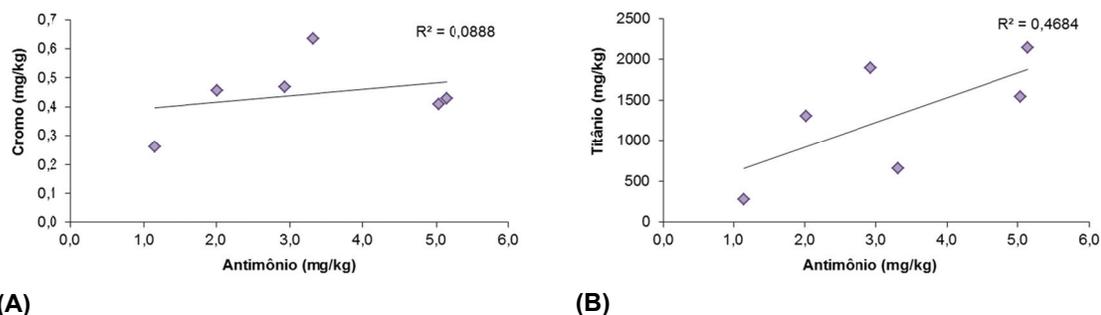
humanos de 1 mg por kg de peso corporal para todos os compostos de alumínio em alimentos, incluindo os aditivos (CODEX, 2011).

Apesar de apresentar baixa biodisponibilidade no organismo, o alumínio e seus compostos não são totalmente conhecidos ainda quanto ao mecanismo de absorção no trato gastrointestinal (BERTHON, 2002; CODEX, 2011). Porém, é sabido que seus efeitos adversos podem ocorrer em longo prazo no organismo, sendo o sistema nervoso o mais sensível ao elemento (YOKEL, 2000).

Antimônio

Cerca de 44 % das rações para cães adultos e 53 % das rações para cães filhotes apresentaram valores de antimônio abaixo do limite de detecção, variando de < 0,01 mg/kg a < 0,04 mg/kg (rações para adultos) e < 0,01 mg/kg a < 0,03 mg/kg (rações para filhotes). No restante das amostras, os resultados obtidos foram de 0,01 mg/kg a 5,04 mg/kg nas rações para cães adultos e de 0,01 mg/kg a 5,14 mg/kg nas rações para filhotes. Atkins et al. (2011) encontraram concentrações de antimônio entre 0,5 mg/kg e 1,0 mg/kg em rações do tipo seca para cães.

Seis rações, sendo quatro para adultos e duas para filhotes, de diferentes marcas comerciais, mas de um mesmo fabricante, mostraram claramente os maiores valores de antimônio (Figura 4.16). Todas essas rações são coloridas artificialmente, indicando que o pigmento adicionado possa ser a causa da elevada concentração de antimônio nessas amostras.



(A) (B)
 Figura 4.17 - Correlações Sb-Cr (A) e Sb-Ti (B) para as seis amostras de rações que mostraram os maiores valores de antimônio

Adicionalmente, em ensaio desenvolvido por Smichowski (2008), foi avaliada a migração do antimônio de embalagens para o próprio alimento. No Brasil, a regulamentação foi estabelecida pela ANVISA (2010) com limites de migração específica para antimônio de 0,04 mg/kg, que deve ser aplicado a embalagens que contêm corantes e pigmentos em sua formulação destinadas a estar em contato com alimentos.

Não há limite máximo de antimônio estabelecido em rações para cães. Entretanto, de acordo com a World Health Organization (WHO, 2001), a ingestão diária tolerável de antimônio para humanos é de 6 µg por kg de peso corporal. Comparado a esse valor máximo tolerável, a ingestão de antimônio vinda da ração pode ser relativamente alta. Considerando que antimônio é potencialmente tóxico mesmo em baixas concentrações (SMICHOWSKI, 2008) e que o rim pode sofrer efeitos tóxicos nefastos devido à ingestão crônica de antimônio (WINSHIP, 1987), esses valores na ração não devem ser aceitos.

Arsênio

Com exceção de duas rações para cães adultos (0,40 mg/kg e 0,43 mg/kg) e duas para filhotes (0,35 mg/kg e 0,56 mg/kg), arsênio ficou abaixo do limite de detecção para todas as amostras avaliadas, variando de < 0,13 mg/kg a < 0,47 mg/kg nas rações para cães adultos, e de < 0,14 mg/kg a < 0,39 mg/kg nas rações para filhotes. Atkins et al. (2011) reportaram valores menores nas rações para cães, entre 0,03 mg/kg e 0,21 mg/kg. Cabe considerar que a técnica analítica utilizada por esses autores foi ICP-MS, que permitiu a detecção de valores menores de arsênio comparado com INAA.

Arsênio é essencial para várias espécies, no entanto, o intervalo de concentração considerado essencial é muito próximo dos níveis tóxicos (CRISPINO, 2005). Para cães, não foi encontrada recomendação de ingestão diária para arsênio (NRC, 2006). De acordo com a diretiva da União Europeia (2002), o limite máximo de arsênio em produtos destinados à alimentação animal é de 2 mg/kg, considerando um teor de umidade de 12%. Assim, todas as amostras avaliadas estão dentro da faixa de segurança com relação à concentração de arsênio.

Bromo

Bromo apresentou valor máximo de concentração de 16,9 mg/kg e 15,4 mg/kg nas rações para cães adultos e filhotes, respectivamente. Tipicamente, esse elemento não é adicionado à dieta de animais, uma vez que não possui essencialidade definida (NRC, 2005). O bromo encontrado na dieta é proveniente de níveis de *background* dos alimentos ou, então, de resíduos decorrentes do uso do elemento como pesticidas na agricultura (NRC, 2005).

Como íon nas dietas, bromo aparentemente tem baixa toxicidade (MERTZ, 1986). Cães toleram a dose de 20 mg/kg de peso por dia sem efeitos adversos (NRC, 2005).

Bromo possui similaridade físico-química ao cloro, com um perfil metabólico comparável. Assim como o cloro, o bromo é eficientemente absorvido pelo trato gastrointestinal e predominantemente encontrado em fluidos extracelulares, secreções gástricas e saliva (NRC, 2005). Além disso, concentrações elevadas de bromo são encontradas na glândula tireoide, comparada com outros tecidos. Porém, o bromo não substitui o iodo na tiroxina e altas concentrações desse elemento leva à diminuição da absorção de iodo pela tireoide, podendo causar deficiência de iodo (NRC, 2005).

Cobalto

Para cobalto, os resultados de concentração obtidos (adultos entre 0,08 mg/kg e 0,82 mg/kg; filhotes entre 0,08 mg/kg e 0,75 mg/kg) foram similares aos observados nas rações dos EUA, que estiveram numa faixa variando entre 0,13 mg/kg e 0,88 mg/kg (ATKINS et al., 2011). De acordo com o NRC (2005), a maioria dos alimentos destinados a animais apresentam baixas concentrações de cobalto (< 0,5 µg/kg).

O cobalto é um componente da vitamina B₁₂ que auxilia na hematopoiese (SCHMIDT-NIELSEN, 1997). Adicionalmente, cobalto não é requerido pelos cães e gatos, desde que sua dieta contenha quantidades adequadas de vitamina B₁₂ (CASE et al., 2011). Toxicose por cobalto é rara em animais monogástricos e pode ocorrer apenas por contaminação ambiental através do alimento ou da água (NRC, 2005).

Cromo

Os valores de cromo variaram dentro de uma ordem de grandeza, de 0,48 mg/kg a 4,33 mg/kg nas rações para cães adultos e de 0,48 mg/kg a 8,27 mg/kg nas rações para filhotes. Nove amostras apresentaram valores abaixo do limite de detecção, que esteve entre < 0,20 mg/kg e < 0,50 mg/kg nas rações para cães adultos e filhotes. O maior valor verificado para cromo, de 8,27 mg/kg, foi em uma ração do segmento *super premium*. Todas as rações para cães e gatos analisadas por Costa et al. (2013) no Brasil permaneceram abaixo do limite de detecção (< 0,1 mg/kg), enquanto as rações analisadas na Turquia (DURAN et al., 2010), os valores de Cr variaram entre 0,58 mg/kg e 3,73 mg/kg, estando mais próximas dos valores obtidos neste estudo.

Cromo pode ser proveniente do equipamento utilizado no processo de fabricação da ração (ATKINS et al., 2011) ou oriunda do uso de fosfatos em certas dietas animais (NRC, 2005).

Baixas ingestões de cromo podem estar associadas com o desenvolvimento de diabetes em cães e gatos (CASE et al., 2011). Além disso, cromo é importante no metabolismo da glicose (ARAÚJO, 2008), mas pode ser tóxico também em níveis elevados, em função da sua forma química (óxido ou cloreto), de acordo com

Teruya (1999). No entanto, o óxido de cromo mesmo em altas quantidades na dieta (acima de 30000 mg/kg) não produziu toxicidade em ratos (NRC, 2005).

Segundo o NRC (2006), cães requerem Cr em níveis menores do que 12 µg por kg de peso por dia, mas ainda pouca informação está disponível, não permitindo definir uma recomendação.

Césio

Césio variou de 0,02 mg/kg a 0,17 mg/kg nas rações para adultos, e de 0,02 mg/kg a 0,19 mg/kg nas rações para filhotes. Césio pertence ao grupo 1A da tabela periódica, apresentando propriedades físico-químicas similares ao potássio e rubídio (MERTZ, 1986). Pais e Jones (1997) relataram a concentração de césio nos alimentos variando de 0,2 mg/kg a 3,3 mg/kg de peso úmido em vegetais e de < 0,1 mg/kg a 2,9 mg/kg de peso úmido em frutas.

Lantânio e escândio

Resultados de concentração de lantânio nas rações para cães adultos e filhotes variaram em amplas faixas, de 0,04 mg/kg a 3,32 mg/kg e de 0,04 mg/kg a 3,14 mg/kg, respectivamente. Somente duas amostras, uma para adultos e uma para filhotes, apresentaram valores abaixo do limite de detecção (< 0,02 mg/kg). Valores de escândio estiveram entre 0,01 mg/kg e 1,41 mg/kg (adultos) e 0,01 mg/kg e 0,78 mg/kg (filhotes). Os maiores valores para ambos os elementos, ou seja, 3,14 mg/kg (La) e 1,41 mg/kg (Sc), foram obtidos para uma ração terapêutica, prescrita para cães com hipersensibilidade alimentar.

Ainda é insuficiente a informação sobre o metabolismo dos elementos terras raras. Logo, o limite máximo tolerável para ETRs em dietas para animais é de 100 mg/kg (NRC, 2005). Tendo em vista esse valor, é possível inferir que todas as rações estão dentro do limite apropriado.

Considerando que ambos os elementos são característicos de matriz geológica (FERNANDES, 1993) e estão normalmente presentes em baixas quantidades nos alimentos destinados a animais (NRC, 2005), os valores mais elevados observados indicam a presença de partículas de solo ou, então, a adição

de minerais não purificados. Fosfatos são normalmente usados como fontes de fósforo e cálcio, e alguns desses fosfatos podem conter altos níveis de escândio, lantânio e outros elementos terras raras (DINALI, 2014).

Rubídio

Rubídio apresentou faixas de concentração nas rações de adultos e filhotes variando entre 5,67 mg/kg a 25,0 mg/kg e 6,50 mg/kg a 22,9 mg/kg, respectivamente. Esse elemento possui comportamento químico similar ao potássio (PETERSON et al., 2007), embora não o substitua em suas funções reguladoras (KABATA-PENDIAS, 2001).

A concentração de rubídio é relativamente baixa em alimentos de origem animal, com exceção de carnes de aves e peixes de água doce que contêm elevada quantidade (ANKE; ANGELOW, 1995).

Titânio

Os resultados de concentração de titânio apresentaram uma grande dispersão, variando de 11 mg/kg a 2300 mg/kg em rações para adultos e de 10 mg/kg a 2140 mg/kg em rações para filhotes. Nove amostras apresentaram valores abaixo do limite de detecção (< 9,0 mg/kg a < 67 mg/kg).

No total, doze amostras apresentaram concentrações de titânio maior ou igual a 1000 mg/kg, sendo seis valores nas rações para cães adultos e dois na ração para filhotes, que se referem a uma mesma marca comercial, conforme apresentado na Figura 4.18. Inclusive, duas dessas rações foram adquiridas em ocasiões diferentes.

As rações com elevada concentração de titânio foram as que tiveram os maiores valores de antimônio, porém, não foi observada correlação entre os dois elementos. Com exceção das rações para filhotes, todas as outras apresentam os grãos coloridos artificialmente. O dióxido de titânio é usado como corante em alimentos para humanos e rações para animais de companhia (NRC, 2005; BRASIL, 2010), podendo explicar tais valores.

Adicionalmente, o titânio é considerado fisiologicamente inativo nos animais, devido a sua baixa biodisponibilidade (PAIS; JONES, 1997) e não é tóxico nas quantidades e formas que normalmente são ingeridos (MERTZ, 1986). Assim, não

existe um limite máximo tolerável para ser sugerido a qualquer animal de companhia (NRC, 2005).

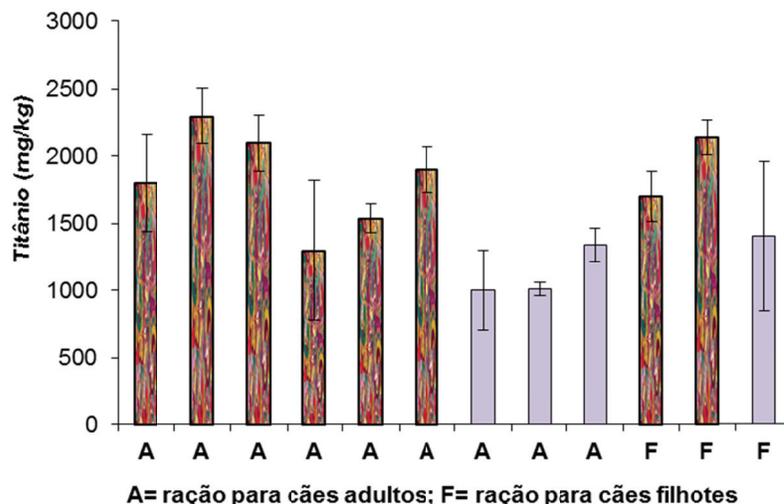


Figura 4.18 - Concentrações de titânio nas doze amostras de ração que apresentaram valores ≥ 1000 mg/kg, sendo que as barras de erro representam as incertezas de medição ($k=2$). As cores das barras indicam uma mesma marca comercial

Urânio

Do total de 95 rações analisadas, 18 para cães adultos e 8 para filhotes mostraram resultados de urânio acima do limite de detecção, que em média foi $< 0,13$ mg/kg. Os valores nas rações para adultos variaram de 0,46 mg/kg a 2,25 mg/kg, enquanto nas rações para filhotes de 0,34 mg/kg a 3,99 mg/kg. Seis amostras de rações destinadas a cães adultos e cinco para filhotes apresentaram valores de urânio $\geq 1,0$ mg/kg (Figura 4.19). Das rações para cães adultos, duas são de linhas terapêuticas prescritas a cães com problemas intestinais (1,01 mg/kg) e hipersensibilidade alimentar (2,25 mg/kg). Além disso, uma ração para filhote, do segmento *super premium*, apresentou 3,01 mg/kg de urânio. Destaque para algumas marcas comerciais que são de um mesmo fabricante e apresentaram os maiores valores de urânio (Figura 4.19).

Dados da literatura mostraram valores de urânio em *pet food* ($n=58$) variando de 0,78 $\mu\text{g/kg}$ a 0,86 mg/kg (ATKINS et al., 2011).

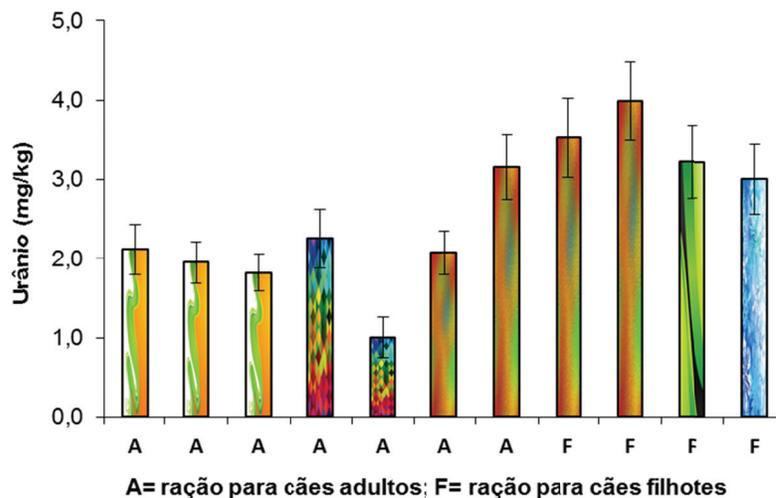


Figura 4.19 - Concentrações de U nas doze amostras de ração que apresentaram valores $\geq 1,0$ mg/kg. As barras coloridas da mesma cor indicam a mesma marca comercial

Duas marcas comerciais foram amostradas em ocasiões distintas. Para a primeira marca, a concentração de urânio foi reduzida de 3,15 mg/kg para 0,82 mg/kg, enquanto para a outra a concentração foi similar, com 3,99 mg/kg em um primeiro momento e 3,53 mg/kg na segunda amostragem.

Produtos derivados de rochas fosfatadas, como o fosfato bicálcico (DCP), são normalmente usados como aditivos na alimentação de animais para suplementação da concentração de fósforo, e podem conter altos valores de urânio (CASACUBERTA et al., 2009). Em DCPs comercializados na Catalunha, Espanha, e usados para alimentação animal, foram quantificadas concentrações de urânio variando de 80 mg/kg a 250 mg/kg (n=12), enquanto em TCP (fosfato tricálcico), destinado ao consumo de humanos, os valores de concentração variaram de 0,2 mg/kg a 2,0 mg/kg (n=4) (CASACUBERTA et al., 2009).

Experimentos com cães, coelhos e ratos demonstraram que esses animais são sensíveis a inalação e ingestão de compostos derivados do urânio, havendo acúmulo principalmente nos ossos, rins e fígado (KEITH et al., 2013). Não foi encontrado limite máximo para urânio em rações, porém os seus efeitos nefrotóxicos já são conhecidos há muito tempo, podendo causar, dependendo da exposição, insuficiência renal crônica (BATISTA, 2009; VICENTE et al., 2010).

De acordo com a US Environmental Protection Agency (EPA, 2010), o consumo diário de urânio em alimentos varia de 0,07 μg a 1,1 μg para humanos.

Considerando um cão da raça Labrador, por exemplo, de 35 kg, que consome cerca de 500 g de ração por dia, a ingestão diária poderia chegar a 2 mg de urânio ao ingerir a ração com maior concentração desse elemento, um valor muito elevado em comparação com a faixa de segurança publicada pela EPA.

4.2.3 Comparação de uma marca comercial de ração adquirida no Brasil e Holanda

Comparando-se as duas amostras de uma mesma marca comercial de ração, adquiridas no Brasil e na Holanda (Figura 4.20), não se verificou padrão único de distribuição para os 24 elementos químicos avaliados nas amostras.

No geral, as concentrações dos elementos químicos obtidas para a ração holandesa foram menores comparadas à ração brasileira.

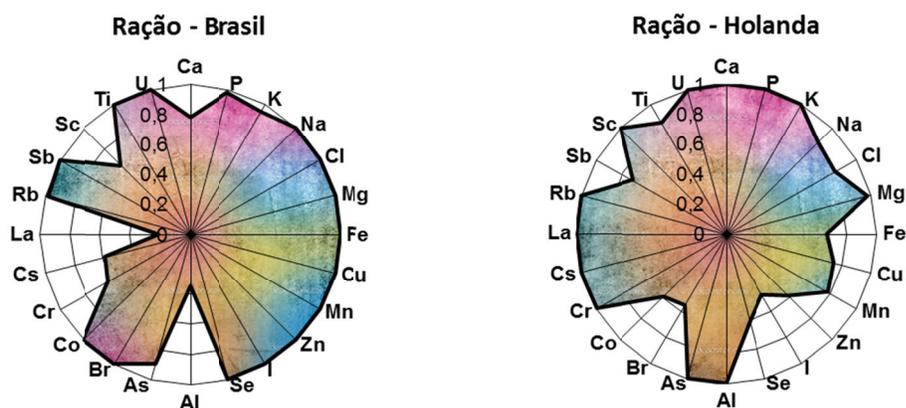


Figura 4.20 - Resultados normalizados a partir da maior concentração dos elementos químicos nas rações

4.3 LS-NAA

A Tabela 4.5 mostra os resultados de concentração obtidos para os 24 sacos de ração de um mesmo lote de produção para os elementos Br, Ca, K, Na e Zn determinados por LS-NAA na TUDelft, Holanda. Outros elementos como Co, Cr, Fe e Sc puderam ser determinados, no entanto, com incertezas relativas maiores que 20%, razão pela qual não foram considerados.

Tabela 4.5. Resultados de concentração (mg/kg) dos elementos químicos obtidos por LS-NAA para os 24 sacos de ração de um mesmo lote de produção, mostrando média, desvio padrão, variação analítica estimada pela combinação de incertezas, e valor calculado para a variação entre amostras (sacos), conforme equação detalhada por Hogewoning e Bode (2000)

	Br	Ca	K	Na	Zn
Média (n=24)	9,79	14800	8570	5400	194
Desvio padrão (n=24)	0,36	2900	260	140	39
Variação analítica	0,24	2800	320	120	24
Variação entre sacos (%)	2,7	5,1	-	1,3	15,8

Br, Ca, Na e Zn apresentaram desvio padrão maior do que a variação analítica, pressupondo-se que há diferenças na composição entre os sacos de ração para tais elementos (Tabela 4.5). A variação obtida entre os sacos de ração foi calculada de acordo com a Equação 4.1 detalhada por Hogewoning e Bode (2000).

$$S_s = \sqrt{S^2 - S_m^2} \quad (4.1)$$

onde:

S = desvio padrão

S_m = incerteza de medição

S_s = variação entre amostra

Br e Na demonstraram variação entre amostras de 2,7 % e 1,3 %, respectivamente, portanto uma diferença pequena, que poderia ser inclusive gerada por algum grau de inexatidão na avaliação das incertezas envolvidas no processo analítico, nesse caso subestimando a variação analítica. Aparentemente pelo mesmo motivo, para K, a variação analítica (320) foi maior do que o desvio padrão (260), produzindo um valor negativo para a variação entre amostras. Considerando a possibilidade de pequena oscilação, para mais ou para menos, na estimativa da variação analítica, apenas as variações entre sacos observadas para Ca (5,1%) e Zn (15,8 %) podem ser apontadas sem dúvida.

A Figura 4.21 mostra os resultados de concentração dos elementos químicos que apresentaram a menor e a maior variação. Nota-se que o melhor resultado foi

conseguido para Na, cujos valores para a maioria das amostras estão bem próximos da linha da média. Para Zn, é notória a variação encontrada entre os sacos de ração, em que grande parte dos resultados está distante da média. Além disso, as incertezas analíticas, embora bem maiores do que as obtidas para Na, muitas vezes não justificam a diferença.

As duas modalidades da NAA (NAA convencional x LS-NAA) foram comparadas a partir de porções tomadas de cada um dos 24 sacos de ração por NAA convencional. As médias das concentrações obtidas por NAA convencional dos elementos Br, Ca, K, Na e Zn (Tabela 4.6), em geral, concordaram com os valores obtidos por LS-NAA (Tabela 4.5).

A partir das médias das concentrações para ambos os métodos analíticos e suas respectivas incertezas relativas, o índice *zeta-score* foi calculado assumindo os valores da NAA convencional como valores de referência. Para Br, Ca e Zn, os resultados foram concordantes, com *zeta-scores* de 0,53, -0,42 e 0,24, respectivamente. Esses valores significam que os resultados de concentração concordam em nível de 99% de significância. No entanto, para K e Na, os valores de *zeta-score* de 2,4 e 3,6 demonstraram diferenças significativas entre os resultados de concentração obtidos por ambos os métodos. Aparentemente, os resultados de LS-NAA para K e Na foram 15 % e 10 % maiores, respectivamente, devido ao erro no procedimento de calibração, muito mais complexo nesse método.

Cabe ressaltar que a exatidão em LS-NAA é altamente dependente da correta avaliação da atenuação dos nêutrons no material da própria amostra (OVERWATER, 1994), o que nem sempre é conseguido em se tratando de matrizes complexas, formada por mistura de diversos componentes, como a ração para cães. Além disso, há dificuldade em obter materiais de referência adequados para o controle da qualidade, pela grande quantidade utilizada (1 kg neste caso) e pela necessidade de semelhança da composição matricial (BODE, 2007).

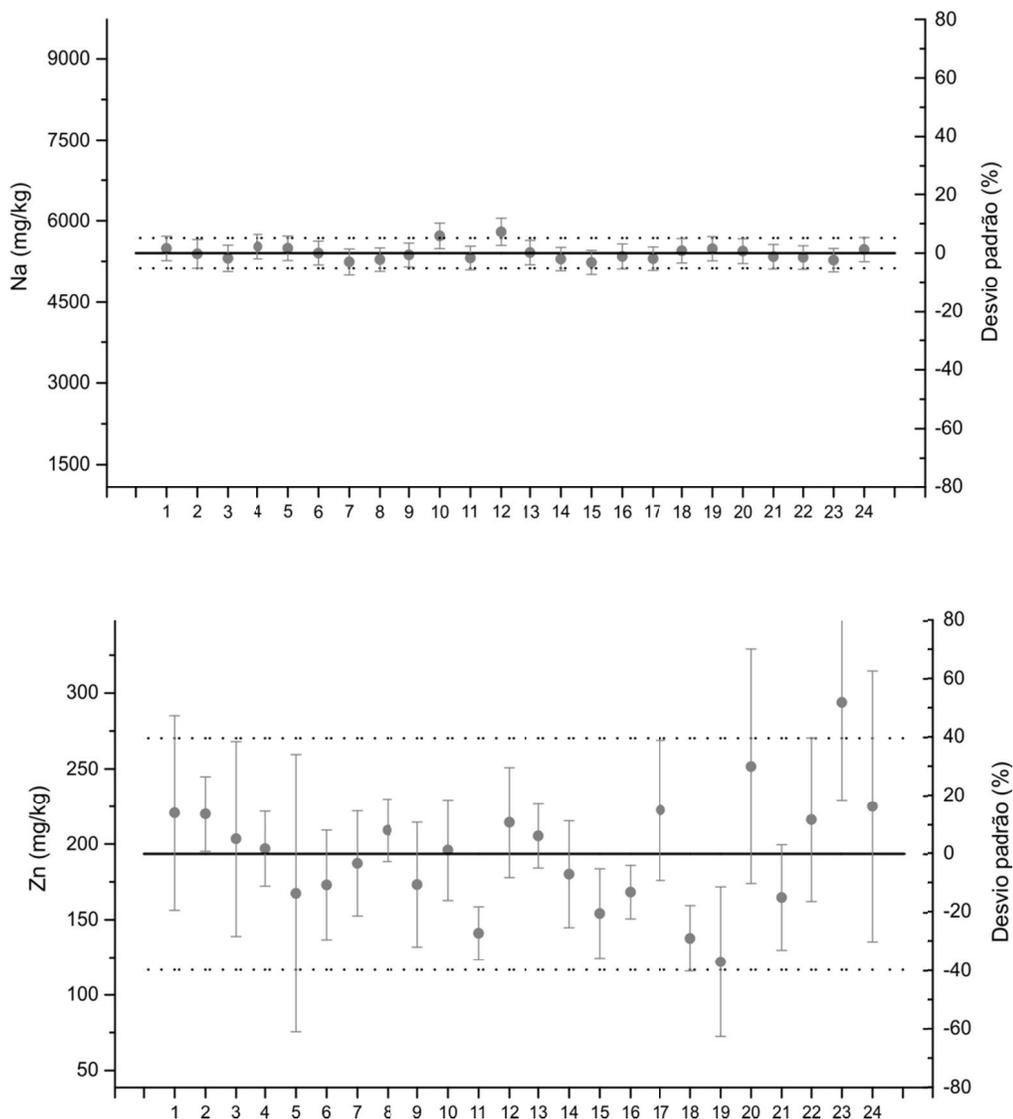


Figura 4.21 - Resultados de concentração de Na e Zn obtidos por LS-NAA nas amostras dos 24 sacos de ração do mesmo lote de fabricação. A linha cheia representa a média e as linhas pontilhadas representam um intervalo de duas vezes o desvio padrão analítico. As barras de erro são a incerteza expandida ($k=2$)

Por NAA convencional (Tabela 4.6), Ca, Na e Zn, apresentaram desvio padrão mais elevado do que a variação analítica. Assim como para LS-NAA, isso representa variação na composição das amostras para esses elementos. A variação entre amostras calculada para Na foi pequena (1,1%) e semelhante à observada para LS-NAA (1,3%). As variações entre amostras obtidas para Ca e Zn foram maiores, respectivamente 4,7% e 14,6%, e também concordantes com os valores conseguidos por LS-NAA, ou seja, 5,1% e 15,8%. Portanto, as variações entre amostras calculadas para os resultados de NAA convencional corroboram os dados

obtidos para LS-NAA, sendo a variação de Ca e Zn entre os sacos confirmada por dois experimentos independentes. Ainda, pode-se afirmar que não foram observadas variações significativas nos resultados pelo uso da menor porção analítica.

Tabela 4.6 - Resultados de concentração (mg/kg) dos elementos químicos obtidos por NAA convencional, para porções de 350 mg tomadas dos 24 sacos de ração de um mesmo lote de produção, mostrando média, desvio padrão, variação analítica estimada pela combinação de incertezas, e valor calculado para a variação entre amostras (em %), conforme detalhado por Hogewoning e Bode (2000)

	Br	Ca	K	Na	Zn
Média (n=24)	9,64	16000	7450	4920	188
Desvio padrão (n=24)	0,11	879	307	79	28
Variação analítica	0,15	462	350	58	5
Variação entre amostras (%)	-	4,7	-	1,1	14,6

4.4 Composição centesimal

4.4.1 Qualidade da determinação analítica

A Tabela 4.7 mostra os resultados médios (%) de composição nutricional obtidos e os valores de referência advindos do ensaio de proficiência em análise de farinha de soja (BRASIL, 2013), assim como seus respectivos coeficientes de variação. Os componentes avaliados foram umidade, proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta e matéria mineral (cinzas). Os resultados de fibra bruta foram os que mais variaram (CV=10,7 %) em relação à média (4,44 %), com um valor mínimo de 3,93 % e máximo de 5,37 %. A umidade foi a que apresentou o menor desvio (0,1 %), apesar da maior discrepância com relação ao valor de referência, com desvio de 26 %. De modo geral, os resultados obtidos estão coerentes com os valores de referência da farinha de soja, podendo-se demonstrar a qualidade do procedimento analítico adotado na avaliação da composição nutricional para as rações de cães.

Tabela 4.7 - Resultados médios (%) de composição nutricional obtidos e de referência em farinha de soja

	<i>Valor de referência</i>		<i>Valor Obtido</i>	
	<i>Média</i>	<i>CV %</i>	<i>Média</i>	<i>CV %</i>
Umidade	13,5	26	5,8	0,1
Proteína bruta	40,0	5,0	37,7	0,6
Matéria mineral (cinzas)	4,92	10	4,62	3,0
Extrato etéreo	10,2	42	12,5	5,0
Fibra bruta	4,08	25	4,44	10,7

Os valores máximos e mínimos dos parâmetros da qualidade a que devem obedecer os alimentos completos eram estabelecidos pela Instrução Normativa nº 9, de 9 de julho de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003). Essa normativa foi revogada pela Instrução Normativa nº 30, de 5 de agosto de 2009 (BRASIL, 2009), que apresenta regras bastante detalhadas quanto à rotulagem, o que é permitido ou vedado, porém, não contém mais definições dos teores nutricionais ou contaminantes que identifiquem e qualifiquem os alimentos completos para animais de companhia (CARCIOFI, 2014). Sendo assim, apenas para fins de comparação, no presente trabalho foram considerados os valores dos parâmetros nutricionais para alimentos secos completos destinados a cães conforme assegurados na antiga Instrução Normativa nº 9.

As Tabelas 4.8 e 4.9 mostram os valores máximo e mínimo obtidos, respectivamente, nas rações para cães adultos e rações para cães filhotes (Tabela 4.9). Também estão inseridos os valores de referência estabelecidos pelo MAPA (BRASIL, 2009).

Tabela 4.8 - Valores obtidos dos parâmetros da qualidade nas rações para cães adultos e os valores de referência estabelecidos pelo MAPA (BRASIL, 2009).

Máx = máximo; Mín = mínimo

Níveis de garantia (%)	Limite	Mín.	Máx.	Média	DP	CV%
Umidade (máx.)	12,0	5,7	19,1	8,9	2,9	32,3
Proteína bruta (mín.)	16,0	16,2	32,3	23,2	4,3	18,6
Extrato etéreo (mín.)	4,5	6,4	19,9	11,7	3,2	27,4
Fibra bruta (máx.)	6,5	2,2	9,2	4,5	2,1	46,4
Matéria mineral (máx.)	12,0	4,5	11,1	7,3	1,8	24,9

Tabela 4.9 - Valores obtidos dos parâmetros da qualidade nas rações para cães em crescimento e os valores de referência estabelecidos pelo MAPA (BRASIL, 2009). Máx = máximo; Mín = mínimo

Níveis de garantia (%)	Limite	Mín.	Máx.	Média	DP	CV%
Umidade (máx.)	12,0	4,1	19,1	8,3	3,5	41,7
Proteína bruta (mín.)	22,0	23,2	34,4	29,8	3,3	11,2
Extrato etéreo (mín.)	7,0	7,7	21,8	14,5	4,4	30,5
Fibra bruta (máx.)	6,0	1,6	5,1	3,4	0,9	26,3
Matéria mineral (máx.)	12,0	5,4	9,8	7,4	1,2	16,7

4.4.2 Umidade

De acordo com Case et al. (2011), alimentos completos para cães do tipo seco contêm cerca de 6 % a 10 % de umidade e 90 % ou mais de matéria seca. No Brasil, o limite máximo de umidade preconizado pela legislação (BRASIL, 2009) é de 12 %. Nas rações para cães adultos, a umidade variou entre 5 % e 19 %. Na Figura 4.22, observam-se duas marcas acima do limite permitido, com teores de umidade de 19 % (ração 4) e 17 % (ração 10). O teor de umidade obtido nas rações para cães filhotes variou de 4 % a 19 %. Houve também duas marcas (6 e 7) que

apresentaram umidade acima do valor máximo, com valores de 19 % e 15 %, respectivamente (Figura 4.23).

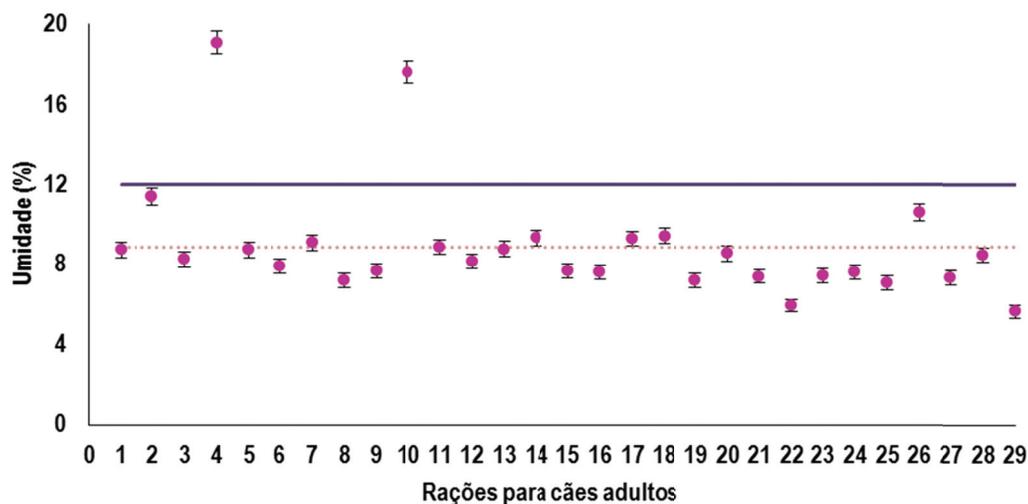


Figura 4.22 - Gráfico mostrando o teor de umidade nas amostras de ração para cães adultos. Os pontos em rosa indicam o teor de umidade médio obtido nas rações (n=3). A linha tracejada rosa representa a média geral das rações para cães adultos. A linha roxa é o limite máximo de umidade permitido nas rações (BRASIL, 2009)

O teor de umidade é uma das medidas mais importantes na análise de alimentos (GOMES; OLIVEIRA, 2013), pois influencia diretamente qualidade, estabilidade e composição do produto (CECCHI, 2013). Do ponto de vista da qualidade, o excesso de umidade na ração pode favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias prejudiciais à saúde dos cães, diminuindo o tempo de prateleira (MURAKAMI, 2010). Além disso, acarreta diluição dos nutrientes presentes na ração, reduzindo proporcionalmente seu valor nutritivo (MURAKAMI, 2010). Por outro lado, a umidade abaixo de 10 % pode alterar a palatabilidade e, conseqüentemente, diminuir o consumo da ração pelo animal (MARRARI, 2014).

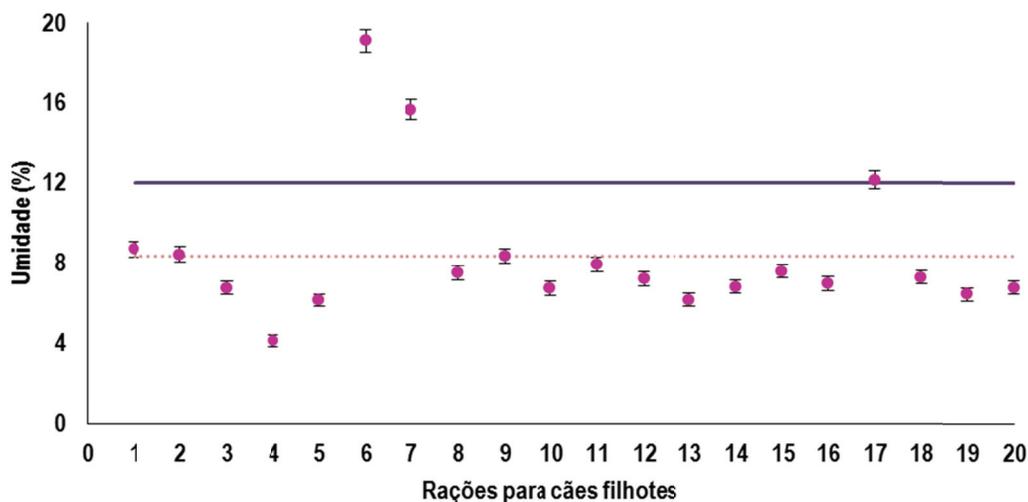


Figura 4.23 - Gráfico mostrando o teor de umidade nas amostras de ração para cães filhotes. Os pontos em rosa indicam o teor de umidade médio obtido nas rações (n=3). A linha tracejada rosa representa a média geral das rações para filhotes. A linha roxa é o limite máximo permitido de umidade nas rações (BRASIL, 2009).

4.4.3 Proteína bruta

Todas as rações avaliadas apresentaram teor de proteína acima do limite mínimo exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2009), ou seja, 16 % nas rações para cães adultos e 22 % nas rações para filhotes. Os teores de proteína obtidos variaram de 16 % a 32 % nas rações para adultos (Figura 4.24) e de 23 % a 34 % nas rações para filhotes (Figura 4.25).

De acordo com a Association of American Feed Control Officials (AAFCO), que é o órgão mais importante na regulação comercial de *pet foods* nos Estados Unidos e internacionalmente (CASE et al., 2011), cães necessitam de elevados níveis dietéticos de proteínas, com um mínimo de 18 % para cães adultos e 22,5 % para filhotes (AAFCO, 2014). Esses valores são referenciados para rações do tipo seca.

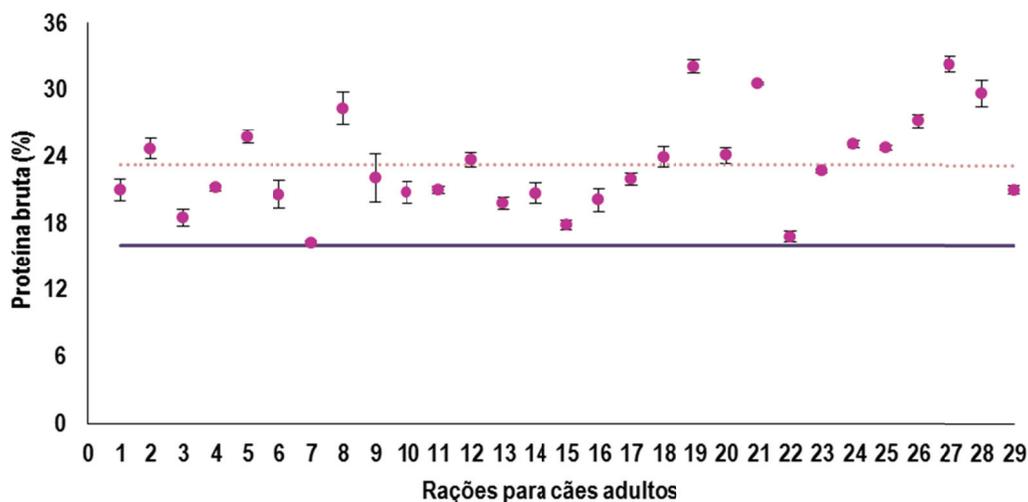


Figura 4.24 - Gráfico mostrando o teor de proteína nas amostras de ração para cães adultos. Os pontos em rosa indicam o teor médio de proteína obtido nas rações (n=3). A linha tracejada rosa é a média geral das rações para adultos. A linha roxa é o limite mínimo permitido de proteína nas rações (BRASIL, 2009)

Considerando os valores de referência da AAFCO, na Figura 4.24 observam-se três rações para cães adultos que apresentaram valores ligeiramente abaixo do limite mínimo permitido, com teores de proteína de 16,2 % (ração 7), 16,8 % (ração 22) e 17,8 % (ração 15). Duas dessas rações são classificadas no segmento econômico. Segundo dados da literatura, o teor de proteína em rações secas pode variar de 18 % a 32 %, dependendo da qualidade da ração (CASE et al., 2011). A terceira ração que apresentou valor abaixo do limite mínimo permitido pela AAFCO é uma ração coadjuvante ao tratamento de insuficiência renal em cães e possui conteúdo protéico reduzido, a fim de diminuir a sobrecarga renal (NRC, 2006). Todas as rações para filhotes estiveram em conformidade com o limite da AAFCO.

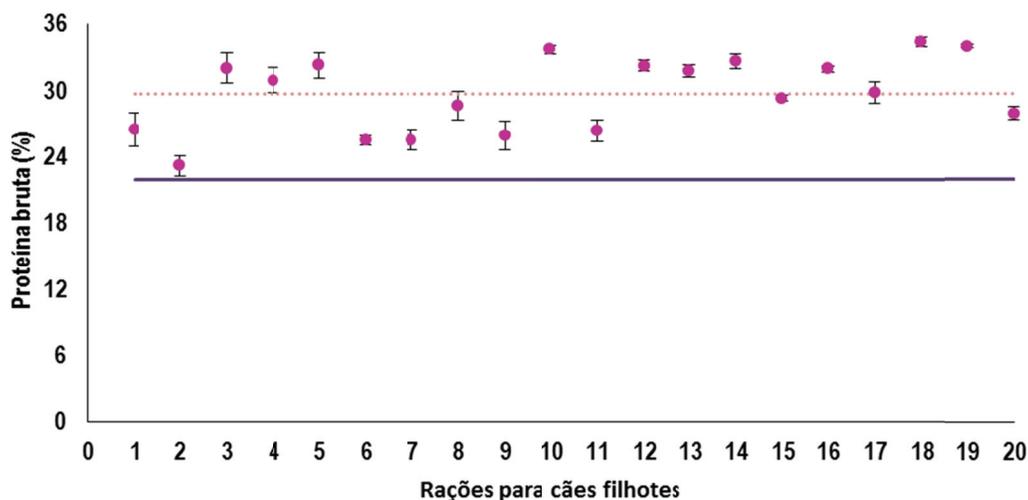


Figura 4.25 - Gráfico mostrando o teor de proteína nas amostras de ração para cães filhotes. Os pontos em rosa indicam o teor médio de proteína obtido nas rações (n=3). A linha tracejada rosa é a média geral das rações para filhotes. A linha roxa é o limite mínimo permitido de proteína nas rações (BRASIL, 2009)

Além da quantidade de proteína, também deve ser considerada a sua qualidade nutricional (CASE et al., 2011). As rações *super premium* são, normalmente, formuladas com proteínas de origem animal e vegetal de alta qualidade, possuindo ótimo aproveitamento pelo animal (SILVA et al., 2010). Por sua vez, as rações da categoria econômica empregam matérias primas de qualidade inferior (os subprodutos) na sua formulação, diminuindo assim a qualidade da proteína na ração, uma vez que não são digeríveis pelo animal e não agregam qualquer valor nutricional à dieta (SILVA et al., 2010; CASE et al., 2011).

4.4.4 Extrato etéreo com hidrólise ácida

Em rações, a legislação brasileira aponta a necessidade de determinar o teor de extrato etéreo com hidrólise ácida prévia. Também assegura o valor nutricional mínimo de 4,5 % em rações para cães adultos e 7,0 % em rações destinadas a filhotes (BRASIL, 2009). Seguindo esses padrões, 100 % das rações avaliadas estavam em conformidade com o teor de extrato etéreo recomendado (Figuras 4.26 e 4.27).

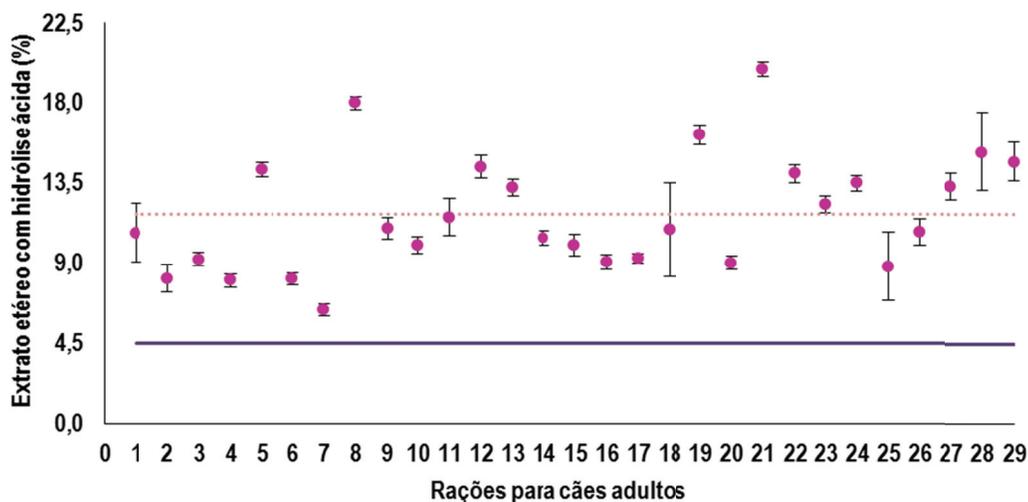


Figura 4.26 - Gráficos mostrando o teor de extrato etéreo com hidrólise ácida nas amostras de ração para cães adultos. Os pontos em rosa indicam o teor médio do extrato etéreo obtido nas rações (n=3). A linha tracejada rosa é a média geral das rações para adultos. A linha roxa é o limite mínimo permitido de extrato etéreo nas rações (BRASIL, 2009).

Na European Pet Food Industry Federation (FEDIAF), órgão regulamentador da União Européia, o teor mínimo de extrato etéreo nas rações é de 5,5 % para cães adultos e 8,5 % para cães filhotes (FEDIAF, 2011), corroborando os valores da AAFCO (2014) e NRC (2006).

Ao comparar os limites entre as legislações internacionais e a nacional, verifica-se uma diferença de 1,0 % e 1,5 % a menos nas rações brasileiras com relação ao teor de gordura, respectivamente para adultos e filhotes. Porém, com exceção da ração 6 para filhote, com 7,7 % de gordura (Figura 4.27), todas apresentaram valores em acordo com a legislação internacional. As gorduras na dieta dos animais são utilizadas como excelente fonte de energia e ácidos graxos essenciais (NRC, 2006). Além disso, contribuem para a melhora da palatabilidade e a textura da ração (CASE et al., 2011).

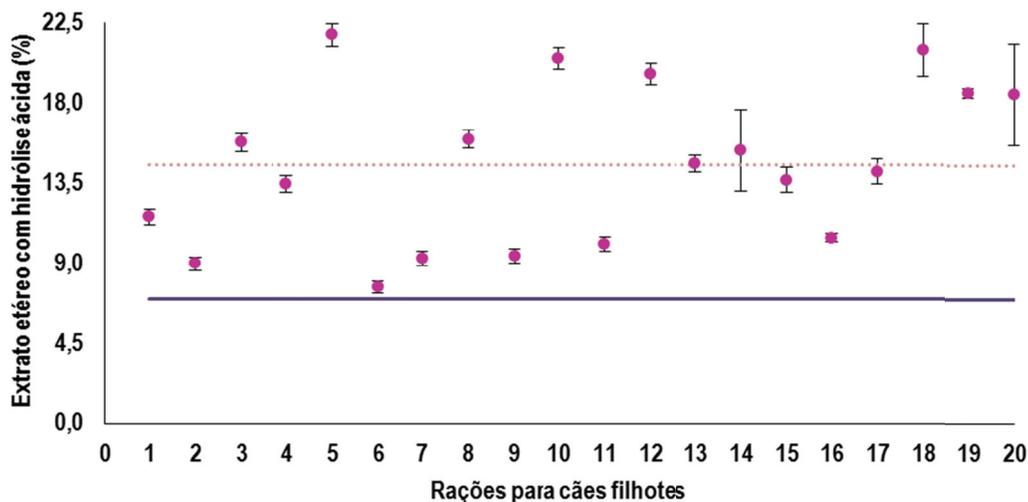


Figura 4.27 - Gráficos mostrando o teor de extrato etéreo com hidrólise ácida nas amostras de ração para cães filhotes. Os pontos em rosa indicam o teor médio do extrato etéreo obtido nas rações (n=3). A linha tracejada rosa é a média geral das rações para filhotes. A linha roxa é o limite mínimo permitido de extrato etéreo nas rações (BRASIL, 2009)

4.4.5 Extrato etéreo

Como citado anteriormente, a determinação de gordura em produtos extrusados requer o tratamento ácido prévio à extração com éter, caso contrário, resultará em subestimação do teor de extrato etéreo (NRC, 2006). As Tabelas 4.10 e 4.11 mostram os valores obtidos pelas duas metodologias de extração de gordura nas rações para cães adultos e filhotes.

Tabela 4.10. Teor médio de extrato etéreo com e sem hidrólise ácida nas rações avaliadas para cães adultos (n=3)

	Marca comercial	EEA (%)*	EE (%)**
1	Alpo	10,7	6,2
2	Big Boss	8,1	4,1
3	Champ	9,2	4,6
4	Deli Dog	8,0	5,5
5	Dog Chow	14,2	8,8
6	Dog Show	8,1	5,3
7	Dunga	6,4	5,5
8	Eukanuba	18,0	15,0
9	Faro Premium	10,9	7,0
10	Frolic	10,0	7,1
11	Herói	11,6	7,4
12	Hill's	14,4	10,2
13	Kanina	13,2	9,0
14	Kazuu	10,4	6,6
15	Lester	10,0	6,0
16	Lider Chips	9,1	5,9
17	Nero	9,3	5,2
18	Pedigree Equilíbrio Natural	10,9	6,2
19	Pedigree Expert	16,2	13,3
20	Pedigree	9,0	4,5
21	Premier	19,9	15,0
22	Royal Canin - Renal Canine	14,0	12,8
23	Sabor e Vida	12,3	8,6
24	Golden	13,5	9,6
25	Max	8,8	4,2
26	Beneful	10,7	6,8
27	Equilíbrio	13,3	9,5
28	Pro Plan	15,3	11,5
29	Royal Canin Indoor	14,7	10,9

* EEA - extrato etéreo com hidrólise ácida; **EE - extrato etéreo

Conforme esperado, teores de gorduras mais elevados foram encontrados com a metodologia de extrato etéreo com hidrólise ácida para ambos os tipos de rações, adultos e filhotes. A literatura cita que o tratamento ácido prévio proporciona a quebra das ligações químicas dos complexos lipídicos, permitindo a extração total dessas moléculas (AOAC, 2006; PERES et al., 2011). Além disso, os valores obtidos pela hidrólise ácida são condizentes com os limites assegurados pelas legislações (NRC, 2006; BRASIL, 2009; FEDIAF, 2011; AAFCO, 2014).

Tabela 4.11. Teor médio de extrato etéreo com e sem hidrólise ácida nas rações avaliadas para cães filhotes (n=3)

	Marca comercial	EEA (%)*	EE (%)**
1	Alpo	11,6	6,1
2	Champ	9,0	5,0
3	Dog Chow	15,8	9,4
4	Dog Excellence	13,4	8,8
5	Eukanuba	21,8	18,3
6	Faro Premium	7,7	5,2
7	Frolic	9,3	6,1
8	Hill's	16,0	14,0
9	Pedigree Equilíbrio Natural	9,4	6,0
10	Pedigree Expert	20,5	15,9
11	Pedigree	10,1	5,9
12	Premier	19,6	14,7
13	Club Performance	14,6	10,5
14	Special Dog Vegetais	15,3	11,2
15	Golden	13,7	9,8
16	Max	10,4	6,4
17	Beneful	14,1	10,3
18	Equilíbrio	21,0	17,4
19	Pro Plan	18,6	14,9
20	Royal Canin Indoor	18,5	14,8

* EEA - extrato etéreo com hidrólise ácida; **EE - extrato etéreo

A Figura 4.28 mostra a relação linear observada entre o teor de extrato etéreo determinado com e sem hidrólise ácida ($R^2 = 0,9077$), indicando correlação entre os resultados das duas metodologias.

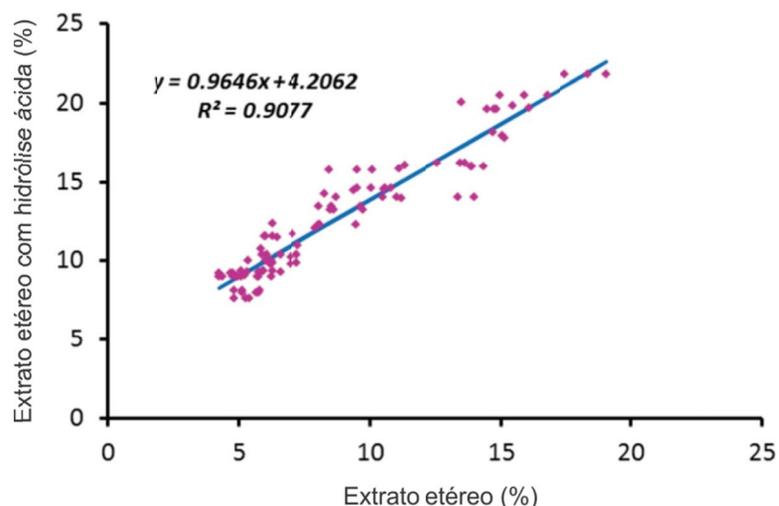


Figura 4.28 - Gráfico de dispersão para os teores de extrato etéreo (%) com e sem hidrólise ácida determinados nas rações (n=102)

A Tabela 4.12 apresenta o resultado da análise estatística de regressão entre os valores obtidos pelas duas metodologias, tomando o teor de extrato etéreo como variável independente. Os valores P, bem abaixo do limite de significância considerado (95 % de confiança), demonstram uma relação linear altamente significativa entre as duas variáveis. Cabe destacar, ainda, que o coeficiente de interseção indica que, em média, a realização de hidrólise ácida permitiu a extração de 4,21% de gordura a mais, porção não removida pela metodologia de extrato etéreo sem o tratamento ácido prévio. Por sua vez, o coeficiente angular de $0,965 \pm 0,031$ demonstra que, fora a maior eficiência na extração de gordura, houve uma concordância bastante razoável entre as metodologias, com desvio sistemático relativo de aproximadamente 3,5 %.

Tabela 4.12. Resultado da análise de regressão para extrato etéreo com hidrólise ácida em função de extrato etéreo (n=102)

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>Valor P</i>
Interseção	4,21	0,30	13,86271	$9,69 \times 10^{-25}$
Angular	0,965	0,031	30,89162	$5,41 \times 10^{-52}$

4.4.6 Fibra Bruta

Existem vários métodos analíticos disponíveis para a caracterização da fração fibrosa em alimentos para cães (OPITZ et al., 1998, OLIVEIRA et al., 2011). Atualmente, a determinação da fibra dietética vem sendo a mais empregada comparada à fibra bruta (CECCHI, 2013). No entanto, o teor de fibra em alimentos destinados a animais é determinado pelos métodos de fibra bruta, fibra em detergente neutro, entre outros (NRC, 2006). Por esse motivo, os valores obtidos aqui se referem ao teor de fibra bruta.

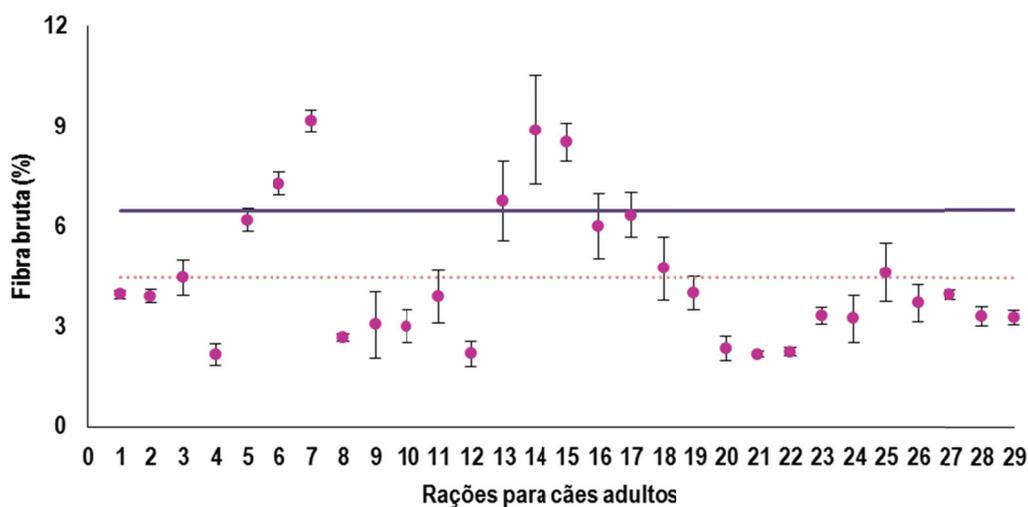


Figura 4.29 - Gráfico mostrando o teor de fibra nas amostras de ração para cães adultos. Os pontos em rosa indicam o teor médio de fibra obtido nas rações (n=3). A linha tracejada rosa é a média geral das rações para filhotes. A linha azul é o limite máximo permitido de fibra nas rações (BRASIL, 2009)

A legislação brasileira estabelece o valor máximo de fibra de 6,0 % para cães filhotes e 6,5 % para cães adultos (BRASIL, 2009). Como se visualiza na Figura 4.29, cinco rações para cães adultos estiveram acima do limite máximo de tolerância, sendo que todas elas são classificadas no segmento econômico. Por outro lado, todas as rações de filhotes indicaram valores de acordo com a legislação (Figura 4.30). Em adição, considerando o limite máximo da AAFCO (2014), que é de 4,0 % para adultos e filhotes, cerca de 38 % das rações para cães adultos e 20 % das rações para filhotes não atendem ao limite internacional.

Fibras não são essenciais aos cães, mas a inclusão de quantidades adequadas na dieta torna-se necessária para o funcionamento normal e saudável do trato gastrointestinal. Além disso, o excesso ou a falta de fibras pode comprometer a qualidade das fezes dos cães (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012). A quantidade de fibra nas rações varia de acordo com o tipo de ingrediente que foi adicionado (CASE et al., 2011), por exemplo, os farelos vegetais (farelos de arroz, trigo e soja) que são ricos em fibras podem elevar a concentração na ração (CARCIOFI et al., 2006).

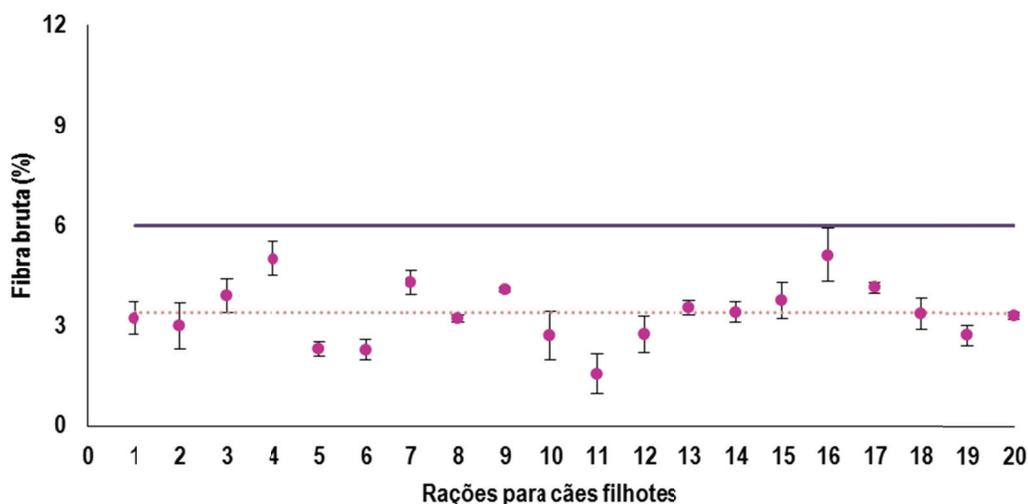


Figura 4.30 - Gráfico mostrando o teor de fibra nas amostras de ração para cães filhotes. Os pontos em rosa indicam o teor médio de fibra obtido nas rações (n=3). A linha tracejada rosa é a média geral das rações para filhotes. A linha roxa é o limite máximo permitido de fibra nas rações (BRASIL, 2009)

4.4.7 Matéria Mineral (cinzas)

Para a matéria mineral, as rações mostraram teores variando entre 4,5 % e 11,0 % nas rações para cães adultos e 5,4 % a 9,8 % nas rações para filhotes (Figuras 4.31 e 4.32), todas atendendo o limite máximo de 12 % do MAPA (BRASIL, 2009).

O excesso de matéria mineral pode diminuir a digestibilidade do alimento, devido à redução no teor de matéria orgânica na ração (CARCIOFI, 2009), e levar ao aumento dos elementos Ca, P e Mg na composição, quando a procedência for de origem animal, ou de Si, quando for de origem vegetal, sendo em ambos os casos incompatíveis com a nutrição ideal dos cães (CARCIOFI, 2008).

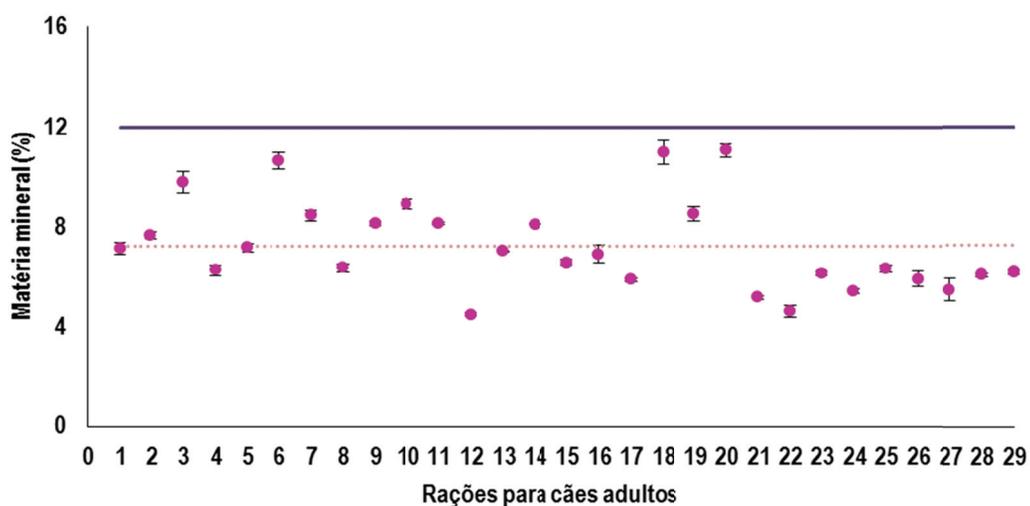


Figura 4.31 - Gráficos mostrando o teor de matéria mineral (cinzas) nas amostras de ração para cães adultos. Os pontos em rosa indicam o teor médio de cinzas obtido nas rações (n=3). A linha tracejada rosa é a média geral das rações para filhotes. A linha roxa é o limite mínimo permitido de cinzas nas rações (BRASIL, 2009)

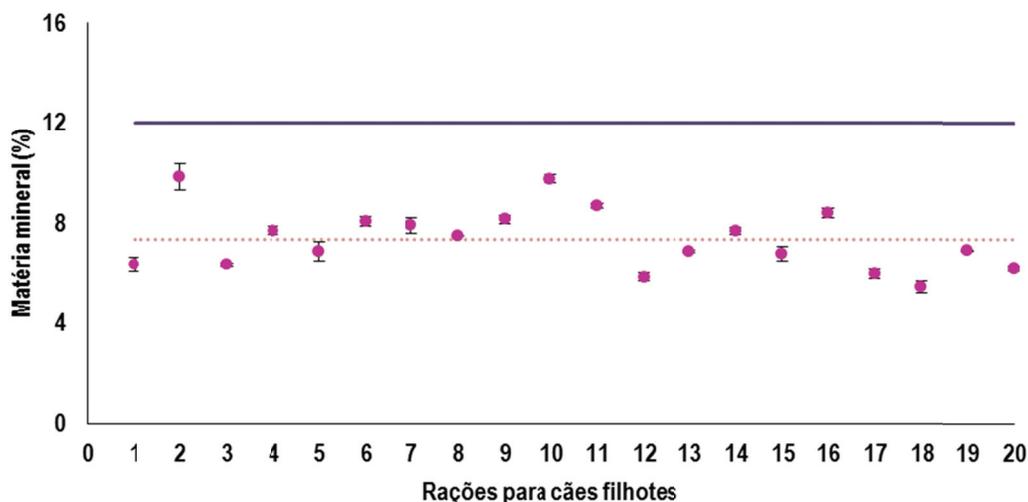


Figura 4.32 - Gráficos mostrando o teor de matéria mineral (cinzas) nas amostras de ração para cães filhotes. Os pontos em rosa indicam o teor médio de cinzas obtido nas rações (n=3). A linha tracejada rosa é a média geral das rações para filhotes. A linha roxa é o limite mínimo permitido de cinzas nas rações (BRASIL, 2009)

4.4.8 Energia Metabolizável

A energia metabolizável (EM) de uma ração representa a quantidade de energia disponível para o animal (CASE et al., 2011). A EM pode ser determinada através de ensaios *in vivo* ou por meio de cálculos matemáticos padronizados, com base nas frações analisadas de proteína, carboidrato e gordura no alimento (CASTRILLO et al., 2009), levando em consideração as perdas de energia que ocorrem na urina e nos gases (GRANDJEAN; BUTTERWICK, 2012). Vários estudos vêm sendo realizados com o propósito de estimar o conteúdo da energia metabolizável por meio de cálculos em ração para animais de companhia (KIENZLE, 2002; CARCIOFI et al., 2003; BAZOLLI et al., 2004; PIRES et al., 2014).

Para animais ativos ou animais em lactação, que necessitam de um alto consumo de energia, consegue-se identificar o alimento ideal para satisfazer as exigências nutricionais a partir da energia metabolizável (CASE et al., 2011). Outro ponto relevante é se o conteúdo de EM de uma ração for muito baixo, a quantidade de ração que esse animal precisa para suprir sua necessidade nutricional pode exceder a capacidade física do trato gastrointestinal (CASE et al., 2011).

Dada a importância da energia metabolizável nos alimentos para os animais, ela foi calculada a partir dos valores obtidos na composição nutricional (UM, PB, EEA, FB e MM – Seção 4.4) das rações, por meio de duas equações matemáticas (expressas em kcal por kg do alimento), proposta por Kienzle (2002) e aquela calculada pelos fatores de Atwater (NRC, 2006; CASE et al., 2011).

Para o cálculo da EM de acordo com Kienzle (2002), foram seguidos três passos:

🐾 1º passo: Estimou-se a energia bruta (EB) do alimento

$$EB = (5,73 \times \text{g de PB}) + (9,08 \times \text{g de EE}) + 4,06 \times (\text{g de ENN}^* + \text{g de FB})$$

🐾 2º passo: Estimou-se a digestibilidade de energia (DE) do alimento

$$DE = 91,2 - (1,43 \times \% \text{ FB})$$

🐾 3º passo: Estimou-se a energia metabolizável (EM)

$$EM \text{ kcal/kg} = (EB \times DE/100) - (1,04 \times \text{g de PB})$$

Para o cálculo da EM por Atwater (NRC, 2006; CASE et al., 2011):

$$EM \text{ kcal/kg} = (\text{g de PB} \times 3,5) + (\text{g de EE} \times 8,5) + (\text{g de ENN} \times 3,5)$$

Os resultados para o conteúdo de EM obtidos pelas diferentes equações para rações de cães adultos e filhotes encontram-se nas Figuras 4.33 e 4.34, respectivamente.

Pelos fatores de Atwater, os valores mínimo e máximo nas rações de cães adultos variaram de 2882 kcal/kg a 3976 kcal/kg e na de filhotes de 3501 kcal/kg a 4270 kcal/kg. Cabe ressaltar que a AAFCO recomenda aos fabricantes de ração que reportem os valores de EM nos rótulos das rações através do cálculo da equação de Atwater (CASE et al., 2011).

Pela equação de Kienzle, foram notados valores entre 2905 kcal/kg a 4135 kcal/kg em rações de cães adultos e na de filhotes variando entre 3670 kcal/kg e 4424 kcal/kg. De acordo com Case et al. (2011), o ideal é escolher uma ração que varie entre 3000 kcal/kg e 5000 kcal/kg, dependendo da necessidade do animal.

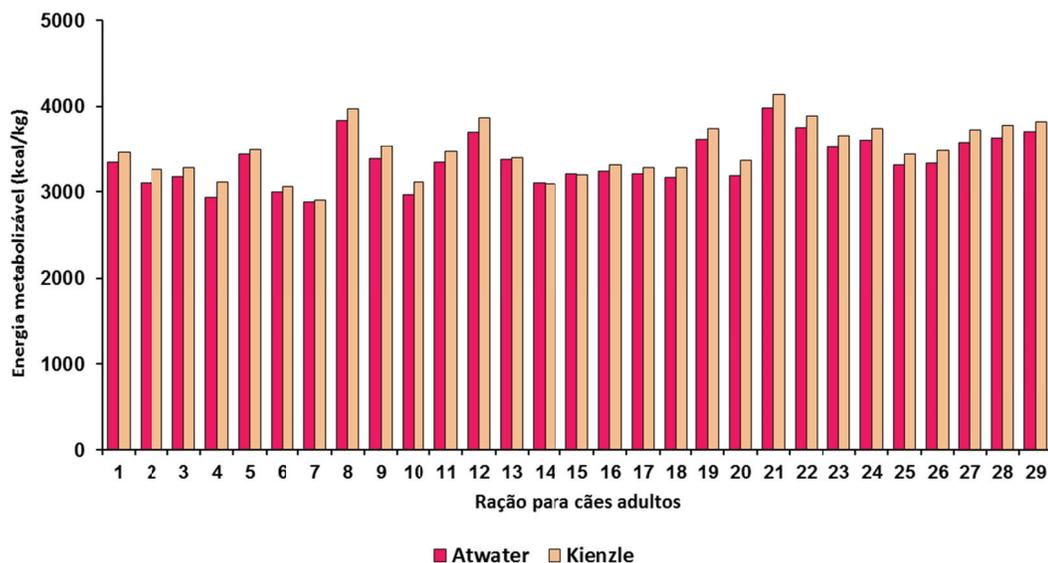


Figura 4.33 - Valores de energia metabolizável (kcal/kg) nas rações para adultos, obtidos por cálculos das estimativas pelos fatores de Atwater e Kienzle

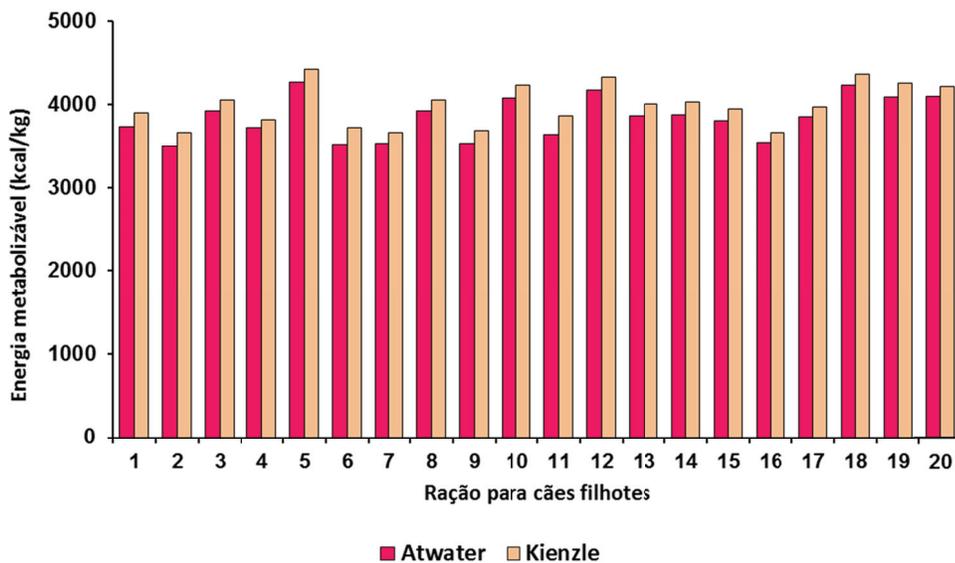


Figura 4.34 - Valores de energia metabolizável (kcal/kg) nas rações para filhotes, obtidos por cálculos das estimativas pelos fatores de Atwater e Kienzle

Valores ligeiramente menores foram alcançados pelos fatores de Atwater, o que inversamente ocorreu para Pires et al. (2014), que obtiveram os menores resultados da EM em rações para cães e gatos pela equação de Kienzle, quando comparados com a equação de Atwater.

No geral, os menores valores foram encontrados para as rações classificadas como econômicas e os maiores valores para as rações do segmento *super premium*. Deve-se levar em consideração no cálculo da EM que rações *super premium* apresentam em sua composição ingredientes de alta qualidade, conferindo maior aproveitamento dos nutrientes, e que ao empregar esses mesmos cálculos para alimentos *premium* e econômicos, podem subestimar o valor da EM para alimentos *super premium* (BAZOLLI et al., 2004). Por outro lado, alimentos que contenham alto conteúdo de fibra (> 8 %) ou proteínas de baixa digestibilidade, o cálculo da EM nesse caso, será ligeiramente superestimada (KIENZLE, 2002; CASTRILLO et al., 2009).

4.5 Análise Estatística

4.5.1 Comparação da composição química elementar dos diferentes segmentos de rações para cães

As rações para cães classificadas como econômica, *premium* e *super premium* mostraram diferenças significativas para os elementos nutricionais Ca, Cl, Cu, I, Mg, Mn, Se e P em nível de 95 % de confiança pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Figuras 4.35 a 4.37), utilizado na comparação de amostras independentes (SAS INSTITUTE, 1996). Cabe lembrar que o teste estatístico foi aplicado aos dados eliminando o efeito causado pelas diferenças das rações para cães adultos e filhotes.

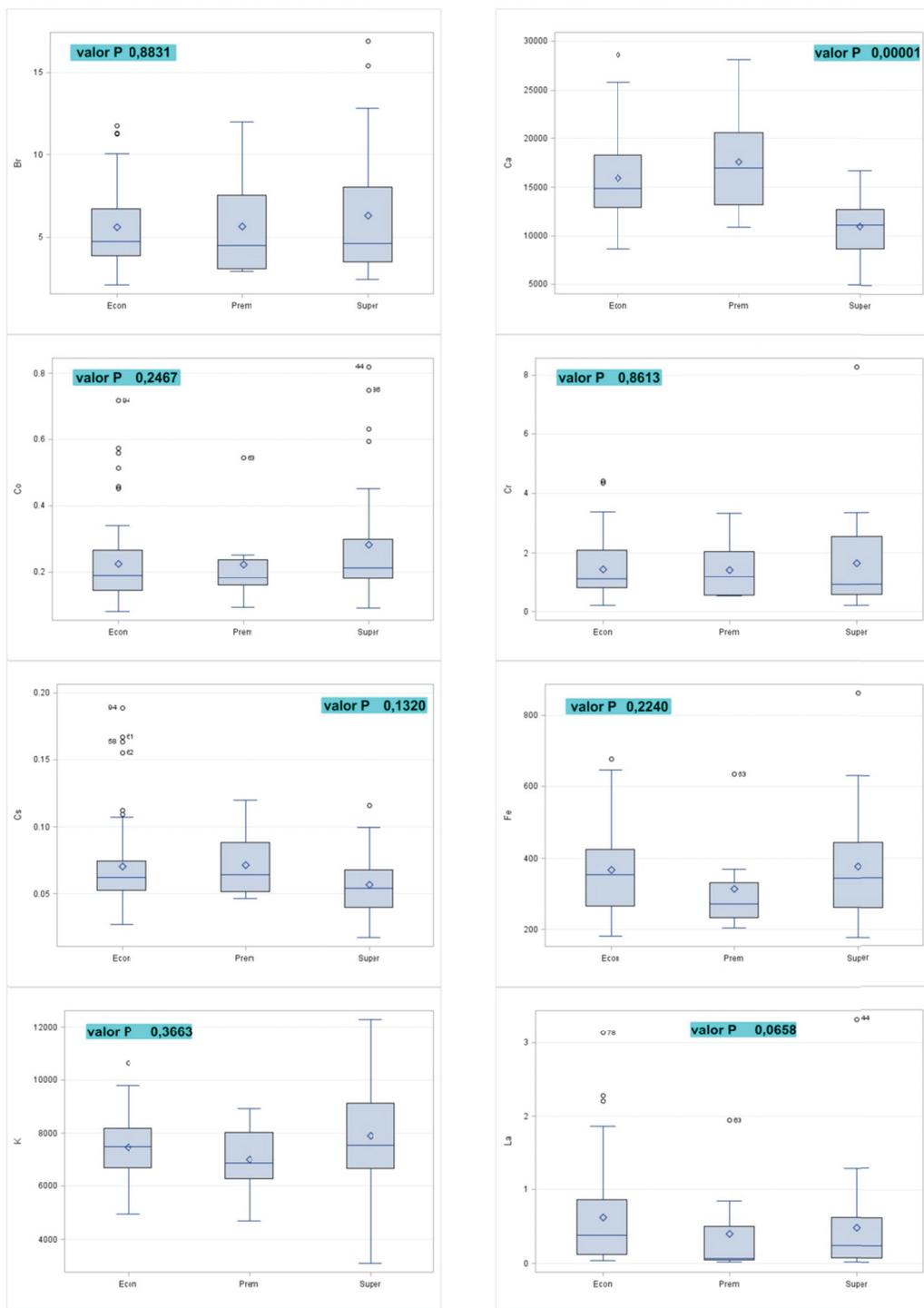


Figura 4.35 - Representação gráfica em boxplot das medianas dos elementos químicos determinados nas rações classificadas como econômicas (Econ), *premium* (Prem) e *super premium* (Super), realizado por meio do teste Kruskal-Wallis

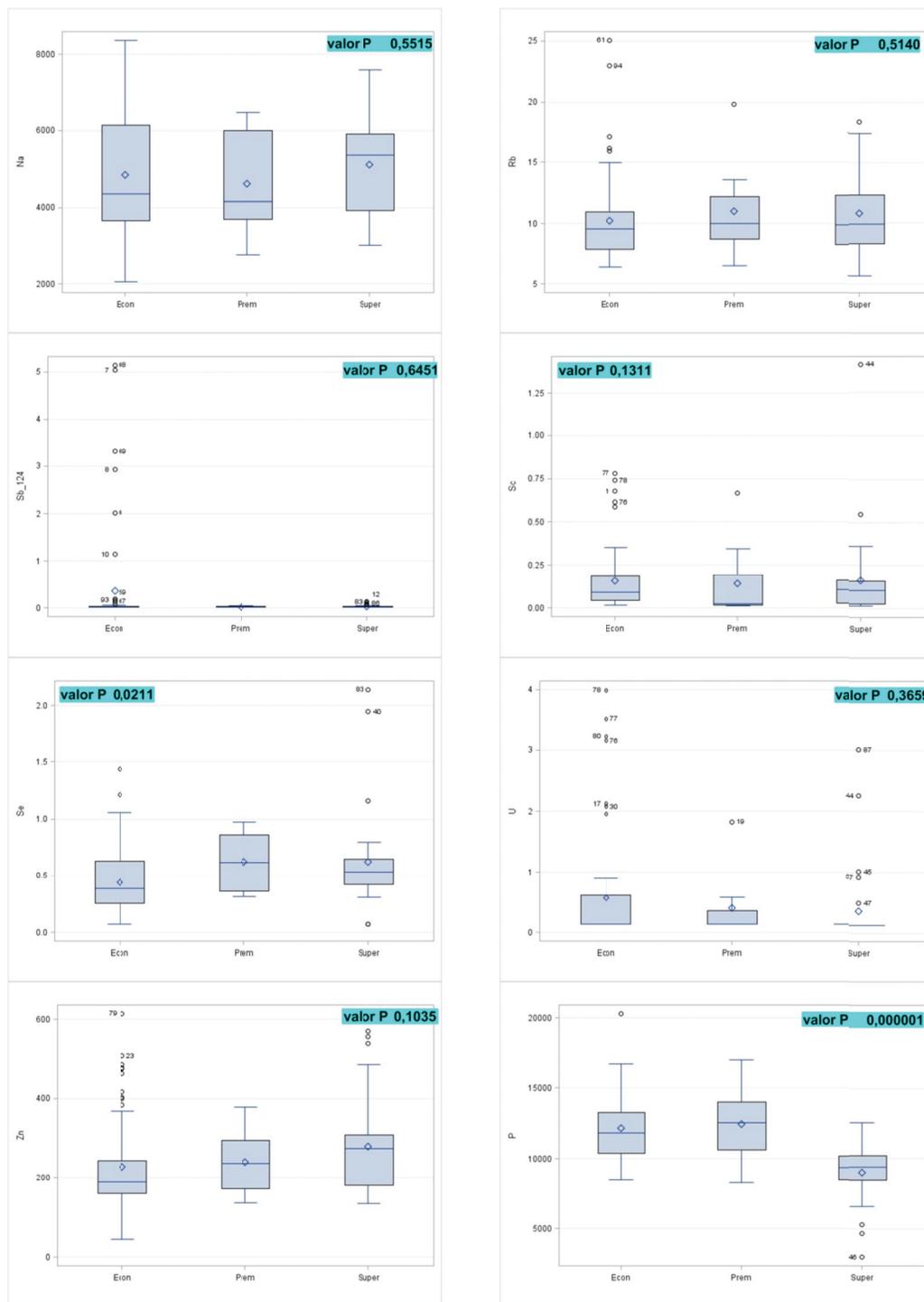


Figura 4.36 - Representação gráfica em boxplot das medianas dos elementos químicos determinados nas rações classificadas como econômicas (Econ), *premium* (Prem) e *super premium* (Super), realizado por meio do teste Kruskal-Wallis

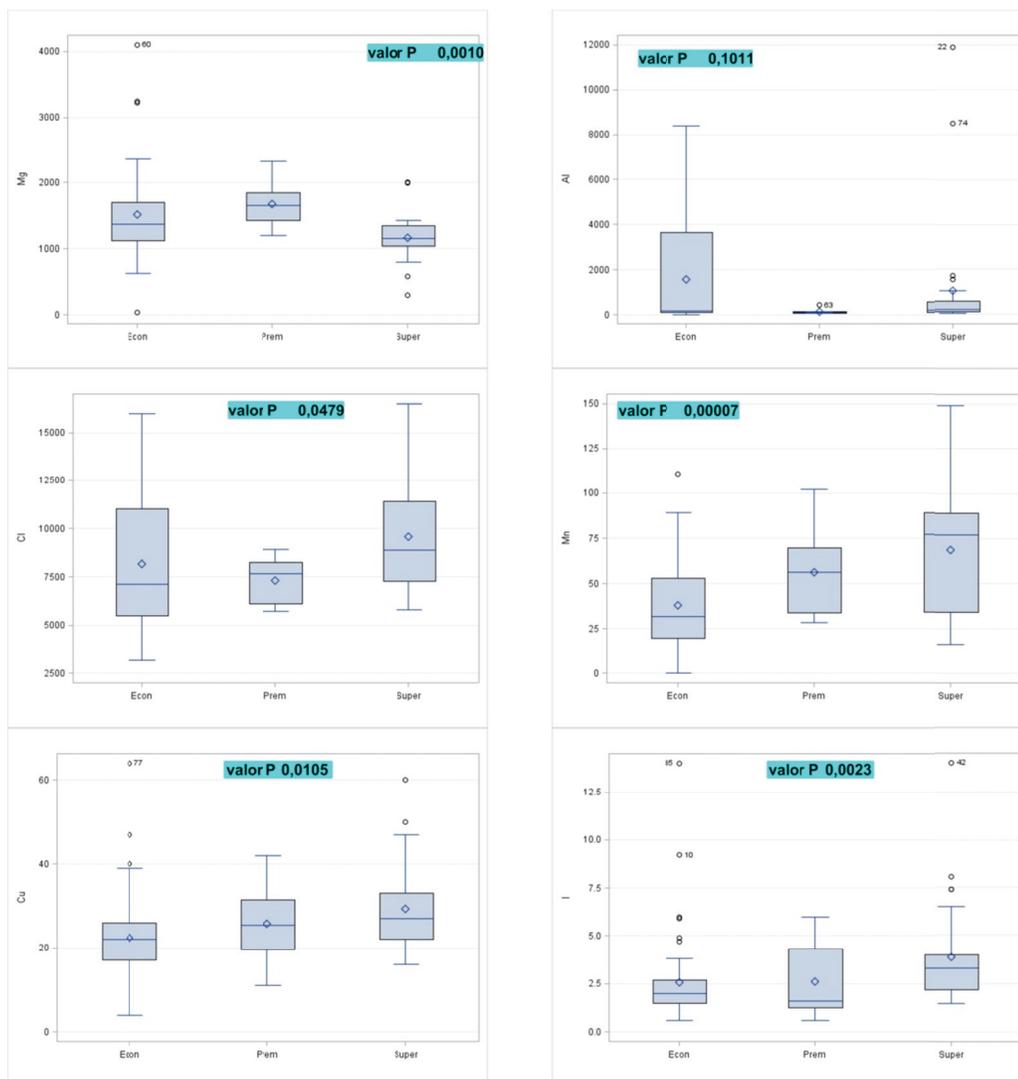


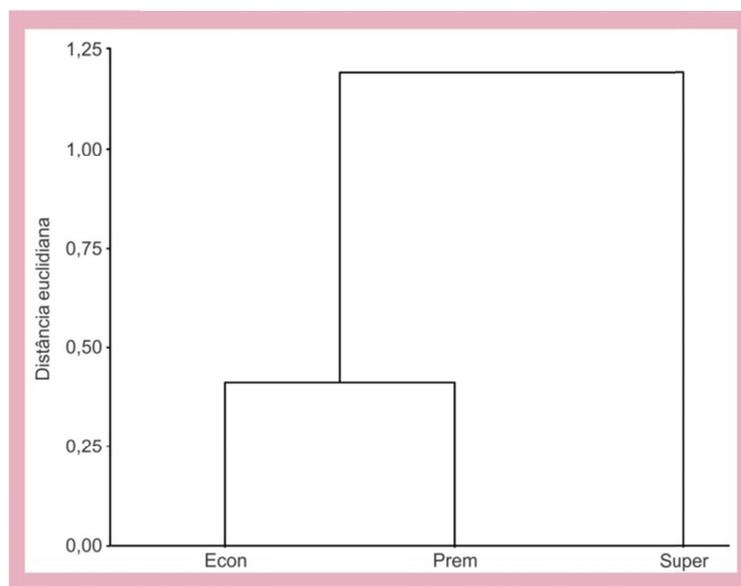
Figura 4.37 - Representação gráfica em boxplot das medianas dos elementos químicos determinados nas rações classificadas como econômicas (Econ), *premium* (Prem) e *super premium* (Super), realizado por meio do teste Kruskal-Wallis

Dos elementos nutricionais, apenas Fe, K, Na e Zn não apresentaram diferença estatística, e também os elementos químicos que não apresentam essencialidade comprovada, como Al, Br, Cr, Co, Cs, La, Rb, Sb, Sc e U.

As diferenças entre as rações econômicas, *premium* e *super premium* são esperadas. Conforme discutido anteriormente, as rações do tipo *super premium* são as mais concentradas e equilibradas, produzidas com proteína animal que auxilia na digestão e absorção dos nutrientes, chegando o seu aproveitamento em torno de 92%. As rações *premium* também são balanceadas, mas em menores

quantidades comparadas às rações *super premium*, uma vez que possuem mais proteína vegetal, o que aumenta a quantidade de ração a ser ingerida. A digestibilidade é em torno de 87 %. As rações econômicas são elaboradas com proteínas mais simples e sua digestibilidade é cerca de 75 %, ou seja, o animal precisa consumir uma quantidade maior de ração para absorver os nutrientes necessários para uma vida saudável (TOTAL ALIMENTOS, 2014).

Por meio da análise de agrupamento, foi obtido um dendrograma construído a partir das concentrações dos elementos químicos em todas as amostras de rações para cães (Figura 4.38). Os resultados apresentam dois grupos principais, um formado pela ração econômica e *premium* e outro pela ração *super premium*, separados principalmente pelos elementos nutricionais, como observado na análise univariada. O primeiro grupo compreende as rações formuladas com ingredientes mais simples, enquanto o segundo grupo, formado pelas rações *super premium*, os ingredientes adicionados são de alta qualidade e promovem uma melhor nutrição ao animal (CARCIOFI et al., 2009).



4.38 - Dendrograma obtido a partir das concentrações de 22 elementos químicos determinados nas 95 amostras de rações para cães classificadas como econômicas (Econ), *premium* (Prem) e *super premium* (Super)

4.6 Bioacessibilidade de cobre nas rações

Os resultados da Tabela 4.13 para as 14 amostras de rações avaliadas mostram as concentrações totais de cobre e suas respectivas incertezas, bem como os resultados da simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*, realizada em triplicata. Os valores obtidos para as rações demonstraram uma bioacessibilidade considerável, ou seja, ao menos 50 % do cobre presente provavelmente encontrava-se sob a forma solúvel em todas as rações. Duas rações para cães adultos classificadas como econômicas apresentaram as maiores concentrações bioacessíveis, com 91 % e 90 %, seguidas das rações do segmento *super premium* para filhote com 81 % e adulto com 80 %, demonstrando a grande importância das rações na dieta dos cães quanto ao fornecimento desse mineral nas ingestões diárias, principalmente para aquelas raças caninas com predisposição genética a desenvolverem hepatopatias associadas ao acúmulo do cobre (HOFFMANN et al., 2009).

Tabela 4.13 - Resultados da bioacessibilidade (n=3) do cobre obtidos pela simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* das rações avaliadas. Econ = Econômica, Prem = *Premium*, Super = *Super premium*

	Ração	Tipo	Concentração (mg/kg)	Inc.	Bioacessibilidade	DP
1	Adulto	Econ.	9,0	1,8	51 %	0,01
2	Adulto	Econ.	34	10	53 %	0,02
3	Adulto	Econ.	31,0	2,5	54 %	0,02
4	Adulto	Econ.	27,0	1,6	62 %	0,01
5	Adulto	Econ.	13,0	1,6	64 %	0,04
6	Adulto	Econ.	12,0	2,4	69 %	0,02
7	Adulto	Econ.	22,0	2,0	71 %	0,04
8	Adulto	Econ.	16,0	1,4	90 %	0,06
9	Adulto	Econ.	18,0	3,2	91 %	0,07
10	Adulto	Prem.	20,0	2,6	63 %	0,02
11	Adulto	Super	60,0	2,4	47 %	0,02
12	Adulto	Super	16,0	1,6	80 %	0,01
13	Filhote	Prem.	35,0	1,8	66 %	0,01
14	Filhote	Super	27,0	2,7	81 %	0,02

Tognon (2012) reportou em arroz e cupuaçu a bioacessibilidade do cobre, chegando a praticamente 100 %. Mazon (2013) analisou em vinhos tinto, branco e espumante e notou que 80 % do cobre presente estava bioacessível. Não foram encontrados valores de concentrações bioacessíveis para cobre em alimentos destinados a animais disponíveis na literatura.

A biodisponibilidade de um elemento depende da capacidade de sua forma físico-química, que está ligada ao sítio de absorção, de ultrapassar a parede intestinal (MAZON, 2013). Normalmente, cerca de 55 % a 75 % do cobre alimentar são absorvidos (KLAASSEN, 2008). A forma química como o cobre se encontra pode inibir a sua absorção a partir do lúmen intestinal, reduzindo sua biodisponibilidade (MAZON, 2013).

4.7 Absorção e metabolismo de cobre e zinco em cães saudáveis

Esse experimento inicialmente deveria ter acontecido em parceria com a Faculty of Veterinary Medicine, da Utrecht University, e com a Delft University of Technology. No entanto, o comitê de ética da Utrecht University não aprovou o experimento envolvendo a aplicação de material radioativo nos cães. Somente a realização de um experimento piloto, com apenas um cão, foi autorizado pelo comitê. Após o experimento, o animal não foi sacrificado.

O experimento piloto objetivou verificar se a utilização de traçadores radioativos, conforme o procedimento planejado, era viável na prática, ou se ajustes seriam necessários. As atividades foram coordenadas pelo doutorando e médico veterinário Ronald Jan Corbee, com participação também da técnica de laboratório Jeannette Wolfswinkel, ambos da Faculty of Veterinary Medicine da Utrecht University e do Prof. Dr. Peter Bode, da Delft University of Technology.

Foram irradiados ZnO e Cu metálico em cápsulas de quartzo no reator nuclear de pesquisa Hoger Onderwijs do RID/TU Delft, a fim de gerar os radioisótopos ^{69m}Zn e ^{64}Cu para posterior administração no cão. Empregou-se ZnO enriquecido no isótopo ^{68}Zn (>99%) para gerar o radioisótopo de interesse (^{69m}Zn), com meia-vida igual a 13,76 h, sem que ocorresse produção significativa do radioisótopo ^{65}Zn , com meia-vida longa (244 dias).

Após a liberação do material radioativo pela equipe de proteção radiológica da TUDelft, adequadamente embalado em recipientes metálicos revestidos com chumbo no interior, ele foi encaminhado para a Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht, localizada a 70 km de Delft, em um tempo total de transporte de cerca de 1 h e 30 min.

O experimento contou com um cão adulto pertencente ao canil da Utrecht University, macho com 4 anos de idade, mestiço da raça Beagle e Bedlington Terriers, conhecida por “Beagletons” (Figura 4.39). O animal recebeu uma dieta balanceada durante o desenvolvimento do experimento. A quantidade de ração fornecida foi adequada para satisfazer as exigências do cão em função do seu nível de atividade e taxa metabólica. A água esteve disponível em todo o momento. Antes de iniciar o experimento, o cão foi submetido a um jejum de 12 h. Assim, na manhã seguinte, foi previamente anestesiado para a fixação de um cateter na veia jugular (pescoço).

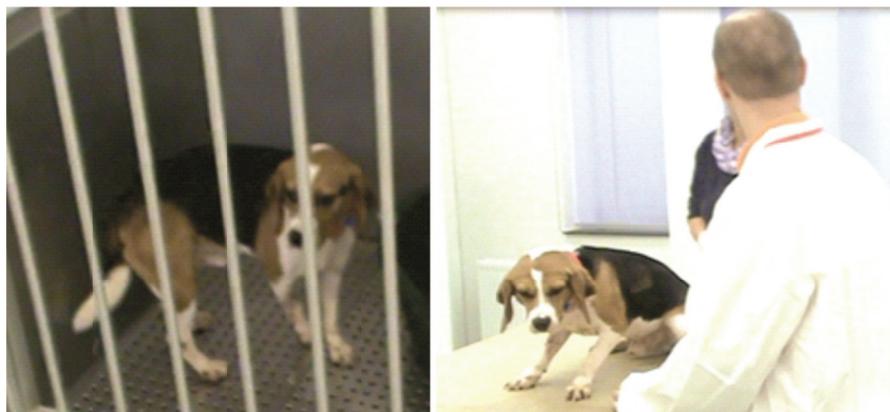


Figura 4.39 - Cão adulto da raça “Beagletons”

Em câmara fechada (*glove-box*), a embalagem contendo o material radioativo foi aberta, sendo os radioisótopos diluídos em solução fisiológica. Antes da aplicação dos radioisótopos no cão, retiraram-se 2 mL de sangue para controle e, em seguida, o cão recebeu as injeções contendo ^{69m}Zn e ^{64}Cu . Foi verificada a radioatividade no animal com um contador Geiger, antes e após a administração dos radioisótopos. A uma distância de 10 cm do cão, o contador marcou 2,13 $\mu\text{Sv/h}$ depois da aplicação, contra 0,10 $\mu\text{Sv/h}$ em medição anterior (Figura 4.40).



Figura 4.40 - Radioatividade medida antes e após a administração dos radioisótopos ^{69m}Zn e ^{64}Cu

Amostras de 2 mL de sangue foram, então, retiradas da veia jugular em tempos de 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 300 e 420 min após a injeção dos radioisótopos (Figura 4.41), sendo utilizados tubos com EDTA 8% para a coleta. Os tubos foram suavemente homogeneizados por inversão, cerca de 6 vezes, para evitar hemólise e coagulação do sangue.

O animal permaneceu no laboratório até 30 min após a administração dos radioisótopos, quando retornou ao canil para descanso, de onde foi retirado para as coletas seguintes. Cabe ressaltar que, apesar do inevitável desconforto causado, o cão não demonstrou sinais de cansaço ou estresse durante o período do experimento.



Figura 4.41 - Coleta de sangue na veia jugular

Posteriormente, os tubos de sangue foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 min para a obtenção do plasma. Em um contador de raios gama, marca Canberra, foi realizada a leitura do plasma para as 15 amostras. A quantificação das contagens ocorreu nas faixas de energias de 439 keV para ^{69m}Zn e de 511 keV para ^{64}Cu como mostra a Figura 4.42. Um problema observado na contagem foi o baixo poder de resolução do detector, o que dificultou a separação dos dois picos que se encontram em energias relativamente próximas.

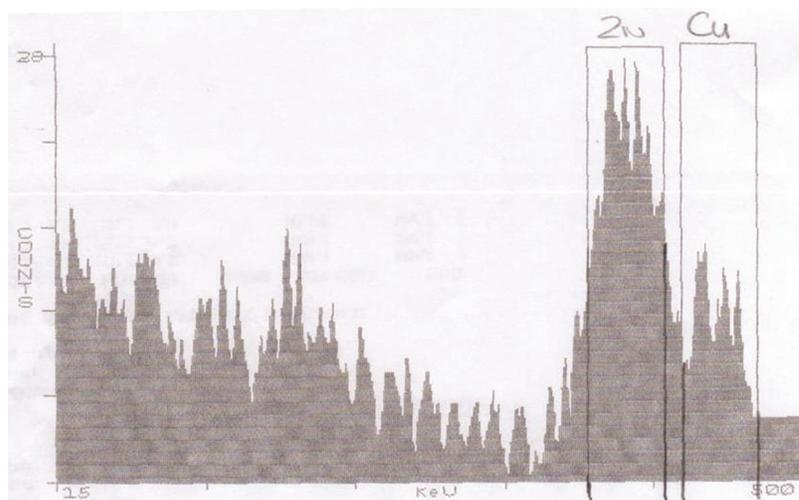


Figura 4.42 - Faixas de energia tomadas para a quantificação, com picos de 439 keV para ^{69m}Zn e de 511 keV para ^{64}Cu

As taxas de contagem obtidas na medição das 15 amostras foram, então, corrigidas para o tempo de decaimento, considerando como referência o momento da aplicação dos dois radioisótopos. Dessa forma, pode-se avaliar a diminuição das atividades de ^{69m}Zn e ^{64}Cu inicialmente aplicadas em função unicamente da ação do metabolismo do cão.

5 CONCLUSÕES

Dentre os estudos realizados, isto é, (I) quantificação dos elementos químicos com função nutricional e elementos com potencial tóxico presentes nas rações para cães, (II) avaliação da composição centesimal das rações amostradas, (III) avaliação da variação dos elementos químicos entre as rações de um mesmo lote de produção (IV), estudo da representatividade de pequenas porções-teste, (V) avaliação da bioacessibilidade de cobre em rações, com experimento *in vitro*, foi possível concluir que:

- ❁ Por meio da INAA, foi possível determinar todos os nutrientes minerais, isto é, Ca, P, K, Na, Cl, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I e Se, com limites estabelecidos pela Association of American Feed Control Officials (AAFCO).
- ❁ Ao menos 32 % das rações para cães adultos e 19 % das rações para filhotes apresentaram valores discrepantes comparados com os valores de referência dos minerais exigidos pela AAFCO.
- ❁ Foram notadas elevadas concentrações de Al, Sb e U, que são elementos com grande potencial tóxico. Assim, evidencia-se a importância de aprofundar o estudo desses três elementos nas rações para cães.
- ❁ A presença dos elementos químicos Sb e Ti nas rações coloridas pode ser atribuída aos corantes adicionados na formulação.
- ❁ A comparação dos resultados obtidos com os valores de referência demonstra conformidade dessas rações avaliadas quanto à composição centesimal, condição importante para a nutrição do animal, embora 16 % dessas amostras para cães adultos e filhotes apresentaram, pelo menos, um parâmetro não conforme.
- ❁ Os dados das metodologias de extrato etéreo com e sem tratamento ácido prévio mostraram forte correlação entre si, sendo que o extrato etéreo com hidrólise ácida produziu resultados mais altos, tendo em vista que permitiu, em média, a extração de 4,21 % de gordura a mais.

- ❁ No caso das rações para cães, a metodologia de extrato etéreo com hidrólise ácida foi a mais eficiente para a determinação da gordura, corroborando os dados da literatura.
- ❁ Os resultados obtidos por LS-NAA e NAA convencional mostraram variação na composição entre os sacos de ração para os elementos Br, Ca, Na e Zn, com boa concordância entre ambos os métodos.
- ❁ O uso da LS-NAA combinada com NAA convencional permitiu observar que pequenas porções teste (350 mg) de ração tomadas para análise, podem ser consideradas representativas comparadas com aquelas de 1 kg para os elementos avaliados aqui (Br, Ca, K, Na e Zn).
- ❁ Ao menos 50 % do cobre presente estavam sob a forma solúvel (bioacessível) em todas as rações, demonstrando a grande importância desse mineral na dieta dos cães.
- ❁ Os resultados de cobre pelo teste *in vitro* nas rações foram comparáveis com os resultados disponíveis na literatura para o elemento.

REFERÊNCIAS

AAFCO - ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. **Dog food nutrient profile**. Arizona, 2008.

AAFCO - ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. **AAFCO methods for substantiating nutritional adequacy of dog and cat foods**. Proposed revisions edited per comments for 2014 Official Publication. Champaign, 2014. 24 p.

ACHARYA, R.; SWAIN, K. K.; SUDARSHAN, K.; TRIPATHI, R.; PUJARI, P. K.; REDDY, A. V. R. Large sample NAA work at BARC: Methodology and applications. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, Amsterdam, v. 622, n. 2, p. 460-463, 2010.

ALFASSI, Z. B. **Chemical analysis by nuclear methods**. New York: John Wiley & Sons, 1994. 556 p.

ALVARADO, C. A.; HODGKINSON, S. M.; ALOMAR, D.; BOROSCHEK, D. Evaluation of the chemical composition of dry dog foods commercialized in Chile used for growing dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 1, p. 218-226, 2008.

AMANCIO, O. M. S. **Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: cobre**. São Paulo: ILSI BRASIL, 2011. v. 19.

ANDRADE, E. C. B.; BARROS, A. M.; TAKASE, I. Avaliação da solubilidade de cobre e zinco em caldos de leguminosas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 386-388, 2003.

ANKE, M.; ANGELOW, L. Rubidium in the food chain. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Heidelberg, v. 352, n. 1-2, p. 236-239, 1995.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC Nº 52 de 26 de novembro de 2010. Dispõe sobre corantes em embalagens e equipamentos plásticos destinados a estar em contato com alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 dez. 2010.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18. ed. Washington, DC, 2006.

AOCS - AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Method Ba 6a-05: Crude Fiber Analysis in Feeds by Filter Bag Technique**. Urbana: ANKOM Technology, 2009.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Editora UFV, 2012. 601 p.

ARAÚJO, T. S. **Produção de hidroxiapatita pura e dopada para aplicação em biosensores**. 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2008.

ATKINS, P.; ERNYEI, L.; DRISCOLL, W.; OBENAU, R.; THOMAS, R. Analysis of toxic trace metals in pet foods using cryogenic grinding and quantitation by ICP-MS, Part I. **Spectroscopy**, Iselin, v. 26, p. 46-56, 2011.

BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N.; OLIVEIRA, H. A. Brazilian experience on k_0 standardized neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 245, n. 1, p. 217-222, 2000.

BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N. Quantu - design and development of a software package dedicated to k_0 -standardized INAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 257, n. 3, p. 577-582, 2003.

BARNES, N. G. **A Market analysis of the US pet food industry to determine new opportunities for the cranberry industry**. North Dartmouth: University of Massachusetts Dartmouth, Center for Business Research, 2005. 186 p.

BATISTA, B. L. **Avaliação do uso da cela de reação dinâmica em espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (DRC-ICP-MS) para determinação de elementos químicos em sangue**. 2009. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

BAZOLLI, R. S.; CARCIOFI, A. C.; VASCONCELOS, R. S. Determinação da energia metabolizável de alimentos *premium* e *super premium* - Resultados preliminares. In: ZOOTEC 2004, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004.

BELLAVER, C. Ingredientes de origem animal destinados à fabricação de rações. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2001.

BERTHON, G. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 228, n. 2, p. 319-341, 2002.

BIPM - BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MEASURES. **International Vocabulary of Metrology** - Basic and general concepts and associated terms - VIM. 3. ed. Sèvres: JCGM 200, 2008. 90 p.

BLAAUW, M. The holistic analysis of gamma-ray spectra in instrumental neutron activation analysis. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, Amsterdam, v. 353, p. 269-271, 1994.

BLAAUW, M. **The k0-consistent gamma-ray catalogue for INAA**. Delft: Interfaculty Reactor Institute, 1996. 141 p.

BODE, P.; OVERWATER, R. M. W. Trace-element determinations in very large samples: A new challenge for neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 167, n. 1, p. 169-176, 1993.

BODE, P.; OVERWATER, R. M. W.; DE GOEIJ, J. J. M. Large-sample neutron activation analysis: Present status and prospects. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 216, n. 1, p. 5-11, 1997.

BODE, P.; MANDIGERS, P.; ROTHUIZEN, J. ^{64}Cu , ^{66}Cu and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ for studies related to copper associated hepatitis in doberman dogs. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 263, n. 1, p. 45-49, 2005.

BODE, P. Quality control in large sample analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 271, n. 2, p. 333-337, 2007.

BODE, P.; BUENO, M. I. M. S.; BORTOLETO, G. G.; HOFFMANN, G.; VAN DEN INGH, T. S. G. A. M.; ROTHUIZEN, J. Neutron activation analysis and X-ray Rayleigh and Raman scattering of hair and nail clippings as noninvasive bioindicators for Cu liver status in Labrador Retrievers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 390, n. 6, p. 1653-1658, 2008.

BODE, P.; GREENBERG, R. R.; FERNANDES, E. A. N. Neutron Activation Analysis: A Primary (Ratio) Method to Determine SI-Traceable Values of Element Content in Complex Samples. **Chimia**, Berlin, v. 63, n. 10, p. 678-680, 2009.

BONTEMPO, V. Nutrition and health of dogs and cats: evolution of pet food. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 45-50, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974. Dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatórias dos produtos destinados à alimentação animal e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 dez. 1974.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 09, de 9 de julho de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre fixação de Padrões de Identidade Qualidade de Alimentos Completos e de Alimentos Especiais destinados a cães e gatos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 jul. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6296, de 11 de dezembro de 2007. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 dez. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 5 de agosto de 2009. Estabelece critérios e procedimentos para o registro de produtos, para rotulagem e propaganda e para isenção da obrigatoriedade de registro de produtos destinados à alimentação de animais de companhia. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 7 ago. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Associação Brasileira da Indústria de Alimentação Animal. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. **Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal**. São Paulo: SINDIRAÇÕES, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório técnico**. Piracicaba, SP, 2013. 117 p.

BREWER, G. J.; DICK, R. D.; SCHALL, W.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MULLANEY, T. P.; PACE, C.; LINDGREN, J.; THOMAS, M.; PADGETT, G. Use of zinc acetate to treat copper toxicosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 201, n. 14, p. 564-568, 1992.

BRUNETTO, M. A.; TESHIMA, E.; NOGUEIRA, S. P.; JEREMIAS, J. T.; CARCIOFI, A. C. Manejo nutricional nas doenças hepáticas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 2, p. 233-235, 2007.

BUCHANAN, R. L.; BAKER, R. C.; CHARLTON, A. J.; RIVIERE, J. E.; STANDAERT, R. Pet food safety: a shared concern. **British Journal of Nutrition**, London, v. 106, n. 1, p. 78-84, 2011.

BUTTERWICK, R. F.; ERDMAN JUNIOR, J. W.; HILL, R. C.; LEWIS, A. J.; WHITTEMORE, C. T. Challenges in developing nutrient guidelines for companion animals. **British Journal of Nutrition**, London, v. 106, n. 1, p. 24-31, 2011.

CARCIOFI, A. C.; FRAGA, V. O.; BRUNETTO, M. A. Ingestão calórica e alta hospitalar em cães e Gatos. **Revista de Educação Continuada**, São Paulo, v. 6, n. 1-3, p. 16-27, 2003.

CARCIOFI, A. C.; VASCONCELLOS, R. S.; BORGES, N. C.; MORO, J. V.; PRADA, F.; FRAGA, V. O. Composição nutricional e avaliação de rótulo de rações secas para cães comercializadas em Jaboticabal-SP. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p. 421-426, 2006.

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

CARCIOFI, A. C.; TESHIMA, E.; BAZOLLI, R. S.; BRUNETTO, M. A.; VASCONCELLOS, R. S.; PEREIRA, G. T.; OLIVEIRA, L. D. Qualidade e digestibilidade de alimentos comerciais de diferentes segmentos de mercado para cães adultos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 2, p. 489-500, 2009.

CARCIOFI, A. C. **Gorduras**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2013. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/clinicacv/AULUSCAVALIERICARCIOFI/aula-gorduras-2013.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2014.

CARCIOFI, A. C. Perfil de identidade e qualidade de alimentos para cães e gatos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL, 6., SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 13., 2014, Valinhos, 2014. **Anais...** Valinhos: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2014.

CARREIRA, R. **Como escolher a ração certa para seu pet?** São Paulo: Meu Pet, 2013. Disponível em: <<http://revistameupet.com.br/alimentacao/como-escolher-a-acao-certa-para-seu-pet/691/>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

CASACUBERTA, N.; MASQUÉ, P.; GARCIA-ORELLANA, J.; BRUACH, J. M.; ANGUITA, M.; GASA, J.; VILLA, M.; HURTADO, S.; GARCIA TENORIO, R. Radioactivity contents in dicalcium phosphate and the potential radiological risk to human populations. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 170, n. 2-3, p. 814–823, 2009.

CASE, L. P.; DARISTOTLE, L.; HAYEK, M. G.; RAASCH, M. F. **Canine and feline nutrition**. Amsterdam: Elsevier, 2011. 562 p.

CASTRILLO, C.; HERVERA, M.; BAUCCELLS, M. D. Methods for predicting the energy value of pet foods. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 1-14, 2009.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Editora Unicamp, 2013. 206 p.

CHANDLER, M. L. Pet food safety: Sodium in pet food. **Topics in Companion Animal Medicine**, New York, v. 23, n. 3, p. 148-153, 2008.

CHIOCCHETTI, G. M. **Potencial de utilização de subprodutos agroindustriais na alimentação: estudo da disponibilidade de nutrientes**. 2013. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Joint FAO/WHO Standards Programme Codex Committee on Contamination in Foods**. CF/5 INF/1. The Hague, 2011. 89 p.

COSTA, S. S. L.; PEREIRA, A. C. L.; PASSOS, E. A.; ALVES, J. P. H.; GARCIA, C. A. B.; ARAUJO, R. G. O. Multivariate optimization of an analytical method for the analysis of dog and cat foods by ICP OES. **Talanta**, Oxford, v. 108, p. 157-164, 2013.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de minerais. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 87-98, 1997.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 1. ed. Barueri: Manole, 2005. 878 p.

CRISPINO, C. C. **Determinação de As, Sb e Se em material agrônômico por espectrometria de emissão óptica acoplada a plasma induzido com geração de**

hidretos (HG-ICP-OES). 2005. 95 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

CUSTÓDIO, D. P.; BRANDSTETTER, E. V.; OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C.; SANTOS, K. J. G.; MACHADO, O. F.; ARAUJO, A. A. Ração: alimento animal perecível. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, São Luís de Montes Belos, v. 1, n. 2, p. 131-147, 2005.

DALLA DEA, R. C.; SILVA, M. V.; CANNIATTI BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V. Disponibilidade de cálcio do leite de búfala irradiado por raios gama. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 2, p. 203-208, 2010.

DE CORTE, F. The standardization of standardless NAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 248, n. 1, p. 13-20, 2001.

DINALI, G. S. **Elementos terras raras em materiais derivados da indústria de fosfatos no Brasil**. 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

DIKEMAN, C. L.; MURPHY, M. R.; FAHEY JUNIOR, G. C. Diet type affects viscosity of ileal digesta of dogs and simulated gastric and small intestinal digesta. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 91, n. 3-4, p. 139-147, 2007.

DURAN, A.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Trace element concentrations of some pet foods commercially available in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, p. 2833-2837, 2010.

DZANIS, D. A. Anatomy of a recall. **Topics in Companion Animal Medicine**, New York, v. 23, n. 3, p. 133-136, 2008.

EHMANN, W. D.; VANCE, D. E. **Radiochemistry and nuclear methods of analysis**. Amsterdam: John Wiley & Sons, 1991. 531 p.

ELLISON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. **Guia Eurachem/Citac: Determinando a incerteza na medição analítica**. 2. ed. Versão brasileira. Rio de Janeiro: SBM, 2002. 168 p.

EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Understanding radiation in your life, your world**. Washington, DC, 2010. Disponível em: <<http://www.epa.gov/radiation/radionuclides/uranium.html>>. Acesso em: 23 jan. 2012.

EUROMONITOR. **Dog food in Brazil**. London, 2014. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com/dog-food-in-brazil/report>>. Acesso em: 18 dez. 2014.

EUROPEAN UNION – EC. **Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council, of 7 May 2002**. Laying down the use of products intended for animal feed which contain levels of undesirable substances exceeding the maximum levels laid down. Brussels: Official Journal of the European Union, 2002.

FEDIAF – EUROPEAN PET FOOD INDUSTRY FEDERATION. **Nutritional guidelines for complete and complementary pet foods for cats and dogs.** Bruxelles, 2011. 75 p.

FEDIAF – EUROPEAN PET FOOD INDUSTRY FEDERATION. **Nutritional guidelines for complete and complementary pet foods for cats and dogs.** Bruxelles, 2014. 99 p.

FERNANDES, E. A. N. Scandium as tracer in the sugar and alcohol agroindustry. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 168, n. 1, p. 41-46, 1993.

FIETEN, H.; LEEGWATER, P. A.; WATSON, A. L.; ROTHUIZEN, J. Canine models of copper toxicosis for understanding mammalian copper metabolism. **Mammalian Genome**, New York, v. 23, n. 1-2, p. 62-75, 2012.

FORTES, C. M. L. S. **Formulação de rações para cães.** In: ZOOTEC 2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005.

FRANÇA, E. J.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A. Ni-Cr alloy as neutron flux monitor: composition and homogeneity assessment by NAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 257, n. 1, p. 113-115, 2003.

FRANÇA, E. J. **A biomonitoração da Mata Atlântica na conservação da biodiversidade:** Espécies arbóreas nativas acumuladoras de elementos químicos. 2006. 362 p. Tese (Doutorado Direto em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta.** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 9 p.

GERMANO, R. M. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Importância do ferro em nutrição humana. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 24, p. 85-104, 2002.

GIBNEY, M. J.; VORSTER, H. H.; KOK, F. J. **Introduction to human nutrition**, 1. ed. London: Nutrition Society, 2002. 317 p.

GIRIO, T. M. S. **Qualidade microbiológica de rações para cães comercializadas no varejo em embalagem fechada e a granel.** 2007. 45 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2007.

GOES, R. H. T. B.; SILVA, L. H. X.; SOUZA, K. A. **Alimentos e alimentação animal.** Dourados: Editora UFGD, 2013.

GOMES, J. C.; OLIVEIRA, G. F. **Análises físico-químicas de alimentos.** Viçosa: Editora UFV, 2013. 303 p.

- GONSALVES, P. E. **Livro dos alimentos**. São Paulo: Editora MG, 2001. 266 p.
- GRANDJEAN, D. **Tudo o que você deve saber sobre o papel dos nutrientes na saúde de cães e gatos**. São Paulo: Intergraf, 2006. 96 p.
- GRANDJEAN, D.; BUTTERWICK, R. WALTHAM: **Pocket book of essential nutrition for cats and dogs**. London: Beyond Design Solutions Ltd, 2012.
- GREENBERG, R. R.; BODE, P.; FERNANDES, E. A. N. Neutron activation analysis: A primary method of measurement. **Spectrochimica Acta**, Oxford, v. 66, p. 193-241, 2011.
- GUERRA, T. A. Cobre: deficiência e intoxicação. In: CORREA, M. N.; SILVA, S. C. **Transtornos metabólicos dos animais domésticos**. Rio Grande do Sul: UFRGS, 2008. 8 p.
- GWOZDZ, R.; GRASS, F. Standardization problems in INAA of large organic samples. **Czechoslovak Journal of Physics**, New York, v. 56, n. 4, p. 229-240, 2006.
- HAND, M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L.; ROUDEBUSH, P.; NOVOTNY, B. J. **Small animal clinical nutrition**. Topeka: Mark Morris Institute, 2010. 1314 p.
- HENRIQUES, G. S.; HIRATA, M. H.; COZZOLINO, S. M. F. Aspectos recentes da absorção e biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da enzima conversora de angiotensina. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 333-345, 2003.
- 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**, Berlin, v. 91, n. 5-6, p. 205-209, 2007.
- HERVERA, M.; BAUCCELLS, M. D.; GONZÁLEZ, G.; PÉREZ, E. CASTRILLO, C. Prediction of digestible protein content of dry extruded dog foods: comparison of methods. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 93, n. 3, p. 366-372, 2009.
- HOFFMANN, G.; van den INGH, T. S. G. A. M.; BODE, P.; ROTHUIZEN, J. Copper associated chronic hepatitis in Labrador Retrievers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 20, p. 856-861, 2006.
- HOFFMANN, G.; JONES, P. G.; BOURGE, V.; van den INGH, T. S. G. A. M.; MESU, S. J.; BODE, P.; ROTHUIZEN, J. Dietary management of hepatic copper accumulation in Labrador Retrievers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 23, p. 957-963, 2009.
- HOGEWONING, S. J.; BODE, P. Sampling studies of plastics and its recycling process using normal and large sample INAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 244, n. 3, p. 531-535, 2000.

HONECKMAN, A. Current concepts in the treatment of canine chronic hepatitis. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 18, n. 4, p. 239-244, 2003.

HOU, X.; JONES, B. T. Inductively coupled plasma/optical emission spectrometry. In: MEYERS, R. A. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. p. 9468-9485.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia**. 4. ed. revisada. Rio de Janeiro, 2007. 72 p.

JIANG, X.; WEN, S.; XIANG, G. Cloud point extraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for the speciation of antimony(III) and antimony(V) in food packaging materials. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 175, n. 1-3, p. 146-150, 2010.

JORHEM, L. Dry ashing, sources of error, and performance evaluation in AAS. **Microchimica Acta**, New York, v. 119, n. 3-4, p. 211-218, 1995.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 3. ed. Florida: Boca Raton, 2001. 413 p.

KEITH, S.; FAROON, O.; RONEY, N.; SCINICARIELLO, F.; WILBUR, S.; INGERMAN, L.; LLADOS, F.; PLEWAK, D.; WOHLERS, D.; DIAMOND, G. **Toxicological profile for uranium**. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), 2013. 525 p.

KELLY, D. G.; WHITE, S. D.; WEIR, R. D. Elemental composition of dog foods using nitric acid and simulated gastric digestions. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 55, p. 568-577, 2013.

KIENZLE, E. Further developments in the prediction of metabolizable energy (ME) in pet food. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 132, p. 1796-1798, 2002.

KLAASSEN, C. D. **Toxicology: the basic science of poisons**. Kansas City: The McGraw-Hill Companies, 2008. 1309 p.

KOPLÍK, R.; KOMINKOVA, J.; BORKOVA, M.; MESTEK, O.; KVASNICKA, F.; SUCHANEK, M. Effect of technological processing and maturity stage of seeds on the content and speciation of phosphorus and trace elements in peas. **Food Chemistry**, Barking, v. 87, n. 3, p. 423-432, 2004.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras**. Piracicaba: CENA/USP, 2008. 282 p.

LUIZ, M. **As perspectivas do mercado pet brasileiro em 2012**. Disponível em: <<http://vetplussoftware.com.br/noticias.php?cod=2>>. Acesso em: 14 abr. 2014.

MACAROVSKA, G. T. **Determinação de elementos metálicos em nutrição enteral**. 2011. 76 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

MacDONALD, R. S. The role of zinc in growth and cell proliferation. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1500-1508, 2000.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana: recentes observações. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2004.

MANDIGERS, P. J. J. **Insights in the pathogenesis of Doberman hepatitis**. 2005. 236 p. Thesis (PhD) - Utrecht University, Utrecht, 2005.

MANDIGERS, P.; BODE, P.; van WEES, A. M. T. C.; van den BROM, W. E.; van den INGH, T. S. G. A. M.; ROTHUIZEN, J. Hepatic ⁶⁴Cu excretion in dobermans with subclinical hepatitis. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v.83, p.204-209, 2007.

MARRARI, AUTOMAÇÃO INDUSTRIAL. **Medição de umidade na produção de ração animal**. Disponível em: <<http://www.marrari.com.br/Medidor-de-Umidade-de-Biomassa.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

MARTINS, A. P. L.; REISSMANN, C. B. Material vegetal e as rotinas laboratoriais nos procedimentos químico-analíticos. **Scientia Agraria**, Toledo, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2007.

MAPS OF WORLD. **Top ten countries with most pet dog population**. San Diego, 2013. Disponível em: <<http://www.mapsofworld.com/world-top-ten/countries-with-most-pet-dog-population.html>>. Acesso em: 18 dez. 2014.

MAZON, E. M. A. **Vinhos brasileiros: teores totais e bioacessibilidade de As, Cd, Cu e Pb, teores de polifenóis totais e avaliação da rotulagem**. 2013. 215 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

MCDONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D.; MORGAN, C. A.; SINCLAIR, L. A.; WILKINSON, R. G. **Animal nutrition**. Harlow: Pearson, 2011. 692 p.

MERTZ, W. **Trace elements in human and animal nutrition**. Washington, DC: The National Academies Press, 1986. v. 2, 499 p.

MENEZES, E. A. **Determinação da disponibilidade de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em amostras de carnes bovinas, suínas e de frango *in natura* e processadas termicamente**. 2010. 108 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

MERRILL, L. **Small animal internal medicine for veterinary technicians and nurses**. Danvers: Wiley-Blackwell, 2012. 548 p.

MIRANDA, E. C.; PEZZATO, A. C.; PEZZATO, L. E.; GRANER, C. F.; ROSA, G. J.; PINTO, L. G. Q. Relação cálcio/fósforo disponível em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 2162-2171, 2000.

MURAKAMI, F. Y. **Impacto da adição de água no processo de extrusão sobre a digestibilidade e propriedades físico-químicas da dieta para cães**. 2010. 37 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

NEVES, M. C. P. **Perigos químicos nos alimentos – como as boas práticas agrícolas podem contribuir para a segurança dos alimentos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 14 p.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Mineral tolerance of animals**. Washington, DC: The National Academies Press, 2005, 510p.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, DC: The National Academies Press, 2006. 398 p.

NUNES, R. V.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; TOLEDO, R. S. Composição bromatológica, energia metabolizável e equações de predição da energia do grão e de subprodutos do trigo para pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 785-793, 2001.

OLIVEIRA, L. D.; TAKAKURA, F. S.; KIENZLE, E.; BRUNETTO, M. A.; TESHIMA, E.; PEREIRA, G. T.; VASCONCELLOS, R. S.; CARCIOFI, A. C. Fibre analysis and fibre digestibility in pet foods - a comparison of total dietary fibre, neutral and acid detergent fibre and crude fibre. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 96, n. 5, p. 895-906, 2012.

OPITZ, B.; SMITH, P. M.; KIENZLE, E.; EARLE, K. E.; MASKELL, I. E. Comparison of various methods of fiber analysis in pet foods. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, p. 2795–2797, 1998.

OTTEN, J. J.; HELLWIG, J. P.; MEYERS, L. D. **Dietary Reference Intakes: the essential guide to nutrient requirements**. Washington, DC: The National Academies Press, 2006. 1329 p.

OVERWATER, R. M. W.; BODE, P.; GOEIJ, J. J. M. Gamma-ray spectroscopy of voluminous sources corrections for source geometry and self-attenuation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, Amsterdam, v.324, n.1-2, p.209-218, 1993.

OVERWATER, R. M. W. **The physics of big sample instrumental neutron activation analysis**. 1994. 177 p. Thesis (PhD) - Delft University of Technology, Delft, 1994.

OVERWATER R. M. W.; HOOGENBOOM J. E. Accounting for the thermal neutron flux depression in voluminous samples for instrumental neutron activation analysis. **Nuclear Science and Engineering**, Illinois, v. 117, n. 3, p. 141-157, 1994.

PAIS, I.; JONES, J. B. **The handbook of trace elements**. Boca Raton: CRC Press, 1997. 240 p.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C. **Análises de materiais biológicos**. Campinas: Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, 2006. Disponível em: <http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/analise_matbiologico.pdf>. Acesso em: 27 out. 2014.

PERES, L. M.; KRINCHEV, A. F. B.; CONSTANTINO, C.; LUCIO, C. L.; PEREIRA, C. C. S.; GODRIM, J. S.; BRIDI, A. M. **Análise comparativa de metodologias de extração de extrato etéreo**. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 20., 2011, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: UEPG, 2011.

PETRY, C. F. **Determinação de elementos traço em amostras ambientais por ICP OES**. 2005. 73 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

PINHEIRO, S. R. F.; SAKOMURA, N. K.; SIQUEIRA, J. C.; MARCATO, S. M.; DOURADO, L. R. B.; FERNANDES, J. B. K.; MALHEIROS, E. B. Níveis nutricionais de cálcio para aves de corte ISA Label criadas sob semiconfinamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 1, p. 231-238, 2011.

PIRES, P. G. S.; TEIXEIRA, L.; MENDES, J. V. Composição nutricional e avaliação de rótulo de rações secas para cães e gatos adultos comercializadas em Pelotas – RS. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 10, n. 18; p. 1001-1008, 2014.

POLDERVAART, J. H.; FAVIER, R. P.; PENNING, L. C.; van den INGH, T. S. G. A. M.; ROTHUIZEN, J. Primary hepatitis in dogs: A retrospective review (2002-2006) **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 23, p. 72-80, 2009.

PRINS, M.; SCHELLENS, C. J. M. M.; van LEEUWEN, M. W.; ROTHUIZEN, J.; TESKE, E. Coagulation disorders in dogs with hepatic disease. **Veterinary Journal**, London, v. 185, p. 163-168, 2010.

RAINONE, R. **Avaliação de métodos analíticos para determinação de Na, K, Ca, Mg, P e S em biodiesel por ICP OES**. 2011. 95 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

RELMAN, A. S. The physiological behavior of rubidium and cesium in relation to that of potassium. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 29, n. 3, p. 248-262, 1956.

REYNOLD, C. V.; ALARCON, M. N.; SERRANA, H. L.; VALERO, V. P.; MARTINEZ, M. C. L. Analysis of total and dialyzable copper levels in duplicate meals by ETAAS: daily intake. **European Food Research and Technology**, Oxon, v. 227, n. 2, p. 367-373, 2008.

ROBINSON, J. W.; FRAME, E. M. S.; FRAME G. M. **Undergraduate instrumental analysis**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 1080 p.

ROMARÍS-HORTAS, V.; GARCÍA-SARTAL, C.; BARCIELA-ALONSO, M. C.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P. Bioavailability study using an in-vitro method of iodine and bromine in edible seaweed. **Food Chemistry**, Barking, v. 124, n. 4, p. 1747-1752, 2011.

ROSA, J. S. **Melamina: fraude, repercussão e segurança alimentar**. Belo Horizonte: Agrosoft Brasil, 2008. Disponível em: www.agrosoft.org.br/agropag/103545.htm. Acesso em: 30 nov. 2014.

SANCHES, F. M. **Composição centesimal e quantificação de ácidos graxos em derivados de carnes**. 2010. 54 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT Guide for personal computers**. 6. ed. Cary: SAS Institute, 1996. 1028 p.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Animal physiology: adaptation and environment**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 617 p.

SCHOULTEN, N. A.; TEIXEIRA, A. S.; BERTECHINI, A. G.; FREITAS, R. T. F.; CONTE, A. J.; SILVA, H. O. Efeito do nível de cálcio sobre a absorção de minerais em dietas iniciais para frangos de corte suplementadas com fitase. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1313-1321, 2002.

SCHOULTEN, N. A.; TEIXEIRA, A. S.; FREITAS, R. T. F.; BERTECHINI, A. G.; CONTE, A. J.; SILVA, H. O. Níveis de cálcio em rações de frangos de corte na fase inicial suplementadas com fitase. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 1190-1197, 2003.

SILVA, C. V.; BARROS, F.; SOUZA, C. F. V. Qualidade nutricional de rações secas para cães adultos comercializadas em Lajeado-RS. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 4, n. 2, p. 154-160, 2010.

SILVA, M. C. **Estudo retrospectivo de lesões hepáticas crônicas em cães**. 2005. 166 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SINDIRAÇÕES - SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Classificação dos aditivos utilizados em alimentação animal**. São Paulo, 2012. Disponível em: http://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2012/02/ncm-tec-aditivos-08_2012.pdf. Acesso em: 22 fev. 2013.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. Stamford: Cengage Learning, 2007. 1056 p.

SLUIS, B.; ROTHUIZEN, J.; PEARSON, P. L.; van OOST, B. A.; WIJMENGA, C. Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 165-173, 2002.

SMEETS-PEETERS, M.; WATSON, T.; MINEKUS, M.; HAVENAAR, R. A review of the physiology of the canine digestive tract related to the development of *in vitro* systems. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 11, p. 45-69, 1998.

SMICHOWSKI, P. Antimony in the environment as a global pollutant: a review on analytical methodologies for its determination in atmospheric aerosols. **Talanta**, Oxford, v. 75, p. 2-14, 2008.

STOREY, M. L.; GREGER, J. L. Iron, zinc and copper interactions: chronic versus acute responses of rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 117, n. 8, p. 1434-1442, 1987.

SWAIN, K. K.; AJITH, N.; ACHARYA, R.; VERMA, R.; REDDY, A. V. R. Large sample neutron activation analysis of dross for gold and silver, **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 294, n. 2, p. 319-322, 2012.

SZEFER, P.; NRIAGU, J. O. **Mineral components in foods**: chemical & functional properties of food components. Boca Raton: CRC Press, 2006. 480 p.

TAGLIAFERRO, F. S. **Metrologia em química**: estudo da qualidade de cafés brasileiros. 2003. 134 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

TAKASE, I.; BARROS, A. M.; ANDRADE, E. C. B. Determinação dos teores de cobre e zinco em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 107, n. 17, p. 103-106, 2003.

TEIXEIRA, M. M.; RIZZO, R.; DETMANN, E.; MOREIRA, R. M. G.; SASSAKI, R. S. Avaliação da qualidade da mistura de ração em misturador horizontal considerando a homogeneidade dos ingredientes. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 123-131, 2012.

TERUYA, C. M. **Aplicação da análise por ativação com nêutrons para a determinação de elementos essenciais e tóxicos em subprodutos agroindustriais utilizados na alimentação animal**. 1999. 90 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

THOMPSON, A. Ingredients: Where pet food starts. **Topics in Companion Animal Medicine**, New York, v. 23, n. 3, p. 127-132, 2008.

TOGNON, A. L. **Quantificação e avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais**. 2012. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

TOTAL ALIMENTOS. Ração super premium, premium e standard – Qual a diferença? Três Corações, 2014. Disponível em: <http://www.equilibriototalalimentos.com.br/artigos/racao-super-premium-premium-e-standard-qual-diferenca.html>. Acesso em: 20 nov. 2014.

TRÉZ, T. A. **Entendendo a experimentação animal: A crítica científica ao uso de animais como modelos de pesquisa para a saúde humana**. Alfenas: Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, 2013. 87 p.

TRYFONIDOU, M. A.; van den BROEK, J.; van den BROM, W. E.; HAZEWINKEL, H. A. Intestinal calcium absorption in growing dogs is influenced by calcium intake and age but not by growth rate. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 132, n. 11, p. 3363-3368, 2002.

VASILOPOULOU, T.; TZIKA, F.; KOSTER-AMMERLAAN, M. J. J.; STAMATELATOS, I. E. Large sample neutron activation analysis of a reference inhomogeneous sample. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 289, n. 3, p. 731-737, 2011.

VELOSO, C. R. **Agência atualiza limites de aditivos em alimentos**. Divinópolis: Alimentarium. Saúde e Alimentação, 2010. Disponível em: <http://alimentarium.blogspot.com.br/2010/11/agencia-atualiza-limites-de-aditivos-em.html> Acesso em: 24 nov.2014.

VICENTE, L. V.; QUIROS, Y.; PÉREZ-BARRIOCANAL, F.; LÓPEZ-NOVOA, J. M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F. J.; MORALES, A. I. Nephrotoxicity of uranium: pathophysiological, diagnostic and therapeutic perspectives. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 118, n. 2, p. 324-347, 2010.

VIEIRA, I. F. R. **Análises bromatológicas: Proteínas em alimentos**. 2010. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/40648220/aula7-proteinas2#scribd> Acesso em: 23 nov.2014.

VIERA, M. S. **Bioquímica do fósforo** - Palestra.. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

WAPNIR, R. Copper absorption and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 67, p. 1054-1060, 1998.

WHO - World Health Organization. **Copper**. Geneva, 1998. (Environmental Health Criteria 200).

WHO - World Health Organization. **Antimony in drinking-water**. Geneva, 2003.

WINSHIP, K. A. Toxicity of antimony and its compounds. **Adverse Drug Reactions and Acute Poisoning Reviews**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 67-90, 1987.

ZELST, M.; HESTA, M.; ALEXANDER, L. G.; BOSCH, G.; HENDRIKS, W. H.; LAING, G. D.; DE MEULENAER, B.; JANSSENS, G. P. J. Association between diet composition and in vitro selenium bioaccessibility in pet foods. In: WALTHAM INTERNATIONAL NUTRITIONAL SCIENCES SYMPOSIUM, 2013, Portland, Oregon. **Proceedings...** Portland, Oregon: Mars Incorporated, 2013. p.144-144.

ZHU, G.; TAN, M.; LI, Y.; XIANG, X.; HU, H.; ZHAO, S. Accumulation and distribution of uranium in rats after implantation with depleted uranium fragments. **Journal of Radiation Research**, Tokyo, v. 50, n. 3, p. 183-192, 2009.