

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

FONTES E NÍVEIS DE METAIS DE TRANSIÇÃO SOBRE A
ESTABILIDADE OXIDATIVA EM *PET FOOD*

Autora: Ingrid Caroline da Silva
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Coorientador: Prof. Dr. Leonir Bueno Ribeiro

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro - 2021

FONTES E NÍVEIS DE METAIS DE TRANSIÇÃO SOBRE A ESTABILIDADE OXIDATIVA EM *PET FOOD*

Autora: Ingrid Caroline da Silva
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Coorientador: Prof. Dr. Leonir Bueno Ribeiro

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro 2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S586f

Silva, Ingrid Caroline da

Fontes e níveis de metais de transição sobre a estabilidade oxidativa em pet food /
Ingrid Caroline da Silva. -- Maringá, PR, 2021.
63 f.figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos.

Coorientador: Prof. Dr. Leonir Ribeiro Bueno.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências
Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2021.

1. Ácidos graxos. 2. Pet food -Teste de palatabilidade. 3. Nutrição animal -
Antioxidante. 4. Oxidação lipídica. I. Vasconcellos, Ricardo Souza, orient. II. Bueno, Leonir
Ribeiro, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias.
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 664.66

Rosana de Souza Costa de Oliveira - 9/1366



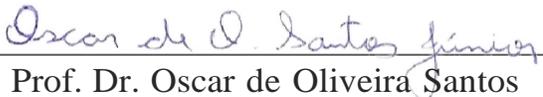
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO-DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

FONTES E NÍVEIS DE METAIS DE TRANSIÇÃO SOBRE A
ESTABILIDADE OXIDATIVA EM *PET FOOD*

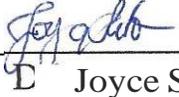
Autora: Ingrid Caroline da Silva
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 26 de fevereiro de 2021.


Prof. Dr. Oscar de Oliveira Santos

Junior


Joyce Sato

Ricardo Souza Vasconcellos

Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Orientador

“There is a light that overwhelms the darkness...”

(Chris Tomlin)

A Deus, por Seu amor cobrir todas as minhas fraquezas, e Sua fidelidade ser maior que todos os obstáculos em minha vida.

À minha família, pelo amor, carinho, compreensão e apoio, por seus exemplos de vida e dedicação.

Aos meus amigos, pela cumplicidade, conforto, inspiração e momentos de riso e descontração.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas inúmeras vezes em que pensei não ser capaz, por se tornar meu único refúgio e força.

Meus pais, Edson José e Teresinha Schmidt, pelo apoio e esforço para que eu chegasse até aqui e todo empenho em garantir que eu realize meus sonhos.

Meus irmãos, Karine Letícia e Guilherme Augusto, pelo apoio e horas de descontração, quando em meio as dificuldades do dia a dia me fizeram sorrir.

Às minhas avós, Anna Hass Schmidt (*in memoriam*) e Terezinha Vieira Santos (*in memoriam*), por todo cuidado e por depositarem toda sua confiança e amor em mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos, pela confiança, ensinamentos e paciência. Pela dedicação e tempo despendido e todo suporte durante a realização deste projeto, sendo um exemplo como pessoa e profissional.

Ao meu coorientador Leonir Bueno Ribeiro, pelos ensinamentos não somente acadêmicos, quanto profissionais.

Ao Centro de Ensino e Estudos Nutricionais em Felinos (CEENUFEL), pela ajuda, companheirismo, ensinamentos e momentos de diversão.

Aos meus amigos, que de alguma forma se tornaram essências não somente nas horas de estudo, quanto de apoio, conforto e descontração.

À Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade em cursar a pós-graduação e por todo suporte necessário para me tornar mestre.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, por todo ensinamento transmitido e lições concedidas.

Aos técnicos do Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) Osvaldo e Ulisses e ao coordenador Prof. Dr. Leandro pela ajuda, orientação e paciência.

Ao técnico do Laboratório de Análises Agropecuárias do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (Comcap) Versi, pela ajuda na execução deste trabalho, pela aprendizagem, companheirismo e conhecimento compartilhado.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI/UEM), pela organização do setor e por toda ajuda quando solicitada.

Ao Prof. Dr. Oscar e a Patrícia, pela disposição em ajudar e colaboração na realização das análises.

Ao Prof. Dr. Aulus, Lucas e a Priscila, pela ajuda no preparo das rações e fase inicial de experimentação.

Ao Prof. Dr. Vanderly, pela contribuição nas análises estatísticas e por ter despendido seu tempo e conhecimento para a realização deste trabalho.

Aos colaboradores e colaboradoras (gatos), pelo todo carinho, afeto e até os arranhões.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

À Alltech, pelo financiamento do projeto.

A vocês agradeço com todo reconhecimento e gratidão.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Ingrid Caroline da Silva, filha de Edson José da Silva e Teresinha Schmidt da Silva, nasceu em Ponta Grossa/Paraná/Brasil, no dia 28 de junho de 1995.

Em março de 2014, iniciou no Curso de Graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Em 2015 ingressou em pesquisa acadêmica, como voluntária sob orientação da Professora Dra Raquel Abdallah da Rocha.

Em 2016 e 2017 atuou como bolsista de Iniciação Científica, na área de reprodução animal sob orientação da Professora Dra Luciana da Silva Leal Karolewski.

Em agosto de 2018, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Em março de 2019, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em nível de mestrado, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Produção Animal, com ênfase em Nutrição Animais de Companhia.

Em fevereiro de 2021, submeteu-se à banca para sua defesa de Dissertação.

ÍNDICE

	Página
I. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Oxidação lipídica.....	3
2.1.1. Controle da oxidação com antioxidantes.....	5
2.1.2. Consequências da oxidação lipídica.....	7
2.1.3. Implicações da oxidação lipídica na palatabilidade.....	7
2.2. Fontes de Minerais.....	8
2.2.1. Metais de transição como catalisadores do processo oxidativo.....	9
2.3. Efeitos da extrusão nas fontes lipídicas.....	11
2.4. Alterações no conteúdo lipídico durante o armazenamento.....	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
4. OBJETIVOS GERAIS.....	18
II. FONTES E NÍVEIS DE METAIS DE TRANSIÇÃO SOBRE A ESTABILIDADE OXIDATIVA EM <i>PET FOOD</i>	19
Resumo.....	20
Abstract.....	21
Introdução.....	22
Materiais e Métodos.....	23
Resultados.....	32
Discussão.....	42
Conclusões.....	46
Agradecimentos.....	47
Referências.....	47

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Composição de Ingredientes e química analisada das dietas.....	25
TABELA 2. Parâmetros de Extrusão durante o processamento das dietas experimentais.....	26
TABELA 3. Perfil de ácidos graxos (mg/g de gordura) na dieta controle e contendo diferentes níveis de minerais inorgânicos (MI-1 e MI-2) ou orgânicos (MO-1 e MO-2) antes ou após a extrusão.....	33
TABELA 4. Retenção de antioxidantes sintéticos após a extrusão.....	35
TABELA 5. Perfil de ácidos graxos na dieta controle e contendo diferentes níveis de minerais inorgânicos (MI-1 e MI-2) ou orgânicos (MO-1 e MO-2) durante <i>shelf-life</i>	36
TABELA 6. Retenção de antioxidantes sintéticos durante <i>shelf-life</i>	38
TABELA 7. Índice de peróxido estimados (mEq/1000g) nas dietas experimentais durante <i>shelf-life</i>	40
TABELA 8. Valores de atividade da água e umidade (%) das dietas experimentais durante <i>shelf-life</i>	40
TABELA 9. Preferência alimentar de gatos nos desafios de palatabilidade durante o <i>shelf-life</i> das dietas experimentais.....	41
TABELA 10. Índice de péroxido (mEq/1000g) das rações usadas para os testes de palatabilidade em gatos.....	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Oxidação catalisada por metal de transição.....	10
FIGURA 2. Concentração de ácidos graxos na mistura pré-extrusão (1) e pós-extrusão (2) nos tratamentos experimentais.....	34
FIGURA 3. Comportamento de ácidos graxos durante <i>shelf-life</i>	37
FIGURA 4. Dispersão dos valores de peróxido de rações para gatos, avaliados durante <i>shelf-life</i> de até 360 dias.....	39

CAPÍTULO I
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO GERAL

Com o crescimento do mercado de produtos destinados a alimentação *pet* as empresas procuram produzir alimentos de alta qualidade, atendendo as recomendações nutricionais dos cães e gatos, promovendo seu bem-estar, proporcionando maior longevidade.

O faturamento do setor no ano de 2019 foi de R\$ 22,3 bilhões, evidenciando um crescimento de 8,4% sobre o ano anterior. Entre os segmentos do mercado, a parcela representada pelos produtos de *pet food* continua a ser de maior evidência, com 73,3% do faturamento (ABINPET, 2019), frente a isto, há hoje no mercado diversas empresas com marcas variadas de alimentos, cada qual com seu produto diferenciado, níveis diversificados de nutrientes e custos de produção variados.

O processo de extrusão é amplamente utilizado na produção de alimentos tanto para humanos quanto para animais, representando a cerca de 95% dos alimentos para cães e gatos no Brasil. Este processo alia altas temperaturas, umidade e pressão, que juntos promovem efeitos importantes no produto acabado, tais como esterilização do alimento, redução de fatores antinutricionais, modificações estruturais em macronutrientes, e contribui com a melhoria na digestibilidade dos nutrientes (Brennan et al., 2011; Sharma et al., 2014).

As rações para animais de estimação devem apresentar, para atender as especificações de rótulo, uma vida de prateleira (*shelf-life*) de geralmente doze a dezoito meses. No entanto, na prática, este período pode ser reduzido ou prolongado conforme a influência de alguns fatores, tais como: nível de antioxidante, teor de extrato etéreo, a presença de metais de transição (ferro, cobre, zinco, manganês, entre outros), características da embalagem, temperatura de armazenamento, condições de processamento e outros inúmeros fatores.

Santos (2012) destaca que os metais de transição podem atuar como catalisadores na formação de radicais livres, como na autoxidação, pois suas moléculas contêm hidrogênio alélico, que faz com que ocorra a formação de radicais livres, que ao reagirem com o oxigênio formam hidroperóxidos. Mesmo quando em concentrações baixas, os metais de transição podem iniciar a decomposição de hidroperóxidos, acelerando a velocidade da autoxidação, diminuindo assim o *shelf-life* do produto.

A gordura na alimentação *pet* é incluída na formulação principalmente como fonte de energia, ácidos graxos essenciais e, também para melhorar a palatabilidade. No entanto, os lipídeos podem sofrer degradação oxidativa durante o processamento e armazenamento, proporcionando alterações dos principais parâmetros de qualidade, tais como cor, sabor, aroma e valor nutricional, e como consequência, afeta o seu consumo e a condição de saúde dos

animais. A maioria destas mudanças são iniciadas por espécies reativas ao oxigênio, ocasionando a formação de vários produtos primários e secundários, como carbonilas, peróxidos e hidroperóxidos (Andersson; Lingnert, 1999; Wagner; Elmadfa, 2001).

Nos organismos, a oxidação de lipídeos tem sido associada a vários estados patológicos e a doenças, uma vez que a ingestão de alimentos oxidados apresenta risco de toxicidade crônica (Kubow, 1992; Kehrer, 1993). As evidências sugerem que espécies oxidantes participam do processo normal de envelhecimento e estão associados às doenças relacionadas com a idade, tais como câncer, aterosclerose e neurodegeneração, há ainda estudos que reforçam que há associação entre a resposta celular às moléculas oxidantes, que estão ligadas aos mecanismos que regulam a longevidade (Finkel; Holbrook, 2000; Guarente; Kenyon, 2000).

Sabe-se que mesmo as rações sendo formuladas com ingredientes de composição química conhecida, as condições do processo por extrusão podem modificar a estrutura química de alguns nutrientes, e, até mesmo causar a perda completa de outros, todavia esses efeitos ainda são pouco conhecidos pelos formuladores.

Os efeitos dos metais de transição sobre a oxidação lipídica no processo de extrusão e vida de prateleira ainda são desconhecidos. Os minerais orgânicos são tecnologicamente desenvolvidos em sua forma complexada a moléculas orgânicas, como aminoácidos ou peptídeos, visando melhorar sua biodisponibilidade para os animais pela redução na competição com outros minerais pela absorção intestinal. Contudo, os efeitos de fontes de minerais orgânicos na estabilidade oxidativa durante o processo de extrusão ainda são pouco conhecidos, sendo possível que estas fontes reduzam a reatividade dos metais com as macromoléculas oxidáveis no alimento quando comparadas às fontes inorgânicas, facilmente ionizáveis.

Desta maneira, pretende-se comparar as fontes de minerais, orgânicas ou inorgânicas, sobre a oxidação lipídica de alimentos extrusados para gatos, durante o processamento das rações por extrusão e vida de prateleira do produto acabado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Oxidação lipídica

Presente em quase todas as matérias-primas, a fração lipídica é diretamente responsável pela qualidade do produto alimentício, uma vez que está relacionada às características organolépticas como aroma, cor, sabor, textura, estabilidade das proteínas, e por consequência pode afetar a vida de prateleira do produto acabado. Sobretudo, a fração lipídica é a fonte de ácidos graxos essenciais e importante fisiologicamente para que ocorra a absorção das vitaminas lipossolúveis (Ferrari, 1998; Silva; Borges; Ferreira, 1999; Silva et al., 2017). Todavia, essa porção do alimento é suscetível ao processo oxidativo, diminuindo seu valor nutricional e vida de prateleira.

A estabilidade oxidativa é dependente da ação de fatores como a estrutura lipídica e o meio onde se encontra (Pratt, 1992). Ácidos graxos insaturados têm estrutura lipídica mais susceptível ao processo oxidativo, uma vez que as insaturações representam partes da cadeia com menor energia de abstração necessária a sua oxidação (Cosgrove; Church; Pryor, 1987).

O processo oxidativo é uma das principais causas de deterioração do alimento durante o processamento e armazenamento (Andersson; Lingnert, 1997). Em alimentos, a oxidação é um processo autocatalítico, que uma vez iniciado, desenvolve-se em constante aceleração, podendo ocorrer por via não enzimática, como na fotoxidação e autooxidação, ou por via enzimática pela ação das lipoxigenases (Soares, 2002; Araújo, 2006).

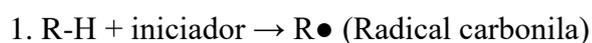
Reações por fotoxidação envolvem a presença de moléculas oxidáveis nos tecidos animais ou vegetais, tais como riboflavina, clorofila e mioglobina. Na presença de luz e oxigênio se inicia o processo de transferência de energia para a reação de oxidação com formação do peróxido. Neste processo, o oxigênio age na dupla ligação, primeiramente, sem que ocorra a formação de radical livre, resultando na formação imediata de hidroperóxidos (Vasconcellos, 2011).

Já na autooxidação, os peróxidos e hidroperóxidos, produtos primários do processo de oxidação, ocorrem, inicialmente, pela reação com radicais livres dos ácidos graxos com o oxigênio (Araújo, 2006; Rocha, 2011) e, uma vez formados, estes compostos continuam as reações oxidativas pelo ataque de novas moléculas até então intactas do alimento, sendo este autocatalítico. Radicais livres são moléculas com um número ímpar de elétrons, ou seja, apresentam um elétron isolado livre para se ligar a qualquer outro elétron, portanto são extremamente reativos (Soares, 2002).

As reações de autoxidação são as principais causadoras de ranço em alimentos (Andreo; Jorge, 2006), ocorrendo em três fases, sendo elas: iniciação, propagação e terminação.

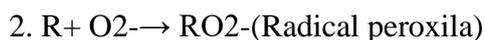
Para que ocorra a oxidação lipídica, transcorre a interação de um iniciador em contato com o oxigênio, que, uma vez ativado, reage com o ácido graxo insaturado, ocorrendo a retirada de um átomo de hidrogênio do carbono metilênico adjacente (entre) à ligação dupla cis do ácido graxo insaturado, levando a formação de radicais alílicos, conforme a reação (Sevanian; Hochstein, 1985; Kanner, 1994):

- Iniciação:



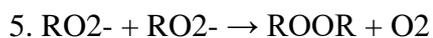
Iniciada, a reação segue em cadeia e somente termina quando se esgotam as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio. Desta maneira, a fase de propagação, ocorre em seguida, sendo caracterizada por diversas reações:

- Propagação:



Na propagação, as reações levam à formação de diversos peróxidos, podendo ser mensurados e usados como índice de oxidação lipídica tanto em alimentos ou organismo humano. Porém, como os peróxidos são instáveis, sua mensuração é limitada às fases iniciais da oxidação lipídica, uma vez que, as reações continuam a ocorrer até a fase de terminação (Sevanian; Hochstein, 1985; Halliwell; Chirico, 1993; Wang; Jiang; Lin, 1995).

- Terminação:



Desta forma, com o consumo dos substratos, as reações da fase de propagação vão diminuindo, dando início a formação dos produtos finais da oxidação. As reações de terminação levam a formação de produtos finais estáveis ou não reativos. Os radicais alquoxila ($RO_2\bullet$), que participam de reações de decomposição, também podem sofrer epoxidação, polimerização (reação 5) ou reagir com outros grupos alquila ($R\bullet$) (reação 6), reações químicas da fase de terminação (Kubow, 1992).

Em alimentos, a oxidação é um processo que ocorre de forma involuntária, sendo inevitável, é um conjunto complexo de reações, sendo responsável pelas mudanças de textura,

coloração, diminuição do valor nutritivo do alimento, degradação de vitaminas e ácidos graxos essenciais (Barriuso; Astiasarán; Ansorena, 2013; Tian; Decker; Goddard, 2013).

Sobretudo, a oxidação pode levar a formação de compostos tóxicos, como os produtos de lipoxidação, sendo estes citotóxicos e genotóxicos (Barriuso; Astiasarán; Ansorena, 2013; Calligares et al., 2015). A formação de subprodutos tóxicos e as perdas em vitaminas essenciais lipossolúveis, durante a oxidação, afetam negativamente a segurança e salubridade dos alimentos (Kubow, 1992).

Com isso, há crescentes esforços para inibir ou ao menos retardar o processo oxidativo nos alimentos, tendo como objetivo contribuir com maior tempo até a geração dos produtos da oxidação garantindo assim, maior vida útil do produto acabado. Especificamente em *pet food*, inibir ou controlar o avanço da oxidação é fundamental para se manter a palatabilidade dos alimentos.

2.1.1. Controle da oxidação lipídica com antioxidantes

Sabendo que o processo de oxidação, uma vez iniciado, ocorre sempre de maneira progressiva, alguns cuidados devem ser tomados de maneira a minimizar e garantir a integridade do produto (Masuchi et al., 2008).

A manutenção das características originais do alimento, durante processamento ou armazenamento, continua sendo grande desafio para as indústrias (Lima; Bruno, 2007). Por este motivo é importante conhecer os fatores que contribuem para a oxidação no intuito de se estabelecer estratégias para mitigá-los. Assim, essas estratégias são construídas visando estabelecer múltiplas características do produto, desde a embalagem até o uso de aditivo, os quais vão minimizar a deterioração do alimento.

A escolha de matérias-primas refinadas, com teores baixos de umidade, com níveis controlados de moléculas potencialmente pró-oxidantes, o armazenamento em baixas temperaturas e em atmosfera inerte, o uso de compostos antioxidantes, embalagens estanques e opacas à radiação ultravioleta entre outros, são adotadas de maneira a limitar o processo oxidativo durante o processamento e armazenagem (Silva; Borges; Ferreira, 1999).

Dentre o conjunto de ações adotadas para garantir a vida de prateleira de um produto, a adição de compostos antioxidantes é uma prática frequentemente, fato que justifica o interesse de estudos e pesquisas acerca do mecanismo de ação e desenvolvimento de novos compostos com capacidade antioxidante. O custo baixo de obtenção, facilidade de emprego, eficácia,

termorresistência, neutralidade organoléptica e ausência de toxicidade são fatores decisivos na seleção e utilização dos antioxidantes em escala industrial (Castera-Rossignol; Bosque, 1994).

Inibindo a oxidação lipídica e prevenindo a deterioração dos alimentos, os antioxidantes atuam estabilizando os ácidos graxos por meio da reação com radicais livres, quelando íons metálicos e interrompendo a fase de propagação (Degaspari; Waszczynskyj, 2004; Masuchi et al., 2008).

Os compostos antioxidantes mais usados são os sintéticos hidroxianisol-butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), butilhidroquinona terciário (TBHQ) e os naturais tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos (Ramalho; Jorge, 2006). Aprovados para a utilização em alimentos de uso humano e animal, desde 1948, os antioxidantes sintéticos se tornaram fundamentais para a manutenção da vida útil de muitos alimentos (Vasconcellos, 2011).

Quando em baixas concentrações, comparada àquelas de um substrato possível de ser oxidável, os compostos antioxidantes atrasam ou previnem o processo oxidativo (Halliwell, 1995; Zicker; Wedekind, 2010). Considerando o ponto de vista das indústrias, o uso de compostos com funções antioxidantes impede a rancidez e descoloração do produto final (ANVISA, 1965; Hurst, 2018). No entanto, os antioxidantes, embora fundamentais em alimentos com *shelf-life* prolongado como *pet food*, devem ser aplicados nas mínimas doses efetivas de acordo com o alimento em questão e apenas como forma de prevenir oxidação, mas não com o intuito de se mascarar problemas de qualidade, uma vez que estas substâncias têm limites máximos estabelecidos por legislação e podem ocasionar problemas para a saúde dos animais em elevadas concentrações.

Quando em doses excessivas, os antioxidantes podem ocasionar danos à saúde dos animais, como carcinoma gástrico, reações epidérmicas e até mesmo resposta inflamatória secundária a pró-oxidação. Por isso, cada país estabelece a sua própria regulamentação quanto ao uso de antioxidantes, de acordo com suas diversificações (Pokorny; Yanishlieva; Gordon, 2001). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) reconhece antioxidantes como aditivos alimentares, determinando doses máximas para seu uso na alimentação animal.

Os compostos BHA e BHT, individualmente ou misturados não podem ultrapassar o valor de 150 mg/kg de dieta total; já o TBHQ tem o limite máximo recomendado pela AAFCO (2003) de 200mg/kg de gordura na ração (AAFCCO, 2003; MAPA, 2016).

Em *pet food* o emprego de antioxidantes é essencial não só para prevenção da oxidação, como também para manter o valor nutricional e qualidade do alimento, contribuindo com maior vida de prateleira (Hilton, 1989; Vasconcellos, 2011).

2.1.2. Consequências da oxidação lipídica

Devido ao processo oxidativo, são formados diversos lipídios oxidados e substâncias potencialmente tóxicas. As consequências da oxidação lipídica incluem: destruição parcial dos ácidos graxos linoleico e linolênico, como de outros lipídios insaturados como Vitamina A, carotenoides e tocoferóis, destruição parcial da vitamina C, formação de produtos secundários como Malonaldeído e compostos de *Maillard*, que reagindo com outras moléculas, diminuem a absorção, além de irritar a mucosa intestinal pela presença de peróxidos, provocando diarreia e diminuindo a absorção dos nutrientes. Sobretudo, lipídios oxidados são antagonistas de alguns nutrientes, tais como tiamina, pantotenato de cálcio, riboflavina, ácido ascórbico, vitamina B₁₂, tocoferóis, vitamina A, proteínas, lisina e aminoácidos sulfurados (Kirk, 1984; Kanner, 1994).

Quando oxidados, os ácidos graxos se tornam moléculas nocivas ao organismo, devendo seu consumo ser evitado, além de ter grande impacto na indústria *pet food*, pela alteração das características organolépticas de um alimento, diminuição da vida de prateleira e alteração na aparência e textura, e pela diminuição da qualidade e segurança nutricional (Almeida, 2016).

A oxidação em *pet food* é acompanhada por análises como índice de peróxido, acidez, rancidez, índice de iodo e quantificação de produtos secundários, como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ou valor de anisidina. No entanto, cada um destes métodos se realizados isoladamente apresentam limitações e devem ser realizados associadamente para melhor compreensão dos resultados. No entanto, nem todos os métodos apresentam valores limites ainda estabelecidos e, na prática, o índice de peróxido e acidez são os mais empregados. No Brasil, a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Animais de Estimação (ABINPET) não sugere limites para alimentos extrusados, mas no caso dos ingredientes de origem animal, 5 mEq/kg de índice de peróxido e 3 mg de NaOH/g são sugeridos.

2.1.3. Implicações da oxidação lipídica na palatabilidade

A palatabilidade é associada a preferência alimentar do animal, sendo de grande relevância sua avaliação para a indústria de *pet food*, é determinada pela associação das características físicas e químicas do alimento, determinada pelo odor, textura, tamanho das partículas, temperatura e sabor (Pizzato; Domingues, 2008).

A fim de se aumentar a palatabilidade de um alimento, a indústria opta por fazer a inclusão de óleos ou gorduras (Zaghini; Biagi, 2005), todavia, a adição desses componentes de maneira exagerada pode favorecer o processo oxidativo.

Se tratando de gatos, existe uma exigência maior em termos de palatabilidade quando comparado a cães (Saad, 2004). O odor desempenha papel relevante na preferência dietética, podendo ser reduzido por fatores como envelhecimento, clima e condições adversas. Aliado ao sabor, dá ao gato a oportunidade de rejeitar um alimento que possivelmente possa ser tóxico ou de baixo valor nutritivo (Bradshaw, 1991).

O conteúdo de gordura aplicado em cobertura pós-extrusão, intensifica o sabor além de ser ótima fonte de energia e fornecimento de ácidos graxos essenciais. Essa gordura, afeta positivamente a textura e sabor da ração, contribuindo com maior aceitabilidade. Durante o processamento, a formação de produtos da reação de *Maillard* melhoram a palatabilidade, enquanto a oxidação de lipídios reduz a aceitação (Shibao; Bastos, 2011).

As alterações no alimento pelo processo oxidativo podem ser identificadas por gatos, sobretudo, deve-se evitar seu fornecimento, uma vez que alimentos com alto grau oxidativo causam danos biológicos aos organismos vivos.

2.2. Fontes de Minerais

A suplementação mineral é necessária para manutenção dos processos metabólicos em todas as espécies de organismos vivos. A suas funções são de grande relevância, no entanto, a suplementação no alimento deve ser feita respeitando as exigências nutricionais de cada espécie, sem deficiências ou excessos.

Considerando as inúmeras competições por sítios de absorção no trato digestório a qual os macro e microelementos estão sujeitos, as pesquisas com nutrição animal, no que se refere a estes nutrientes, evidenciam que a biodisponibilidade de minerais pode ser melhorada quando estes estão unidos a ligantes orgânicos, como mistura de proteínas, aminoácidos ou de peptídeos, levando a essas fontes, a denominação de orgânicos (Acda; Chae, 2002) ou quelatados. Todavia, em relação a disponibilidade dos minerais orgânicos frente aos inorgânicos, ainda existem controvérsias, uma vez que resposta do organismo sofre influência do mineral em questão, das condições dietéticas e do estado fisiológico em que o animal se encontra.

A obtenção de um mineral orgânico ou quelatado se dá após a hidrólise de uma fonte proteica e a exposição do mineral ao hidrolisado, formando complexos de íons metálicos

quelatados. Como alternativa, os minerais orgânicos podem também ser sintetizados através de processos biossintéticos, como ocorre no uso de leveduras (Hyne; Kelly, 1995).

A origem do mineral, afeta significativamente o seu aproveitamento pelo animal, e mesmo existindo divergências em relação a disponibilidade, as fontes de minerais mais usadas são ainda as inorgânicas como óxidos, sulfatos, cloretos, carbonatos e fosfatos (França et al., 2011), isso pode ser justificado pelo alto custo da forma orgânica, que impacta negativamente a adoção de seu uso em larga escala.

Já em relação aos efeitos durante o processo de extrusão, a influência da fonte mineral, ainda é incerta (Camire; Camire; Krumhar, 1990), sendo seus efeitos e estabilidade durante o processo de extrusão e armazenamento pouco estudados. Pode ser que fontes orgânicas possam reduzir a reatividade dos metais de transição com as macromoléculas oxidáveis presentes no alimento, reduzindo assim o processo oxidativo quando em comparação a minerais inorgânicos.

2.2.1. Metais de transição como catalisadores do processo oxidativo

Ao passo que os antioxidantes abrangem compostos que sequestram os radicais livres, estimulando a quelatação de metais ou outros compostos, os metais de transição podem agir como pró-antioxidantes em alimentos.

Pró-oxidantes são compostos que além de iniciar o processo oxidativo o facilitam e aceleram, sendo encontrados na maioria dos alimentos. Podem acelerar a oxidação por meio da interação direta com ácidos graxos insaturados, gerando a formação de hidroperóxidos (lipoxigenases e oxigênio singlete), ou por promoverem a formação de espécies reativas (metais de transição, ultravioleta e pigmentos) (Chaiyasit et al. 2007).

Os processos de oxidação já foram estudados e revisados por diversos autores. Silva, Borges e Pereira (1999) e Barden e Decker (2016) destacam que a presença de minerais de transição tais como Ferro e Cobre podem atuar como catalisadores do processo, assim como a enzima lipoxigenase.

A presença de oligoelementos, com destaque ao Ferro, pode desempenhar papel significativo na oxidação após o processo de extrusão. Esses metais podem agir como pró-oxidantes inclusive durante a extrusão, pelo fato desses elementos possuírem a habilidade em catalisar a formação de radicais livres (Miller; Buettner; D' Aust, 1990; Lin; Hsieh; Huff, 1998; Deffenbaugh, 2007).

A formação de espécies reativas, pela presença de metais de transição pode ser facilitada, uma vez que estes possuem potencial variável de acordo com o seu ligante, atuando,

portanto, como catalisadores de reações de transferência de elétrons (Kanner; Rosenthal, 1992). De acordo com Frankel (2005) estes elementos podem captar elétrons dos hidroperóxidos, decompondo-os em novas espécies reativas.

Metais de transição, especialmente, Ferro e Cobre, possuem potencial variável conforme seu ligante, atuando como catalisadores das reações de transferência de elétrons. Sendo o Ferro encontrado em maior proporção em alimentos, é o maior pró-oxidante presente em óleos, podendo ser incluído nos alimentos como contaminante durante o processamento (Taylor, 1987; Kolawska, 2003).

De acordo com Frankel (2005) estes metais catalisam o processo oxidativo doando ou captando elétrons dos hidroperóxidos, os decompondo em outras espécies reativas, conforme demonstrado na figura a seguir (figura 1):

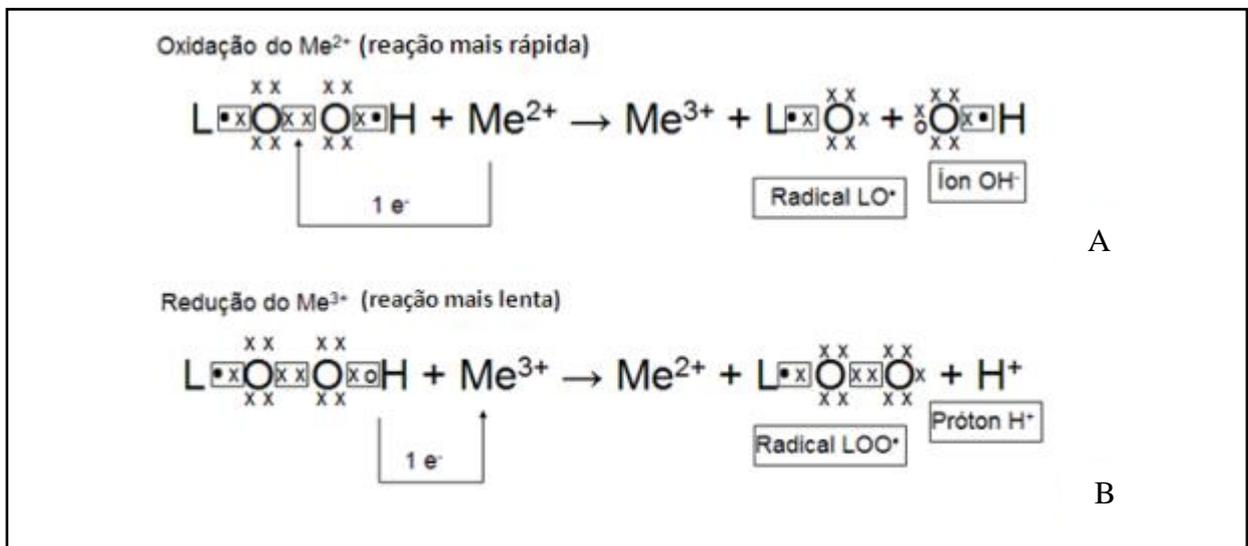


Figura 1

Oxidação catalisada por metal de transição. 2A Metal Ferroso; 2B Metal Férrico (Frankel, 2005).

Em alimentos secos para gatos, os níveis mínimos recomendados de cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn) são, respectivamente, de 6,7; 107; 6,7 e 100 mg/kg. Ao mesmo tempo que são nutrientes considerados essenciais e necessários de estarem nas concentrações adequadas nos alimentos, é comum ter teores de Ferro superiores a 300 mg/kg e manganês também muito elevados, em função das suas altas concentrações em subprodutos de origem animal. Desta forma, é possível que estes níveis mais elevados estejam atuando como catalisadores oxidativos, reduzindo a vida de prateleira dos alimentos.

2.3. Efeitos da extrusão nos lipídios

A tecnologia de processamento por extrusão consiste em uma mistura de ingredientes condicionada a vapor, comprimida e forçada através da matriz da extrusora (Rokey; Plattner, 1995). O amplo uso da extrusão para produção de alimentos de *pet food* se deve a versatilidade na mistura das dietas e melhora na funcionalidade, esterilização e texturização da variedade de matérias-primas usadas como ingredientes alimentares. O processo associa umidade, pressão e temperatura de cisalhamento para que seja possível estas reações e transformações (Cheftel, 1986; Rokey; Plattner, 1995).

Diversos trabalhos foram realizados de maneira a elucidar os efeitos da extrusão na qualidade e características do produto acabado. Sabe-se que o tratamento termomecânico afeta as características dos produtos extrusados modificando sua digestibilidade e utilização dos nutrientes. Sobretudo, pode ocasionar a desnaturação de proteínas, alterar a estrutura de carboidratos, proporcionar a perda de lipídios por oxidação, e reações de *Maillard*, alterando desta maneira a qualidade nutricional do alimento (Harper, 1978; Cheftel, 1986). Sobretudo, o processo de extrusão pode afetar a porção lipídica resultante da hidrogenação, isomerização, polimerização e oxidação lipídica (Rockey; Plattner, 1995).

Em condições particulares de processamento, podem ser formados complexos de lipídio-proteína ou lipídio-amido, sendo a alta umidade e temperatura os principais responsáveis pela hidrólise de lipídios (Bjorck; Asp, 1983).

Em alimentos para cães e gatos, o conteúdo lipídico pode ser proveniente das matérias-primas, ou adicionado ao produto acabado. A extrusão de rações com alto teor de lipídios, não é recomendada, especialmente se tratando de produtos expandidos, uma vez que níveis acima de 5-6% causam prejuízos ao desempenho da extrusora (Camire; Camire; Krumhar, 1990).

A oxidação é tida como grande desafio na preservação de *pet food*, uma vez que a taxa do processo oxidativo é afetado por fatores como tipo e teor de gordura, conteúdo de umidade e grau de expansão, e as insaturações das gorduras (Lin; Hsieh; Huff, 1998; Deffenbaugh, 2007).

Ácidos graxos livres são formados nos alimentos por meio da hidrólise de triglicerídeos, pela ação das enzimas lipase e a alta temperatura. A extrusão pode inibir a liberação de ácidos graxos livres pela desnaturação de enzimas hidrolíticas (Camire; Camire; Krumhar, 1990).

Mesmo que o conteúdo lipídico na mistura pré-extrusão seja baixo e as temperaturas raramente altas o suficiente, usadas durante curto período de tempo para que permita a

degradação térmica significativa dos lipídios, condições ideais de processamento, devem ser adotadas de modo a minimizar os efeitos adversos do processo na qualidade do produto final.

2.4. Alterações no conteúdo lipídico durante o armazenamento

O processo de extrusão causa a inativação de lipases e lipoxidase dos alimentos, garantindo menores chances de oxidação durante o armazenamento do alimento. O nível alto de ácidos graxos livres nos alimentos afeta o sabor e a qualidade do produto (Camire Camire; Krumhar, 1990; Lin; Hsieh; Huff, 1998).

Os fatores que afetam a qualidade do alimento durante a *shelf-life* são classificados em intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos compreendem as propriedades do produto acabado como: atividade da água (A_w), valor de pH e acidez total, potencial redox, disponibilidade de oxigênio, nutrientes, composição bromatológica, enzimas e reagentes químicos e conservantes. Já os extrínsecos estão relacionados ao ambiente em que o alimento é processado e acondicionado, como temperatura de processamento, umidade relativa, armazenagem e distribuição, exposição a luz ultravioleta e infravermelha durante armazenagem e distribuição, controle da temperatura no processo e temperatura do ambiente na estocagem, entre outros (FIB, 2011).

As mudanças químicas que podem ocorrer em *pet food* durante a vida de prateleira, compreendem reações dos componentes dos alimentos com os fatores externos, como a presença de oxigênio e luz, ocasionando rancidez. O processo oxidativo causa influência negativa na qualidade dos alimentos, provocando alterações de odor, sabor, cor e textura, e possivelmente pode resultar no aparecimento de compostos nocivos, afetando diretamente a vida de prateleira do produto alimentício com destaque aos alimentos de *pet food* (Calligaris et al., 2015; Chanadang; Koppel; Aldrich, 2016; Silva et al., 2017).

A oxidação nos alimentos não é apenas associada a qualidade nutricional ou ao seu tempo de vida útil, como também a questão de segurança alimentar. Sendo um processo lento e gradativo, faz com que a vida útil do alimento diminua conforme a oxidação aumente, a adoção do uso de antioxidante é pela necessidade de prolongar a *shelf-life* dos produtos (Silva et al., 2017).

Por fim, o uso de aditivos que previnam processo de deterioração, prolongando o prazo de validade, aliado as condições adequadas de armazenamento garantem a preservação da qualidade nutricional do alimento, garantindo maior vida de prateleira.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acda, S. P.; Chae, B. J. A. 2002. Review on the applications of organic trace minerals in pig nutrition. *Journal of Nutrition*, v. 131, n. 1, p. 25-30.
- Almeira, R. D. 2016. Avaliação do Índice Peróxidos e Acidez de matérias-primas e de alimentos compostos para animais ao longo do armazenamento. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade de Aveiro.
- Andersson, K.; Lingnert, H. 1997. Influence of oxygen concentration on the storage stability of cream powder. *LWT - Food Science and Technology*, v. 30, n. 2, p. 147-54.
- Andersson, K.; Lingnert, H. 1999. Kinetic studies of oxygen dependence during initial lipid oxidation in rapeseed oil. *Journal of Food Science*, v. 64, n. 2, p. 262-266.
- Andreo, D.; Jorge, N. 2006. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - Ceppa, Curitiba*, v. 24, n. 2, p. 319-36.
- ANVISA. 1965. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto Nº 55.871, de 26 de março de 1965. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 09 de abril.
- Araújo, J. M. A. 2006. Química de Alimentos: Teoria e Prática. 3ª ed. Viçosa: Viçosa: Imprensa Universitária, Universidade federal de Viçosa, 478 p.
- ABINPET. 2019. Associação brasileira da indústria de produtos para animais de estimação. Dados de Mercado 2019. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site/mercado/2015>>. Acesso em 10 de jan. de 2021.
- AAFCO. 2003. Association of american feed control official. Official Publication 2003, Association of American Feed Control Official, 2003.
- Barden, L.; Decker, E. A. 2016. Lipid Oxidation in Low-moisture Food: A Review. *Food Science and Nutrition*, v. 56, n. 15, p. 2467-2482.
- Barriuso, B.; Astiasarán, I.; Ansorena, D. 2013. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology*, v. 236, p. 1-15.
- Bjorck, I.; Asp, N. G. 1983. The effects of extrusion cooking on nutritional value, a literature review. *Journal of Food Engineering*, v. 2, p. 281-308.
- Bradshaw, J. W. S. 1991. Sensory and experiential factors in the design of foods for domestic dogs and cats. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 50, p. 99-106.
- Brennan, C.; Brennan, M.; Derbyshire, E.; Kumar, T. B. 2011. Effects of extrusion on the polyphenols vitamins and antioxidants activity of foods. *Journal of Food Science and Technology*, v. 22, p. 570-575.
- Calligares, S.; Manzocco, L.; Anese, M.; Nicoli, M. C. 2015. Shelf-life assessment of food undergoing oxidation – a review. *Food Science and Nutrition*, v. 56, p. 1903-1912.

- Camire, M. E.; Camire, A.; Krumar, K. 1990. Chemical and nutritional changes in foods during extrusion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 29, n. 1, p. 35-57.
- Castera-Rossignol, A.; Bosque, F. 1994. Nouvelle approche des anti-oxydants. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, v. 1, p. 131-143.
- Chaiyasit, W.; Elias, R. J.; McClements, D. J.; Decker, E. A. 2007. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Food science and nutrition*, v. 47, n. 3, p. 299-317.
- Chanadang, S.; Koppel, K.; Aldrich, G. 2016. The impact of rendered protein meal oxidation level on shelf-life, sensory characteristics and acceptability in extruded pet food. *Animals*, v. 6, p. 44-61.
- Cheftel, J. C. 1986. Nutritional effects of extrusion cooking. *Food Chemistry*, v. 20, p. 263–283.
- Cosgrove, J. P.; Church, D. F.; Pryor, W. A. 1987. The kinetics of autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids, Champaign*, v. 22, n. 5, p. 299-304.
- Deffenbaugh, L. 2007. Optimizing pet food, aquatic and livestock feed quality. In: *Extruders and Expanders in Pet Food, Aquatic and Livestock Feeds*, ed. by Riaz MN. Agrimedia, Clenze, p. 327–342.
- Degáspari, C. H.; Waszczyński, N. 2004. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, v. 5, n. 1, p. 33-40.
- Ferrari, C. K. B. 1998. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. *Revista Nutrição, Campinas*, v. 11, p. 3-14.
- Finkel, T.; Holbrook, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, p. 239-247.
- FIB. 2011. *Food Ingredientes Brasil*. São Paulo: Fihba, Trimestral. Disponível em: <<http://www.revista.fi.com>>. Acesso em 11 de janeiro de 2021.
- França, J.; Saad, F. M. O. B.; Saad, C. E. P.; Silva, R. C.; Reis, J. S. 2011. Avaliação de ingredientes convencionais e alternativos em rações de cães e gatos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, p. 222-231.
- Frankel, E. N. 2005. *Lipid oxidation*. 2ed. Bridgwater: OilyPress, p. 391-405.
- Guarente, L.; Kenyon, C. 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*, v. 408, p. 255-262.
- Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Lolinger, J.; Aruoma, O. I. 1995. The characterization on antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, n. 7, p. 601-617.
- Harper, J. M. 1978. Food extrusion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 11, p. 155–215.

- Hilton, J. W. 1989. Antioxidants: function, types and necessity of inclusion in pet foods. *Canadian Veterinary Journal*, v. 30, p. 682-684.
- Hurst, J. W.; Finley, W. J.; Deman, M. J. 2018. Additives and Contaminants. *Food Science Text Series*, p. 527-565.
- Hyne, M. J.; Kelly, P. 1995. Metal ions, chelates and proteينات. In: *Biotechnology in the Feed Industry*. Loughborough, Leics, UK: nottingham University Press, p. 233-248.
- Kanner, J. 1994. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*, v. 36, n. 1/2, p. 169-189.
- Kanner, J.; Rosenthal, L. 1992. An assessment of lipid oxidation in foods. *Pure and Applied Chemistry*, v. 64, n. 12, p. 1959-1964.
- Kehrer, J. P. 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 23, n. 1, p. 21-48.
- Kirk, J. R. 1984. Biological availability of nutrients in processed foods. *Journal of Chemical Education*, v. 61, n. 4, p. 364-367.
- Kolakowska, A. Lipid oxidation in food systems. In: Sikorski, Z. E.; Kolakowska, A., eds. *Chemical and functional properties of food lipids*. Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 133-166 (Chemical and functional properties of food components series).
- Kubow, S. 1992. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 12, n. 1, p. 63-81.
- Lima, J. R.; Bruno, L. M. 2007. Estabilidade de pasta de amêndoa de castanha de caju. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 27, n. 4, p. 816-822.
- Lin, S.; Hsieh, F.; Huff, H. E. 1998. Effects of lipids and processing conditions on lipid oxidation of extruded dry pet food during storage. *Animal Feed Science and Technology*, v. 71, p. 283-294.
- Masuchi, M. H.; Celeghini, M. S.; Gonçalves, L. A. G.; Grimaldi, R. 2008. Quantificação de TBHQ (terc butil hidroquinona) e avaliação da estabilidade oxidativa em óleos de girassol comerciais. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1053-1057.
- Miller, D. M.; Buettner, G. R.; D' Aust, S. 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 8, p. 95-108.
- MAPA. 2016. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução Normativa nº 44, de 15 de dezembro de 2016.
- Pizzato, D. A.; Domingues, J. L. 2008. Palatabilidade de alimentos para cães. *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 5, p. 504-511.

- Pokorky, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. 2001. Antioxidants in food: practical applications. Boca, Raton, Boston, New York, Washington, D.C.: Woodhead Publishing, CRC Press. p 268-283.
- Pratt, D. E. 1992. Natural antioxidants from plant material. In: Huang, M. T.; Ho, C. T.; Lee, C. Y. Phenolic compounds in food and their effects on health II: Antioxidants and cancer prevention. American Chemical Society. Symposium Series n. 507, ACS. Washington, USA, p. 54-71.
- Ramalho, V. C.; Jorge, N. 2006. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 755-760.
- Rocha, J. S. R. 2011. Efeito da cantaxantina dietética para matrizes pesadas com idade avançada e do período de armazenamento dos ovos sobre a fertilidade, rendimento de incubação, nutrientes da gema e desenvolvimento embrionário. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Rokey, G.; Plattner, B. 1995. Process description: pet food production. Wenger Mfg, Inc., Sabetha, KS USA, p. 1-18.
- Saad, F. M. O. B. 2004. História evolutiva na alimentação e controle de consumo dos cães e gatos. In: Apostila. Curso de Pós-Graduação “Latu Sensu” (Especialização) a Distância em Nutrição e Alimentação de Cães e Gato. Universidade Federal de Lavras - UFLA, FAEPE - Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão. Lavras – MG, p. 44.
- Santos, N. A. 2012. Influência de metais de transição no processo oxidativo do biodiesel de soja. João Pessoa, 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de ciências exatas e da natureza.
- Sevanian, A.; Hochstein, P. 1985. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annual Reviews of Nutrition*, Palo Alto, v. 5, p. 365-390.
- Sharma, S.; Kaur, S.; Dar, B., Singh, B. 2014. Storage stability and quality assessment of processed cereal brans. *Journal of Food Science and Technology*, v. 51, p. 583-588.
- Shibao, J.; Bastos, D. H. M. 2011. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. *Revista de Nutrição*, v. 24, n. 6, p. 895-904.
- Silva, A. A.; Pena, S. A.; Assis, F. G.; Montefoglia, N.; Castilha, L. D.; Nascimento, S. T.; Vasconcellos, R. S. 2017. Estabilidade oxidativa e qualidade de bifeinhos para cães formulados com antioxidante natural. *PUBVET*, v. 11, p. 30-137.
- Silva, F. A. M.; Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A. 1999. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22, p. 94-103.
- Soares, S. E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*. Campinas, v.15, n. 1, p. 71 – 81.
- Taylor, A. J. Effect of water quality on lipid oxidation. *Food Science & Technology Today*, v. 1, p. 158-159, 1987.

- Tian, F.; Decker, E. A.; Goddard, J. M. 2013. Controlling lipid oxidation of food by active packaging Technologies. *Food & Function*, v. 4, p. 669-680.
- Vasconcellos, R. S. 2011. A segurança do uso de antioxidantes sintéticos em pet food. *Revista Pet Food Brasil*, ed. 16, p. 16-18.
- Wang, F. S.; Jiang, Y. N.; Lin, C. W. 1995. Lipid and cholesterol oxidation in Chinese-style sausage using vacuum and modified atmosphere packaging. *Meat Science, Essex*, v. 40, n. 1, p. 93-101.
- Wagner, K. H.; Elmadfa, I. 2001. Effects of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 103, p. 624-629.
- Zaghini, G.; Biagi, G. 2005. Nutritional peculiarities and diet palatability in the cat. *Veterinary Research Communications*, v. 29, p. 39-44.
- Zicker, C. S.; Wedekind, J. K. 2010. Antioxidants. Ed. 5. Mark Morris Institute: Small Animal Clinical Nutrition, p. 150-155.

4. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos do presente trabalho são comparar a estabilidade oxidativa de alimentos para gatos suplementados com diferentes níveis e fontes de elementos traços ferro, zinco e cobre, durante o processo de extrusão e durante a vida de prateleira do produto acabado.

CAPÍTULO II

FONTES E NÍVEIS DE METAIS DE TRANSIÇÃO SOBRE A ESTABILIDADE OXIDATIVA EM *PET FOOD*

Fontes e níveis de metais de transição sobre a estabilidade oxidativa em *pet food*

Resumo

Minerais orgânicos ou quelatados, desenvolvidos tecnologicamente em sua forma complexada a outras moléculas (aminoácidos ou peptídeos), vêm sendo estudados por sua melhor disponibilidade em relação a fontes inorgânicas. Contudo, os efeitos de fontes de minerais orgânicos na oxidação lipídica durante a extrusão ainda são pouco conhecidos. Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar as fontes de minerais (inorgânicas e/ou orgânicas) na oxidação lipídica em alimentos extrusados para gatos adultos, durante a extrusão e *shelf-life* de *pet food*. Para tal, foram formuladas 5 tratamentos, sendo uma dieta controle, e dietas suplementadas com dois níveis das fontes inorgânicas e orgânicas dos minerais Ferro, Cobre e Zinco. Tais tratamentos foram analisados com relação às concentrações de ácidos graxos e residuais de antioxidante durante a extrusão e *shelf-life* das rações, índice de peróxido, atividade de água e umidade durante o armazenamento. O teste de palatabilidade durante a *shelf-life* foi realizado para verificar a percepção organoléptica dos gatos frente a alimentos com diferentes fontes de minerais. Observou-se reduções significativas dos ácidos graxos palmítico (16:0), oleico (18:1n9); linoleico (18:2n6), linolênico (18:3n3) e araquidônico (20:4n6) durante a extrusão, bem como a redução na concentração de antioxidantes sintéticos de 49,72%; 35,04%; 38,56%, 33,61% e 33,14% para os tratamentos controle, MI-1, MI-2, MO-1 e MO- 2. Durante a vida de prateleira, os níveis de metais de transição afetaram a estabilidade oxidativa. O índice de peróxido para as dietas suplementadas com a fonte orgânica tendeu a crescimento menos acentuado quando comparado a fonte inorgânica. A atividade de água aumentou durante a estocagem das rações, seguindo o comportamento da umidade. Houve preferência pela dieta suplementada com minerais orgânicas, no início e com 360 dias de armazenamento, quando comparada à dieta controle e às dietas com minerais inorgânicos nos dias 90 e 360 de *shelf-life*. Conclui-se que o processo de extrusão causa alterações oxidativas significativas em *pet food* e que esta não é influenciada pela fonte ou níveis dos metais de transição cobre, ferro e zinco. Durante a vida de prateleira, os níveis de metais de transição afetam a estabilidade oxidativa dos alimentos que pode ser controlada parcialmente pelo uso de fontes orgânicas de minerais.

Palavras-chave: ácidos graxos; índice de peróxido; minerais inorgânicos; minerais orgânicos; residual de antioxidante.

Abstract

Organic or chelated minerals, technologically developed in their form complexed to other molecules (amino acids or peptides), have been studied due to their better availability in relation to inorganic sources. However, the effects of organic mineral sources on lipid oxidation during extrusion are still little known. Therefore, the aim of this study was to compare mineral sources (inorganic and/or organic) in lipid oxidation in extruded foods for adult cats, during extrusion and *shelf-life* of pet food. For this, 5 treatments were formulated, being a control diet, and diets supplemented with two levels of inorganic and organic sources of Iron, Copper and Zinc minerals. These treatments were analysed in relation to the concentrations of fatty acids and antioxidant residuals during extrusion and *shelf-life* of the diets, peroxide index, water activity and humidity during storage. The palatability test during *shelf-life* was performed to verify the organoleptic perception of cats in food with different mineral sources. There were significant reductions in palmitic fatty acids (16:0), oleic (18:1n9); linoleic (18:2n6), linolenic (18:3n3) and arachidonic (20:4n6) during extrusion, as well as a reduction in the concentration of synthetic antioxidants of 49.72%; 35.04%; 38.56%, 33.61% and 33.14% for control, MI-1, MI-2, MO-1 and MO-2 treatments. During *shelf-life*, the transition of metal levels affected the oxidative stability. The peroxide index for diets supplemented with organic source tended to have a less pronounced growth when compared to inorganic source. Water activity increased during *shelf-life*, following humidity behaviour. There was preference for diet supplemented with organic minerals, at the beginning and with 360 days of storage, when compared to the control diet and diets with inorganic minerals on the 90th and 360th of *shelf-life*. It was concluded that the extrusion process causes significant oxidative changes in pet food and that it was not influenced by source or levels of the metals copper, iron and zinc transition. During *shelf-life*, the transition of metal levels affected the oxidative stability of food, which can be partially controlled by the use of organic mineral sources.

Keywords: fatty acids; peroxide index; inorganic minerals; organic minerals; residual antioxidant.

1. Introdução

A medida que aumenta a procura por animais de estimação, cresce a demanda pelos produtos e serviços destinados a eles. No ano de 2019, o faturamento total do setor *pet*, abrangendo os segmentos de *pet service*, *pet care*, *pet vet* e *pet food* foi de R\$22,3 bilhões, sendo o último a parcela de maior destaque, com 73,3% do faturamento total (ABINPET, 2019). Com um mercado em constante crescimento, os consumidores de produtos destinados a alimentação *pet*, buscam por alimentos de qualidade, que atendam as recomendações nutricionais, apresentem boa aceitação pelos animais, vida de prateleira adequada, promovendo seu bem-estar e proporcionando longevidade.

A tecnologia de extrusão termoplástica vem sendo empregada para a produção de alimentos secos para animais de estimação há mais de 60 anos e graças a evolução de maquinários e a sua versatilidade, ainda é responsável por 95% da produção dos alimentos comercializados no Brasil. O processo consiste na moldagem da massa, composta por uma mistura de ingredientes de origem vegetal e animal, que são forçados através de uma matriz, em que são aliados os efeitos de cisalhamento entre o contato da massa com as partes do sistema de extrusão, altas temperaturas, umidade e pressão, que como consequência promovem efeitos importantes no produto acabado, como esterilização, redução de fatores antinutricionais, melhora na digestibilidade, formação de sabor, entre outros. Apesar da extrusão ter muitos benefícios na qualidade dos alimentos, algumas modificações ocorridas no processo são consideradas deletérias, tais como complexações de nutrientes, perdas por oxidação ou destruição de moléculas pelo calor, reduzindo seu valor nutricional (Brennan et al., 2011; Sharma et al., 2014; Sá, 2015).

O *pet food* seco extrusado, no geral apresenta vida de prateleira (*shelf-life*) de doze a dezoito meses, podendo este período ser reduzido ou prolongado conforme a influência de alguns fatores, como qualidade de ingredientes, condições de processamento industrial, características da formulação e embalagens, uso de aditivos antioxidantes e condições de estocagem e transporte. A redução na vida de prateleira de um alimento, em geral, está relacionada a deterioração microbiana ou oxidação que devidamente controladas favorecem o *shelf-life* estendido do produto.

Sendo a principal causa de deterioração dos ácidos graxos, a oxidação pode causar perdas durante o processamento do alimento quanto no armazenamento, tendo como principal consequência a alteração do *flavor* original e o surgimento de odores e gostos associados a rancidez, implicando diretamente no valor comercial e qualidade nutricional do alimento

(Castera-Rossignol; Bosque, 1994, Silva; Borges; Ferreira, 1999).

A oxidação lipídica é um conjunto complexo de mecanismos, que está associado ao tipo de estrutura lipídica e o meio em que esta se encontra, número e tipo de insaturações presentes, o tipo de interface entre os lipídios e o oxigênio, exposição a luz e ao calor, e a presença de pró-oxidantes, tais como metais de transição (Berset; Cuvelier, 1996; Frankel, 2005). A formulação de um alimento é etapa fundamental para se prevenir a oxidação, controlando a quantidade e qualidade da gordura utilizada, os níveis e fontes de metais de transição, a qualidade dos ingredientes e processos e ainda o uso de aditivos, como os antioxidantes.

Os minerais orgânicos ou quelatados, assim denominados por serem desenvolvidos tecnologicamente em sua forma complexada a outras moléculas, tais como aminoácidos ou peptídeos, vem sendo estudados por sua melhor disponibilidade em relação a fontes inorgânicas (Maciel et al., 2010). Contudo, os efeitos de fontes de minerais orgânicos na estabilidade oxidativa durante o processo de extrusão ainda é pouco conhecido, sendo possível que estas fontes reduzam a reatividade do Fe e Cu com as macromoléculas oxidáveis no alimento quando comparadas às fontes inorgânicas, facilmente ionizáveis.

Frente a isto, neste estudo foram comparadas as fontes de minerais (inorgânicas ou orgânicas) na oxidação lipídica em alimentos extrusados para gatos adultos, durante o processamento via extrusão e vida de prateleira.

2. Materiais e Métodos

O experimento foi realizado em duas etapas, sendo: i) avaliação dos efeitos das fontes e níveis de minerais sobre a oxidação lipídica durante o processo de extrusão e, ii) avaliação da vida de prateleira destes mesmos alimentos durante 12 meses.

As dietas foram extrusadas na Fábrica de rações da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal (FCAV/UNESP), e as análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA/UEM), Laboratório de Análises Físico-Químicas em Águas e Alimentos da UEM (CCQ/UEM) e Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Felinos Domésticos (FEI/UEM).

Para os testes com animais, o protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEM), sob o nº 2818200121.

2.1. Dietas

Foram formuladas cinco dietas para gatos adultos em manutenção, consistindo em uma dieta controle (DC), sendo a esta dieta incluídos dois níveis de uma mistura comercial de Fe, Cu e Zinco, nas formas inorgânica (MI-1 e MI-2) e orgânica (MO-1 e MO-2), resultando nos tratamentos que seguem abaixo:

1. Dieta Controle (DC): formulada para atender os requerimentos nutricionais mínimos descritos em *European Pet Food Industry Federation* (FEDIAF, 2018). A pré-mistura de vitaminas e minerais desta dieta não teve as fontes de Fe, Zn e Cu, sendo as concentrações destes minerais fornecidas apenas por meio dos ingredientes utilizados na formulação;
2. Recomendação mínima de minerais inorgânicos (MI-1): Foi adicionada à DC a recomendação mínima de acordo com FEDIAF (2018) com fonte inorgânica dos minerais (6,7 mg / kg de cobre; 107 mg / kg de ferro e 100 mg / kg de zinco) em Matéria Seca (MS);
3. Minerais inorgânicos duas vezes a recomendação mínima (MI-2): À DC foi acrescida uma recomendação duas vezes maior que a recomendação da FEDIAF (2018) com fontes inorgânicas (13,4 mg / kg de cobre; 214 mg / kg de ferro e 200 mg / kg de zinco) em base de MS.
4. Mínimo de minerais orgânicos (MO-1): Foi incorporada à DC a recomendação mínima da FEDIAF com fontes de minerais orgânicos (6,7mg / kg de cobre; 107mg / kg de ferro e 100 mg / kg de zinco).
5. Minerais orgânicos duas vezes maior que a recomendação mínima (MO-2): Na DC foi adicionada a recomendação da FEDIAF (2018) duas vezes maior, com as fontes orgânicas (13,4 mg / kg de cobre; 214 mg / kg de ferro e 200 mg / kg de zinco) com base na MS.

A inclusão dos ingredientes nos tratamentos experimentais e a composição química analisada estão descritas na tabela 1.

Tabela 1

Composição de Ingredientes e química analisada das dietas

Tratamentos (%Inclusão dos ingredientes)					
Ingrediente	Controle	MI 1	MI 2	MO 1	MO 2
Milho Grão	22,90	22,90	22,90	22,90	22,90
Quirera de arroz	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Farinha de Vísceras de aves	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00
Óleo de frango	10,26	10,26	10,26	10,26	10,26
Cloreto de Colina	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Sal	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Farinha de Glúten 60% PB	14,55	14,55	14,55	14,55	14,55
Farelo de Soja	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Calcário	0,930	0,930	0,930	0,930	0,930
Premix (livre de Ferro)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Cloreto de Potássio	0,320	0,320	0,320	0,320	0,320
Fibra de Cana	2,140	2,140	2,140	2,140	2,140
Palatabilizante em pó	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
Acidificante ¹	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Antioxidante ²	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Fonte de Ferro ³ (mg/kg)	-	400,0	800,0	600,0	1200
Fonte de Cobre ⁴ (mg/kg)	-	20,00	40,00	6,000	120,0
Fonte de Zinco ⁵ (mg/kg)	-	480,0	9606	640,0	1280
Composição Química					
Umidade (%)	5,280	4,820	4,730	4,420	4,090
Valores em base de Matéria Seca					
Proteína Bruta (%)	37,26	37,26	37,19	37,26	37,25
Extrato Etéreo por Hidrólise Ácida (%)	14,81	13,80	14,48	13,53	14,38
Cinzas (%)	5,930	5,720	5,830	6,230	5,310
Fibra Bruta (%)	3,370	3,250	3,280	3,290	3,330
Extrato não nitrogenado (%)	38,81	39,87	39,23	45,55	39,79
Energia Bruta (kcal/kg)	5,220	5,230	5,220	5,240	5,260
Ferro (mg kg ⁻¹)	28,10	134,6	241,8	133,9	240,3
Cobre (mg kg ⁻¹)	3,700	10,20	16,80	10,90	17,40
Zinco (mg kg ⁻¹)	21,50	118,4	219,3	120,6	221,7
Manganês (mg kg ⁻¹)	5,900	6,100	6,120	7,300	7,500

1 Mold Zap Citrus - ácido propiônico (250g / kg), hidróxido de amônio (50g / kg) (Alltech, Inc., EUA)

2 Eurotiox P-18 - BHT (125g / kg), BHA (10 g / kg) e Etoxiquina (10 g / kg) (Eurotec Nutrition, Palhoça, Brasil)

3 Fonte orgânica - Bioplex ferro (150g / kg; Alltech, Inc., EUA); Fonte inorgânica - sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO₄.7H₂O, 99% PA-ACS, 200 g / kg Fe, Labsynth, Brasil)4 Fonte orgânica - Bioplex cobre (100g / kg; Alltech, Inc., EUA); Fonte inorgânica - sulfato de cobre anidro (CuSO₄, 99%, PA-ACS, 300 g / kg Cu, Labsynth, Brasil)5 Fonte orgânica - Bioplex zinco (150g / kg; Alltech, Inc., EUA); Fonte inorgânica - sulfato de zinco hepta-hidratado (FeSO₄.7H₂O, 99%, 227,4 g / kg Zn, PA-ACS, 200 g / kg Fe Labsynth, Brasil)

2.2. Processamento das Dietas

As fontes de microelementos, orgânicas ou inorgânicas foram inicialmente diluídas em milho moído e homogeneizadas em misturador tipo Y. Após esta pré-diluição e pré-mistura, estes foram adicionados no misturador juntamente com o restante dos ingredientes e então cada uma das dietas foi devidamente misturada. A mistura foi então moída em moinho de martelos, equipado com peneira de furos de 0,9mm (Sistema Tigre de Mistura e Moagem, Tigre, São Paulo, Brasil). As rações foram extrusadas na Fábrica de rações da Faculdade de Ciências

Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal (FCAV/UNESP), em extrusora da Marca Manzoni, Modelo: MEX- 250.

As condições de processamento foram registradas a cada 15 min para: velocidade do parafuso de alimentação (rpm); velocidade do eixo do condicionador (rpm); fluxo de água do condicionador (kg/h); temperatura da massa de descarga do pré-condicionador (°C); velocidade do eixo da extrusora (rpm); carga motora (A); velocidade da faca de corte (rpm); pressão de vapor (psig); temperatura ambiente (°C); umidade do ar (%). A densidade aparente de *kibbles* após a extrusão e após a secagem (g/L) foi registrada a cada tempo de amostragem (medido como o peso do alimento correspondente a um volume de 1L). A taxa de fluxo de massa da extrusora medida diretamente em um balde em cada tempo de amostragem. A cada tempo de observação, as amostras de alimentos foram coletadas do pré-condicionador, da extrusora e da secadora. As amostras de alimentos foram armazenadas a -20°C para posteriores análises. Após a extrusão, os *kibbles* foram secos em um secador de ar forçado a 110°C por aproximadamente 20 min. O intuito dessas avaliações foi manter as condições de processo semelhantes entre os tratamentos, conforme pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2

Parâmetros de Extrusão durante o processamento das dietas experimentais

	Parâmetro				
	Controle	MI 1	MI 2	MO 1	MO 2
Temperatura do Condicionador (°C)	82,80	84,50	85,80	85,00	86,20
Produtividade (kg/h)	204,3	155,3	155,8	165,3	172,5
Temperatura da Extrusora (°C)	138,5	134,8	133,5	135,3	132,8
Pressão da Extrusora (barr)	18,10	18,80	17,5	22,90	23,60
Densidade (g/l)	365,0	362,0	366,0	364,0	368,0
SME (Kw. T. h-1)	15,70	18,00	17,60	17,20	16,20
Teor de Umidade (%)					
Saída do Condicionador	24,90	25,90	26,60	24,10	24,00
Saída da Extrusora	25,70	25,30	25,80	23,60	22,30
Saída do Secador	4,300	4,000	4,400	3,200	3,000

SME – Specific Mechanical Energy (Energia Mecânica Específica).

2.3. Amostragem durante a extrusão

A coleta das amostras durante o processo de extrusão se deu em quatro repetições por tratamento (n = 4), sendo as amostras coletadas em três etapas, simultaneamente em cada repetição: Antes da extrusão (mistura pré extrusão); Após a secagem; e após o revestimento com palatilizante e óleo de frango (produto acabado). Para a realização das análises se fez um *pool* a cada duas amostras.

2.4. Composição química das dietas

Os alimentos foram analisados quanto ao teor de umidade (método 930.15), proteína bruta (método: 954.01), extrato etéreo por hidrólise ácida (método: 954.02), cinzas (método: 942.05) e fibra bruta (método: 978.10) de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (1995). A energia bruta das dietas foi determinada por calorimetria adiabática (calorímetro 6200 Isoperibol, Parr Instrument Company, Moline, Estados Unidos).

Por fim, os extrativos não nitrogenados foram determinados pela diferença entre 100% e os demais componentes da análise bromatológica (proteína bruta, cinzas, fibra bruta, extrato etéreo e umidade).

Para as determinações dos minerais Ferro, Cobre, Zinco e Manganês, primeiramente as amostras foram incineradas em mufla com temperatura de 600°C por 5 horas. Em seguida, procedeu-se a digestão das amostras em 5mL de ácido nítrico e 1mL de peróxido de hidrogênio.

Após a digestão das cinzas, na solução de ácido, a solução foi filtrada e diluída para 100mL com água ultrapura. Em seguida os minerais foram determinados individualmente por espectrometria de emissão atômica por plasma de microondas Agilent 4200 indutivamente (MP-AES; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipado com um Nebulizador inerte One Neb e uma câmara de pulverização ciclônica de classe de passagem dupla (Agilent Technologies).

2.4. Determinação de *shelf-life*

Para análise dos efeitos e níveis de minerais durante a vida de prateleira, cada tratamento foi acondicionado em embalagens de polipropileno. As amostras dos produtos acabados, após recobrimento com óleo de frango e palatilizante, foram colocadas em estufa da Marca nova Ética, Modelo : 410/6NDR, N de série : 08125/06 para controle de temperatura à 30°C.

A cada quarenta e cinco dias, por um período de doze meses, foram realizadas coletas, totalizando nove períodos de coletas, sendo: Dia 0, Dia 45, Dia 90, Dia 135, Dia 180, Dia 225, Dia 270, Dia 315 e Dia 360. O material coletado foi misturado e embalado a vácuo e mantido congelado até o momento da realização das análises.

Durante a *shelf-life*, foram realizadas as análises de ácidos graxos (AGs), residual de antioxidantes, índice de peróxido (IP), atividade de água (Aw) e umidade.

2.5. Análise do Perfil de Ácidos Graxos

A análise dos ácidos graxos foi realizada por Cromatografia Gasosa (CG) empregando a metodologia de ISO- 5509 (1978). O óleo das amostras foi extraído previamente por hidrólise ácida conforme metodologia da AOAC (1995) (método: 954.02), com a adição de 4µl de solução de metanol e BHA 10%, de maneira a minimizar o efeito da complexação de lipídios devido ao processamento.

Para a análise cromatográfica, foram pesados aproximadamente 100 mg de óleo, em um tubo e adicionado 2,0 mL de n-heptano e a solução foi agitada por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 2,0 ml de solução KOH/metanol (2,0 mol.L⁻¹) e agitado por mais 2 minutos, posteriormente, foram adicionados 500 µL de padrão interno (23: 0), e a fase superior foi coletada e injetada no CG.

A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo ThermoScientific Trace Ultra 3300 equipado com detector de ionização de chama (FID), sistema de injeção de amostra split / splitless e coluna capilar de sílica fundida (Select FAME, 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de um filme fino de cianopropil como uma fase estacionária). As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 235°C. A temperatura da coluna foi aquecida a 165°C, mantida por 7 min e depois aquecida novamente a 185°C a taxa de aquecimento de 4°C min⁻¹, e então mantida constante por 3 min. Em seguida, uma nova taxa de aquecimento de 6°C min⁻¹ foi aplicada para que a temperatura da coluna atingisse 235°C. A temperatura da coluna foi mantida a 235°C por 2,67 min, totalizando tempo de análise de 26 min. Hidrogênio (H₂), com fluxo constante de 1,2 mL min⁻¹, foi utilizado como gás carreador e Nitrogênio como gás auxiliar (make-up) a 30 mL min⁻¹. No detector, a chama foi produzida com H₂ e ar sintético com vazões de 30 e 300 mL min⁻¹, respectivamente. As amostras foram injetadas em modo split, com proporção de 1:40 e volume de injeção de 1,0 µL. Os FAMES foram identificados comparando o tempo de retenção da amostra e os constituintes do padrão. Um fator de correção foi utilizado para calcular as concentrações de ácidos graxos presentes na amostra de acordo com Visentainer e Franco (2012), sendo as concentrações expressas em mg/g⁻¹ da amostra. Além disso, foi realizada correção dos valores obtidos pelo detector, uma vez que a magnitude do sinal gerado pelo FID é proporcional ao número de C + ligados aos átomos de hidrogênio.

2.7. Determinação do Residual de Antioxidantes

A análise residual dos antioxidantes foi realizada via Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Para tanto, os solventes foram

filtrados em membrana de 0,45 μm . A extração foi realizada em tubo Falcon, no qual foram retirados 2 g de amostra de ração dissolvida em 10 mL de metanol. A mistura foi agitada durante 5 min. O solvente foi então evaporado em evaporador rotativo, a temperatura de aproximadamente 40°C. Os extratos foram filtrados em membrana com poros de 0,45 μm antes da injeção no cromatógrafo.

As condições cromatográficas foram: Vazão 1,2 mL / min. começando com 70:30 por 3 min, (v / v) acetonitrila-água (acidificado com ácido acético 5%, para pH 3,1), com a mesma fase móvel a proporção passou para 80:20 por 5 min, retornando para as condições iniciais 70:30 por 4 min tempo de execução 12 minutos.

2.8. Análise de Índice de Peróxido

As análises de índice de peróxido nas rações foram feitas conforme metodologia adaptada ao método oficial do Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, 2009.

Ao primeiro passo, foram pesados 20g de amostra em Erlenmeyer de 250 ml. À amostra foi adicionado 50 mL de metanol, 25 ml de clorofórmio e 18,2 ml de água, então os Erlenmeyers eram tampados hermeticamente e submetidos à agitação durante 30 minutos. Concluído o tempo de agitação, adicionou-se 25 ml de clorofórmio e 25 ml de solução de sulfato de sódio 1,5%, tampou-se novamente e se agitou por mais 2 minutos.

A solução com a amostra foi então transferida para funil de separação, deixando que vertesse a camada inferior (clorofórmio e lipídios) para um funil de menor tamanho, contendo filtro de papel e sulfato de sódio anidro, a função deste último serve para remoção das frações de água que invariavelmente eram arrastados, recolhendo o filtrado em Erlenmeyer de 125 ml.

Com uso de pipeta volumétrica foi pipetado exatamente 20 ml do filtrado para outro Erlenmeyer de 125 ml e então foram adicionados 20 ml de ácido acético concentrado e 0,5 ml de solução fresca e saturada de iodeto de potássio. A solução era levemente agitada e levada ao escuro por 1 minuto. Por fim, eram adicionados 30 mL de água destilada e 1 mL de solução 1% de amido, se ao adicionar o amido ocorre alguma alteração de cor, mesmo que pequena, passando de amarelo para roxo, a solução era titulada com solução de Tiosulfato de Sódio 0,1N, até que a coloração escura desaparecesse.

Se confirmado o peróxido, era pipetado 5 ml do filtrado em placas de gordura com peso previamente conhecido e colocadas em estufa a 105°C por uma hora. Após o tempo de estufa, as placas de gordura eram resfriadas em dissecador e pesadas.

Com o volume de Tiosulfato de Sódio usado para titulação de cada amostra foram

feitos os cálculos do índice de peróxido através da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Peróxido mEq de gordura} = \frac{(A-B) \times M \times F \times 1000}{P \times 4}$$

Em que:

A: Volume de Tiosulfato de sódio 0,1M gasto na titulação da amostra, em ml;

B: Volume de Tiosulfato de sódio 0,1 M gasto na titulação da prova branco, em ml;

M: Molaridade da solução de Tiosulfato de sódio;

F: Fator de correção da solução de Tiosulfato de sódio;

P: Peso da gordura extraída na alíquota x 4 (peso da placa com gordura – peso da placa vazia), em gramas;

1000: Conversão para miliequivalentes.

2.9. Análise da Atividade de água e Umidade

A umidade foi obtida pela secagem em estufa a 105°C (método 930.15) e a atividade de água pelo método de ponto de orvalho (método 978.18) com auxílio de equipamento específico (Aqualab 4TE, Decagon Devices, Inc, USA), ambas metodologias descritas pela AOAC (1995).

3.0. Teste de Palatabilidade

Com o intuito de verificar a percepção organolética dos gatos frente a alimentos com diferentes fontes de minerais, durante a vida de prateleira, o teste de palatabilidade foi realizado para as dietas Controle, MI 2 e MO 2.

Foi realizado um teste de palatabilidade com rações iguais para verificar se os animais estavam aptos a perceber mudanças no alimento. O poder de teste comprovou que não havia diferença de palatabilidade entre as rações, pois a razão de ingestão neste desafio de 0,43 e 0,57.

Para os testes com as dietas experimentais, foram incluídos gatos adultos, sem raça definida, machos e fêmeas em três comparações diferentes usando o método de dois potes (A x B), sendo os desafios: DC x MI 2; DC x MO 2; MI 2 x MO 2. Os testes foram realizados no início do experimento (Dia 0) e a cada três meses durante o período de *shelf-life* (Dia 90, Dia 180, Dia 270 e Dia 360).

Os animais receberam 60g de cada alimento teste, fornecidos nos potes indentificados (A e B), e cada um continha uma ração diferente. Alojados em gaiolas individuais, para determinação da primeira escolha de olfato e paladar, determinados na primeira refeição do dia

e cálculo da razão de ingestão (IR) entre as dietas em cada ensaio, ao final do dia, considerou-se o consumo de ração A proporcional ao consumo total. O período de teste se fez em dois dias por desafio, sendo o primeiro dia de adaptação.

O tamanho e cor dos potes eram iguais de maneira a eliminar qualquer possível interferência por fatores externos ao alimento. Durante o período experimental, os gatos recebiam o alimento diário em quatro refeições diárias, sendo duas pelo período da manhã nos horários 08h e 10h e duas a tarde às 14h e 16h, período no qual os potes eram invertidos de posição. Em cada refeição os gatos eram mantidos nas gaiolas por aproximadamente vinte minutos.

3.1. Análises Estatísticas

O estudo apresentou um delineamento inteiramente ao acaso, com as medidas repetidas (etapas do processo ou períodos de *shelf-life*) analisados através do programa estatístico R versão 3.3.3 (2017). Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) considerando os tratamentos, etapas do processamento ou dias de *shelf-life* e suas interações.

Para análises de ácidos graxos foi utilizado um modelo de efeitos mistos em que é adicionado efeito aleatório a média geral devido ao preparo da mistura e/ou em etapa (pré e pós extrusão). Assim o modelo foi descrito como segue:

$$y_{ijl} = (\mu + b_{j0}) + \alpha_i + (\beta_l + b_{j1}) + (\alpha\beta)_{il} + \varepsilon_{ijl}; i = 1, \dots, 5 \quad j = 1, \dots, 10 \quad l = 1; 2$$

Em que:

μ : uma constante comum a todos os tratamentos (média geral);

α_i : efeito fixo do i -ésimo tratamento;

β_l : efeito fixo da l -ésima quantificação;

b_{j0} ; b_{j1} : efeitos aleatórios da j -ésima porção e j -ésima extrusão, $b_{j0} \stackrel{iid}{\sim} N(0; \sigma^2 u_0)$ e $b_{j1} \stackrel{iid}{\sim} N(0; \sigma^2 u_1)$;

ε_{ij} : o erro aleatório, $\varepsilon_{ij} \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma^2)$.

Para a concentração de antioxidantes sintéticos BHA e BHT foi calculado o percentual de retenção nas concentrações após o processo ou ao longo do *shelf-life*. Desta forma, procedeu-se com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis considerando apenas o efeito de tratamento.

Para análise dos índices de peróxido, os valores foram agrupados considerando fonte do mineral (MI x MO), e níveis dentro da mesma fonte (MI 1 x MI 2; MO 1 x MO2) considerando o período de *shelf-life*. O modelo foi então ajustado:

$$\text{Peróxido} = \beta_0 + \beta_1 \text{ Período} + \beta_3 \text{ Grupo1} + \beta_4 \text{ Período} * \text{Grupo1} + \varepsilon$$

Em que:

β_0 ; β_2 ; β_3 ; β_4 :Efeito fixo;

ε : resíduo.

Os valores de umidade e atividade da água são apresentados na forma de análise descritiva.

Os resultados do teste de palatabilidade foram analisados conforme metodologia descrita por Pires et al. (2020) considerando como significativo o poder de teste superior a 0,70, que foi calculado considerando tamanho da amostra (n) usada por desafio, diferença nas preferências (delta), desvio padrão (DP) e o nível de significância a 5%.

3. Resultados

3.1. Efeito das fontes de minerais durante o processo de extrusão

Na tabela 3 está descrito o perfil de ácidos graxos da gordura, das rações experimentais, considerando a mistura pré-extrusão (etapa 1) e pós-extrusão (etapa 2). Nota-se que houve perda significativa dos ácidos graxos palmítico (16:0), oleico (18:1n9); linoleico (18:2n6), linolênico (18:3n3) e araquidônico (20:4n6) durante a extrusão.

Tabela 3

Perfil de ácidos graxos (mg/g de gordura) na dieta Controle e contendo diferentes níveis de minerais inorgânicos (MI-1 e MI-2) ou orgânicos (MO-1 e MO-2) antes ou após a extrusão

	Controle	MI 1	MI 2	MO 1	MO 2	Média	EPM	MI * MO
Ácido Graxo 16:0								
Antes	235,4 Aa	214,4 Ae	226,7 Ac	231,4 Ab	219,9 Ad	225,6	2,403	
Depois	222,7 Ba	210,3 Bc	200,5 Be	202,9 Bd	214,2 Bb	210,1	2,528	
Média	229,1	212,4	213,6	217,2	217,1	217,8		<0,0001
EPM	3,175	1,025	6,550	7,125	1,425			
Ácido Graxo 18:1n9								
Antes	302,6 Ac	303,6 Ab	304,3 Ab	301,6 Ad	311,2 Aa	304,7	1,074	
Depois	224,3 Bc	223,9 Bc	230,0 Bb	235,7 Ba	215,6 Bd	225,9	2,124	
Média	263,5	263,8	267,2	268,7	263,4	265,3		0,121
EPM	19,58	19,93	18,58	16,48	23,90	19,69		
Ácido Graxo 18:2n6								
Antes	269,9 Ad	268,9 Ad	278,4 Aa	274,8 Ab	274,4 Ab	273,28	1,099	
Depois	218,6 Ba	207,9 Bc	211,7 Bb	218,1 Ba	196,1 Bd	210,5	2,604	
Média	244,3	238,4	245,1	246,5	235,3	241,9		0,829
EPM	12,83	15,25	16,68	14,18	19,58			
Ácido Graxo 18:3n3								
Etapa 1	1,181 Ab	0,866 Bc	1,424 Aa	1,193 Ab	1,129 Ab	1,159	0,056	
Etapa 2	1,129 Aa	1,110 Aa	1,006 Bbc	0,946 Bc	0,899 Bcd	1,018	0,028	
Média	1,155	0,988	1,215	1,070	1,014	1,088		0,001
EPM	0,013	0,061	0,105	0,062	0,057			
Ácido Graxo 20:4n6								
Etapa 1	4,410 Aab	4,500 Aa	3,860 Acd	3,920 Abcd	3,820 Ad	4,102	0,092	
Etapa 2	3,040 Bb	2,560 Bd	2,890 Bc	3,750 Aa	2,980 Bbc	3,044	0,123	
Média	3,725	3,530	3,375	3,835	3,400	3,573		0,519
EPM	0,343	0,485	0,243	0,043	0,210			

EPM – Erro padrão da média; MI * MO – interação entre as fontes de minerais; Letras maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente; Letras minúsculas diferentes na linha diferem estatisticamente.

Houve reduções significativas dos ácidos graxos em todos os tratamentos, durante a extrusão, e interação entre as fontes de minerais inorgânicos e orgânicos, podendo ser confirmado na figura 2, em que se nota o comportamento de cada ácido graxo em cada tratamento, nas etapas de processo. Embora tenham ocorrido diferenças significativas entre os tratamentos dentro de cada período, este dado deve ser analisado com cautela, pois, nota-se que as diferenças já foram verificadas desde a etapa de mistura antes da extrusão.

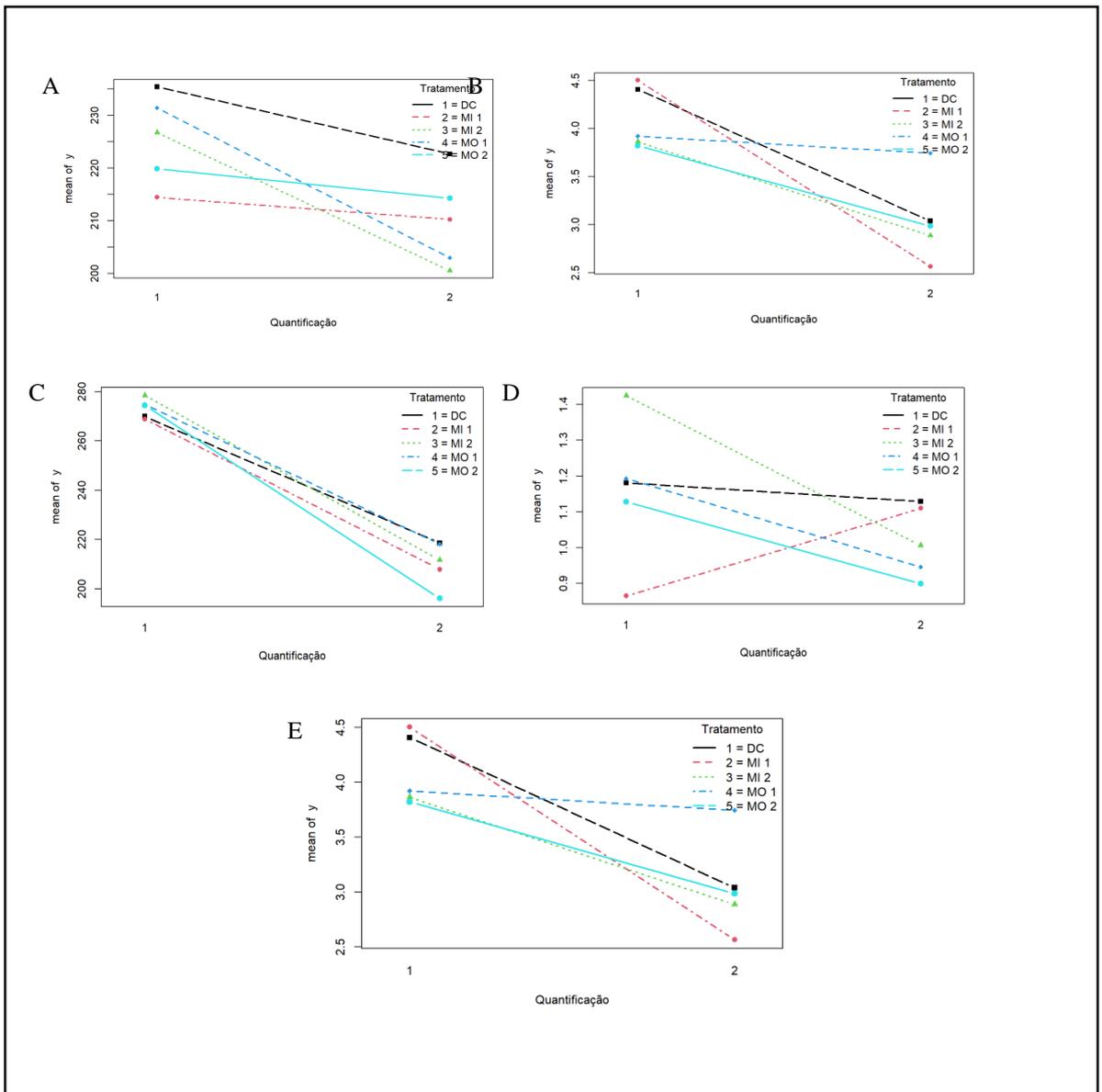


Figura 2

Concentração de ácidos graxos na mistura pré-extrusão (1) e pós-extrusão (2) nos tratamentos experimentais. 2A ácido graxo palmítico; 2B ácido graxo oleico; 2C ácido linoleico; 2D ácido graxo linolênico; 2E ácido graxo araquidônico.

Durante o processamento das rações ocorreu redução na concentração de antioxidantes BHA e BHT, como descrito na tabela 4.

Tabela 4

Retenção de antioxidantes sintéticos após a extrusão

	Controle	MI 1	MI 2	MO 1	MO 2	Média	DP	P
BHA	42,83	33,15	42,52	38,16	35,07	38,35	3,881	0,081
BHT	50,98	35,39	37,98	32,78	32,78	37,98	6,778	0,081
Total	49,72	35,04	38,56	33,61	33,14	38,01	6,154	0,081

DP – Desvio Padrão; BHA – hidroxianisol-butilado; BHT – hidroxitolueno butilado.
P significativo <0,05.

A concentração média de antioxidantes total em cada tratamento, na fase inicial (pré extrusão) foi de 80,59; 94,13; 90,42; 72,92 e 77,97 ppm nos tratamentos Controle, MI 1, MI 2, MO 1 e MO 2, respectivamente, demonstrando a retenção de 49,72%; 35,04%; 38,56%, 33,61% e 33,14%. Houve redução significativa na concentração de antioxidantes ($P < 0,001$) durante o processo, todavia, considerando o valor de P (Tabela 4), pode-se perceber que não houve diferença entre os tratamentos.

3.2. Efeito das fontes de minerais sobre o *shelf-life*

Durante o período de *shelf-life* houve redução significativa dos ácidos graxos analisados, como pode ser notado na tabela 5, havendo diferenças também entre os tratamentos.

Independente do tratamento, durante o armazenamento houve redução média de 5,329%; 3,384%; 18,90%; 15,62% e 62,63% dos ácidos graxos palmítico (16:0), oleico (18:1n9); linoleico (18:2n6), linolênico (18:3n3) e araquidônico (20:4n6).

O comportamento dos ácidos graxos analisados nas rações experimentais, logo no início de armazenamento, com 180 dias e 360 dias de *shelf-life*, pode ser observado na figura 3.

Tabela 5

Perfil de ácidos graxos na Dieta Controle e contendo diferentes níveis de minerais inorgânicos (MI-1 e MI-2) ou orgânicos (MO-1 e MO-2) durante *shelf-life*.

	Controle	MI 1	MI 2	MO 1	MO 2	Média	EPM
Ácido Graxo 16:0							
Dia 0	235,3 Aa	212,0 Ad	225,3 Ab	215,7 Ac	217,0 Ac	221,1	4,172
Dia 180	234,4 Aa	202,2 Cd	212,4 Bb	208,5 Bc	209,4 Bc	213,4	5,511
Dia 360	231,5 Ba	209,0 Bb	207,8 Cb	198,0 Cc	200,1 Cc	209,3	5,948
Média	233,7	207,7	215,2	207,4	208,8	214,6	
EPM	0,296	0,749	1,352	1,327	1,262		
Ácido Graxo 18:1n9							
Dia 0	292,4 Ad	300,7 Ab	301,6 Aa	290,5 Ae	293,34 Ac	295,708	1,436
Dia 180	281,6 Bab	271,8 Bab	283,0 Ca	265,1 Cb	273,45 Ca	272,9725	1,859
Dia 360	284,1 Bd	275,5 Be	289,5 Bb	287,7 Bc	291,74 Ba	285,702	1,797
Média	287,0	286,2	301,6	277,8	283,4	287,205	
EPM	1,893	5,233	2,478	4,649	3,684		
Ácido Graxo 18:2n9							
Dia 0	251,4 Ab	219,2 Ae	255,1 Aa	233,1 Ac	230,4 Ad	237,8	4,259
Dia 180	240,9 Ba	218,4 Ade	232,5 Bb	221,7 Bcd	212,7 Be	225,2	3,208
Dia 360	198,5 Ca	189,1 Bd	190,9 Ccd	192,8 Cbc	193,2 Cb	192,9	0,999
Média	246,2	218,8	243,8	227,4	221,6	231,5	
EPM	9,336	5,717	10,86	6,925	6,202		
Ácido Graxo 18:3n3							
Dia 0	1,185 Aa	1,151 Aab	1,018 Ac	1,157 Aa	1,123 Ab	1,127	0,018
Dia 180	1,241 Aa	1,146 Ab	1,026 Ae	1,065 Bd	1,127 Ac	1,121	0,023
Dia 360	0,958 Bd	0,851 Bc	1,008 Ba	0,974 Cc	0,963 Bc	0,951	0,017
Média	1,213	1,149	1,022	1,111	1,125	1,124	
EPM	0,050	0,057	0,003	0,031	0,031		
Ácido Graxo 20:4n6							
Dia 0	3,570 Ab	2,950 Ac	3,010 Ac	3,840 Aa	3,410 Ab	3,356	0,107
Dia 180	3,150 Bab	2,400 Bc	3,020 Ab	3,450 Ba	3,210 Ba	3,046	0,111
Dia 360	1,400 Cb	1,490 Ca	1,240 Bc	1,110 Cd	1,030 Ce	1,254	0,054
Média	3,360	2,675	3,015	3,645	3,310	3,201	
EPM	0,384	0,246	0,342	0,492	0,440		

EPM – Erro padrão da média; Letras maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente; Letras minúsculas diferentes na linha diferem estatisticamente.

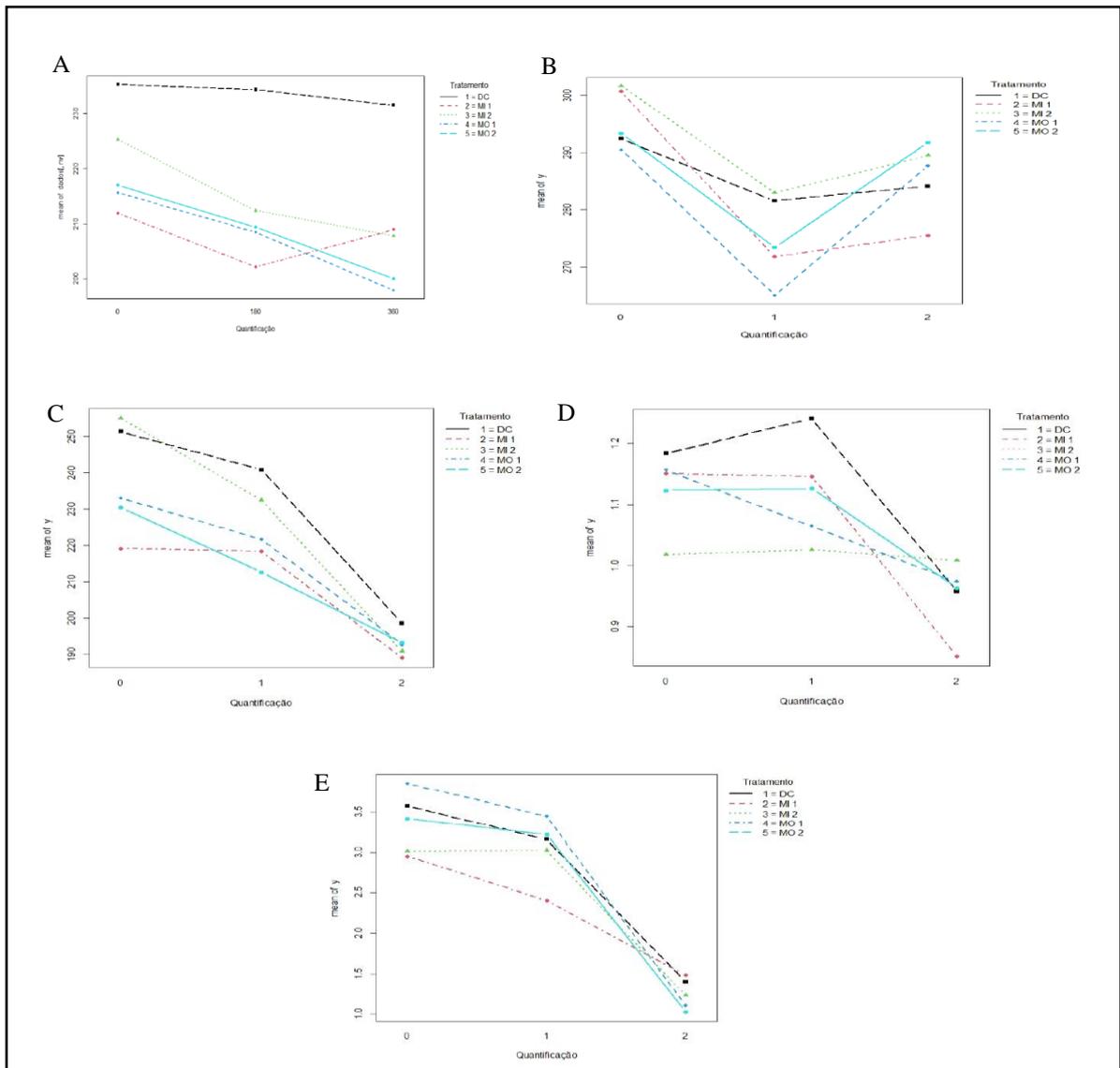


Figura 3

Comportamento de ácidos graxos durante a *shelf-life*. 3A ácido graxo palmítico; 3B ácido graxo oleico; 3C ácido linoleico; 3D ácido graxo linolênico; 3E ácido graxo araquidônico.

BHA e BHT reduziram significativamente durante a vida de prateleira, sendo mais evidente a redução nos primeiros 180 dias de armazenamento, como demonstrado na tabela 6. Houve efeito de tratamento para a retenção de antioxidantes e as maiores taxas de retenção foram observadas nos tratamentos contendo minerais orgânicos.

Tabela 6Retenção de antioxidantes sintéticos durante o *shelf-life*

	Controle	MI 1	MI 2	MO 1	MO 2	Média	DP	P
Dia 180								
BHA	59,99 ^c	55,41 ^d	60,37 ^c	64,71 ^b	67,28 ^a	61,55	4,107	0,012
BHT	30,77 ^d	33,60 ^c	26,24 ^d	39,06 ^b	45,25 ^a	34,98	6,604	0,009
Total	34,08 ^c	36,37 ^c	29,86 ^d	42,43 ^b	48,66 ^a	38,28	6,591	0,009
Dia 360								
BHA	50,89 ^{bc}	52,52 ^b	49,61 ^c	59,55 ^a	52,32 ^b	52,98	3,448	0,017
BHT	27,05 ^{bc}	28,92 ^b	19,00 ^c	37,16 ^a	40,60 ^a	30,55	7,656	0,015
Total	29,76 ^b	31,92 ^b	22,24 ^c	40,10 ^a	42,43 ^a	33,29	7,298	0,014

DP – Desvio Padrão; BHA – hidroxianisol-butilado; BHT – hidroxitolueno butilado.

P significativo <0,05.

Os valores de peróxido em mEq/1000g de gordura foram analisados entre níveis e entre as fontes de minerais estimados conforme os modelos ajustados:

Para MI 1:

$$\text{Peróxido} = 0,503179 + 0,023229 * \text{Período}$$

Para MI 2:

$$\text{Peróxido} = (0,503179 + 1,526617) + (0,023229 - 0,000120) * \text{Período}$$

Para MO 1:

$$\text{Peróxido} = 0,430459 + 0,012183 * \text{Período}$$

Para MO 2:

$$\text{Peróxido} = (0,430459 + 0,201894) + (0,012183 + 0,005966) * \text{Período}$$

Os valores estimados pelas equações estão descritos na tabela 7, em que são observados menores índices de peróxido nos tratamentos com minerais orgânicos quando comparados aos inorgânicos. Não foi realizada a comparação das médias para estes valores, pois os efeitos de fontes e níveis foram comparados pelos coeficientes angulares das retas. Pela curva de contraste entre as fontes, independente de níveis (Figura 4C) pode-se verificar que as fontes orgânicas apresentaram menor coeficiente angular em relação as fontes inorgânicas (P=0,000912), mostrando que há diferença significativa no acréscimo do índice de peróxido das rações contendo as fontes inorgânicas (MI) ou orgânicas (MO). Entre os níveis, dentro de cada fonte, foi possível verificar que para os minerais inorgânicos, o comportamento foi semelhante para ambos os níveis, porém, com maiores índices de peróxido no nível mais

elevado ($P=0,0208$). Para a fonte orgânica, houve interação entre nível e período e desta forma, os coeficientes angulares foram diferentes entre si, mostrando maior acréscimo no peróxido em cada período no tratamento MO-2 em relação ao MO-1 ($P=0,00499$).

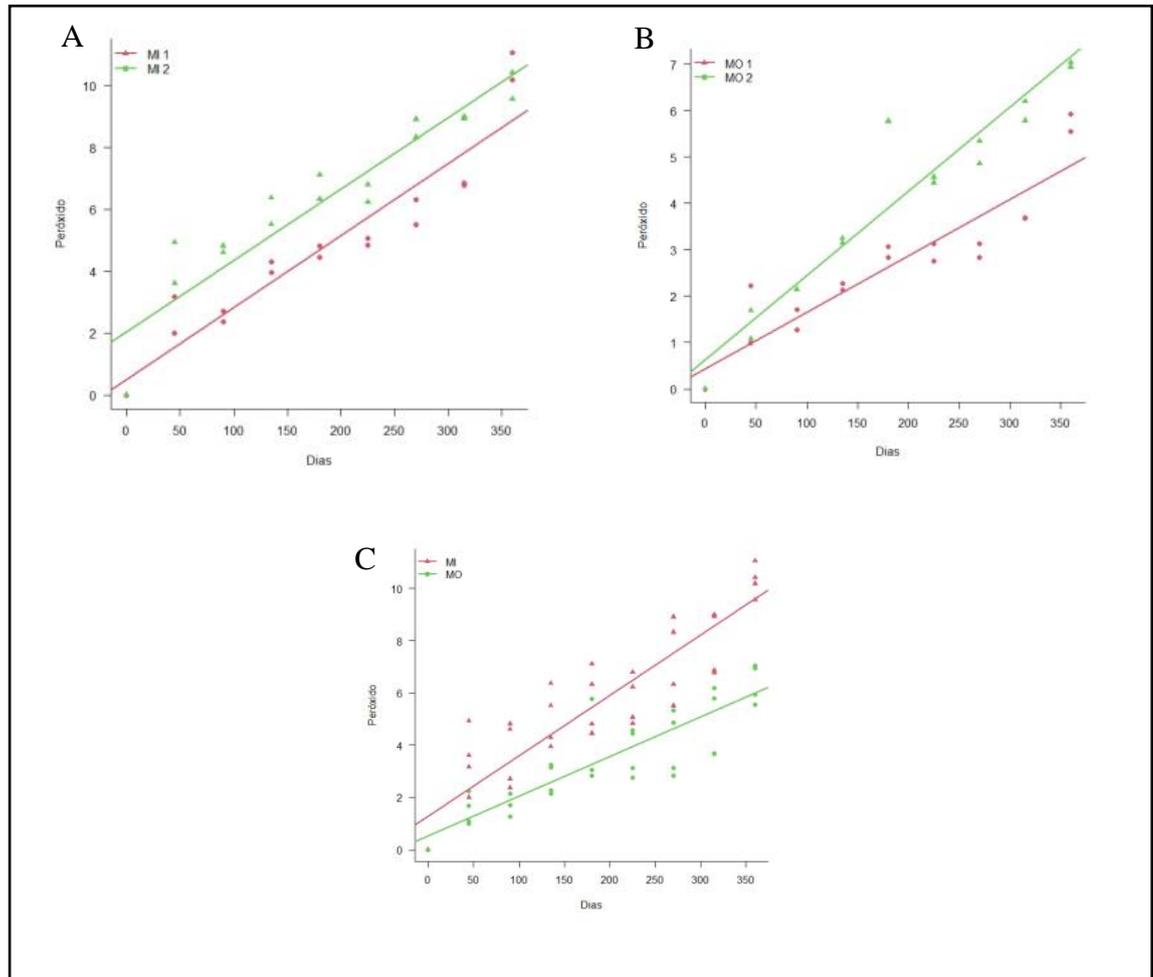


Figura 4

Dispersão dos valores de peróxido de rações para gatos, avaliados durante o período de armazenamento de até 360 dias. 4A Dispersão de peróxido MI 1 x MI 2; 4B Dispersão de peróxido MO 1 x MO2; Dispersão de peróxido MI x MO.

Tabela 7

Índice de peróxido estimados (mEq/1000g) nas dietas experimentais durante a vida de prateleira

	Controle	MI 1	MI 2	MO 1	MO 2
Dia 0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Dia 45	0,000	1,096	3,070	0,979	1,449
Dia 90	0,863	2,141	4,110	1,527	2,266
Dia 135	1,496	3,186	5,150	2,075	3,082
Dia 180	1,427	4,232	6,189	2,623	3,899
Dia 225	1,306	5,277	7,229	3,172	4,716
Dia 270	1,631	6,322	8,269	3,720	5,533
Dia 315	3,005	7,367	9,309	4,268	6,349
Dia 360	2,640	8,413	10,349	4,816	7,166

Os valores de atividade da água e umidade foram usados como parâmetros de controle e estão descritos na tabela 8. Observa-se que a atividade de água aumentou durante a estocagem das rações, seguindo o comportamento da umidade.

Tabela 8

Valores de atividade da água e umidade (%) das dietas experimentais durante a vida de prateleira

	Controle	MI 1	MI 2	MO 1	MO 2
Atividade de água					
Dia 0	0,45	0,41	0,43	0,37	0,37
Dia 45	0,58	0,52	0,5	0,48	0,46
Dia 90	0,56	0,53	0,51	0,51	0,50
Dia 135	0,56	0,54	0,54	0,52	0,55
Dia 180	0,56	0,55	0,54	0,54	0,54
Dia 225	0,58	0,55	0,55	0,54	0,54
Dia 270	0,57	0,52	0,51	0,51	0,51
Dia 315	0,54	0,52	0,52	0,50	0,49
Dia 360	0,60	0,60	0,60	0,59	0,59
Umidade (%)					
Dia 0	4,50	4,26	4,04	3,29	3,02
Dia 45	5,74	5,26	4,89	4,72	4,51
Dia 90	5,70	5,72	5,39	5,21	4,88
Dia 135	5,92	6,17	5,74	5,46	5,62
Dia 180	5,80	5,99	5,62	5,16	5,38
Dia 225	6,18	5,86	5,93	5,48	5,73
Dia 270	5,53	5,77	5,44	5,26	5,44
Dia 315	5,49	5,28	5,28	4,91	5,29
Dia 360	6,76	6,76	6,85	6,73	6,53

3.3. Efeito dos minerais sobre a Palatabilidade

É possível notar que houve preferência pela dieta suplementada com minerais orgânicos, em relação à Controle logo no início de armazenamento (Dia 0) e com 360 dias de *shelf-life*, e as dietas com minerais inorgânicos nos dias 90 e 360, considerando o poder do teste superior a 0,7, conforme método validado por Pires et al., 2020.

Tabela 9

Preferência alimentar de gatos nos desafios de palatabilidade durante o *shelf-life* das dietas experimentais.

Alimento A	Alimento B	Olfato A (%)	Paladar A (%)	RI A	DP	N	Poder do Teste
Shelf-life D0							
Controle	MI 2	33,33	33,33	0,49	0,187	15	0,105
Controle	MO 2	33,33	40,00	0,36	0,155	15	1,000
MI 2	MO 2	40,00	40,00	0,54	0,203	15	0,424
Shelf-life D90							
Controle	MI 2	40,00	52,00	0,51	0,244	25	0,106
Controle	MO 2	48,00	40,00	0,50	0,241	25	0,050
MI 2	MO 2	40,00	28,00	0,38	0,168	25	1,000
Shelf-life D180							
Controle	MI 2	52,00	52,00	0,53	0,165	25	0,548
Controle	MO 2	56,00	56,00	0,51	0,157	25	0,152
MI 2	MO 2	60,00	60,00	0,47	0,141	25	0,664
Shelf-life D270							
Controle	MI 2	58,00	38,00	0,53	0,175	24	0,494
Controle	MO 2	46,00	42,00	0,50	0,144	24	0,050
MI 2	MO 2	46,00	46,00	0,48	0,155	24	0,338
Shelf-life D360							
Controle	MI 2	15,00	35,00	0,52	0,221	20	0,194
Controle	MO 2	35,00	30,00	0,43	0,170	20	0,971
MI 2	MO 2	25,00	25,00	0,40	0,154	20	0,999

RI – Razão de ingestão; DP – Desvio Padrão; N – Número amostral.

Os índices de peróxido das dietas usadas nos testes de palatabilidade nos respectivos períodos de avaliação se encontram na Tabela 10.

Tabela 10

Índice de peróxido (mEq/1000g) das rações usadas para os testes de palatabilidade em gatos.

Período/Tratamento	Dia 0	Dia 90	Dia 180	Dia 270	Dia 360
Dieta Controle	0,000	1,561	2,933	5,078	5,813
MI 2	0,000	3,356	7,641	8,230	8,471
MO 2	0,000	2,923	5,675	9,105	10,54

4. Discussão

A extrusão é um processo versátil, com diferentes combinações de parâmetros de processo como temperatura, velocidade da rosca da extrusora e do alimentador, de maneira a desenvolver diversos produtos de valor agregado (Dalbhagat; Mahato; Mishra, 2019; Liu et al., 2011). O controle desses parâmetros se fez necessário para evitar a perda das características nutricionais e sensoriais do produto alimentício.

Durante a extrusão ocorrem modificações estruturais, químicas e funcionais nos ingredientes, promovendo a gelatinização do amido e solubilidade de fibras, desnaturando proteínas, e facilitando a oxidação lipídica e vitamínica, podendo complexar alguns nutrientes e como consequência modificar a biodisponibilidade dos nutrientes (Riaz, 2007; Alam et al., 2016).

Pouco se conhece sobre as alterações que ocorrem nos ácidos graxos durante a extrusão. É possível que o processamento, cause a complexação de alguns nutrientes ou que ocorra mudanças químicas, como hidrogenação, isomerização, polimerização e oxidação de lipídios. Tais alterações, podem fazer com que ocorram modificações na estabilidade oxidativa e no valor nutricional do produto final (Rockey; Plattner, 1995).

Pode ser que o processo de extrusão tenha complexado parte do teor de lipídios das dietas, podendo ter contribuído com a redução significativa durante o processo, mesmo que este efeito tenha sido amenizado pela hidrólise ácida das amostras, antes da análise de cromatografia, a metodologia não recupera todo o percentual da gordura.

Mesmo com o uso de antioxidantes, as reduções nos níveis de ácidos graxos na extrusão foram significativas. Esta redução dos compostos antioxidantes foi mais marcante, mostrando que estes são consumidos para proteger os lipídeos da oxidação. Compostos antioxidantes agem quelando as espécies reativas, formando produtos inativos. Desta forma, caso o antioxidante já tenha sido completamente utilizado, o radical peróxido irá remover o hidrogênio presente no ácido graxo insaturado, formando um hidroperóxido e mais um radical livre, até que toda a gordura tenha sido oxidada (Baller et al., 2018).

Para controle da oxidação lipídica em alimentos, os antioxidantes têm a função de inativar os radicais livres, por meio dos doadores de hidrogênio e elétrons, podendo atuar de forma secundária na complexação de íons metálicos, inativação de espécies reativas de oxigênio, transformação de hidroperóxidos em espécies não radicalares (Araújo, 2011).

Os antioxidantes BHA e BHT possuem nomes, estruturas e atividade semelhantes, todavia, o BHA é mais estável sendo mais efetivo em elevadas temperaturas quando em comparação ao BHT, que apresenta efeito protetor menor nessas condições. Por isso, é comum

seu uso associado. O BHA irá agir sequestrando radicais peróxidos ao passo que o BHT agirá como regenerador de radicais BHA (Araújo, 2011).

O processo oxidativo durante a extrusão pode ser minimizado também através do controle dos parâmetros de extrusão. Ribeiro (2018), ao avaliar os efeitos dos parâmetros de extrusão na oxidação de ácidos graxos, observou que no condicionador não houve redução do ácido linoleico, conforme o emprego de diferente energia mecânica específica (EME) durante o processo. Todavia, ocorreu redução importante na extrusora, e na saída da extrusora, sendo a maior concentração do ácido graxo em questão, quando foi adotado menor EME. Já no secador, a concentração do ácido linoleico reduziu conforme o aumento da EME.

Os metais de transição já foram descritos como catalisadores da oxidação de lipídios, fato este que explica a correlação negativa que ocorre entre o conteúdo mineral e a estabilidade oxidativa de um alimento (Miller; Buettner; D' Aust, 1990). Todavia, no presente estudo, o efeito dos metais de transição como catalisadores do processo oxidativo durante a extrusão, não foi percebido, podendo ser justificado pelo curto período do processo de extrusão e a presença de concentrações adequadas de antioxidantes em todos os alimentos, que eventualmente mascararam o efeito catalítico desses metais.

Neste estudo, mesmo que tenha ocorrido reduções significativas nos teores de ácidos graxos durante o processo de extrusão, não houve efeito das fontes e níveis de minerais, uma vez, que a dieta controle, cujo teor de metais de transição era mais baixo, também apresentou essa redução. Ribeiro (2018) verificou que esta redução pode ser superior a 50% quando estes ácidos graxos não estão protegidos por antioxidantes, demonstrando a necessidade de proteção de moléculas lipídicas por antioxidantes em alimentos extrusados.

Alimentos para cães e gatos, apresentam prazo de validade normalmente de 12 meses, todavia, este período pode ser estendido por até 18 meses (Brasil, 2009). Para que o tempo de prateleira do alimento seja aceitável, e estejam em boas condições para consumo, é necessário atentar para alguns fatores, como a atividade de água, umidade e os parâmetros oxidativos, tal como índice de peróxido.

Os principais fatores que favorecem a oxidação dos ácidos graxos, são a temperatura e a característica destes ácidos graxos, como tamanho da cadeia e número de duplas ligações. O teor de água, parece ser também relevante, uma vez que a concentração de água no alimento interfere na reação hidrolítica (Siger; Michalak, 2016).

Houve reduções significativas dos ácidos graxos durante o *shelf-life* nos diferentes tratamentos, contudo, não se pode concluir qual fonte foi mais eficaz na preservação dos ácidos graxos. Compostos pró-oxidantes, como os metais de transição, além de iniciar o processo

oxidativo, catalisam sua progressão, seja pela interação direta com ácidos graxos insaturados, gerando a formação de hidroperóxidos, ou pela formação de espécies reativas (Chaiyasit et al. 2007).

As reduções foram mais evidentes para os ácidos graxos linoleico (18:2n6), linolênico (18:3n3) e araquidônico (20:4n6) sendo de 18,90%; 15,62% e 62,63% respectivamente. Estes, por se tratarem de ácidos graxos poli-insaturados, apresentam estrutura lipídica mais susceptível à oxidação, uma vez, que é conhecida a relação entre o grau de insaturações e a propensão a oxidação (Cosgrove; Church; Pryor, 1987).

A redução de antioxidantes foi menos acentuada que os antioxidantes, evidenciando o que o efeito protetor e relevante dos antioxidantes em *pet food*. Compostos antioxidantes atuam protegendo os lipídios dos iniciadores da oxidação ou interrompendo a fase de propagação, o principal mecanismo de ação é a inativação de radicais livres de lipídios, diminuindo a produção de espécies reativas, interrompendo a fase de propagação da autooxidação lipídica (Gordon, 2004).

O índice de peróxido é um método analítico que permite medir os hidroperóxidos, formados no início da oxidação, comumente usados pelas indústrias. O método se baseia na oxidação do íon de iodeto, medindo o iodo produzido a partir da decomposição do iodeto de potássio pelos peróxidos (Shahidi; Zhong, 2005). O teor máximo sugerido para *pet food* é de 10 mEq/kg (ABINPET, 2019).

Através das equações ajustadas pelo modelo estatístico, foi possível estimar o período que levaria para que cada tratamento atingisse o padrão permitido, sendo que com 360 dias de vida de prateleira, a dieta com inclusão de minerais inorgânicos, duas vezes a recomendação da FEDIAF (2018), já estaria inapta para consumo, enquanto a dieta com suplementação de minerais na forma orgânica atingiria o limite apenas com 516 dias de *shelf-life*. Fato que comprova que as fontes orgânicas podem prevenir a formação de compostos resultantes da oxidação lipídica durante armazenamento.

Com base nos resultados de índice de peróxido, pode-se notar os efeitos dos metais de transição no processo oxidativo das rações, pois com 360 dias de prateleira, a dieta controle apresentou índice de peróxido de 2,64 mEq/kg, enquanto estas concentrações foram em média 3,55 vezes superior nos tratamentos com minerais inorgânicos, independentemente do nível, e 2,26 vezes superior nos tratamentos com minerais orgânicos. Desta forma, estes achados mostram a importância de se controlar os níveis de metais de transição nos alimentos de *pet food*, e adicionalmente, quando usados na forma orgânica, esta pareceu ser mais efetiva na prevenção da oxidação.

A umidade e a atividade de água são usadas pela indústria de *pet food* como maneira de evitar contaminações microbiológicas, servindo como parâmetros de qualidade. Todavia, não se recomenda que seja definido o teor de umidade isoladamente, pois a atividade de água é tida como medida mais adequada, indicando a quantidade de água disponível para que ocorram reações de degradação do alimento (Krabbe, 2009).

A água livre influencia a oxidação lipídica dos alimentos, intensificando a atividade catalítica dos metais de transição, com isso, o risco de oxidação aumenta conforme ocorre aumento da atividade de água e umidade do alimento (Food Ingredients Brasil, 2014).

Para *pet food* a umidade geralmente é de no máximo 14% (FEDIAF, 2018), e a atividade de água máxima recomendada de 0,65 para que microrganismos não se desenvolvam. Estes teores podem variar conforme a composição química do alimento em questão e o armazenamento (Park et al., 2008).

Estes achados, mostram que mesmo com 360 dias de *shelf-life* a umidade ainda se encontrou dentro do ideal, assim como o valor de atividade de água, comprovando que as rações, independente do tratamento, estavam aptas para o consumo considerando somente esses parâmetros.

O aumento da umidade e da atividade de água mais acentuado nos dias 0 e 45 pode ser justificado pela forma de armazenamento das rações antes do envase das amostras de *shelf-life*, após o revestimento com óleo de frango e palatilizante em pó, as rações ficaram em bombonas plásticas durante sete dias para que a gordura fosse uniformemente distribuída na ração, e pode ter contribuído com o aumento desses parâmetros durante este período.

Considerando que a palatabilidade é um ponto importante em alimentos para gatos, uma vez, que se tratam de animais extremamente exigentes, com o olfato e paladar apurados, neste teste, os animais conseguem diferir as alterações mesmo que pequenas nos graus de oxidação das dietas, preferindo alimentos com menores índices de oxidação confirmada pela análise de índice de peróxido. Podendo concluir então, que existe capacidade de detecção a presença de processos oxidativos nas dietas experimentais, que se explica pela seletividade do animais, com relação ao odor e ao sabor do alimento, pois os gatos apresentam tendência a ingestão de produtos com odor e sabor já conhecidos, em contraste aos desconhecidos (Becques et al., 2009).

Como resultado a ingestão de alimentos, os animais podem aprender a associar determinados alimentos com as consequências sensoriais e fisiológicas que trazem (Stubbs; Whybrow, 2004) fazendo com que os gatos tenham a preferência pelos alimentos com menor grau de rancificação, considerando que alimentos oxidados trazem uma série de malefícios a

saúde deles. No entanto, considerando o índice de peróxido das rações usadas para o teste de palatabilidade, a pequena diferença no grau de oxidação entre os tratamentos, não foi percebida pelos animais.

No tempo zero de *shelf-life*, quando ambas dietas não apresentaram nenhum grau oxidativo, os animais também tiveram preferência pela dieta suplementada com a fonte orgânica, em frente a dieta controle, sendo ambas com a mesma inclusão de palatilizante e gordura, comprovando a maior palatabilidade dos minerais orgânicos.

Em testes de palatabilidade, observou-se que a adição em 2% do extrato de levedura ao alimento completo seco extrusado conferiu maior palatabilidade, demonstrando preferência pela dieta contendo este ingrediente na proporção de 67%:33% em contraste com a dieta controle (Teshima et al., 2007). Comprovando maior aceitabilidade de minerais orgânicos frente aos inorgânicos.

Pode ser que o método de avaliação de vida de prateleira possa ter influenciado nos resultados, pois o método convencional, em temperatura ambiente, reproduz melhor as condições reais de armazenamento. Trabalhos já realizados, mostram que o efeito da temperatura em compostos com potencial antioxidante é afetado, ou seja, a medida que se aumenta a temperatura se reduz a capacidade antioxidante dos compostos (Paraginski et al., 2015).

Os testes de *shelf-life* em tempo real, em temperatura ambiente se mostraram mais eficientes ao analisar níveis crescentes de oxidação em dietas secas para *pets*, e se verificou que os residuais de antioxidantes se mostram como melhores preditores de vida de prateleira em comparação com o método de estufa (Chanadang; Koppel; Aldrich, 2016).

O método de avaliação de *shelf-life* em estufa, pode ter contribuído com a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos, pois não consegue reproduzir as condições reais de armazenagem.

5. Conclusões

Conclui-se que o processo de extrusão promove alterações oxidativas significativas em *pet food* e que estas não são influenciadas pela fonte ou níveis dos metais de transição cobre, ferro e zinco. Por outro lado, durante a vida de prateleira, os níveis de metais de transição afetam a estabilidade oxidativa dos alimentos, visto pelo consumo de compostos antioxidantes e aumento no índice de peróxido das amostras, os quais podem ser prevenidos parcialmente pelo

uso de fontes orgânicas destes elementos. Além de tudo, pode-se concluir que gatos preferem alimentos com fontes de minerais orgânicos em comparação as fontes inorgânicas.

6. Agradecimentos

A Alltech, pelo financiamento deste projeto.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos.

7. Referências

- Alam, M. S.; Kaur, J.; Khaira, H.; Gupta, K. 2016. Extrusion and extruded products: Changes in quality attributes as affected by extrusion process parameters: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 56, n. 3, p. 445-475.
- AOAC. 1995. Association of official analytical chemists international. Official methods of analysis. 16th ed. Arlington
- Araújo, J. M. A. 2011. Química de alimentos: teoria e prática. 5 ed. Viçosa, MG: UFV.
- Associação brasileira da indústria de produtos para animais de estimação (ABINPET) 2019: Dados de Mercado 2019. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site/mercado/2015>>. Acesso em 18 de jan. de 2021.
- Baller, M. A.; Pacheco, P. D. G.; Peres, F. M.; Monti, M.; Carciofi, A. C. 2018. The effects of in-barrel moisture on extrusion parameters, kibble macrostructure, starch gelatinization, and palatability of a cat food. *Animal Feed Science and Technology*, v. 246, p. 82-90.
- Becques, A.; Larose, C.; Gouat, P.; Serra, J. 2009. Effect of pre- and postnatal olfactogustatory experience on early preferences at birth and dietary selection at weaning in kittens. *Chemical Senses*, v. 35, p. 41-45.
- Berset, C.; Cuvelier, M. E. 1996. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and measuring antioxidizing power. *Sciences des Aliments*, v.16, p. 219-245.
- Brasil. 2009. Instrução Normativa nº 30 de 05 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. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Brennan, C.; Brennan, M.; Derbyshire, E.; Brijesh, K. T. 2011. Effects of extrusion on the polyphenols vitamins and antioxidants activity of foods. *Journal of Food Science and Technology*, v. 22, p. 570-575.

- Castera-Rossignol, A.; Bosque, F. 1994. Nouvelle approche des anti-oxydants. Oléagineux, Corps gras, Lipides, v. 1, p. 131-143.
- Chaiyasit, W.; Elias, R. J.; McClements, D. J.; Decker, E. A. 2007. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. Food science and nutrition, v. 47, n. 3, p. 299-317.
- Chanadang, S.; Koppel, K.; Aldrich, G. 2016. The impact of rendered protein meal oxidation level on shelf-life, sensory characteristics and acceptability in extruded pet food. Animals, v. 6, p. 44-61.
- Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. 2009. São Paulo: Sindirações, 3.ed.
- Cosgrove, J. P.; Church, D. F.; Pryor, W. A. 1987. The kinetics of autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Lipids, Champaign, v. 22, n. 5, p. 299-304.
- Dalbhat, C. G.; Mahato, D. K.; Mishra, H. N. 2019. Effect of extrusion processing on physicochemical, functional and nutritional characteristics of rice and rice-based products: a review. Trends in Food Science and Technology, v. 85, p. 226-240.
- FEDIAF. 2018. European Pet Food Industry Federation. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. FEDIAF Nutritional Guidelines, 100p.
- FIB. 2014. Food Ingredientes Brasil. São Paulo: Fihba, Trimestral. Disponível em: <<http://www.revista.fi.com>>. Acesso em 08 de fev. de 2021.
- Frankel, E. N. 2005. Lipid oxidation. 2ed. Bridgwater: OilyPress, p. 391-405.
- Gordon, M. H. 2004. Factors affecting lipid oxidation. In: Steel R, editor. Understanding and measuring the shelf-life of food. Boca Raton: CRC Press.
- ISO 5509. 1978. International Standard Organization: animal and vegetable fats and oils: preparation of methyl esters of fatty acids. London: International Organization for Standardization.
- Krabbe, E. L. 2009. Controle da atividade de água e produção de alimentos secos e semi-úmidos. In: I Congresso Internacional e VIII Simpósio sobre nutrição de animais de estimação - CBNA. Campinas – SP, Anais.
- Liu, C.; Zhang, Y.; Liu, W.; Wan, J.; Wang, W.; Wu, L.; Wan, J.; Wang, W.; Wu, L. Zuo, N.; Zhou, y.; Yin, Z. 2011. Preparation, physicochemical and texture properties of texturized rice produce by improved extrusion cooking technology, Journal of Cereal Science, v. 54, n. 3, p. 473-480.
- Maciel, M. P.; Saraiva, E.P.; Aguiar, E.F.; Ribeiro, P. A. P.; Passos, D. P.; Silva, J. B. 2010. Effect of using organic microminerals on performance and external quality of eggs of commercial laying hens at the end of laying. Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, p.344-348.

- Miller, D. M.; Buettner, G. R.; D' Aust, S. 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 8, p. 95-108.
- Paraginski, R. T.; Talhamento, A.; Oliveira, M.; Elias, M. C. 2015. Efeitos da temperatura nas alterações do teor de compostos com potencial antioxidante em grãos de milho durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 17, p. 159- 167.
- Park, K. J. B.; Park, K. J.; Cornejo, F. E. P.; Dal Fabbro, I. M. 2008. Considerações termodinâmicas das isotermas. *Revista Brasileira de Produtos Agropecuários*. v. 10, p. 83-94.
- Pires, K. A.; Miltenburg, T. Z.; Miranda, P. D.; Abade, C. C.; Janeiro, V.; Menolli, A. L.; Mizubuti, I. Y.; Ribeiro, L. B.; Vasconcellos, R. S. 2020. Factors affecting the results of food preference tests in cats. *Research in Veterinary Science*, v. 130, p. 247-254.
- Riaz, M. N. 2007. *Extruders and Expanders in Pet Food, Aquatic and Livestock Feeds*. Agrimedia, Clenze, USA.
- Ribeiro, P. M. 2018. Oxidação lipídica no processo de extrusão em *pet food*. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Produção Animal, Universidade Estadual de Maringá.
- Rokey, G.; Plattner, B. 1995. Process description: pet food production. Wenger Mfg, Inc., Sabetha, KS USA, p. 1–18.
- Sá, F. C. 2015. Energia Mecânica, Energia Térmica e Moagem na Extrusão de Alimentos para Cães e Gatos. 2015. 94 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Shahidi, F., Zhong. Y. 2005. *Bailey's industrial oil and fat products – lipid oxidation: measurement methods*, 6th ed. John Wiley & Sons, Inc., St. John's, Newfoundland, Canada.
- Sharma, S.; Kaur, S.; Dar, B.; Singh, B. 2014. Storage stability and quality assessment of processed cereal brans. *Journal of Food Science and Technology*, v. 51, p. 583–588.
- Siger, A.; Michalak, M. 2016. The long-term storage of cold-pressed oil from roasted rapeseed: Effects on antioxidant activity and levels of canolol and tocopherols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 118, n. 7, p. 1030–1041.
- Silva, F. A. M.; Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A. 1999. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22, n. 1, p. 94-103.
- Stubbs, R. J.; Whybrow, S. 2004. Energy density, diet composition and palatability: influences on overall food energy intake in humans. *Physiology & Behavior*, v. 81, p. 755-764.
- Teshima, E.; Rivera, N. I. M.; Kawachi, I. M.; Gomes, M. O. S.; Brunetto, M. A.; Carciofi, A. C. 2007. Extrato e levedura na alimentação de cães: digestibilidade e palatabilidade. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 44., 2007,

Jaboticabal. Anais...Jaboticabal, 2007.

Visentainer, J. V.; Franco, M. R. B. 2012. Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação, 2ª ed.; Editora da Universidade Estadual de Maringá/Eduem.