

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

MÉTODOS SUBSTITUTIVOS AO USO DE ANIMAIS EM GAIOLAS
METABÓLICAS PARA ESTUDOS DE DIGESTIBILIDADE E PH URINÁRIO EM
GATOS

Autora: Flávia Luiza Lavach

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

MARINGÁ
Estado do Paraná
Setembro – 2022

MÉTODOS SUBSTITUTIVOS AO USO DE ANIMAIS EM GAIOLAS
METABÓLICAS PARA ESTUDOS DE DIGESTIBILIDADE E PH URINÁRIO EM
GATOS

Autora: Flávia Luiza Lavach

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para a 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
Setembro – 2022

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

L393m	<p>Lavach, Flávia Luiza</p> <p>Métodos substitutivos ao uso de animais em gaiolas metabólicas para estudos de digestibilidade e PH urinário em gatos / Flávia Luiza Lavach. -- Maringá, PR, 2022. 73 f.: il. color., figs., tabs.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2022.</p> <p>1. Bem-estar animal. 2. Digestibilidade gatos. 3. Dióxido de titânio. 4. Óxido crômico. I. Vasconcellos, Ricardo Souza, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.</p> <p>CDD 23.ed. 636.0832</p>
-------	--



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

MÉTODOS SUBSTITUTIVOS AO USO DE ANIMAIS
EM GAIOLAS METABÓLICAS PARA ESTUDOS
DE DIGESTIBILIDADE E PH URINÁRIO EM GATOS

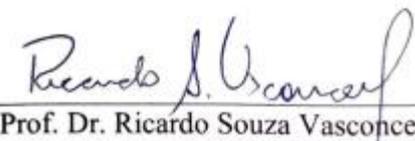
Autora: Flavia Luiza Lavach
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 02 de setembro de 2022.


Profª Drª Simara Marcia Marcato


Profª Drª Ananda Portela Felix


Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Orientador

"Seja a força que você está destinada a ser."

Clarissa Pinkola Estés

*À minha família,
Aos meus amigos especiais,*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e meus irmãos, Tati e Flávio, pelo amor e apoio incondicional, por sempre me incentivarem a fazer melhor, estudar e batalhar cada vez mais pelos meus objetivos e, principalmente, por me conferirem a oportunidade de chegar até aqui.

Ao meu orientador, Ricardo Vasconcellos, exemplo de paciência e profissionalismo, agradeço por toda sua dedicação e compreensão, pela confiança, liberdade, amizade e ensinamentos durante toda a minha jornada na pós-graduação.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Zootecnia e do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

As minhas irmãs de alma Anna, Alina, Isabela e Rafaela por serem minhas amigas e companheiras, por estarem sempre prontas a apoiar, escutar e acolher.

À Carolina, minha parceira desde a graduação, trilhou comigo cada passo deste mestrado, sendo sempre o apoio que eu necessitava, agradeço pelas horas de conversas e consolo, apoio no trabalho e amizade verdadeira.

Ao Osvaldo, técnico do Laboratório de Análises de Alimentos (LANA), que se tornou um grande amigo, pela valiosa ajuda nas análises, pela paciência com minhas infinitas dúvidas e erros, por todos os conselhos e puxões de orelha que me tornaram melhor.

À toda equipe do Centro de Ensino e Estudos Nutricionais em Felinos (CEENUFEL), pela ajuda na condução dos experimentos, pela dedicação e companheirismo.

Às estrelas principais deste trabalho, nossos queridos felinos.

Aos tutores que confiaram a mim os seus bichanos e, ainda, despenderam tempo e paciência para que o trabalho obtivesse êxito.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa e a Farmina PetFood, pelo financiamento do projeto.

BIOGRAFIA

FLÁVIA LUIZA LAVACH, filha de Edina Aparecida Lavach, nasceu em São Paulo - SP no dia 06 de maio de 1996. Em março de 2015, iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia, na Universidade Federal do Pampa. No mesmo ano, iniciou sua jornada na pesquisa como estagiária no Núcleo de Ensino, Pesquisa e Extensão em Aquacultura, atuando como bolsista de Iniciação Científica, durante os quatro anos que foi membro do grupo. Em dezembro de 2019, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Federal do Pampa. Em março de 2020, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na área de Produção Animal, da Universidade Estadual de Maringá, realizando estudo e pesquisas em Nutrição de Animais de Companhia.

ÍNDICE

CAPÍTULO I CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Bem-estar em animais de pesquisa.....	14
2.2 Digestibilidade	16
2.3 Indicadores em ensaios de digestibilidade	18
2.4 Óxido crômico.....	19
2.5 Dióxido de Titânio	22
2.6 pH urinário	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
4. OBJETIVO.....	37
CAPÍTULO II DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE EM GATOS PELO MÉTODO DOS INDICADORES	38
RESUMO	39
ABSTRACT.....	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.1 Animais e instalações.....	42
2.2 Dietas experimentais	42
2.3 Protocolo experimental	44
2.4 Análises laboratoriais	44
2.5 Análise estatística.....	46
3. RESULTADOS.....	47
4. DISCUSSÃO.....	48
5. CONCLUSÃO	51
CAPÍTULO III ESTUDO DE DIGESTIBILIDADE E PH URINÁRIO <i>IN HOME</i> COM GATOS	52
RESUMO	53
ABSTRACT.....	54
1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAIS E MÉTODOS	56
2.1 Animais e instalações.....	56
2.2 Dietas experimentais	56
2.3 Protocolo experimental	57

2.4 Análises laboratoriais	61
2.5 Análise estatística.....	62
3. RESULTADOS.....	62
4. DISCUSSÃO.....	63
5. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE EM GATOS PELO MÉTODO DE COLETA TOTAL E INDICADORES

TABELA 1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais..... 43

TABELA 2. Concentração dos indicadores nas rações experimentais (valores na matéria seca)..... 47

TABELA 3. Coeficientes de digestibilidade aparente (média \pm desvio padrão da média) das rações determinados pelo método de coleta total (CT) e pelos indicadores óxido crômico (Cr_2O_3) e dióxido de titânio (TiO_2)..... 48

CAPÍTULO III - ESTUDO DE DIGESTIBILIDADE E PH URINÁRIO *IN HOME* COM GATOS

TABELA 1. Coeficientes de digestibilidade aparente (média \pm desvio padrão da média) determinados pelo método dos indicadores óxido crômico (Cr_2O_3) e dióxido de titânio (TiO_2) em gaiolas metabólicas e *in home*..... 63

TABELA 2. Valores do pH urinário (média \pm desvio padrão da média), obtidos em gaiolas metabólicas e *in home*..... 63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Caixa de areia sanitária utilizada pelos tutores.....	57
FIGURA 2. Microesferas de polipropileno.....	58
FIGURA 3. Recipiente plástico com urina.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

NRC – National Research Council

AAFCO – Association of American Feed Control Officials

CT – Coleta Total

HCl-3N – Ácido clorídrico na concentração de três Normal

Cr₂O₃ – Óxido crômico

TiO₂ – Dióxido de titânio

CDA – Coeficiente de digestibilidade aparente

TR – Taxa de recuperação

MS – Matéria seca

PB – Proteína bruta

MO – Matéria orgânica

ENN - Extrativos não-nitrogenados

FB – Fibra bruta

EB – Energia bruta

MM – Matéria mineral

EEHA – Extrato etéreo em hidrólise ácida

CDAN – Coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes

CDAMS – Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca

nm – Nanômetro

RESUMO

Este trabalho objetivou desenvolver uma metodologia de avaliação da digestibilidade, energia metabolizável e pH urinário em gatos na casa de seus tutores, com o uso de indicadores, de forma a melhorar cada vez mais as condições de bem-estar dos animais, substituindo o uso de gaiolas metabólicas. Para isto, foram realizados dois experimentos. No primeiro estudo, afim de validar o uso dos indicadores em felinos, avaliou-se comparativamente os coeficientes de digestibilidade aparente de quatro rações balanceadas para felinos adultos obtidos pelos indicadores óxido crômico e dióxido de titânio, com aqueles estimados pelo método de coleta total em gaiolas metabólicas (método de referência). No segundo estudo, avaliou-se um aparato para a coleta de fezes e urina de gatos *in home*, onde também foram comparados os resultados de digestibilidade aparente de quatro rações balanceadas para felinos adultos e pH urinário obtidos pelo método convencional, com animais em gaiolas metabólicas, com os resultados obtidos com animais de tutores (*in home*). Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os coeficientes de digestibilidade aparente determinados em gaiolas metabólicas pelos métodos de CT e Cr_2O_3 para todos os nutrientes, no entanto, os coeficientes determinados pelo TiO_2 foram significativamente menores. Desta forma, este indicador mostrou-se ineficiente para estimar a digestibilidade dos nutrientes, quando comparado à coleta total de fezes e Cr_2O_3 . Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os coeficientes de digestibilidade aparente da MS, PB, EEHA, MO e EB obtidos em gaiolas metabólicas e *in home*, diferindo ($p < 0,05$) somente para o ENN. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o valor de pH urinário obtido nas gaiolas metabólicas e o obtido *in home*, sendo o valor obtido *in home* estatisticamente maior. A metodologia desenvolvida e a utilização do Cr_2O_3 e do TiO_2 como indicadores para a realização de estudos de digestibilidade com gatos domiciliados foram validadas nas condições do presente experimento, no entanto, a metodologia desenvolvida para avaliação do pH urinário *in home* não se mostrou confiável, em virtude da diferença entre os valores obtidos nos dois ambientes.

Palavras-chave: felinos, bem-estar animal, métodos alternativos, digestibilidade.

ABSTRACT

This work aimed to develop a methodology for assessing digestibility, metabolizable energy and urinary pH in cats at their guardians' homes, using indicators, in order to increasingly improve the welfare conditions of the animals, replacing the use of metabolic cages. For this, two experiments were carried out. In the first study, in order to validate the use of the indicators in felines, the apparent digestibility coefficients of four balanced diets for adult felines obtained by the chromic oxide and titanium dioxide indicators were compared with those estimated by the total collection method in cages metabolism (reference method). In the second study, an apparatus for the collection of feces and urine of cats at home was evaluated, where the results of apparent digestibility of four balanced diets for adult cats and urinary pH obtained by the conventional method, with animals in metabolic cages were also compared, with the results obtained with animals from tutors (in home). No significant differences ($p>0.05$) were observed between the apparent digestibility coefficients determined in metabolic cages by the CT and Cr₂O₃ methods for all nutrients, however, the coefficients determined by TiO₂ were significantly lower. Thus, this indicator proved to be inefficient to estimate the digestibility of nutrients, when compared to the total collection of feces and Cr₂O₃. No significant differences ($p>0.05$) were observed between the apparent digestibility coefficients of DM, CP, EEHA, MO and EB obtained in metabolic cages and at home, differing ($p<0.05$) only for ENN. There was a significant difference ($P<0.05$) between the urinary pH value obtained in metabolic cages and that obtained at home, with the value obtained at home being statistically higher. The methodology developed and the use of Cr₂O₃ and TiO₂ as indicators for carrying out digestibility studies with domesticated cats were validated under the conditions of the present experimente, however, the methodology developed for the assessment of urinary pH at home did not prove to be reliable, due to the difference between the values obtained in the two environments.

Keywords: cats, animal welfare, alternative methods, digestibility.

CAPÍTULO I
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO GERAL

A digestibilidade de nutrientes é um dos principais parâmetros que qualificam nutricionalmente as rações ao representar o quanto de cada nutriente foi absorvido pelo animal após o consumo do alimento. Desta forma, ensaios de digestibilidade são imprescindíveis para o balanceamento adequado de dietas que propiciem o atendimento das necessidades nutricionais dos animais.

A determinação da digestibilidade pode ser realizada por dois procedimentos: o método de coleta total de fezes e o método dos indicadores ou substâncias índices (Andreasi, 1956). Os indicadores podem ser divididos em dois grupos, quanto à sua origem: internos, presentes nos ingredientes da dieta, ou externos, adicionados à dieta ou administrados aos animais oralmente.

Entre os indicadores externos utilizados na avaliação da digestibilidade de cães e gatos, o óxido crômico (Cr_2O_3) é o mais utilizado, entretanto, alternativas à sua utilização têm sido demandadas em função de aspectos associados à sua provável atividade cancerígena (Myers et al., 2006). Outros limitantes ao uso do óxido crômico como a variação nas taxas de recuperação dependendo da composição do alimento e sua influência negativa no consumo de alimento pelos animais, também foram descritos por Jagger et al. (1992).

Como alternativa a estas limitações do óxido crômico, o dióxido de titânio (TiO_2) tem sido empregado em ensaios com animais de estimação (Childs-Sanford et al., 2006; Hagen-Platinga et al., 2014; Alvarenga et al., 2019), com resultados satisfatórios. Este indicador apresenta a vantagem de não possuir limitações quanto à inclusão em rações para animais, sendo comum sua utilização como corante alimentar em produtos destinados à alimentação humana, portanto, há menos preocupações com a segurança de animais e pesquisadores.

Em cães, a utilização do método de coleta parcial com o uso de indicadores permite que os animais fiquem soltos em baias, dispensando o uso de gaiolas metabólicas, o que pode promover um maior bem-estar a esses animais. Em gatos, até o momento, não foram encontrados trabalhos que desenvolveram os testes com os animais fora das gaiolas.

Dentre os diversos desafios da nutrição felina está a composição química da dieta que impacta diretamente o pH urinário, comprometendo a saúde do trato urinário destes animais. Desta forma, metodologias que permitam formular dietas que favoreçam um pH urinário ideal vêm sendo desenvolvidas, como o método de predição do pH da urina

através da composição cátion-iônica do alimento, entretanto, os resultados *in vivo* com animais ainda são fundamentais no processo de desenvolvimento e avaliação das rações. Nestes estudos, os animais também precisam ser confinados por algum período em gaiolas metabólicas para que possa ser feita a coleta de urina (Carciofi, 2007; Jeremias, 2009; Pires, et al., 2011).

O uso de animais em pesquisas e o seu bem-estar é um tópico atualmente muito discutido e gerador de grande polêmica. Desta forma, torna-se crucial inovar, desenvolver alternativas mais humanas aos modelos e práticas de pesquisa estabelecidos há muito tempo, para que o bem-estar dos animais utilizados nas pesquisas possa ser otimizado, que os efeitos adversos como dor, medo e angústia sejam evitados ou minimizados e que os animais sejam mantidos em condições que promovam sua saúde e bem-estar (Prescott e Lidster, 2017).

O bem-estar de animais utilizados em pesquisas está intimamente relacionado a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos. O Guia Brasileiro de Produção, Manutenção, ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (2016), destaca que quando há comprometimento do bem-estar animal, poderá ocorrer o aumento na variabilidade dos dados; a dificuldade na reprodutibilidade dos resultados; ausência de dados; credibilidade reduzida dos resultados; resultados que não podem ser aplicados a outras situações; resultados impublicáveis; comprometimento na universalidade experimental e, conseqüentemente, o uso desnecessário de vidas.

Desta forma, é de grande importância promover o desenvolvimento, a validação e a discussão de alternativas para a substituição das técnicas atuais utilizadas em ensaios de digestibilidade envolvendo animais. Alternativas estas que melhorarão não apenas o bem-estar animal, mas também os resultados científicos obtidos nos estudos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bem-estar em animais de pesquisa

O uso de animais em pesquisas e o seu bem-estar é um tópico polêmico e, atualmente, muito discutido, tanto por pesquisadores, quanto pela população geral. Com isso, pesquisas que não utilizam animais como objetos de experimento ou que minimizam o sofrimento destes, têm sido cada vez mais incentivada (Trez, 2015).

Segundo Hurnik (1992), o termo bem-estar animal pode ser definido como o "estado de harmonia entre o animal e seu ambiente, caracterizado por condições físicas e fisiológicas ótimas". Broom (1986) propõe que o bem-estar de um indivíduo se refere ao seu estado, em relação às suas tentativas de adaptar-se ao ambiente, sendo assim, o homem não pode dar bem-estar aos animais, por ser uma qualidade inerente a estes, mas sim fornecer meios para o animal conseguir essa adaptação.

A legislação sobre a proteção dos animais utilizados para pesquisas reflete as visões sociais, e garante que normas relativas à utilização humanitária dos animais sejam cumpridas, minimizando qualquer sofrimento desnecessário ao animal. No Brasil, a Lei 11.794/2008, conhecida como Lei Arouca (Brasil, 2008), estabelece procedimentos para o uso científico de animais e impõe limites nos procedimentos, garantindo o mínimo de conforto e higiene nos biotérios, e também ampara os animais em caso de abusos e maus tratos.

Em busca da realização de pesquisas que forneçam condições para que os animais alcancem o seu estado de "bem-estar", a ciência de animais de laboratório em todo o mundo é regida atualmente pelos princípios dos 3R's, um conceito de bioética descrito pela primeira vez em 1959 por William Russell e Rex Burch no livro denominado "Os princípios da técnica experimental humanitária".

O princípio é assim denominado em função das iniciais, em inglês, de seus principais objetivos. Baumans (2005) resumiu da seguinte forma:

1) Redução (redução), significa a diminuição do número de animais utilizados por padronização em termos de genótipo e qualidade microbiológica, e por padronização dos procedimentos experimentais e do ambiente em termos de alimentação e clima na sala dos animais. O valor da avaliação estatística antes do experimento (ou seja, análise de poder) para calcular com precisão o número de animais necessários também é observado.

2) Refinement (refinamento), refere-se à diminuição do desconforto através da satisfação das necessidades comportamentais e fisiológicas do animal através de

alojamento e criação adequados, fornecendo anestesia, analgesia e cuidados, garantindo as competências do pesquisador/equipe responsável pelo estudo, melhorando o procedimento experimental.

3) Replacement (substituição), significa a busca de métodos alternativos que substituam os animais vivos, pode ser feito por técnicas *in vitro* (uso de células e tecidos), modelos de computador entre outros métodos.

Os dois primeiros representam objetivos a curto-prazo e o último, a meta máxima a ser alcançada (Cazarin, 2004).

A qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos em pesquisas que utilizam animais também está intimamente relacionada com o bem-estar destes (Prescott e Lidster, 2017). O Guia Brasileiro de Produção, Manutenção, ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (2016), destaca que quando há comprometimento do bem-estar animal, poderá ocorrer o aumento na variabilidade dos dados; a dificuldade na reprodutibilidade dos resultados; ausência de dados; credibilidade reduzida dos resultados; resultados que não podem ser aplicados a outras situações; resultados impubescíveis; comprometimento na universalidade experimental e conseqüentemente o uso desnecessário de vidas.

Apesar da conscientização sobre a importância do bem-estar ser relativamente recente, pesquisas antigas já apontavam a sua interferência nos resultados dos estudos. Hubrecht et al. (1992) demonstraram que cães de laboratório podem apresentar comportamentos estereotipados, durante 51% do tempo observado, e suas necessidades nutricionais podem ser três vezes maiores do que em cães comuns, o que certamente interfere na acurácia dos resultados.

Estudos de nutrição como os ensaios de digestibilidade exigem o confinamento dos animais em gaiolas metabólicas, usadas para medição de ingestão total de alimentos e água, bem como a excreção de urina e fezes por serem equipadas com um sistema único para evitar a contaminação da urina, separando efetivamente as fezes e possibilitando a coleta da urina em tubos fora da gaiola (Kurien et al., 2004).

Estas gaiolas exigem o alojamento individual dos animais. Uma classificação da gravidade dos procedimentos envolvendo animais, descrita na Diretiva da UE 2010/63/EU sugere que um procedimento em que os animais são alojados individualmente em uma gaiola de metabolismo por mais de cinco dias, com restrição de movimento por um período prolongado, deve ser classificado como um procedimento severo.

Hetts (1992) aponta que o alojamento único de beagles tem uma influência negativa em seu comportamento, levando a movimentos repetitivos, diminuição do sono e aumento das taxas de vocalização. Sabchuk et al. (2012) ao avaliar o comportamento a digestibilidade em cães alojados em canis ou gaiolas metabólicas, não observaram diferença nos valores de digestibilidade entre cães dos dois tipos de alojamento, entretanto, os cães alojados em gaiolas metabólicas passaram mais tempo inativos, do que aqueles mantidos em canis. Kendrick et al. (2020), comparou dados de equilíbrio de excreção de cães alojados em pares e cães alojados individualmente, a fim de demonstrar que a realização do alojamento em pares melhora o bem-estar animal sem comprometer a integridade científica do estudo. Os resultados foram inconclusivos devido a grandes variações nos níveis de cortisol. No entanto, os cães pareciam mais calmos no ambiente de alojamento em pares.

Mertens e Schär (1988), afirmam que gatos confinados em ambientes relativamente restritos são mais propensos a desenvolver problemas de comportamento. Como resposta a más condições ambientais, esses animais tornam-se inativos e inibem comportamentos normais, como automanutenção (alimentação, higiene e eliminação), exploração e brincadeiras (McCune 1992; Rochlitz 1999). Mellen (1997) e Holmes (1993) descrevem tédio, agressão a pessoas e gatos, medo, má reprodução, anorexia, perseguição de caudas, estereotípias e automutilação como problemas específicos associados ao confinamento.

Segundo Lidewij et al. (2008), a incapacidade do animal em realizar comportamentos específicos da sua espécie pode causar a redução do seu bem-estar.

2.2 Digestibilidade

A digestibilidade e a energia metabolizável são dois dos principais parâmetros que determinam a qualidade das dietas para cães e gatos, visto que o primeiro representa a fração do alimento consumido que não é recuperada nas fezes, foi absorvida e pode ser realmente utilizada pelos animais (Andrigueto, 1988; Case et al., 1998) e o segundo, está relacionado à proporção dos nutrientes e a regulação do consumo, ou seja, é a base do manejo alimentar, por definir a quantidade de alimento necessária (Carciofi, 2006).

Shields (1993) identificou inúmeros fatores que afetam a digestibilidade dos nutrientes em animais de companhia. O autor cita a influência dos tipos de ingredientes utilizados nas dietas e os efeitos de processamento (no pré-condicionamento, na extrusora e no secador), as práticas de manejo alimentar, como alimentação prévia e quantidade de

alimento fornecido, os fatores inerentes ao animal (raça, idade, sexo e estado fisiológico) e também os fatores ambientais (tipo de alojamento, temperatura ambiente, controle de estresse), embora estes últimos sejam difíceis de quantificar.

As medidas de digestibilidade são expressas pelo coeficiente de digestibilidade, e a busca de métodos para a estimativa destes coeficientes tem sido alvo de inúmeras pesquisas, uma vez que são referência, tanto na avaliação dos alimentos, como na validação dos métodos de estimação, entretanto, os ensaios com animais são caros e laboriosos, relativamente longos e exigem infra-estrutura específica.

Existem, basicamente, dois métodos para a realização de ensaios de digestibilidade: o método convencional ou coleta total (padrão) e o método dos indicadores ou substâncias índices.

Na coleta total, são quantificados o consumo de alimentos e a excreção de fezes para determinação da proporção dos nutrientes efetivamente digeridos e absorvidos através da diferença entre a ingestão e a excreção. Apesar de ser um método simples, pode ser considerado oneroso e trabalhoso (Silva e Leão, 1979), pois requer a contenção dos animais em gaiolas metabólicas com dispositivo para separação de urina e fezes para o controle rigoroso da ingestão e excreção ou o uso de bolsa coletora de fezes.

Tanto a utilização de gaiolas como o uso da bolsa coletora podem interferir no comportamento do animal, em razão de provocarem desconforto e estresse. Animais de companhia como cães e gatos, mantidos sob contenção total, podem pisotear as fezes e realizar coprofagia e a coleta quantitativa pode ser prejudicada, levando a erros na verdadeira medição da produção fecal. Além disso, em espécies selvagens ou em animais mantidos a pasto, essa metodologia é impraticável e a aplicação em testes em casa não é confiável (Atkinson et al., 1984; Alvarenga et al., 2019)

O método dos indicadores consiste na utilização de uma substância de referência e se baseia na indigestibilidade desta substância, em que toda a substância consumida deve ser excretada nas fezes do animal (Ferreira et al., 2009). A mensuração deste processo é denominada taxa de recuperação e considera-se um bom indicador uma substância que apresente este índice próximo de 100%, ou seja, praticamente todo indicador ingerido é excretado inalterado pelo animal e recuperado em suas fezes (Vasconcellos, 2007).

Comparado ao método de coleta total, o uso de indicadores simplifica os procedimentos e minimiza a interferência no comportamento do animal, tendo em vista a não necessidade de grandes quantidades de material, pois para o cálculo da digestibilidade

leva-se em conta a quantidade do indicador fornecido e a sua concentração nas fezes, além de dispensar o uso de gaiolas metabólicas e a coleta de dados de ingestão alimentar e fezes excretadas (Saliba, 2013).

2.3 Indicadores em ensaios de digestibilidade

Os indicadores utilizados para fins de determinação da digestibilidade de alimentos são substâncias químicas que devem possuir alguns requisitos básicos para serem considerados eficientes.

Diversos autores (Fahey Júnior; Jung, 1983; Kotb; Luckey, 1972) sugerem que o indicador ideal deve possuir as seguintes propriedades:

- Ser inerte;
- Não ser tóxico;
- Não ter função fisiológica;
- Não ser metabolizado a fim de ser totalmente recuperado do trato digestivo;
- Capacidade de ser processado com o alimento;
- Ter tamanho apreciável;
- Misturar intimamente com o alimento e permanecer uniformemente distribuído na digesta;
- Não ter influência sobre a motilidade e secreções do trato digestivo;
- Não ter influência sobre a microflora e seus hospedeiros;
- Possuir um método específico e sensível de determinação;
- Ter propriedades físico-químicas que não interfiram nos processos digestivos.

Até hoje, não há nenhum indicador considerado “perfeito”, capaz de atender a todos estes critérios, desta forma, no momento da escolha, deve-se buscar o indicador com maior número de características próximas daquelas atribuídas a um indicador ideal, além de se avaliar o custo, facilidade de obtenção, uso e determinação do mesmo (Oliveira Jr. et al., 2004; Saliba, 2005).

Tradicionalmente, os indicadores são classificados em duas grandes categorias, quanto a sua origem (Kotb e Luckey, 1972; Owens e Hanson, 1992; 1):

Indicadores internos, presentes naturalmente no alimento ou dieta, tais como a Sílica, a Lignina, a FDN e FDA Indigestíveis, a Cinza Insolúvel em Ácido e os N-alcanos, sendo os quatro últimos os mais utilizados ultimamente.

Indicadores externos, substâncias indigeríveis que são adicionadas às dietas ou podem ser administradas aos animais via oral. Dentre os indicadores externos de digestibilidade, destacam-se o óxido crômico, o dióxido de titânio, os elementos terras raras (Lantano, Samário, Cério, Ytérbio, Disprósium), o Rutênio Fenantrolina, o Cromo mordente, utilizados para fase sólida e o Cobalto-EDTA, Cromo-EDTA e o Polietilenoglicol (PEG), utilizados para fase líquida.

A maior limitação dos indicadores externos é que eles não se comportam como as partículas do alimento, e, quando aderidos a sua porção fibrosa, podem alterar algumas características químicas e físicas, como a gravidade específica (Ehle et al., 1984).

O princípio que rege o uso de indicadores em ensaios de digestibilidade baseia-se no fato de que à medida em que o alimento transita pelo trato gastrointestinal, a concentração do indicador aumenta progressivamente pela remoção de constituintes do alimento por digestão e absorção. Sendo este aumento proporcional à digestibilidade, a mesma pode ser calculada a partir das concentrações do indicador no alimento e nas fezes (Astigarraga, 1997).

Para que as metodologias que utilizam indicadores possam ser validadas, as mesmas devem sempre ser comparadas ao método padrão de coleta total, entretanto, para se obter resultados semelhantes e confiáveis, comparáveis com o método de coleta total, é necessário que se obtenha recuperação total do indicador, caso contrário, a deficiência de recuperação causará erros nas estimativas de excreção fecal e, conseqüentemente, na estimativa da digestibilidade, sendo essa a maior limitação do uso dos indicadores (Rodriguez et al., 2006; Figueiredo 2011).

2.4 Óxido crômico

O óxido crômico, também denominado óxido de cromo III ou sesquióxido de cromo (Cr_2O_3) é um dos indicadores externos mais difundidos e utilizados em ensaios de digestibilidade animal, tendo sido utilizado para tal fim pela primeira vez em 1918, em estudo com vacas leiteiras.

Na determinação da digestibilidade de alimentos para animais de estimação, o óxido crômico foi utilizado pela primeira vez em um estudo com cães realizado por Lloyd e McCay (1954), onde os autores concluíram ser um indicador eficiente e aplicável à

espécie canina. Da mesma forma, Carciofi et al. (2007), While et al. (2007) e Duque-Saldarriaga et al. (2020) não encontraram diferenças entre os coeficientes de digestibilidade obtidos por coleta total e indicador óxido crômico em seus estudos com cães, confirmando ser este um método confiável em substituição à coleta total. Poucos estudos avaliando a utilização de cromo como indicador na espécie felina são encontrados na literatura. Vasconcellos (2007), comparou os métodos de CT e dos indicadores óxido crômico, cinzas insolúveis em ácido (CIA) e lignina (LIG) na determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes em gatos. O autor observou grande potencial na CIA e Cr_2O_3 para utilização como indicadores, enquanto a baixa recuperação da LIG em uma das rações, aliada à maior variabilidade dos resultados obtidos por este método não justificaram seu emprego como substância índice.

A utilização do óxido crômico nos estudos de digestibilidade apresenta vantagens como seu baixo custo, facilidade de administração e análise relativamente fácil.

Em ensaios de digestibilidade, o óxido crômico pode ser administrado por meio de impregnação em papel, cápsulas de gelatina, comprimidos, na forma de peletes, suspenso em óleos, misturado na dieta ou introduzido diretamente no trato digestório quando utilizado em ruminantes (Holt, 1993). Segundo o protocolo de teste baseado em indicadores proposto pela American Association of Feed Control Officials (AAFCO), para cães e gatos, recomenda-se a completa homogeneização do óxido crômico na ração, a um nível de inclusão de $\pm 0,25\%$. No entanto, ao trabalhar com alimentos industrializados já preparados, a inclusão do indicador externo exige a moagem da ração para posterior homogeneização da substância, o que, de acordo com Vasconcellos et al. (2007) inviabiliza o uso do indicador nesta condição para gatos, uma vez que estes animais não ingerem alimento seco moído, mesmo que umedecido em água. Lôbo Jr. et al. (2001), obtiveram taxa de recuperação de 93,7% do indicador por este método ao fornecerem óxido crômico em cápsulas de gelatina para cães. Vasconcellos et al. (2007), avaliaram a administração de óxido crômico em cápsulas de gelatina para estimar a digestibilidade aparente em gatos, os autores não observaram diferenças para os CDA obtidos pelo indicador e pelo método de coleta total, a taxa de recuperação média do indicador foi de 97,93%. Os dois estudos atestam a eficiência do fornecimento do Cr_2O_3 em cápsulas de gelatina, sendo este método bem aceito, tanto pelos cães, como pelos gatos, com taxas de recuperação do indicador satisfatórias.

Recomenda-se um período de adaptação ao óxido crômico de cinco a sete dias, anterior ao início das coletas de fezes, a fim de alcançar um platô de concentração (Le Du

e Penning, 1982; Owens e Hanson, 1992; Astigarra, 1997). Pond et al. (1989) sugeriram que cinco dias seriam suficientes, sendo este o intervalo utilizado em diversos trabalhos com diversas espécies (Carciofi et al., 2006; Leopoldino, 2000; Bargo, 2002).

A quantificação do óxido crômico em amostras de fezes e alimentos pode ser realizada por colorimetria (Fenton e Fenton, 1979) e por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) (Williams et al., 1962), no entanto, em seu protocolo, a AAFCO recomenda como método para a determinação laboratorial do cromo a EAA e não faz menção ao uso do método colorimétrico.

A determinação por colorimetria, descrita por Fenton e Fenton (1979), apresenta características que o tornam muito prático, uma vez que se utiliza um equipamento de baixo custo e que pode ser facilmente encontrado em laboratórios, no entanto, à presença de compostos de mesmo espectro de coloração que o óxido de cromo nas fezes e alimentos podem interferir na quantificação desse composto, limitando a confiança na precisão deste método. A Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) é mais precisa, porém mais complexa e mais cara (Saha e Gilbreath, 1991; Kozloski et al., 1998).

A comparação entre métodos de determinação do Cr_2O_3 foi verificada em bovinos (Kozloski et al., 1998) e em suínos (Saha e Gilbreath, 1991) e, em ambos estudos, foram observadas melhores respostas ao se utilizar a espectrofotometria de absorção atômica, o que pode ser atribuído à maior sensibilidade deste para a determinação de cromo.

Honorato et al. (2012), ao comparar o método colorimétrico com a espectrofotometria de absorção atômica nas dietas e nas fezes de pacu para determinação da digestibilidade aparente de dietas extrusadas ou peletizadas, não observaram diferença significativa nas médias de óxido de cromo recuperado. Estes dados corroboram o estudo realizado por Carciofi et al. (2007), onde os autores não observaram diferença na quantificação do óxido de cromo comparando-se os mesmos métodos em dietas para cães, indicando que os dois métodos para quantificação laboratorial de óxido de cromo são sensíveis e confiáveis para a utilização nos ensaios de digestibilidade.

Conforme Titgemeyer (1997), o óxido crômico na forma de Cr_2O_3 , foi o indicador mais utilizado nos trabalhos publicados pelo Journal Animal Science entre os anos de 1985 a 1995, prestando uma excelente contribuição para informações científicas sobre o consumo e a digestibilidade de alimentos. Apesar de ser um dos marcadores externos mais utilizados, algumas limitações associadas ao seu uso são relatadas na literatura, como a difícil homogeneização na dieta (Coelho Silva e Leão, 1979), influência

negativa no consumo de alimento pelos animais (Jagger et al., 1992), incompleta recuperação fecal (Mir et al., 1989), flutuação diária da excreção, (Owens & Hanson, 1992; Kozloski et al., 2006), passagem mais rápida pelo rúmen que o material fibroso (Van Soest, 1994), além do potencial carcinogênico, pois no processo de mineralização requerido em sua análise, ocorre a liberação de íons de dicromato que podem ser prejudiciais ao ambiente e aos analistas.

Por todas estas características citadas, seu uso tem sido limitado e gradualmente substituído por outros indicadores como o dióxido de titânio, os alcanos e a LIPE.

2.5 Dióxido de Titânio

O dióxido de titânio (TiO_2) é um pó de coloração branca, formado a partir das reações dos minérios de titânio com ácido sulfúrico, ou pela reação com gás cloreto. É inodoro, sem gosto, insolúvel em água e em ácidos diluídos, quimicamente inerte e termicamente estável (Ferreira et al., 2009; Sampaio, 2011). Devido à sua grande capacidade de branquear e seu alto poder de reflectância, o TiO_2 tem sido muito utilizado na indústria de cosméticos, de alimentos e biotecnologia e principalmente na indústria de tintas (Ferreira e Daniel, 2004).

O Register of Feed Additives for the European Union classifica o TiO_2 como aditivo alimentar, inclusive em alimentos para cães e gatos, promovendo clareamento consistente, por exemplo, em alimentos enlatados à base de aves ou peixes e em petiscos em forma de osso para cães. A Food and Drug Administration aprovou o uso de TiO_2 em alimentos em quantidades que não excedam a 1% do produto final (Beynen, 2021).

Atualmente, o TiO_2 também tem sido utilizado como indicador externo em estudos de digestibilidade com diversas espécies e na avaliação do consumo de matéria seca e produção fecal em ruminantes (Marcondes, 2007; Ferreira et al., 2009; Pina, 2010; Figueiredo, 2011).

O TiO_2 surge como alternativa ao indicador óxido crômico por não possuir propriedades carcinogênicas, não apresentando riscos para a saúde humana e animal, sendo por isso aprovado como aditivo dietético pelo FDA (Sampaio et al., 2011). Ainda, outra vantagem competitiva do TiO_2 diz respeito ao seu custo, relativamente menor do que o óxido crômico, além de possuir um processo analítico rápido e acurado.

Um dos primeiros trabalhos com TiO_2 na nutrição animal foi realizado em 1927 por Lehmann e Herget (1927). Os autores forneceram TiO_2 derivado de ilmenita para

quatro gatos e um cão e relataram que a ingestão de grandes quantidades de TiO_2 , não resultou na deposição dessa substância nos tecidos animais.

Na determinação da digestibilidade, a primeira descrição sobre o uso do dióxido de titânio foi realizada por Askew (1931), estudando a alimentação de ovinos, onde este sugeriu que o TiO_2 poderia ser usado como indicador de digestibilidade nesta espécie.

Este marcador tem mostrado grande potencial para ser utilizado como indicador externo em ensaios de digestibilidade, visto que alguns autores já afirmaram que o dióxido de titânio apresentou bons resultados de recuperação fecal em diferentes espécies. Em animais de estimação, este indicador também tem sido avaliado, no entanto, ainda são poucos os trabalhos avaliando a sua recuperação fecal nestes animais.

Titgemeyer et al. (2001) conduziram três experimentos para avaliar o uso do dióxido de titânio como indicador para estimação da produção fecal e digestibilidade de novilhos alimentados com feno de pradaria à vontade, dietas à base de milho com restrição e dieta também à base de milho, mas sem restrição. No primeiro experimento, a recuperação de TiO_2 foi de 92,8% e a digestibilidade calculada pelo TiO_2 foi estatisticamente igual a digestibilidade aparente pelo método de coleta total. No segundo e no terceiro experimento apesar da recuperação fecal do indicador terem sido de 95% e 90% respectivamente a digestibilidade calculada com pelo TiO_2 foi subestimada em relação a digestibilidade com base na coleta total de fezes.

Glindemann et al. (2009), ao avaliarem o indicador TiO_2 em ovinos adultos alimentados com feno, suplementado ou não com concentrado, encontraram valores para recuperação média de TiO_2 de 104%. A recuperação do TiO_2 foi maior ($P < 0,001$) em dietas com apenas feno do que em dietas com feno e concentrado (108% e 99% respectivamente).

Schaafstra et al. (2018) avaliaram o uso de TiO_2 e Cr_2O_3 como marcadores para calcular a digestibilidade aparente e investigar o efeito da frequência de administração do marcador na mensuração dos valores de digestibilidade em pôneis galeses. Os pôneis foram dosados com 3,3 g de TiO_2 e 3,2 g de Cr_2O_3 uma vez ao dia ou com 1,65 g de TiO_2 e 1,60 g de Cr_2O_3 duas vezes ao dia. A média geral de recuperação fecal cumulativa de Cr_2O_3 e TiO_2 foi de 102,0% e 96,6%, respectivamente. Entre os tratamentos, as recuperações fecais médias diárias não foram diferentes. O TiO_2 foi considerado pelos autores o marcador preferido para testes de digestibilidade em equinos, visto que a recuperação de TiO_2 nas fezes dos pôneis alimentados com feno de alfafa picado com TiO_2 administrado uma ou duas vezes ao dia foi próximo de 100%.

Singh et al. (2009) determinaram a recuperação fecal de TiO_2 em cães alimentados com duas dietas, com baixa e alta quantidade de nutrientes. Os autores relataram recuperação média de TiO_2 de 74,5 e 80,6% para duas fórmulas de dieta diferentes. Uma possível retenção do marcador no sistema gastrointestinal ou excreção na urina são apontadas como razões pelas quais a recuperação do marcador não atingiu 100%.

Childs-Sanford e Angel (2006), administraram oralmente TiO_2 encapsulado para avaliação do tempo de trânsito das dietas em cães domésticos. Nas fezes coletadas por 48 horas após a administração, a recuperação de titânio foi de 97%. Segundo os autores, a recuperação fecal total de TiO_2 foi alta, e corresponde bem à recuperação de TiO_2 em estudos semelhantes realizados em suínos (96%) (Njaa, 1961) e ratos (98%) (Kavanagh et al., 2001).

De Cuyper et al. (2018) utilizaram o TiO_2 como marcador para avaliar o tempo de retenção de duas dietas em cães. A média ($n=6$) de recuperação fecal de titânio para cada dieta foi de 81,2 e 73,7%.

Alvarenga et al. (2019), ao avaliarem o óxido crômico, dióxido de titânio e a cinza insolúvel em ácido como marcadores para estimar a produção fecal de cães, obtiveram coeficientes de digestibilidade aparente muito próximos determinados pelo método de coleta total, óxido crômico e dióxido de titânio em cães. Os autores sugerem que o TiO_2 pode ser um marcador preferencial para estimar a produção fecal em cães, quando comparado ao Cr_2O_3 . Já o uso da cinza insolúvel em ácido representa uma opção potencial para determinar a digestibilidade de dietas nas quais os marcadores externos são impraticáveis. Neste estudo os autores não disponibilizaram dados referentes à recuperação do TiO_2 .

É fundamental para garantir a eficiência na utilização de um indicador em ensaios de digestibilidade um período adequado de adaptação para que este possa estabilizar sua concentração nas fezes (Glindemann et al., 2009) e ainda, um número correto de dias de coletas por meio de amostras compostas, para aumentar a precisão dos resultados. O horário das coletas, número de coletas e a quantidade e forma de administração do indicador também são variáveis que podem provocar efeito sobre a estimativa da digestibilidade.

O período recomendado para adaptação ao dióxido de titânio a fim de se obter o equilíbrio da ingestão e excreção é de cinco a sete dias segundo estudos realizados por Myers et al. (2006) e Glindemann et al. (2009).

Normalmente em ensaios de digestibilidade utilizando indicadores externos para estimação da produção fecal, utilizam-se cinco a seis dias de coleta de fezes. No entanto, algumas pesquisas utilizando o TiO_2 como indicador demonstraram que até três dias poderia ser suficiente para obter estimativas precisas, minimizando o trabalho durante as coletas (Marcondes et al., 2006; Pina et al., 2006; Ferreira et al., 2009).

O dióxido de titânio pode ser administrado aos animais misturando-o diretamente a dieta ou fornecendo-o em cápsulas. Singh et al., (2009) determinaram a digestibilidade a partir de 0,3% de TiO_2 incorporado à ração seca de cães. Outros estudos também focados no uso de TiO_2 como indicador em cães utilizaram taxas de inclusão dietética de 0,4% em ração seca (Donadelli e Aldrich, 2018. Pezzali et al., 2020). Alvarenga et al. (2019) sugere que o indicador deve ser adicionado a mistura seca da dieta antes da extrusão, garantindo uma dosagem uniforme e consistente.

A determinação do dióxido de titânio em amostras biológicas como ração e fezes é realizada através da digestão em ácido sulfúrico (H_2SO_4) adicionado de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A intensa coloração laranja/amarelo resulta da reação de H_2O_2 à solução de TiO_2 ácido. Essa reação é necessária para a detecção do TiO_2 em amostras através de colorimetria (Colodo e Figueiredo, 2013). Baseados neste conceito foram desenvolvidas as metodologias da AOAC, de Short et al. (1996), Titgemeyer et al. (2001) e Myers et al. (2004), as mais utilizadas atualmente.

2.6 pH urinário

O pH urinário varia como consequência da manutenção homeostática do equilíbrio ácido-base (Chew e DiBartola, 1992), por esta razão, está diretamente relacionado com a alimentação da espécie em questão e com a capacidade dos rins em eliminar álcalis e ácidos não voláteis (Mundin, 2010).

Dentre os fatores dietéticos que determinam o pH urinário, destaca-se a composição mineral do alimento (Kienzle e Schuhknecht, 1991; Zentek e Schulz, 2004), a oxidação de aminoácidos sulfurados e o balanço de ânions e cátions metabolizáveis (Markwell et al, 1998; Allen e Kruger, 2000). Desta forma, sais minerais produzem efeito variável sobre o pH urinário, sendo fontes potenciais de ácido ou base. Os óxidos e carbonatos são alcalinizantes enquanto cloretos, fosfatos e sulfatos produzem efeito acidificante (Allen e Kruger, 2000).

O pH urinário apresenta, ainda, variação circadiana devido à influência de fatores como composição do alimento, horário da alimentação e quantidade ingerida (Buffington

e Chew, 1996). Sabe-se, por exemplo, que a alimentação *ad libitum* resulta em onda alcalina pós-prandial de menor magnitude quando comparada à alimentação sob a forma de refeições diárias menos frequentes, em consequência, não se deve interpretar apenas um valor de pH, sendo necessárias observações e mensurações na urina colhida em 24 horas (Allen e Kruger, 2000).

Em cães e gatos, a determinação e modulação dietética do pH é extremamente importante devido a sua ligação direta com as urolitíases (Davies, 1999; Lekcharoensuk, 2005, Yamka et al., 2006).

As urolitíases são a causa mais comum de doença obstrutiva do trato urinário inferior em cães e gatos (Wagner et al., 2006), e se caracterizam pela presença de cristais urinários (cristalúria, ou concreções macroscópicas (urólitos ou cálculos) dentro da vesícula urinária ou uretra (Osborne et al., 1996).

Diferentes tipos de urólitos ou cristais podem ser formados em função do valor do pH urinário. Os urólitos mais observados são os de estruvita e oxalato de cálcio.

Os urólitos de estruvita, em geral, estão associados a um pH urinário alcalino, maior que 6,8 com a urina supersaturada com íons de magnésio, amônio e fosfato (Houston et al., 2003). A redução do pH urinário demonstrou-se eficaz na diminuição da incidência da formação destes cristais, sendo o pH o fator mais importante que a redução de magnésio na dieta (Markwell et al., 1998). Recomenda-se alimentos que mantenham a urina a um pH entre 6,2 e 6,4 para a prevenção destes urólitos e entre pH 5,9 e 6,1 para dissolução (Allen e Kruger, 2000).

Os urólitos de oxalato de cálcio são observados em pH urinário mais ácido (Navarro, 2005). Dietas acidificantes, que induzem pH urinário a valores inferiores a 6,29 e apresentam muito pouco magnésio, podem aumentar o risco de formação destes cristais (Markwell et al., 1998). Uma vez formados, estes cristais não podem ser dissolvidos na vesícula urinária, devendo as dietas de prevenção manter pH urinário entre 6,6 e 6,8 (Allen e Kruger, 2000).

Assim, o objetivo principal da manipulação do pH urinário através da alimentação é, portanto, alcançar um equilíbrio de forma a reduzir o risco de formação destes cristais.

Não existe atualmente um consenso sobre a melhor metodologia para estudos do pH urinário, o que pode ser verificado pela diversidade de protocolos experimentais de diferentes autores. Aspectos importantes a serem considerados são o tempo de adaptação à dieta, que tem variado de 2 (Kienzle, et al. 1994) a 14 dias (Zentek e Schultz, 2004). É importante salientar que a ocorrência de vômito ou diarreia inviabiliza a avaliação da

dieta no animal, pois nestes processos a perda de eletrólitos é intensa e alterações no equilíbrio ácido-básico e hidro-eletrolítico se refletem em alterações urinárias importantes (Carciofi, 2007).

O período e a forma de coleta de urina também têm variado entre os protocolos. Períodos de coleta de 14 dias (Wagner et al., 2006), 4 dias (Kienzle, et al., 1991) e até mesmo 3 dias (Zentek et al., 1995; Yamka et al., 2006) são descritos. Quanto a forma de coleta, a maioria dos estudos realiza coleta total de urina no período de 24 horas, com exceção de Yamka et al. (2006) que trabalharam com o pH médio de duas micções de cada felino no período de 24 horas.

A conservação da urina tem sido feita de diferentes maneiras. Enquanto alguns autores praticam a coleta frequente, em intervalos de 2 horas, outros a conservam com solução de Timol (antisséptico), vaselina ou óleo mineral (evita evaporação), procedimentos que se mostraram eficazes (Kienzle e Wilms-Eilers, 1994).

Além do pH urinário, rotineiramente são mensurados o volume de urina diário produzido e a densidade urinária, uma vez que estes dois parâmetros também influenciam a formação ou não de urólitos. Sendo a densidade específica inversamente proporcional à concentração de solutos presentes na urina, quanto maior a proporção de água excretada com os solutos urinários, menor a concentração de solutos e densidade (Lanevski e Kramer, 1994). Neste mesmo sentido, Hoppe, (1997) e Stevenson e Markwell, (2001), afirmam que o aumento do volume urinário e a consequente diminuição da concentração de solutos urinários têm um efeito de diluição sobre os cristais responsáveis pela formação de um urólito. Isto também aumenta a frequência da micção e, portanto, propicia menos tempo para a agregação e formação de cálculos.

O pH urinário apresenta variação circadiana devido à influência de alguns fatores como a composição do alimento, horário de alimentação e o volume consumido (Buffington e Chew, 1996). Portanto, para uma correta interpretação do pH urinário, deve-se considerar o momento da alimentação e o tipo de alimento consumido, pois a alimentação ad libitum produz uma onda pós-prandial menos alcalina se comparada a alimentação menos frequente (Allen e Kruger, 2000).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAFCO - ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIAL. Official Publication 2003, Association of American Feed Control Official, 2003.

ALLEN, T. A.; KRUGER, J. M. Enfermedad felina de las vias urinarias. In: HAND, M. S. *et al.* Nutrición clínica en pequeños animales. 4th ed. Bogotá: Panamericana, cap. 46, p. 811-845, 2000.

ALVARENGA, I. C.; ALDRICH, C. G.; OU, Z. (2019). Comparison of four digestibility markers to estimate fecal output of dogs. *Journal of animal science*, v. 97, n. 3, p. 1036-1041, 2019.

ANDREASI, F. Estudos de métodos indiretos (óxido crômico e lignina) para a determinação da digestibilidade aparente no cão, 60p. Tese (Livre Docência), São Paulo, Universidade de São Paulo, 1956.

ANDRIGUETO, J. M. et al. *Nutrição animal*. v. 1. Nobel, São Paulo, p. 143-246, 1988.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 16 ed., Gaithersburg, v.1, cap. 4, p.1-45, 1996.

ASTIGARRAGA, L. Técnicas para la medición del consumo de rumiantes en pastoreo. In: SIMPÓSIO SOBRE AVALIAÇÃO DE PASTAGENS COM ANIMAIS, 1997, Maringá. Anais... Maringá: UEM, p.1-23. 1997.

ATKINSON, J. L.; HILTON, J. W.; SLINGER, S. J. Evaluation of acid-insoluble ash as an indicator of feed digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 41, n. 9, p. 1384-1386, 1984.

BARGO, F.; MULLER, L. D.; DELAHOY, J. E.; T.W. CASSIDY. Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2948–2963. 2002.

BAUMANS, V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, v. 24, n. 2, p. 503, 2005.

BEYNEN A. C. Chromium in petfood. *Bonny Canteen* 2021; 2: 1-19.

BEYNEN AC. Titanium in petfood. *Bonny Canteen* 2021; 2: 2: 115-128.

- BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal*, London, v.142, p.524-526, 1986.
- BUFFINGTON, C. A. T.; CHEW, D. J. Intermittent alkaline urine in a cat fed and acidifying diet. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 209, n. 1, p. 103-104, July 1996.
- CARCIOFI, A. C. et al. Avaliação de dietas com diferentes fontes protéicas para cães adultos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, p. 754-760, 2006.
- CARCIOFI, A. C. et al. Chromic oxide as a digestibility marker for dogs: a comparison of methods of analysis. *Animal Feed Science and Technology*, v. 134, p. 273-282, 2007.
- CASE, L. P.; CAREY, D. P.; HIRAKAWA, D. A. *Nutrição Canina e Felina – Manual para profissionais*. Madrid, Harcourt Brace, 424p, 1998.
- CAZARIN, K. C. C.; CORREA, C. L.; DUQUE, F. A. Z.Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.
- CHEW D. J.; DIBARTOLA S. P. Diagnóstico e fisiopatología da molestia renal. In: Ettinger S.J. (Ed.), *Tratado de Medicina Interna Veterinaria: moléstias do cão e gato*. 3rd ed. Manole, São Paulo, 1992.
- CHILDS-SANFORD, S. E.; ANGEL, C. R. Transit time and digestibility of two experimental diets in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and domestic dog (*Canis lupus*). *Zoo Biol*, v.25, p. 369-381, 2006.
- COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I. *Fundamentos de nutrição de ruminantes Piracicaba: Livrocetes*, 1979. 384p.
- DE CUYPER A, CLAUSS M, HESTA M, COOLS A, BOSCH G, HENDRIKS WH, JANSSENS GJP. Are carnivore digestive separation mechanisms revealed on structure-rich diets? Faecal inconsistency in dogs (*Canis familiaris*) fed day old chicks. *Plos One* 2018.
- DONADELLI, R.; ALDRICH, G. PSXIII-37 A comparison of different methods of estimation of dry fecal output in dogs. *Journal of Animal Science*, v. 96, n. 3, p. 160-160, 2018.

EHLE, F. R. Influence of particle size on determination of fibrous feed components. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 7, p. 1482-1488, 1984.

DUQUE-SALDARRIAGA, JUAN C. et al. A comparison of two methods to assess apparent total tract digestibility of nutrients in dogs. *Archives of animal nutrition*, v. 74, n. 2, p. 138-149, 2020.

FAHEY JR, G. C.; JUNG, H. G. Lignin as a marker in digestion studies: a review. *Journal of animal science*, v. 57, n. 1, p. 220-225, 1983.

FENTON, T. W. e FENTON, M. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. *Canadian Journal of Animal Science*, vol. 59, p. 631-634, 1979.

FERREIRA, I. V. L; DANIEL, L. A. TiO₂ heterogeneous photocatalysis in secondary wastewater treatment. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 9, p. 335-342, 2004.

FERREIRA, M. D. A., VALADARES FILHO, S. D. C., MARCONDES, M. I., PAIXÃO, M. L., PAULINO, M. F., VALADARES, R. F. D. Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes: digestibilidade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, p. 1568-1573, (2009).

FIGUEIREDO, M. R. P.. Indicadores externos de digestibilidade em ovinos. 2011.

GLINDEMANN, T. et al. Evaluation of titanium dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep. *Animal feed science and technology*, v. 152, n. 3-4, p. 186-197, 2009.

Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 4: primatas não humanos mantidos em instalações de instituições de ensino e pesquisa científica [recurso eletrônico]/ coordenador: José Augusto Pereira Carneiro Muniz; Alcides Pissinatti ... [et al.]. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2016. 93 p.

HAGEN-PLANTINGA, E. A.; G. BOSCH, G.; HENDRIKS, W. H. Feline excretion in domestic cat breeds: a preliminary investigation. *Journal Animal Physiology Animal Nutrition*, vol. 98, p. 491-496, 2014.

HETTS, S. et al. Influence of housing conditions on beagle behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 34, n. 1-2, p. 137-155, 1992.

HOLMES, R. A. Feline heartworm disease. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v. 15, n. 5, p. 687-690, 1993.

HOLT, N.W. Calibration curves for the determination of low levels of chromium in feces. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v.73, p.109-115, 1993.

HONORATO, C. A.; NUNES, C.; ALMEIDA, L. C.; CARRILHO, E. N. V. M.; MORAES, G. Digestibilidade de dietas peletizadas e extrusadas para o pacu: quantificação do óxido de cromo. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, v. 10, n. 3, p. 269-275, 2012.

HOPPE, B. et al. Influence of nutrition on urinary oxalate and calcium in preterm and term infants. *Pediatric nephrology*, v. 11, n. 6, p. 687-690, 1997.

HOUSTON, D. M. et al. Feline urethral plugs and bladder uroliths: a review. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 44, n. 12, p. 974, 2003.

HUBRECHT, Robert C.; SERPELL, James A.; POOLE, Trevor B. Correlates of pen size and housing conditions on the behaviour of kennelled dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 34, n. 4, p. 365-383, 1992.

HURNIK, J. *Behaviour, farm animal and the environment*. Cambridge: CAB International, 1992.

JAGGER, S. et al. Evaluation of inert markers of the determination of ileal and faecal apparent digestibility values in the pig. *British Journal of Nutrition*, London, n.68, p 729-739, 1992.

JEREMIAS, J. T. Relação entre o excesso de bases do alimento e o ph urinário de gatos. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, SP. 2009.

JOSÉ, V. A. Digestibilidade e valores energéticos de alimentos extrusados para cães. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2009.

KAVANAGH, S. et al. A comparison of total collection and marker technique for the measurement of apparent digestibility of diets for growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, New York, v 89, p 49-58,2001.

KENDRICK, J. et al. A novel welfare and scientific approach to conducting dog metabolism studies allowing dogs to be pair housed. *Laboratory animals*, v. 54, n. 6, p. 588-598, 2020.

KIENZLE, E.; SCHUKNECHT, A.; MEYER, H. Influence of food composition on the urine pH in cats. *The Journal of Nutrition*, v. 121, n. 11, p. 87-88, 1991.

KIENZLE, E.; WILMS-EILERS, S. Struvite diet in cats: effect of ammonium chloride and carbonates on acid base balance of cats. *The Journal of nutrition*, v. 124, n. 12, p. 2652-2659, 1994.

KOTB, A.R.; LUCKEY, T. D. Markers in nutrition. *Nutrition Abstracts and Reviews*, Wallingford, v.42, p. 813-845, 1972.

KOZLOSKI, G. V; FLORES, E. M. M; MARTINS, A. F. Use of chromium oxide in digestibility studies: variations of the results as a function of the measurement method. *Journal Science Food Agriculture*, v. 76, p. 373-376, 1998.

KURIEN, B.T., EVERDS, N.E., AND SCOFIELD, R. H. Experimental animal urine collection: a review. *Laboratory animals*, v.38, p.333–361, 2004.

LEHMANN, K. B.; HERGET, L. Studies on the hygienic characteristics of titanium dioxide and titanium white. *Chemiker-Zeitung*, v. 51, p. 793-794, 1927.

LEKCHAROENSUK, C. et al. Trends in the frequency of calcium oxalate uroliths in the upper urinary tract of cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 41, n. 1, p. 39-46, 2005.

LEVAI, L. F. *Direito dos animais*. Campos do Jordão: Editora Mantiqueira, 2004.

LLOYD LE, MCCAY CM. The use of chromic oxide in digestibility and balance studies with dogs. *Journal Nutrition*, v.53, p. 613-622, 1954.

LÔBO JR., M. F. et al. Coeficientes de digestibilidade aparente pelos métodos de indicadores e coleta total de fezes em cães. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.53, n. 6, p. 691-694, 2001.

MARCONDES, Marcos Inácio. *Desempenho de bovinos Nelore alimentados individualmente ou em grupo, exigências nutricionais e avaliação protéica de alimentos para ruminantes*, 2007.

- MARKWELL, P. J.; BUFFINGTON, C. T.; SMITH, B. H. E. The effect of diet on lower urinary tract diseases in cats. *The Journal of Nutrition*, v. 128, n. 12, p. 2753-2757, 1998.
- MCCUNE, S. et al. Enriching the environment of the laboratory cat. *Environmental Enrichment Information Resources for Laboratory Animals: 1965–1995 Birds, Cats, Dogs, Farm Animals, Ferrets, Rabbits, and Rodents*, p. 27-42, 1995.
- MERTENS, C.; SCHAR, R. Practical aspects of research on cats. *Domestic cat: the biology of its behavior*/edited by Dennis C. Turner and Patrick Bateson, 1988.
- MELLEN, J. D.; SHEPHERDSON, D. J. Environmental enrichment for felids: an integrated approach. *International Zoo Yearbook*, v. 35, n. 1, p. 191-197, 1997.
- MIR, P. S.; KALNIN, C. M.; GARVEY, S. A. Recovery of fecal chromium used as a digestibility marker in cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 72, n. 10, p. 2549-2553, 1989.
- MUNDIM, A. V. *Morfofisiologia Renal e Interpretação do Exame de Urina*, Uberlândia: Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, 2007. 17 p. [Apostila].
- MYERS, W.D.; LUDDEN, P.A.; NAYIGIHUGU, V.; HESS, W. B. Technical Note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide, *Journal of Animal Science*, vol.63, p.179–183, January 2004.
- MYERS, W.D.; LUDDEN, P.A.; NAYIGIHUGU, V. et al. Excretion patterns of titanium dioxide and chromic oxide in duodenal digesta and feces of ewes. *Small Ruminant Research*, vol.63, p.135-141, 2006.
- NJAA, L. R. Determination of protein digestibility with titanium dioxide as indicator substance. *Acta Agriculturae Scandinavica*, v. 11, n. 3-4, p. 227-241, 1961.
- OLIVEIRA JUNIOR, R. C. et al. Avaliação de indicadores para estimar a digestibilidade dos nutrientes em novilhos Nelore alimentados com dietas contendo alto teor de concentrado e fontes nitrogenadas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, p. 749-758, 2004.
- OWENS, F. N.; HANSON, C. F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *Journal of dairy science*, v. 75, n. 9, p. 2605-2617, 1992.

PEZZALI, J. G. et al. Effects of different carbohydrate sources on taurine status in healthy Beagle dogs. *Journal of animal science*, v. 98, n. 2, 2020.

PINA, D. S. et al. Efeitos da inclusão e dos tempos de exposição da cana-de-açúcar ao óxido de cálcio sobre os parâmetros digestivos e fisiológicos de novilhas nelores. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 1579-1586, 2010.

PIRES, C. P.; SAAD, F. M. O. B.; CARCIOFI, A. C.; SANTOS, J. P. F. Inter-relação entre o balanço cátion-aniônico do alimento e o ph urinário de gatos. *Archives of Veterinary Science*, v.16, n.3, p.76-86, 2011.

POND, K. R.; ELLIS, W.C.; MATIS, J.H.; DESWYSEN, A. G. 1989. Passage of chromium-mordanted and rare earth-labeled fiber: time dosing kinetics. *Journal Animal Science*, v. 67, p. 1020-1028.

PRESCOTT, M. J.; LIDSTER, K. Improving quality of science through better animal welfare: the NC3Rs strategy. *Lab Animal*, v. 46, n. 4, p. 152-156, 2017.

ROCHLITZ, I. Recommendations for the housing of cats in the home, in catteries and animal shelters, in laboratories and in veterinary surgeries. *Journal of feline medicine and surgery*, v. 1, n. 3, p. 181-191, 1999.

RUSSEL, W. M. S. e BURCH, R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique* (Methuen,1959).

SABCHUK, T. T. et al. Digestibility and behavior of dogs housed in kennels or metabolic cages. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 41, p. 118-122, 2012.

SAHA, D. C.; GILBREATH, R. L. Analytical recovery of chromium from diet and faeces determined by colorimetry and atomic absorption spectrophotometry. *Journal of Science of Food and Agriculture, Philadelphia*, v.55, p.433-446, 1991.

SALIBA, E.O.S. Mini-curso sobre o uso de indicadores. In: *TELECONFERÊNCIA SOBRE INDICADORES EM NUTRIÇÃO ANIMAL*, 1., 2005, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Escola de Veterinária/UFMG, 2005. p.23-35.

SALIBA, E.O.S. *Compêndio de Utilização de Indicadores do Metabolismo Animal*. Editores: Eloísa de Oliveira Saliba, André Cayô Cavalcanti – Belo Horizonte, 2013. p.117-127.

SAMPAIO, C. B. et al. Evaluation of fecal recovering and long term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, p. 174-182, 2011.

SCHAAFSTRA, F. J. W. C. et al. Evaluation of titanium dioxide and chromic oxide as digestibility markers in ponies fed alfalfa hay in relation to marker dosing frequency. *animal*, v. 13, n. 4, p. 702-708, 2019

SHIELDS, R. G. Digestibility and metabolizable energy measurement in dogs and cats. In: *Pet Food Forum*, 1., 1993, New York. Anais... New York: Watt Publishing, 1993. p. 21-35.

SHORT, F. J. et al. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Animal feed science and technology*, v. 59, n. 4, p. 215-221, 1996.

SINGH, I. et al. Investigation of indigestible markers in dogs. In: *Proceedings of the British Society of Animal Science*. Cambridge University Press, 2009. p. 67-67.

STEVENSON, A. E.; MARKWELL, P. J. Comparison of urine composition of healthy Labrador retrievers and miniature schnauzers. *American journal of veterinary research*, v. 62, n. 11, p. 1782-1786, 2001.

TITGEMEYER, E. C.; ARMENDARIZ, C. K.; BINDEL, D. J.; GREENWOOD, R. H.; e LÖEST, C. A. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal Animal Science*, vol. 79, p. 1059–1063, 2001.

VASCONCELLOS, R. S.; CARCIOFI, A.C.; OLIVEIRA, L.D.; Prada, F.; Pereira, G.T.; Utilização de indicadores para estimar a digestibilidade aparente em gatos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol. 59 n. 2 Belo Horizonte, 2007.

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant: Ruminant Metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forages and plant fiber. Ithaca, Cornell University Press, 1987.

VHILE, S. G. et al. Yttrium oxide (Y₂O₃) as an inert marker in digestibility studies with dogs, blue foxes and mink fed diets containing different protein sources. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, v. 91, n. 9-10, p. 381-389, 2007.

WAGNER, E.; KEISCH, C.H.; IBEN, C.H. Influence of the feed Base Excess on urine parameters in cats. *Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition*. n. 90, p. 10- 41, 2006.

WILLIAMS, C. H.; DAVID, D. J.; IISMAA, O. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, n.59, p 381-385, 1962.

YAMKA, R. M.; MICKELSEN, S. L. The prediction of urine pH using dietary cations and anions in dogs fed dry and wet foods. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 4, n. 4, p. 355, 2006.

ZENTEK, J.; SCHULZ, A. Urinary composition of cats is affected by the source of dietary protein. *The Journal of nutrition*, v. 134, n. 8, p. 2162-2165, 2004

4. OBJETIVO

Neste estudo, objetivou-se desenvolver uma metodologia de avaliação da digestibilidade, energia metabolizável e pH urinário em gatos na casa de seus tutores, de forma a melhorar cada vez mais as condições de bem-estar dos animais, substituindo o uso de gaiolas metabólicas.

Para isto, foram realizados dois experimentos, com os seguintes objetivos específicos:

Experimento 1: Comparar os coeficientes de digestibilidade aparente obtidos pelos indicadores óxido crômico e dióxido de titânio, com aqueles estimados pelo método de coleta total em gaiolas metabólicas (método de referência), afim de validar estes indicadores.

Experimento 2: Avaliar um aparato para a coleta de fezes e urina de gatos *in home*, e determinar o pH urinário e a digestibilidade pelo método dos indicadores, comparando estes dados com os dados obtidos em gaiolas metabólicas pelo uso dos mesmos métodos.

CAPÍTULO II
DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE
APARENTE EM GATOS PELO MÉTODO DOS INDICADORES

RESUMO

A utilização de substâncias indicadoras representa um método prático e com potencial de substituição a Coleta Total (CT), quando esta torna-se inviabilizada, na determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente. Poucos indicadores têm sido estudados em gatos domésticos. O presente estudo teve como objetivo avaliar comparativamente o método de coleta com indicadores (Cr_2O_3 e TiO_2) e o método de coleta total de fezes, na determinação da digestibilidade aparente dos nutrientes de quatro rações balanceadas para felinos adultos. Foram utilizados 24 gatos adultos saudáveis, confinados em gaiolas metabólicas. Quatro dietas para gatos adultos foram formuladas, de acordo com as recomendações nutricionais da AAFCO (2003), contendo 0,20% do indicador óxido crômico e 0,20% do indicador dióxido de titânio. O período experimental teve duração de 14 dias, sendo 7 dias para adaptação dos animais às dietas e 7 dias de coleta fezes. As taxas de recuperação dos indicadores (médias \pm desvio padrão) foram, respectivamente, de $79,22\% \pm 9,77\%$ e $109,75\% \pm 15,47\%$ para o TiO_2 e Cr_2O_3 . Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os coeficientes de digestibilidade aparente determinados pelos métodos de CT e Cr_2O_3 para todos os nutrientes, no entanto, os coeficientes determinados pelo TiO_2 foram significativamente menores. Desta forma, este indicador mostrou-se ineficiente para estimar a digestibilidade dos nutrientes, quando comparado à coleta total de fezes e Cr_2O_3 .

Palavras-chave: óxido crômico, dióxido de titânio, felinos, digestibilidade.

ABSTRACT

The use of indicative substances represents a practical method and with potential to substitute the Total Collection (TC), when it becomes unfeasible, in the determination of the coefficients of apparent digestibility. Few indicators have been thought of in cats. The present study aimed to comparatively evaluate the method of collection with indicators (Cr₂O₃ and TiO₂) and the method of total data collection, in determining the apparent digestibility of nutrients in balanced diets for adult cats. Twenty-four healthy adult cats were used, confined in metabolic cages. Four diets for adult cats were formulated according to the AAFCO nutritional guidelines (2003) containing 0.20% of the chromic oxide indicator and 0.20% of the titanium dioxide indicator. The experimental period lasted 14 days, with 7 days for animals to adapt to the diets and 7 days for collection. The recovery rates of the indicators (means \pm standard deviation) were, respectively, 79.22% \pm 9.77% and 109.75% \pm 15.47% for TiO₂ and Cr₂O₃. There were no significant differences ($p > 0$, methods) between the apparent digestion coefficients determined by CT and Cr₂O₃ for all nutrients, however, the specific coefficients by TiO₂ were significantly lower, thus, this indicator proved to be inefficient to estimate the digestibility of nutrients, when compared to the total collection of feces and Cr₂O₃.

Keywords: chromic oxide, titanium dioxide, felines, digestibility.

1. INTRODUÇÃO

A digestibilidade de nutrientes é um dos principais parâmetros que qualificam nutricionalmente as rações ao representar o quanto de cada nutriente foi absorvido pelo animal, após o consumo do alimento. Assim, ensaios de digestibilidade são imprescindíveis para o balanceamento adequado de dietas que propiciem o atendimento das necessidades nutricionais dos animais (José, 2009).

O método de coleta total de fezes é o padrão ouro para estimar a digestibilidade aparente em diversas espécies animais, porém, pode ser considerado trabalhoso e oneroso, pois exige rigoroso controle da ingestão e excreção e, para isso, se faz necessária a contenção dos animais em gaiolas metabólicas com dispositivo para separação de urina e fezes (Berchielli et al., 2000).

Uma alternativa à coleta total é o uso de indicadores. Entre os indicadores externos utilizados na avaliação da digestibilidade, o óxido crômico (Cr_2O_3) é o mais utilizado, entretanto, alternativas à sua utilização têm sido demandadas, em função de aspectos associados ao seu possível efeito mutagênico (Myers et al., 2006). Desta forma, o dióxido de titânio (TiO_2), utilizado como corante alimentar em produtos destinados à alimentação humana tem sido empregado como alternativa ao uso do óxido crômico em ensaios de digestibilidade (Platinga et al., 2014; Alvarenga et al., 2019), e obtido resultados satisfatórios.

Dentre os indicadores conhecidos, poucos foram testados em gatos domésticos até o momento, não sendo encontrado inclusive nenhum estudo sobre o uso do dióxido de titânio nestes animais. Ainda, os estudos em geral não disponibilizam a taxa de recuperação destas substâncias e muitos utilizam apenas uma ração, tornando difícil prever-se a repetibilidade dos resultados.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar comparativamente o método de coleta com indicadores (Cr_2O_3 e TiO_2) e o método de coleta total de fezes, na determinação da digestibilidade aparente dos nutrientes de quatro rações balanceadas para felinos adultos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá, protocolo nº 8084180121.

2.1 *Animais e instalações*

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Felinos Domésticos, localizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá.

Foram utilizados 24 gatos adultos saudáveis, castrados, sem raça definida, com idade aproximada de 7 anos, peso corporal médio de $4,3 \pm 0,56$ kg, castrados, previamente vacinados e desverminados.

2.2 *Dietas experimentais*

Foram utilizadas 4 dietas para gatos adultos, formuladas de acordo com as recomendações nutricionais da Association of American Feed Controls Official (2003). Todos os alimentos foram extrusados na Fábrica de Rações da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), campus Porto Alegre. A cada dieta, foi adicionado 0,20% do indicador óxido crômico (cat. 393703, Chromium (III) oxide, Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) e 0,20% do indicador dióxido de titânio (cat. 248476, Titanium (IV) Oxide, Anatase, Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil), ambos foram incorporados nas misturas das rações anteriormente à extrusão. A fórmula e a composição química das rações estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais.

Ingredientes	Ração 1	Ração 2	Ração 3	Ração 4
Farinha de arroz	44,39	34,12	41,73	29,95
HCLP ¹	-	-	21,89	30,99
Farinha de vísceras de aves	20,33	28,73	-	-
Farelo de glúten de milho	15,87	19,99	15,87	19,99
Plasma sanguíneo	2,66	3,38	2,66	3,38
Fibra de cana-de-açúcar	3,11	3,0	3,80	4,0
Sal	0,5	0,5	0,5	0,5
Premix mineral e vitamínico ²	0,4	0,4	0,4	0,4
Indicadores ³	0,48	0,48	0,48	0,48
Calcário	-	-	2,11	2,41
Fosfato bicálcico	1,14	0,08	0,65	0,16
Cloreto de colina	0,25	0,16	0,48	0,5
Cloreto de potássio	0,55	0,46	0,42	0,27
Ácido fosfórico	0,50	0,50	0,50	0,50
Adicionado por cobertura após a extrusão (%)				
Óleo de aves	8,33	6,69	7,02	4,98
Palatabilizante ⁴	1,50	1,50	1,50	1,50
Composição nutricional (valores na matéria seca)				
Matéria seca	92,60	93,60	93,30	93,50
Proteína Bruta	32,60	41,10	31,50	39,30
Extrato etéreo por hidrólise ácida	13,80	12,30	11,90	13,20
Fibra Bruta	7,83	9,04	9,88	6,15
Extrato Não Nitrogenado	47,70	39,80	50,60	40,80
Cinzas	5,91	6,85	6,05	6,79
Amido	37,90	31,00	39,20	30,40
Índice de gelatinização do amido	99,00	90,70	93,30	91,70
Energia Bruta (kcal/kg)	3914	3529	4359	4074
DGM, µm	399	378	324	300

¹HCLP, pó de fígado de galinha hidrolisado.

²Premix mineral vitamínico (fornecido por quilograma de dieta): vitamina A (10.800U), vitamina D3 (980U), vitamina E (60 mg), vitamina K3 (4,8 mg), vitamina B1 (8,1 mg),

vitamina B2 (6,0 mg), vitamina B6 (6,0 mg), 12 vitamina (30 mcg), ácido pantotênico (12 mg), niacina (60 mg), ácido fólico (0,8 mg), biotina (0,084 mg), manganês (7,5 mg), zinco (100 mg), ferro (35 mg), cobre (7,0 mg), cobalto (10 mg), iodo (1,5 mg), selênio (0,36 mg), colina (2,400 mg), taurina (100 mg) e, antioxidante BHT (150 mg).

³Dióxido de titânio e óxido de cromo misturados a 0,25% e 0,23%, respectivamente.

⁴DTECH 8L, S.P.F. Argentina S.A., Argentina.

2.3 Protocolo experimental

O ensaio de digestibilidade seguiu o protocolo de coleta total de fezes, de acordo com as recomendações da AAFCO (2014), com adaptações. O período de adaptação a dieta foi superior ao recomendado para assegurar uma adequada normalização do trânsito dos indicadores pelo trato digestório dos animais e, em virtude da menor produção fecal em gatos, optou-se por período de colheita de fezes de sete dias e não cinco. Sendo assim, o período experimental teve duração de 14 dias, sendo 7 dias de adaptação à dieta e 7 dias de coleta de fezes. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas em inox. O alimento foi oferecido duas vezes ao dia, às 8:00 h e às 14h, ficando disponível até o dia seguinte, quando as sobras foram recolhidas e pesadas, registrando-se o consumo. A quantidade fornecida foi calculada individualmente para cada animal de acordo com as necessidades energéticas (NRC, 2006). A água foi oferecida *ad libitum*. As fezes de cada animal foram coletadas uma vez ao dia, pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer (-15°C) para posterior análise.

Após o fim da coleta, as fezes foram descongeladas, homogeneizadas e colocadas em estufa de ventilação forçada a 55°C, durante 72 h, para efetuar a pré-secagem. A amostra de cada animal foi moída separadamente em moinho tipo faca tipo “willey” (Marconi, Piracicaba, São Paulo). equipado com peneira de 1 mm. As rações passaram pelo mesmo procedimento de moagem.

2.4 Análises laboratoriais

As análises das amostras de fezes pré-secas e das rações foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) da Universidade Estadual de Maringá. Foram determinadas a matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEA) e fibra bruta, segundo procedimentos da AOAC (1995). A energia bruta (EB) foi determinada em bomba

calorimétrica. Todas as análises foram conduzidas em duplicata, sendo repetidas quando variarem mais de 5%. O extrativo não nitrogenado (ENN) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{ENN (\%)} = 100 - (\text{PB} + \text{EEHA} + \text{FB} + \text{MM} + \text{Umidade})$$

O óxido de cromo foi quantificado segundo o método colorimétrico descrito por Fenton e Fenton (1979). Amostras de 1g de fezes de cada animal, secas e homogeneizadas em tubos micro-Kjeldahl, foram incineradas em mufla a 450° por 12 horas. Para determinação nas dietas, foram utilizadas amostras de 2g de cada tratamento. Após resfriamento, foram adicionados as cinzas 8 mL de uma solução contendo 10 g de molibdato de sódio dissolvido em 500 mL de solvente constituído por 150 mL de água destilada, 150 mL de ácido sulfúrico concentrado e 200 mL de ácido perclórico. Os tubos foram levados a digestores e mantidos a 300° até a coloração das amostras passarem do verde para o amarelo ou laranja. Após resfriamento, as amostras foram transferidas para balão volumétrico de 100 mL e o volume final completado com água destilada; 10 mL foram transferidos para tubos de centrífuga e centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. A leitura da absorvância foi então realizada em um espectrofotômetro (BIOPLUS – BIO 2000), utilizando o comprimento de onda de 440 nm. As amostras foram analisadas em duplicata e a concentração do cromo foi calculada a partir da análise de regressão linear da curva padrão construída a partir de 7 concentrações (2, 8, 14, 20, 26, 32 e 38 mg) de Cr₂O₃

O dióxido de titânio foi determinado por colorimetria, segundo protocolo descrito por Myers et al. (2004). Foram pesadas amostras de 0,5g de fezes e ração, em tubos de digestão macro-Kjeldahl de 250 mL, em seguida, adicionou-se 20 mL de ácido sulfúrico concentrado e 5 g de uma mistura digestora contendo sulfato de sódio e sulfato de cobre pentahidratado a cada tubo. Os tubos foram levados para o bloco digestor e aquecidos lentamente até a temperatura de 400°, onde foram mantidos até a solução atingir a coloração esverdeada. Após resfriamento, foram adicionados lentamente 10 mL de peróxido de hidrogênio e procedida a transferência do material para balão volumétrico de 100 mL utilizando papel de filtro quantitativo livre de cinzas. O volume final foi completado com água destilada e cerca de 15 mL da solução foram armazenados em frasco limpo e armazenados sob refrigeração (4°) até o momento da leitura. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (BIOPLUS – BIO 2000), utilizando o comprimento de onda de 410 nm. Imediatamente antes da leitura, foram adicionadas 3

gotas de peróxido de hidrogênio em cada amostra. As amostras foram analisadas em duplicata e a concentração de dióxido de titânio foi calculada a partir da análise de regressão linear da curva padrão construída a partir de 6 concentrações (0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg) de TiO₂.

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca, proteína bruta, matéria orgânica, matéria mineral e energia bruta segundo AAFCO (2010). A energia metabolizável foi calculada considerando os valores de energia digestiva e proteína digestível das dietas.

Pelo método de coleta total (CT) os cálculos utilizados na determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) foram os seguintes:

$$\text{CDA (\%)} = \frac{\text{nutriente ingerido} - \text{nutriente excretado}}{\text{nutriente ingerido}}$$

Para determinação da taxa de recuperação (TR) de cada indicador e dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes (CDAN) e da matéria seca (CDAMS) pelo método dos indicadores os cálculos utilizados foram:

$$\text{TR (\%)} = \frac{\text{indicador ingerido}}{\text{indicador excretado}}$$

$$\text{CDAN (\%)} = 100 - \left(100 \times \frac{\text{indicador alimento} \times \text{nutriente fezes}}{\text{indicador fezes} \times \text{nutriente alimento}} \right)$$

$$\text{CDAMS (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{indicador alimento}}{\text{indicador fezes}} \right)$$

2.5 Análise estatística

O estudo seguiu um delineamento em blocos casualizados no tempo em um esquema de parcelas subdivididas, sendo cada alimento a parcela e os métodos (coleta total, Cr₂O₃ e TiO₂) as subparcelas. Os dados foram submetidos a Análise de Variância, considerando os pressupostos de normalidade e igualdade de variâncias. As médias foram comparadas pelo teste Tukey, considerando-se 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

Os valores de óxido crômico obtidos nas rações experimentais ficaram muito próximos dos almejados durante a preparação das misturas (tabela 2), tendo a ração 3 exatamente o mesmo teor utilizado na preparação e apenas a ração 1 com teor mais baixo do que o esperado.

O dióxido de titânio apresentou maior discrepância entre os valores esperados e os valores obtidos. Todas as rações apresentaram concentrações deste indicador maiores do que o almejado durante a preparação, sendo que a ração 2 apresentou concentração de TiO_2 cerca de 1,9 vezes maior do que o esperado (tabela 2).

Tabela 2: Concentração dos indicadores nas rações experimentais (valores na matéria seca).

Indicador	Ração 1	Ração 2	Ração 3	Ração 4
Cr_2O_3 (%)	0,18	0,24	0,23	0,22
TiO_2 (%)	0,37	0,46	0,37	0,39

As taxas de recuperação dos indicadores em estudo estão apresentadas na Tabela 3. Para óxido crômico, encontrou-se o valor médio de $109,75 \pm 15,47$ % (média \pm desvio-padrão da média) e para dióxido de titânio $79,22 \pm 9,77$ %. Observa-se que para o indicador dióxido de titânio, não houve recuperação completa, enquanto que, para o óxido crômico, recuperou-se mais do que foi ingerido, sendo os valores encontrados, estatisticamente diferentes ($<0,05$)

Os resultados obtidos para os Coeficientes de Digestibilidade Aparente segundo cada um dos métodos empregados, podem ser encontrados na Tabela 3.

Como o objetivo deste estudo foi a comparação dos métodos para validação dos indicadores e não a avaliação das dietas, considerou-se na análise dos resultados de CDA's a média das 4 dietas.

A análise estatística dos resultados não detectou diferenças significativas ($p>0,05$) entre os coeficientes de digestibilidade aparente da MS, PB, EEHA, MO, EB e MM auferidos pelos métodos de CT e Cr_2O_3 , estes valores diferiram ($p<0,05$) apenas para o ENN, sendo o resultado estimado pelo indicador óxido crômico estatisticamente menor.

O mesmo não ocorreu com o indicador TiO_2 , sendo todos os coeficientes de digestibilidade aparente estimados por ele estatisticamente menores que os estimados pela CT e Cr_2O_3 . Estes resultados podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3: Coeficientes de digestibilidade aparente (média \pm desvio padrão da média) das rações determinados pelo método de coleta total (CT) e pelos indicadores óxido crômico (Cr_2O_3) e dióxido de titânio (TiO_2).

Composição	COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE		
	CT	Cr_2O_3	TiO_2
Matéria seca	82,89 \pm 1,91 a	84,27 \pm 2,03 a	78,57 \pm 3,60 b
Proteína Bruta	86,10 \pm 1,82 a	87,25 \pm 1,14 a	82,62 \pm 1,89 b
Extrato Etéreo	93,16 \pm 0,89 a	93,25 \pm 1,77 a	90,80 \pm 2,56 b
Matéria Orgânica	85,87 \pm 2,14 a	87,25 \pm 1,65 a	82,57 \pm 3,10 b
Energia Bruta	84,96 \pm 1,73 a	86,27 \pm 2,01 a	81,27 \pm 3,58 b
Matéria Mineral	39,10 \pm 6,80 a	44,15 \pm 7,48 a	24,47 \pm 9,53 b
ENN	88,02 \pm 3,72 a	77,42 \pm 3,75 b	69,42 \pm 4,39 c
Taxa de recuperação		109,75 \pm 15,47 a	79,22 \pm 9,77 a

^{a,b} - Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste T ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A taxa de recuperação média para o óxido crômico foi de 109,75%, explicando o porquê da maior digestibilidade estimada por este indicador em relação a CT e ao TiO_2 .

O erro padrão da média da TR do Cr_2O_3 foi de 15,47% em média, valor muito mais alto daquele obtido por Vasconcellos et al. (2007), que apresentaram um erro de 2,5%. Ressalta-se que, tanto a metodologia para determinação do cromo, quanto a espécie utilizada, foram as mesmas para os dois estudos. Explicações para este fato podem incluir erros analíticos. Segundo Berchielli (2003), o fato de o cromo ser oriundo do óxido crômico ou do dicromato, oferece certos problemas analíticos. Por colorimetria, a técnica determina a necessidade de manter a mesma concentração molar de ácido sulfúrico para não se alterar a absorvância da amostra, aumentando o grau de dificuldade e reduzindo a repetibilidade das análises. Ainda, Kozloski et al. (1998) destacam a importância da interferência na leitura da absorvância por outros componentes de cor presentes no alimento ou nas fezes, que podem limitar a precisão da quantificação do cromo contido no alimento ou nas fezes pelo método colorimétrico.

Apesar da TR estar acima do que é preconizado como ideal (100%), ainda foram obtidos coeficientes de digestibilidade aparente estatisticamente iguais ao da CT, validando este marcador para uso em felinos. Valor semelhante foi observado por Carciofi et al., (2006), ao compararem o método colorimétrico com a EAA, para determinação deste indicador em estudos de digestibilidade com cães. Os autores encontraram TR de 106% para Cr_2O_3 pelo método colorimétrico, o mesmo utilizado neste estudo. Também avaliando métodos para determinação de cromo, SAHA e GILBREATH (1991) trabalhando com suínos, encontraram TR média de 97,96% pelo método colorimétrico e 103,03% pela EAA, valor próximo ao observado no presente trabalho.

Embora o resultado referente à TR do Cr_2O_3 tenha sido adequado, o valor encontrado neste estudo mostra-se acima dos valores encontrados na maioria dos trabalhos disponíveis na literatura.

Apesar da indicação do emprego de Cr_2O_3 em ensaios de digestibilidade para gatos pela ASSOCIATION OF... (2003), foi localizado na literatura científica apenas um trabalho avaliando o indicador para a espécie em estudos de digestibilidade com o fornecimento de dados referentes à sua taxa de recuperação, sendo ele realizado por Vasconcellos et al., (2007) onde os autores avaliaram os indicadores óxido crômico, cinza insolúvel em ácido e lignina, comparados ao método de coleta total em estudo de digestibilidade com gatos doméstico e obtiveram TR média de 97% do Cr_2O_3 utilizando o método colorimétrico.

Em estudos realizados com cães, Andreasi (1956), empregando uma única dieta, recuperou 97,8% do óxido crômico pelo método colorimétrico e Lôbo Jr. et al. (2001) obtiveram uma recuperação do mesmo indicador de 93,7% por EAA. Também na espécie canina, Hill et al. (1996) estudaram a recuperação fecal do óxido crômico determinado colorimetricamente em quatro dietas, obtendo uma TR média de 87%, que variou de 82,1% a 92,0%.

O conteúdo analisado de TiO_2 nas dietas foi em média 0,39% (esperado 0,25%), presume-se que as elevadas concentrações deste indicador nos alimentos podem ter sido responsáveis pela sua baixa taxa de recuperação fecal, cuja média foi de 79,22%, refletindo na subestimação dos coeficientes de digestibilidade aparente de todos os nutrientes obtidos por este indicador. Resultado de recuperação fecal muito semelhante foi encontrado por Titgemeyer et al. (2001), que encontraram TR de 79,4% ao avaliar o período de adaptação de bovinos à adição de marcadores. Em trabalhos realizados em cães, Singh et al. (2009), recuperaram em média 74,5 e 80,6% de TiO_2 para duas fórmulas

de dieta diferentes. De Cuyper et al., (2018) utilizaram o TiO_2 como marcador para avaliar o tempo de retenção de duas dietas em cães. A média de recuperação fecal de titânio para cada dieta foi de 81,2 e 73,7%.

Kavanagh et al. (2000), ao avaliarem os marcadores Cr_2O_3 , TiO_2 e cinzas insolúveis em ácido (AIA) para o cálculo da digestibilidade em suínos também encontraram diferenças entre os valores assumidos na formulação e os valores analisados nas dietas para Cr_2O_3 e TiO_2 . Os autores levantam o debate sobre qual dado utilizar, uma vez que não há um padrão estabelecido, e pontuam que, ao usar os valores esperados com base nas quantidades adicionadas, assume-se que o marcador é disperso corretamente através da ração e que não há perdas deste material, no entanto, no estágio de mistura, principalmente se um moinho for utilizado, poderá ocorrer tal perda e assim, a concentração assumida estará incorreta. Ao se analisar quimicamente as dietas e até mesmo as fezes, erros na condução da análise podem levar à alteração dos valores corretos. Há também a possibilidade de contaminação da amostra, seja por manipulação ou armazenamento incorreto ou até mesmo, no momento da análise, a utilização de vidrarias não higienizadas corretamente pode levar a um aumento nos teores do indicador, levando a erros no resultado final.

Desta forma, assume-se neste estudo, que o conteúdo de TiO_2 presente nas rações, cerca de 1,9 vezes maior que o esperado, pode ser decorrente de erros na condução da técnica analítica utilizada. No presente experimento, o cálculo da taxa de recuperação e coeficientes de digestibilidade, com base no teor de dióxido de titânio adicionado a dieta (0,25%), em vez do teor de dióxido de titânio analisado (0,39%) resultaria em uma maior taxa de recuperação e conseqüentemente em maiores coeficientes de digestibilidade aparente.

Em virtude da variação nos resultados de recuperação fecal, diferentes metodologias e adaptações para determinação de TiO_2 podem ser encontradas na literatura. Leone (1973) recomendou 10 ml de H_2SO_4 concentrado, mas Jagger et al. (1992) e Short et al. (1996) modificaram esta técnica, utilizando duas vezes mais H_2SO_4 . Titgmeyer et al. (2001) modificaram esta técnica usando 7,4 ml H_2SO_4 e 10 ml de H_2O_2 a 30%. Já Myers et al. (2004) trocou utilização do procedimento de incineração antes da digestão, pela suspensão úmida da amostra com H_2SO_4 concentrado.

O comprimento de onda utilizado na leitura também pode afetar a sensibilidade da técnica para determinação do TiO_2 . O uso de diferentes comprimentos pode ser observado nas diferentes metodologias, variando de 400 nm por Short et al. (1996) e

Kavanagh et al. (2001), a 408 nm por Jagger et al. (1992) e Leone (1973) e 410 nm por Titgmeyer et al. (2001) e Myers et al. (2004). No presente estudo, o TiO_2 foi determinado a 410 nm.

De maneira geral, observa-se que o CDA foi sempre maior quando se utilizou o óxido de cromo como indicador, apresentando a coleta total valores intermediários e o dióxido de titânio valores mais baixos. Isto é explicado pelas taxas de recuperação dos indicadores. Como para o Cr_2O_3 encontrou-se recuperação acima de 100%, o procedimento de cálculo originou valores sistematicamente maiores, ocorrendo o inverso com o TiO_2 .

Os coeficientes de digestibilidade aparente estudados em ruminantes, disponíveis em alguns dos trabalhos consultados, apresentaram resultados muito semelhantes aos observados neste estudo. Titgmeyer et al. (2001), obtiveram coeficientes de digestibilidade superestimados com Cr_2O_3 e subestimados com TiO_2 , quando comparados com a coleta total, também em decorrência da baixa recuperação fecal de TiO_2 na espécie bovina. Da mesma forma, Kavanagh et al. (2001), observaram valores semelhantes para coleta total e Cr_2O_3 , enquanto os valores obtidos com TiO_2 foram menores em comparação com coleta total e Cr_2O_3 .

Em cães, Alvarenga et al., (2019) avaliaram o óxido crômico, dióxido de titânio e a cinza insolúvel em ácido como marcadores para estimar a produção fecal de cães e obtiveram coeficientes de digestibilidade aparente muito próximos determinados pelo método de coleta total, óxido crômico e dióxido de titânio. Ao contrário do achado neste estudo, os autores sugerem que o TiO_2 pode ser um marcador preferencial para estimar a produção fecal em cães quando comparado ao Cr_2O_3 .

Não foram localizados trabalhos sobre o emprego de TiO_2 em ensaios de digestibilidade para gatos.

5. CONCLUSÃO

A ausência de diferenças estatísticas entre o indicador óxido crômico e o método de coleta total para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes válida, nas condições do presente experimento, a utilização deste indicador em ensaios de digestibilidade com gatos. O indicador dióxido de titânio mostrou-se ineficiente para estimar a digestibilidade dos nutrientes, em virtude da sua baixa TR, que subestimou os CDA, quando comparado à coleta total de fezes e ao indicador óxido crômico.

CAPÍTULO III
ESTUDO DE DIGESTIBILIDADE E PH URINÁRIO *IN HOME* COM
GATOS

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar um aparato para a coleta de fezes e urina e ainda, desenvolver e validar metodologias para determinação do pH urinário e coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes com o uso dos indicadores óxido crômico (Cr_2O_3) e dióxido de titânio (TiO_2) em gatos domiciliados. Para isto, os resultados obtidos *in home* foram comparados com os resultados obtidos com os animais confinados em gaiolas metabólicas, pois este é o método de referência para estes dois testes. Quatro alimentos foram submetidos a ensaios de digestibilidade pelo método dos indicadores, sendo cada alimento avaliado com animais em gaiola (n=6) ou *in home* (n=6). Os indicadores Cr_2O_3 e TiO_2 foram incluídos nas rações no momento da mistura e tiveram sua determinação realizada por colorimetria. Para o indicador Cr_2O_3 , não houve diferença ($p>0,05$) entre os coeficientes de digestibilidade aparente da MS, PB, EEHA, MO e EB obtidos em gaiolas metabólicas e *in home*, apenas para ENN, observou-se diferença ($p<0,05$), o mesmo ocorreu com o indicador TiO_2 , não apresentando diferenças significativas ($p>0,05$) entre os coeficientes de digestibilidade aparente da MS, PB, EEHA, MO e EB obtidos em gaiolas metabólicas e *in home*, diferindo ($p<0,05$) somente para o ENN. Houve diferença significativa ($P<0,05$) entre o valor de pH urinário obtido nas gaiolas metabólicas e o obtido *in home*, sendo o valor obtido *in home* estatisticamente maior. Nas condições do presente experimento, a metodologia desenvolvida e a utilização do Cr_2O_3 e do TiO_2 como indicadores para a realização de estudos de digestibilidade com gatos domiciliados foram validados. Já a metodologia desenvolvida para avaliação do pH urinário *in home* não se mostrou confiável, em virtude da diferença entre os valores obtidos nos dois ambientes

Palavras-chave: bem-estar, indicadores, felinos, digestibilidade, urina, tutor

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate an apparatus for the collection of feces and urine and also, to develop and validate methodologies for determination of urinary pH and coefficients of apparent digestibility of nutrients using the indicators chromic oxide (Cr₂O₃) and titanium dioxide (TiO₂) in domiciled cats. For this, the results obtained in home were compared with the results obtained with animals confined in metabolic cages, as this is the reference method for these two tests. Four foods were submitted to digestibility tests by the indicator method, each food being evaluated with animals in cages (n=6) or in home (n=6). The Cr₂O₃ and TiO₂ indicators were included in the rations at the time of mixing and were determined by colorimetry. For the Cr₂O₃ indicator there was no difference (p>0.05) between the apparent digestibility coefficients of DM, CP, EEHA, MO and EB obtained in metabolic cages and in home, only for ENN there was a difference (p<0.05), the same occurred with the TiO₂ indicator, showing no significant differences (p>0.05) between the apparent digestibility coefficients of DM, CP, EEHA, MO and EB obtained in metabolic cages and in home, differing (p< 0.05) only for the ENN. There was a significant difference (P<0.05) between the urinary pH value obtained in metabolic cages and that obtained in home, with the value obtained in home being statistically higher. Under the conditions of the present experiment, the methodology developed and the use of Cr₂O₃ and TiO₂ as indicators for carrying out digestibility studies with domiciled cats were validated. The methodology developed for the evaluation of urinary pH in home was not reliable, due to the difference between the values obtained in the two environments.

Keywords: welfare, indicators, felines, digestibility, urine, tutor

1. INTRODUÇÃO

A maior parte da vida dos animais de laboratório é passada em gaiolas e/ou ambientes como salas com área restrita. O objetivo do confinamento é manter os animais em condições que atendam às suas necessidades básicas e ao mesmo tempo fornecer um ambiente prático e padronizado para reduzir a variabilidade experimental. A combinação do controle de fatores de monitoramento ambiental e sanitário com economia e manejo levaram ao desenvolvimento de sistemas de alojamento que são fáceis de manusear, limpar, armazenar, e ainda, possibilitam manter muitos animais em uma área restrita (Brain e Benton, 1979; Hetts, 1991), no entanto, nem sempre as condições de bem-estar são plenamente atendidas.

Estudos de nutrição como os ensaios de digestibilidade e pH urinário exigem o confinamento dos animais em gaiolas metabólicas, usadas para medição de ingestão total de alimentos e água, bem como a excreção de urina e fezes por serem equipadas com um sistema único para evitar a contaminação da urina, separando efetivamente as fezes e possibilitando a coleta da urina em tubos fora da gaiola (Kurien et al., 2004). Apesar da extrema relevância destes estudos, confinar os animais em gaiolas, provocando seu isolamento do restante do grupo e restringindo seu espaço físico, mesmo que por um curto período de tempo, representa uma situação de estresse, comprometendo em partes o bem-estar animal.

Por outro lado, a determinação da digestibilidade pelo método dos indicadores não exige o confinamento dos animais, pois o cálculo leva em conta apenas a quantidade do indicador fornecido ao animal e a sua concentração nas fezes (Rodriguez, 2006; Alvarenga et al., 2019). Sendo assim, o indicador permite que testes de digestibilidade possam ser realizados até mesmo com cães domiciliados, desde que haja comprometimento do tutor com o protocolo a ser seguido e assim garante-se maior bem-estar aos animais utilizados nestas pesquisas, pois estes estarão em seu ambiente domiciliar natural, livres para expressarem seu comportamento natural.

Como o bem-estar animal é um pré-requisito para resultados experimentais confiáveis, é fundamental buscar métodos e procedimentos que melhorem o bem-estar dos animais. O bem estar animal e a boa ciência estão intrinsecamente ligados.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar um aparato para a coleta de fezes e urina e ainda, desenvolver e validar metodologias para determinação dos coeficientes

de digestibilidade aparente e pH urinário em gatos domiciliados, comparando os resultados aqui obtidos com os obtidos em gaiolas metabólicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá, protocolo nº 8084180121.

2.1 Animais e instalações

A seleção dos animais elegíveis foi baseada em entrevistas realizadas com os tutores que se voluntariaram para participar. As entrevistas foram realizadas entre os meses de junho e julho de 2021, com esclarecimento aos tutores sobre os objetivos e procedimentos do estudo, incluindo as análises realizadas nas amostras de fezes de seus gatos.

Para ser selecionado, o animal deveria ser único em sua residência ou o tutor deveria garantir que este ficasse isolado dos demais animais durante o período experimental, de modo a garantir que as fezes e urina coletada fosse realmente do animal selecionado. O gato participante também deveria ter entre dois e sete anos de idade, estar saudável e não fazer uso de medicamentos. O tutor do animal selecionado também precisou garantir que a alimentação fornecida seria somente a dieta experimental, e que o animal não teria acesso à rua ou a outro ambiente não controlado pelo tutor.

Ao final das entrevistas, seis gatos saudáveis, dois machos e quatro fêmeas sem raça definida foram incluídos neste estudo. Formulários de consentimento dos tutores foram obtidos para cada gato participante do estudo.

2.2 Dietas experimentais

Para fins de comparação entre os CDA's obtidos, foram utilizadas as mesmas quatro dietas para gatos adultos para os dois experimentos (*in home* e gaiolas metabólicas), formuladas de acordo com as recomendações nutricionais da Association of American Feed Controls Official (2003). A fórmula e a composição química das dietas encontram-se na Tabela 1.

2.3 Protocolo experimental

2.3.1 Experimento in home

Todos os gatos foram mantidos em suas residências e os tutores foram orientados a seguirem suas rotinas normais, evitando ao máximo mudanças ou interferências desnecessárias.

Para a realização deste experimento, uma caixa sanitária especial foi adquirida e adaptada segundo as necessidades do estudo (Figura 1). A caixa conta com dois compartimentos, sendo o primeiro vazado para que haja o escoamento da urina e as fezes não sejam contaminadas, já o segundo compartimento conta com uma inclinação, para que a urina seja escoada diretamente por uma mangueira para um ralo. Em nossa adaptação, retiramos a mangueira e acoplamos um recipiente coletor ao fundo da caixa. Os dois compartimentos da caixa são montados por encaixe, para facilitar a limpeza.



Figura 1: Caixa de areia sanitária utilizada pelos tutores.

Normalmente, gatos fazem uso de caixas sanitárias com areia específica para esse fim, no entanto, o uso da areia implicaria na contaminação das fezes e na absorção da urina, impossibilitando a sua coleta. Diante disso, utilizou-se microesferas de polipropileno em substituição a areia convencional, um material plástico não aderente e não absorvente (Figura 2).



Figura 2: Microesferas de polipropileno.

Cada tutor recebeu uma caixa sanitária, a “areia” e as dietas já pesadas nas quantidades que deveriam ser fornecidas a cada animal diariamente, mediante o cálculo das necessidades energéticas (NRC, 2006). Para a coleta das fezes foram fornecidos sacos plásticos apropriados e luvas para facilitar o procedimento. Para limpeza das caixas e lavagem da areia foi fornecido detergente neutro e os tutores foram instruídos a não utilizarem outro produto que pudesse de alguma forma contaminar as amostras e interferir nos resultados.

Anteriormente ao início do período experimental, recomendou-se um período de adaptação dos animais a caixa sanitária e a areia de no mínimo 15 dias.

O período experimental teve duração de 14 dias, sendo sete dias de adaptação a dieta e sete de coleta das fezes. O período de adaptação às dietas e de coleta de fezes foi superior ao recomendado pela ASSOCIATION OF... (2014) para assegurar uma adequada normalização do trânsito dos indicadores pelo trato digestório dos animais e, em virtude da menor produção fecal em gatos, optou-se por período de colheita de fezes de sete dias e não cinco.

Durante todo o período de adaptação e coleta, os tutores foram instruídos a alimentarem os animais apenas com a dieta experimental, os horários de cada refeição deveriam ser mantidos conforme os hábitos de cada animal, bem como a frequência de alimentação diária e apenas a quantidade de ração fornecida sofreria mudanças, devendo ser fornecida exatamente a quantidade recomendada para cada dia, conforme as necessidades energéticas de cada animal (NRC, 2006).

Mesmo sendo adotado o método dos indicadores de digestibilidade, em virtude da menor produção fecal em gatos, os tutores foram instruídos a realizarem a coleta total das

fezes, no entanto, não houve a necessidade de se mensurar o consumo ou a quantidade total de fezes produzidas. As coletas compreenderam o período de 24 horas, não tendo um horário específico para serem realizadas, podendo o tutor realizar esse manejo no momento em que melhor se encaixasse na sua rotina.

Após a coleta, as fezes foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer.

No primeiro dia de coleta de fezes, também foi iniciado o período de coleta de urina, com duração de cinco dias. Nesta fase, a urina foi coletada uma vez ao dia, sendo o tutor orientado a realizar a coleta compreendendo no mínimo 24 horas. As amostras foram coletadas já nos recipientes plásticos (Figura 3) acoplados a caixa. Cada tutor recebeu cinco recipientes (um para cada dia de coleta), todos foram entregues etiquetados com nome do animal, dia de coleta e dieta correspondente. Todos os recipientes continham timol, um antisséptico com atividade antibacteriana e antifúngica para conservação da urina (ABINPET, 2019). Após as coletas, o recipiente contendo a urina foi armazenado em freezer (-15°C) até o momento da análise.



Figura 3: Recipiente plástico com urina.

Todos os tutores foram orientados a higienizar a caixa sanitária com detergente neutro e água apenas e realizar a troca da areia após cada coleta, afim de diminuir as chances de contaminação das amostras posteriores.

Ao fim do período experimental, todo o material coletado (recipientes com urina e as amostras de fezes) foram recolhidos na casa de cada tutor e levados a laboratório para as análises.

Já no laboratório, as amostras de urina foram descongeladas e, quando estas atingiram temperatura ambiente, foi medido o volume em uma proveta de vidro graduada e realizada a leitura do pH em um peagâmetro digital de bancada (modelo D22, da marca Digimed).

As fezes foram descongeladas, homogeneizadas e colocadas em estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 h para efetuar a pré-secagem. A amostra de cada animal foi moída separadamente em moinho tipo faca “willey” (Marconi, Piracicaba, São Paulo) equipado com peneira de 1 mm.

Todas as dietas passaram pelo mesmo procedimento de moagem para posterior análise.

2.3.2 Experimento gaiolas metabólicas

O ensaio de digestibilidade seguiu o protocolo de coleta total de fezes, de acordo com as recomendações da AAFCO (2014), com adaptações, mas os cálculos para determinação dos coeficientes de digestibilidade foram feitos pelo método dos indicadores. O período de adaptação a dieta foi superior ao recomendado para assegurar uma adequada normalização do trânsito dos indicadores pelo trato digestório dos animais e, em virtude da menor produção fecal em gatos, optou-se por período de colheita de fezes de sete dias e não cinco. Sendo assim, o período experimental teve duração de 14 dias, sendo 7 dias de adaptação a dieta e 7 dias de coleta de fezes.

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas em inox. O alimento foi oferecido duas vezes ao dia, as 8:00 h e as 14h, ficando disponível até o dia seguinte, quando as sobras foram recolhidas e pesadas, registrando-se o consumo. A quantidade fornecida foi calculada individualmente para cada animal de acordo com as necessidades energéticas (NRC, 2006). A água foi oferecida *ad libitum*. As fezes de cada animal foram coletadas uma vez ao dia, pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer (-15°C) para posterior análise.

Junto ao ensaio de digestibilidade a coleta de urina foi realizada conforme o protocolo descrito no Manual Pet Food Brasil (ABINPET, 2019), sendo os primeiros sete dias destinados à adaptação dos gatos às dietas e os três dias subsequentes destinados à coleta total de urina. A coleta ocorreu uma vez ao dia, em recipientes plásticos colocados sob o funil coletor da gaiola, contendo 1 ml de ácido clorídrico 1N, para evitar perdas de nitrogênio e proliferação de bactérias. Após cada coleta, o volume foi medido em uma

proveta de vidro graduada, e a leitura do pH realizada utilizando um peagâmetro digital de bancada (modelo D22, da marca Digimed).

Todas as amostras de urina foram descartadas após as análises.

O pH final foi obtido pela média aritmética \pm coeficiente de variação do valor diário adquirido para cada animal.

2.4 Análises laboratoriais

As análises das amostras de fezes pré-secas e das rações foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) da Universidade Estadual de Maringá. Foram determinadas a matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEA) e fibra bruta segundo procedimentos da AOAC (1995). A energia bruta (EB) foi determinada em bomba calorimétrica. Todas as análises foram conduzidas em duplicata, sendo repetidas quando variarem mais de 5%. O extrativo não nitrogenado (ENN) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{ENN (\%)} = 100 - (\text{PB} + \text{EEHA} + \text{FB} + \text{MM} + \text{Umidade})$$

O óxido de cromo foi quantificado pelo método colorimétrico segundo Fenton e Fenton (1979) e o dióxido de titânio também determinado por colorimetria, segundo Myers et al. (2004). Ambos os protocolos estão descritos detalhadamente no Capítulo II desta dissertação.

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca, proteína bruta, matéria orgânica, matéria mineral e energia bruta segundo AAFCO (2010). A energia metabolizável foi calculada considerando-se os valores de energia digestiva e proteína digestível das dietas.

Segundo o método dos indicadores, os cálculos utilizados na determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes (CDAN) e da matéria seca (CDAMS) foram os seguintes:

$$\text{CDAN (\%)} = 100 - \left(100 \times \frac{\text{indicador alimento}}{\text{indicador fezes}} \times \frac{\text{nutriente fezes}}{\text{nutriente alimento}} \right)$$

$$\text{CDAMS (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{indicador alimento}}{\text{indicador fezes}} \right)$$

2.5 Análise estatística

O estudo seguiu um delineamento inteiramente casualizado, considerando para as análises estatísticas, os efeitos de ambiente (gaiola e *in home*) para cada indicador. Para isto, os dados foram submetidos a Análise de Variância, considerando 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos para os Coeficientes de Digestibilidade Aparente segundo os dois indicadores empregados (Cr_2O_3 e TiO_2), avaliados dentro dos dois ambientes (Laboratório/Gaiola metabólica e *in home*) podem ser encontrados na Tabela 1.

Para o indicador óxido crômico, não houve diferença ($p>0,05$) entre os coeficientes de digestibilidade aparente da MS, PB, EEHA, MO e EB obtidos em gaiolas metabólicas e *in home*, apenas para ENN observou-se diferença ($p<0,05$), sendo o valor obtido *in home* estatisticamente maior que o obtido nas gaiolas.

O indicador dióxido de titânio não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$) entre os coeficientes de digestibilidade aparente da MS, PB, EEHA, MO e EB obtidos em gaiolas metabólicas e *in home*, no entanto, estes valores também diferiram ($p<0,05$) para o ENN, sendo o resultado consignado em gaiolas metabólicas estatisticamente menor que o *in home*.

Os valores médios de pH e volume urinário estão apresentados na tabela 2. Houve diferença significativa ($P<0,05$) entre o valor de pH urinário obtido nas gaiolas metabólicas e o obtido *in home*, sendo o valor obtido *in home* estatisticamente maior.

Tabela 1. Coeficientes de digestibilidade aparente (média \pm desvio padrão da média) determinados pelo método dos indicadores óxido crômico (Cr₂O₃) e dióxido de titânio (TiO₂) em gaiolas metabólicas e *in home*.

Cr ₂ O ₃				
ITEM	Gaiola	In home	Média	P
Matéria seca	84,27 \pm 2,03 ^a	83,17 \pm 1,93 ^a	83,72	0,5587
Proteína Bruta	87,25 \pm 1,13 ^a	86,02 \pm 1,54 ^a	86,63	0,3664
Extrato Etéreo	93,25 \pm 1,76 ^a	90,70 \pm 0,67 ^a	91,97	0,0520
Matéria Orgânica	87,25 \pm 1,65 ^a	86,40 \pm 1,60 ^a	86,82	0,5998
Energia Bruta	86,27 \pm 2,02 ^a	82,72 \pm 2,49 ^a	84,50	0,0928
Matéria Mineral	44,15 \pm 7,48 ^a	33,72 \pm 1,32 ^a	38,93	0,0824
ENN	77,42 \pm 3,74 ^a	88,72 \pm 1,40 ^b	83,07	0,0003
TiO ₂				
ITEM	Gaiola	In home	Média	
Matéria seca	78,57 \pm 3,60 ^a	77,85 \pm 3,85 ^a	78,21	0,0723
Proteína Bruta	82,62 \pm 1,88 ^a	81,85 \pm 1,01 ^a	82,23	0,5636
Extrato Etéreo	90,80 \pm 2,55 ^a	87,65 \pm 2,36 ^a	89,22	0,0206
Matéria Orgânica	82,57 \pm 3,10 ^a	82,17 \pm 3,03 ^a	82,37	0,8041
Energia Bruta	81,27 \pm 3,57 ^a	77,32 \pm 4,32 ^a	79,30	0,0649
Matéria Mineral	24,47 \pm 9,53 ^a	14,60 \pm 10,91 ^a	19,53	0,0978
ENN	69,43 \pm 4,38 ^a	85,17 \pm 2,87 ^b	77,30	<0,0001

^{a,b} - Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste T (P<0,05).

Tabela 2. Valores do pH urinário (média \pm desvio padrão da média), obtidos em gaiolas metabólicas e *in home*.

Item	Ambientes	
	Gaiola	<i>In home</i>
pH urina	6,58 \pm 0,23 ^a	7,08 \pm 0,51 ^b

^{a,b} - Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste T (P<0,05).

4. DISCUSSÃO

Com exceção de serem caçadores solitários quando em vida livre na natureza, gatos são criaturas sociais. A maioria de suas atividades são realizadas dentro de grupos sociais estáveis e juntos podem, por exemplo, se cuidar, brincar ou dormir juntos (Crowell-Davis et al., 2003). Além de reconhecerem os membros de seu próprio grupo, os gatos parecem também considerar seus donos como parte dele e mostram isso aplicando o mesmo tipo de comportamento social em relação a eles (Bradshaw et al., 2012). Gatos que vivem em laboratório podem ter o seu bem-estar afetado por diversos

fatores. O isolamento social, tanto de pessoas como de outros gatos, e/ou o alojamento em ambiente restrito com locais de descanso e esconderijo insuficientes podem se tornar situações de grande estresse (Luescher et al., 1991).

Pesquisas confirmam que grande parte de animais de laboratório possuem o bem-estar comprometido. Stella et al. (2014) avaliaram o comportamento de gatos alojados em macroambientes (salas) e microambientes (gaiolas). No estudo, ao utilizarem como parâmetros a ingestão de alimentos, micção, defecação e presença de comportamento anormal para verificar o desconforto sentido pelos animais, os autores sugerem que todos os gatos experimentaram angústia e que mais gatos alojados nas gaiolas do que em salas exibiram comportamento anormal. Os autores também observaram que os animais alojados em ambientes maiores se aclimataram mais rapidamente do que aqueles alojados nas gaiolas metabólicas, o que pode ser confirmado pela maior porcentagem de gatos exibindo comportamentos naturais como afiliação ou manutenção.

Woo (2017), avaliando o efeito das condições ambientais de habitação sobre a digestibilidade de nutrientes e nível de estresse em gatos, observou maior digestibilidade da matéria seca e proteína bruta para os animais alojados em salas, o autor também verificou que os níveis de estresse foram diminuídos significativamente nos gatos alojados em salas quando comparados aos animais mantidos em gaiolas.

Kendrick et al. (2020), comparou dados de equilíbrio de excreção de cães alojados em gaiolas metabólicas em pares e cães alojados individualmente nas gaiolas, a fim de demonstrar que a realização de estudos de equilíbrio de excreção com um design de alojamento em pares melhora o bem-estar animal sem comprometer a integridade científica do estudo. A avaliação dos níveis de estresse dos cães foi investigada medindo-se os níveis de cortisol sérico como biomarcador indicativo. Os resultados foram inconclusivos devido a grandes variações nos níveis de cortisol. No entanto, pode-se perceber que os cães pareciam mais calmos no ambiente de alojamento em pares.

Outras pesquisas, sobre o bem-estar de gatos confinados estão direcionadas a modificações em suas gaiolas, estudando a adição de oportunidades para os animais se esconderem e empoleirar-se (Rochlitz, 2000; Gourkow e Fraser, 2006; Kry e Casey, 2007).

Buscando atender melhores condições de bem-estar para animais utilizados em pesquisas, e seguindo o princípio do refinamento da teoria dos 3R's, os estudos *in home* surgem como alternativa aos estudos realizados em laboratórios pois proporcionam mais liberdade para os animais expressarem seu comportamento natural (Spangenberg, 2007),

além de simularem o que realmente acontece com estes em ambientes domésticos, aumentando a acurácia dos resultados obtidos. No entanto, a determinação da digestibilidade e do pH urinário em ambiente domiciliar pode tornar as amostras mais suscetíveis à contaminação ambiental e além disso, a garantia de que fatores externos não afetem os resultados finais é mais difícil, pois todo o manejo será feito pelo tutor do animal e restará ao pesquisador apenas confiar de que o protocolo estabelecido será seguido.

Nas condições do presente estudo, pode-se presumir que a metodologia desenvolvida para o estudo da digestibilidade em gatos *in home* foi validada, pois de maneira geral, os dois indicadores, óxido crômico e dióxido de titânio proporcionaram CDA dos nutrientes semelhantes entre os dois ambientes. Apenas os coeficientes de digestibilidade do ENN obtidos pelos dois indicadores foram significativamente diferentes, quando avaliados *in home* em relação a gaiola. Possíveis explicações para isto ainda não foram encontradas.

Não há dados na literatura relatando a avaliação da digestibilidade com gatos em ambiente domiciliar utilizando o óxido crômico ou o dióxido de titânio, e apenas um trabalho, realizado com cães, foi localizado utilizando o TiO_2 . Neste estudo, apesar dos dados observados não terem sido validados com um ensaio padronizado de digestibilidade usando cães em ambiente laboratorial e a taxa de recuperação do indicador não ter sido avaliada, os autores afirmam a eficácia do TiO_2 na determinação do CDA em cães de propriedade privada (Hagen-Plantinga et al., 2014).

O valor médio do pH urinário obtido em gaiolas metabólicas encontra-se dentro do recomendado para manter a função renal normal em gatos, sendo esta faixa entre 6,2 a 6,8 para prevenção de urólitos de estruvita e oxalato de cálcio (Allen e Kruger, 2000).

Já o pH urinário obtido no experimento *in home*, mostrou-se não só acima do obtido em gaiolas metabólicas como também do recomendado. De acordo com o valor observado (7,08), obteve-se urina alcalina, ao contrário do observado no estudo em gaiolas metabólicas, onde o valor de 6,58 aponta para uma urina ácida. Reine e Langston (2005) apontam algumas causas para urina alcalina, entre elas a alimentação, que pode resultar em uma urina alcalina transitória como resultado da vaga alcalina pós-prandial, devido à secreção de ácido gástrico causar uma relativa alcalose. Alcaloses respiratórias e metabólicas resultam em reduzida excreção urinária do íon hidrogênio (H^+) o que também aumenta o pH. A infecção do trato urinário com bactérias produtoras de urease (*Proteus sp.* e *Staphylococcus sp.*, por exemplo) pode acarretar na conversão de uréia em

amônia, alcalinizando a urina. Atraso de processamento, má conservação da amostra e administração de alcalinizantes também constituem causas de urina com elevado pH segundo os autores.

Tendo-se utilizado as mesmas alimentações nos dois experimentos e sendo os animais do estudo *in home* saudáveis, sem a presença de quaisquer sintomas de problemas urinários, presume-se que as causas para a discrepância nos valores obtidos são extrínsecas a esses dois fatores (ração e animal). A hipótese de que mecanismos fisiológicos podem ser diferentes entre os animais mantidos em gaiolas e os animais livres no ambiente domiciliar também pode ser levantada, embora não existam relatos na literatura sobre este assunto.

Explicações mais plausíveis para as diferenças observadas entre os ambientes podem ser encontradas na higienização incorreta da caixa sanitária e até mesmo no processo de conservação entre o momento da coleta de urina e a análise do pH.

O procedimento usado *in home* para a higiene diária das caixas pode ter tido impacto direto sobre o pH obtido, pois, apesar das orientações feitas aos tutores, sobre qual produto utilizar e como realizar a limpeza da caixa, acredita-se que estas variáveis não podem ser totalmente controladas. Resquícios de sabão, água contida na caixa, fruto de secagem incorreta ou até mesmo urina de dias anteriores podem ser apontadas como possíveis causas para o aumento do pH urinário.

No presente estudo, foi realizada uma modificação no armazenamento da urina após coleta, estabelecendo-se o congelamento como forma de conservação. Isto foi necessário em decorrência da impossibilidade de proceder-se a leitura do pH logo após a coleta, tanto pelos tutores não possuírem o aparelho para tal análise como por questões logísticas, não ser possível que a equipe buscasse as urinas nas casas de cada tutor assim que essa fosse coletada. Segundo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, amostras de urina para realização de urinálise (exame de urina que também avalia o pH) nunca devem ser congeladas, pois o congelamento prejudica diretamente a avaliação dos elementos figurados da urina, no mesmo sentido Mundim (2010), aponta que a urina deve ser analisada em no máximo 30 minutos após a coleta sem refrigeração e, se refrigerada (0 a 4°C), deve ser por no máximo 6 horas, o que pode causar um leve aumento da densidade e precipitação de cristais amorfos (Sink e Feldman, 2006), já Navarro (1996) defende que o período de refrigeração não deve exceder 4 horas e à temperatura de refrigeração deve ser de 4 a 8°C. A normativa da ABNT NBR 15268:200511 regulamenta que a análise de urina deve ocorrer em condições

de temperatura ambiente em até 4 horas, após esse prazo a amostra deve ser refrigerada de 4 a 8°C sem estabelecer um tempo máximo para isso e caso o refrigeração ocorra, deve-se aguardar retornar a temperatura ambiente para iniciar a análise. Neste estudo, o descongelamento foi feito ao ar livre e a leitura de pH só foi realizada após as amostras retornarem a temperatura ambiente.

Contrário a essas recomendações, Mezaroba (2019), comparando tiras de reagentes com os métodos padrões para realização da urinálise, também utilizou o congelamento como forma de conservação da urina para análise de pH, e obteve o resultado desejado, não apontando problemas oriundos do congelamento.

Não foi encontrado na literatura quais as implicações do congelamento sobre o pH urinário diretamente, mas acredita-se que está também pode ter sido uma razão para a diferença entre os valores encontrados nos dois ambientes.

Tanto a caixa sanitária utilizada neste estudo quanto a “areia” mostraram-se viáveis, embora adaptações possam ser feitas, visando melhorias para se obter resultados compatíveis entre os ambientes e facilitar o manejo por parte dos tutores.

Alguns inconvenientes foram relatados pelos tutores, entre eles, o mais apontado foi o odor forte de urina no ambiente em que a caixa sanitária foi mantida, fato que já era esperado, pois o material utilizado como areia não absorve a urina tão pouco ameniza o seu odor, como ocorre com a areia convencional. Uma possível solução para isso, seria o uso de algum produto que neutralizasse o odor, porém testes devem ser feitos para que seja garantido que o referido produto não interfira nos resultados finais de digestibilidade e pH urinário.

Estudos mais aprofundados sobre os efeitos dessa mudança de ambiente nos animais, no que tange ao seu melhor bem-estar, são necessários para validar de fato a metodologia desenvolvida e afirmar, de forma científica, que os animais mantidos em ambiente natural doméstico possuem mais condições de estarem em uma situação de bem-estar, do que aqueles mantidos em laboratórios, confinados em gaiolas metabólicas.

A autora sugere que estudos futuros incluam a avaliação de parâmetros comportamentais e fisiológicos como forma de reconhecer a presença ou ausência de estados de dor e desconforto, fatores que impactam diretamente o bem-estar de um animal. Como parâmetros comportamentais, podem ser avaliados os comportamentos anormais, como estereotípias, postura, medo ou agressão repentina, vocalização, diminuição da autolimpeza (comportamento comum em gatos saudáveis) e alterações na atividade. Em relação aos parâmetros fisiológicos, pode-se incluir a perda de peso,

redução da ingestão de alimentos, diarreia, sinais respiratórios e cardiovasculares e alterações nos níveis de hormônio do estresse e parâmetros imunológicos.

5. CONCLUSÃO

A ausência de diferenças estatísticas nos coeficientes de digestibilidade aparente obtidos em gaiolas metabólicas e *in home* pelos dois indicadores validam, nas condições do presente experimento, a metodologia desenvolvida e a utilização do Cr_2O_3 e do TiO_2 como indicadores para a realização de estudos de digestibilidade com gatos domiciliados. Já a metodologia desenvolvida para avaliação do pH urinário *in home* não se mostrou confiável, em virtude da diferença entre os valores obtidos nos dois ambientes, no entanto, acredita-se que mudanças nos procedimentos de higienização da caixa sanitária e conservação da urina sejam suficientes para que a metodologia seja passível de validação.

Este estudo apresenta-se como um avanço no desenvolvimento de técnicas de experimentação animal que favoreçam as condições de bem-estar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAFCO - ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIAL. Official Publication. Dog and cat food substantiation methods. Canada, 2003, 444p.
- ALVARENGA, I. C.; ALDRICH, C. G.; OU, Z. (2019). Comparison of four digestibility markers to estimate fecal output of dogs. *Journal of animal science*, v. 97, n. 3, p. 1036-1041, 2019.
- ALLEN, T. A.; KRUGER, J. M. Enfermedad felina de las vias urinarias. In: HAND, M. S. *et al.* Nutrición clínica en pequeños animales. 4th ed. Bogotá: Panamericana, 2000. chap. 46, p. 811-845.
- ANDREASI, F. Estudos de métodos indiretos (óxido crômico e lignina) para a determinação da digestibilidade aparente no cão. 1956, 60p. Tese (Livre Docência), São Paulo, Universidade de São Paulo.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 16 ed., Gaithersburg, 1996, v.1, chap. 4, p.1-45.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 15268:200511: Laboratório Clínico. Requisitos e recomendações para o exame de urina. Brasil. 2005.
- BERCHIELLI, T. T.; ANDRADE, P.; FURLAN, C. L. Avaliação de indicadores internos em ensaios de digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 830-833, 2000.
- BRAIN, P.; BENTON, D. The interpretation of physiological correlates of differential housing in laboratory rats. *Life Sciences*, v. 24, n. 2, p. 99-115, 1979.
- BRADSHAW, J. WS. Sociality in cats: A comparative review. *Journal of veterinary behavior*, v. 11, p. 113-124, 2016.
- CARCIOFI, A. C. et al. Chromic oxide as a digestibility marker for dogs: a comparison of methods of analysis. *Animal Feed Science and Technology*, v. 134, p. 273-282, 2007.
- CROWELL-DAVIS, S. L.; CURTIS, T. M.; KNOWLES, R. J. Social organization in the cat: a modern understanding. *Journal of feline medicine and surgery*, v. 6, n. 1, p. 19-28, 2004.

DE CUYPER, A. et al. Are carnivore digestive separation mechanisms revealed on structure-rich diets? Faecal inconsistency in dogs (*Canis familiaris*) fed day old chicks. Plos One 2018.

FENTON, T. W. e FENTON, M. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. Canadian Journal of Animal Science, vol. 59, p. 631-634, 1979.

GOURKOW, N.; FRASER, D. The effect of housing and handling practices on the welfare, behaviour and selection of domestic cats (*Felis sylvestris catus*) by adopters in an animal shelter, 2006.

HAGEN-PLANTINGA, E. A.; G. BOSCH, G.; HENDRIKS, W. H. Feline excretion in domestic cat breeds: a preliminary investigation. Journal Animal Physiology Animal Nutrition, vol. 98, p. 491–496, 2014.

HETTS, S. et al. Influence of housing conditions on beagle behaviour. Applied Animal Behaviour Science, v. 34, n. 1-2, p. 137-155, 1992.

HILL, R.C. et al. The use of chromic oxide as a marker for measuring small intestinal digestibility in cannulate dogs. Journal of Animal Science, Champaign, n.74, p 1629-1634, 1996.

JAGGER, S. et al. Evaluation of inert markers of the determination of ileal and faecal apparent digestibility values in the pig. British Journal of Nutrition, London, n.68, p 729-739, 1992.

JOSÉ, V. A. Digestibilidade e valores energéticos de alimentos extrusados para cães. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2009.

KAVANAGH, S. et al. A comparison of total collection and marker technique for the measurement of apparent digestibility of diets for growing pigs. Animal Feed Science and Technology, New York, v. 89, p. 49-58, 2001.

KENDRICK, L. et al. A novel welfare and scientific approach to conducting dog metabolism studies allowing dogs to be pair housed. **Laboratory Animals**, v. 54, n. 6, p. 588-598, 2020.

KOZLOSKI, G. V.; FLORES, E. M. M.; MARTINS, A. F. Use of chromium oxide in digestibility studies: variations of the results as a function of the measurement method. *Journal Science Food Agriculture*, v. 76, p. 373-376, 1998.

KRY, K.; CASEY, R. The effect of hiding enrichment on stress levels and behaviour of domestic cats (*Felis sylvestris catus*) in a shelter setting and the implications for adoption potential. *Animal Welfare*, v. 16, n. 3, p. 375-383, 2007.

KURIEN, B. T.; EVERDS, N. E.; SCOFIELD, R. H. Experimental animal urine collection: a review. *Laboratory animals*, v. 38, p. 333–361, 2004

LÔBO JR., M. F. et al. Coeficientes de digestibilidade aparente pelos métodos de indicadores e coleta total de fezes em cães. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.53, n.6, p.691-694, 2001.

LUESCHER, U. A.; MCKEOWN, D. B.; HALIP, J. Stereotypic or obsessive-compulsive disorders in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 21, n. 2, p. 401-413, 1991.

MEZAROBA, M. E. Comparação entre tiras reagentes veterinárias e humanas na urinálise de cães e gatos. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2019.

MYERS, W.D.; LUDDEN, P.A.; NAYIGIHUGU, V.; HESS, W. B. Technical Note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide, *Journal of Animal Science*, vol.63, p.179–183, January 2004.

MYERS, W.D.; LUDDEN, P.A.; NAYIGIHUGU, V. et al. Excretion patterns of titanium dioxide and chromic oxide in duodenal digesta and feces of ewes. *Small Ruminant Research*, vol.63, p.135-141, 2006.

MUNDIM, A. V. Morfofisiologia Renal e Interpretação do Exame de Urina, Uberlândia: Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, 2007. 17 p. [Apostila].

NAVARRO, C.E.K. Manual de Urinálise Veterinária. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 95p. 1996.

NRC - Nutrient Requirements of Dogs and Cats; capítulo 2: “ Feeding Behavior Of Dogs and Cats”, 22-27, 2006.

REINE, N. J.; LANGSTON, C. E. Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from small sample. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 20, p. 2-10, 2005.

ROCHLITZ, I. Feline welfare issues. Turner, Bateson (Eds.) *The Domestic cat: The Biology of its Behavior*, Cambridge University Press, Cambridge, p. 207-226, 2000.

SAHA, D. C.; GILBREATH, R. L. Analytical recovery of chromium from diet and faeces determined by colorimetry and atomic absorption spectrophotometry. *Journal of Science of Food and Agriculture*, Philadelphia, v.55, p.433-446, 1991.

SINGH, I. et al. Investigation of indigestible markers in dogs. In: *Proceedings of the British Society of Animal Science*. Cambridge University Press, 2009. p. 67-67.

SINK, C. A.; FELDMAN, B. F. *Urinálise e Hematologia Laboratorial para o Clínico de Pequenos Animais*, 1. ed., São Paulo: Rocca, 2006, p. 04.

SHORT, F. J. et al. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Animal feed science and technology*, v. 59, n. 4, p. 215-221, 1996.

STELLA, J.; CRONEY, C.; BUFFINGTON, T. Environmental factors that affect the behavior and welfare of domestic cats (*Felis silvestris catus*) housed in cages. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 160, p. 94-105, 2014.

TITGEMEYER, E. C.; ARMENDARIZ, C. K.; BINDEL, D. J.; GREENWOOD, R. H.; e LÖEST, C. A. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal Animal Science*, vol. 79, p. 1059–1063, 2001.

VASCONCELLOS, R. S.; CARCIOFI, A.C.; OLIVEIRA, L.D.; Prada, F.; Pereira, G.T.; Utilização de indicadores para estimar a digestibilidade aparente em gatos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol. 59 n. 2 Belo Horizonte, 2007.

WOO, P. C. Investigation of Various Factors in Nutrients Cat digestibility for animal welfare. 2017. Tese (Doutorado em Agricultura) - Escola de Biotecnologia Agrícola, Universidade Nacional de Seul, Seul, 2017.