

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

CLAUDIOMAR PEDRO SCHERER

**CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS, MICROBIOLÓGICAS E INTESTINAIS DE
LEITÕES ALIMENTADOS COM ALGAS MARINHAS CALCÍTIAS**

Marechal Cândido Rondon

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

CLAUDIOMAR PEDRO SCHERER

**CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS, MICROBIOLÓGICAS E INTESTINAIS DE
LEITÕES ALIMENTADOS COM ALGAS MARINHAS CALCÍTIICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon, como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Zootecnia”, Linha de Pesquisa “Produção e Nutrição de Não-ruminantes”, Área de concentração “Produção e Nutrição Animal”.

Orientador: Prof. Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho

Marechal Cândido Rondon

2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Scherer, Claudiomar Pedro
Características ósseas, microbiológicas e intestinais de
leitões alimentados com algas marinhas calcíticas /
Claudiomar Pedro Scherer; orientador(a), Newton Tavares
Escocard de Oliveira; coorientador(a), Paulo Levi de
Oliveira Carvalho, 2020.
64 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste
do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,
2020.

1. calcário calcítico. 2. Lithothamnium calcareum. 3.
exigência nutricional. 4. cálcio. I. Oliveira, Newton
Tavares Escocard de. II. Carvalho, Paulo Levi de Oliveira.
III. Título.

CLAUDIOMAR PEDRO SCHERER

Características ósseas, microbiológicas e intestinais de leitões alimentados com algas marinhas calcárias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de “Mestre em Zootecnia”, Área de Concentração em “Produção e Nutrição Animal”, Linha de Pesquisa “Produção e Nutrição de Não-Ruminantes”, APROVADO pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador / Presidente - Prof. Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Marechal Cândido Rondon

Membro - Prof^a. Dr.^a Silvana Teixeira Carvalho
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Marechal Cândido Rondon

Membro - Dr. Jansller Luiz Genova
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Marechal Cândido Rondon

Membro - Prof. Dr. Diovani Paiano (Membro externo)
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Marechal Cândido Rondon, 11 de dezembro de 2020.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira**, declaro como **ORIENTADOR** que presidi os trabalhos de defesa **à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação do candidato **Claudiomar Pedro Scherer**, aluno de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, a apresentação e a arguição dos membros da banca examinadora, **formalizo como Orientador**, para fins de registro, por meio desta declaração, a decisão da banca examinadora de que o candidato foi considerado **APROVADO COM RESTRIÇÕES** na banca realizada em 11/12/2020, com o trabalho intitulado: "**Características ósseas, microbiológicas e intestinais de leitões alimentados com algas marinhas calcíticas**".

Seguem abaixo a descrição das restrições elaboradas pelos membros da banca:

O mestrando se comprometeu com os membros da banca em realizar as seguintes mudanças no material escrito:

- a) Resumo geral, resumo do artigo e seus respectivos abstracts: Ajustes na escrita e padronização das conclusões;
- b) Introdução geral e do artigo: Construção de parágrafos sequenciais conectados que contextualizam o problema a ser resolvido, que demonstre a justificativa do trabalho e que evidencie a importância dos tratamentos testados;
- c) Revisão: Atualização de referências e construção de parágrafos com originalidade, mais elaborados e sem repetição textual com a literatura;
- d) Material e métodos: Ajustes na escrita de partes do texto, com mudanças no estilo e no formato, evitando a repetição textual com a literatura;



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

- e) Resultados e discussão: Construção de parágrafos com novas abordagens; ampliação das discussões existentes e conexão das ideias e conteúdos da pesquisa;
- f) Conclusões: Ajuste da conclusão efetuada, com possibilidade de ampliações;
- g) Referências: Atualização detalhada e substancial das referências relacionadas, bem como de suas correspondentes atualizações no texto;
- h) Considerações finais: Inclusão deste tópico, com escrita adequada das novas perspectivas de trabalho com o assunto e de outras conclusões, diferentes das relatadas nos objetivos da pesquisa;
- i) Apêndices (anexos): Inclusão deste tópico, para alocação de resultados estatísticos e outros (se necessário).

O não atendimento dos quesitos listados acima implicará na ausência de assinatura do orientador na declaração de revisão final da referida dissertação.

Newton Tavares Escocard de Oliveira.

Prof. Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira – Orientador/Presidente
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / *Campus* de Mal. Cândido Rondon
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof.^a Dr.^a Silvana Teixeira Carvalho**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação do candidato **Claudiomar Pedro Scherer**, aluno de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como membro externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado **APROVADO COM RESTRIÇÕES** na banca realizada em 11/12/2020, com o trabalho intitulado: **"Características ósseas, microbiológicas e intestinais de leitões alimentados com algas marinhas calcíticas"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

O referido candidato foi aprovado com restrições, que serão relatadas pelo documento a ser enviado pelo orientador.

Prof.^a Dr.^a Silvana Teixeira Carvalho

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / *Campus* de Mal. Cândido Rondon
Centro de Ciências Agrárias



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Dr. Jansller Luiz Genova**, declaro que participei, à **distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação do candidato **Claudiomar Pedro Scherer**, aluno de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como membro externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato foi considerado **APROVADO COM RESTRIÇÕES** na banca realizada em 11/12/2020, com o trabalho intitulado: "**Características ósseas, microbiológicas e intestinais de leitões alimentados com algas marinhas calcíticas**".

Seguem abaixo a descrição das restrições elaboradas (observadas) pelos membros da banca:

O mestrando se comprometeu com os membros da banca em realizar as seguintes mudanças no material escrito:

- a) Resumo geral, resumo do artigo e seus respectivos abstracts: Ajustes na escrita e padronização das conclusões;
- b) Introdução geral e do artigo: Construção de parágrafos sequenciais conectados que contextualizam o problema a ser resolvido, que demonstre a justificativa do trabalho e que evidencie a importância dos tratamentos testados;
- c) Revisão: Atualização de referências e construção de parágrafos com originalidade, mais elaborados e sem repetição textual com a literatura;
- d) Material e métodos: Ajustes na escrita de partes do texto, com mudanças no estilo e no formato, evitando a repetição textual com a literatura;



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

- e) Resultados e discussão: Construção de parágrafos com novas abordagens; ampliação das discussões existentes e conexão das ideias e conteúdos da pesquisa;
- f) Conclusões: Ajuste da conclusão efetuada, com possibilidade de ampliações;
- g) Referências: Atualização detalhada e substancial das referências relacionadas, bem como de suas correspondentes atualizações no texto;
- h) Considerações finais: Inclusão deste tópico, com escrita adequada das novas perspectivas de trabalho com o assunto e de outras conclusões, diferentes das relatadas nos objetivos da pesquisa;
- i) Apêndices (anexos): Inclusão deste tópico, para alocação de resultados estatísticos e outros (se necessário).

Dr. Jansller Luiz Genova

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / Campus de Mal. Cândido Rondon
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Diovani Paiano**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação do candidato **Claudiomar Pedro Scherer**, aluno de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como membro externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado APROVADO na banca realizada em 11/12/2020, com o trabalho intitulado: "**Características ósseas, microbiológicas e intestinais de leitões alimentados com dietas com algas marinhas calcíticas**".

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Prof. Dr. Diovani Paiano
Universidade do Estado de Santa Catarina

Dedico

A minha esposa Rozimeri, minhas filhas Marina, Sophia e Yasmim, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo.
Ao meu orientador Prof. Newton Tavares Escocard de Oliveira e ao meu coorientador Prof. Paulo Levi de Oliveira Carvalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua infinita bondade e misericórdia.

A Rozimeri pelo amor, compreensão e incentivo em me fazer continuar e perseverar no objetivo em finalizar o curso para crescimento e realização pessoal e profissional.

Às minhas filhas Marina, Sophia e Yasmim pela compreensão, apoio e ensinamento de que sempre é possível realizarmos nossos sonhos e que ser feliz é uma obrigação.

Ao Prof. Paulo Levi de Oliveira Carvalho, pela oportunidade, amizade, ensinamento, apoio e confiança durante o processo de orientação do curso.

Ao Prof. Newton Tavares Escocard de Oliveira pela confiança, apoio e ensinamento como orientador do trabalho.

A Prof.^a Silvana Teixeira Carvalho pela ajuda com a metodologia do trabalho.

Aos docentes com os quais tive a oportunidade de conviver neste período, pela amizade e ensinamentos.

Aos graduandos, pós-graduandos, estagiários e funcionários do setor de suinocultura pelo auxílio na condução deste trabalho.

CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS, MICROBIOLÓGICAS E INTESTINAIS DE LEITÕES ALIMENTADOS COM ALGAS MARINHAS CALCÍDICAS

RESUMO - O presente estudo teve por objetivo a avaliação das características ósseas, microbiológicas e intestinais de leitões em fase de creche, alimentados com suplementação dietética de algas marinhas calcílicas (AMC) como fonte de cálcio (Ca^{2+}) alternativa. Um total de 128 leitões, machos mestiços de linhagem comercial (Landrace x Large White, Agroceres σ e DanBred ϕ), com peso corporal médio inicial de 5,50 (0,49) kg. foi utilizado em delineamento experimental de blocos casualizados completos, com quatro tratamentos, repetidos duas vezes em quatro blocos, e quatro suínos por unidade experimental. Os tratamentos foram constituídos por quatro dietas experimentais: dieta formulada na exigência de Ca^{2+} proveniente de calcário calcítico (CC); dieta formulada na exigência de Ca^{2+} proveniente de proporções equivalentes de CC e AMC (CC + AMC); dieta formulada com redução de 30% da exigência de Ca^{2+} proveniente de AMC (AMC (-30%)) e dieta formulada na exigência de Ca^{2+} proveniente de AMC (AMC). As variáveis analisadas foram: matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e concentração de Ca^{2+} (Ca^{2+}) no 3º e 4º metatarso e nos rins, coração e fígado; peso fresco (PFR), peso seco (PS), comprimento (CO), área (A), composição mineral óssea (CMO), densidade mineral óssea (DMO), índice de Seedor (IS) e resistência óssea (RO) no 3º e 4º metatarso; pH estomacal e pH e contagem de população bacteriana no jejuno, íleo, ceco e cólon; morfometria intestinal no duodeno, jejuno e íleo. Houve influência ($p < 0,05$) dos tratamentos no PFR, PS, CO, A, CMO, IS e RO dos metatarsos. Animais suplementados com AMC (-30%) apresentaram menores médias dos parâmetros ósseos em relação aos leitões que receberam CC e AMC, com comprometimento do desenvolvimento ósseo. Para órgãos, houve maior concentração de Ca^{2+} no fígado de animais suplementados com AMC e maior porcentagem de MS no fígado de animais que receberam AMC (-30%). Suínos que receberam dietas com AMC apresentaram maior ($p < 0,05$) população de enterobactérias no jejuno e menor ($p < 0,05$) média de pH do ceco em relação aos suínos alimentados com dietas com CC e AMC (-30%). Como fonte de Ca^{2+} , a AMC pode ser utilizada como alternativa na dieta de leitões em fase de creche, assemelhando-se ao calcário calcítico (fonte convencional de Ca^{2+}), e não traz prejuízos aos parâmetros analisados, desde que a exigência nutricional de Ca^{2+} seja atendida.

Palavras-chave: calcário calcítico, cálcio, densidade óssea, exigência nutricional, *Lithothamnium calcareum*, suíno desmamado

BONE, MICROBIOLOGICAL AND INTESTINAL CHARACTERISTICS OF PIGLETS FEEDING CALCITIC SEAWEED

ABSTRACT - The present study aimed to evaluate the bone, microbiological and intestinal characteristics of piglets in the nursery phase fed dietary supplementation of calcitic seaweed (CS) as an alternative calcium source (Ca^{2+}). A total of 128 piglets, crossbred males of commercial lineage (Landrace x Large White, Agroceres♂ and DanBred♀), with initial average body weight of 5.50 (0.49) kg, was used in a complete randomized blocks design, with four treatments, repeated twice in four blocks, and four pigs per experimental unit. The treatments consisted of four experimental diets: diet formulated in Ca^{2+} requirement from limestone (L); diet formulated in Ca^{2+} requirement from equivalent proportions of L and CS (L + CS); diet formulated with a 30% reduction in Ca^{2+} requirement from CS (CS (-30%)) and diet formulated in Ca^{2+} requirement from CS (CS). The variables analyzed were: dry matter (DM), ash (ASH) and Ca^{2+} concentration (Ca^{2+}) in the 3rd and 4th metatarsal bones and in the kidneys, heart and liver; fresh weight (FW), dry weight (DW), length (LEN), area (A), bone mineral composition (BMC), bone mineral density (BMD), Seedor index (SI) and bone resistance (BR) in the 3rd and 4th metatarsal bones; stomach pH and pH and bacterial population count in the jejunum, ileum, cecum and colon; morphometry in the duodenum, jejunum and ileum. There was influence ($p < 0.05$) of treatments in FW, DW, LEN, A, BMC, SI and BR of metatarsals. Animals supplemented with CS (-30%) presented lower averages bone parameters in relation to piglets that received L and CS, which impaired bone development. For organs, there was a higher concentration of Ca^{2+} in the liver of animals supplemented with CS and a higher percentage of DM in the liver of animals that received CS (-30%). Pigs that received diets with CS had a higher ($p < 0.05$) population of enterobacteria in the jejunum and lower ($p < 0.05$) mean pH of the cecum compared to pigs fed diets with L and CS (-30%). As a source of Ca^{2+} , CS can be used as an alternative in the diet of piglets in the nursery phase, resembling limestone (conventional source of Ca^{2+}) and does not cause harm to the parameters analyzed, since that the nutritional requirement of Ca^{2+} is met.

Keywords: bone density, calcium, limestone, *Lithothamnium calcareum*, nutritional requirement, weaned pig

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Principais nutrientes da farinha de algas marinhas de <i>Lithothamnium calcareum</i> | 29 |
| Tabela 2. Composição centesimal e química das dietas para leitões na fase de creche alimentados com algas marinhas calcílicas..... | 44 |
| Tabela 3. <i>Lsmeans</i> de características de composição química, peso fresco, peso seco e comprimento dos metatarsos de leitões de acordo com os tratamentos..... | 51 |
| Tabela 4. <i>Lsmeans</i> de características de densitometria, densidade e resistência dos metatarsos de leitões de acordo com os tratamentos..... | 52 |
| Tabela 5. <i>Lsmeans</i> de matéria seca, matéria mineral e cálcio do coração, fígado e rins de leitões de acordo com os tratamentos..... | 54 |
| Tabela 6. <i>Lsmeans</i> de pH do estômago, jejuno, íleo, ceco e cólon, e do logaritmo da contagem de bactérias ácido lácticas, de enterobactérias e do total de bactérias no intestino de leitões de acordo com os tratamentos..... | 55 |
| Tabela 7. <i>Lsmeans</i> da razão entre altura de vilos e profundidade de criptas do duodeno, jejuno e íleo de leitões de acordo com os tratamentos..... | 57 |

Sumário

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2. Revisão de literatura..... | 17 |
| 2.1 A importância do Ca ²⁺ na nutrição de suínos..... | 17 |
| 2.2. Mecanismos de regulação do Ca ²⁺ | 18 |
| 2.3 Absorção intestinal de cálcio..... | 19 |
| 2.4 O Ca ²⁺ e sua relação com o tecido ósseo..... | 21 |
| 2.5 O efeito do Ca ²⁺ sobre o trato gastrointestinal de leitões..... | 25 |
| 2.6 Fontes de Ca ²⁺ na formulação de dietas para suínos..... | 27 |
| 2.7 Uso das algas marinhas calcílicas <i>Lithothamnium calcareum</i> em dietas para suínos.... | 28 |
| 2.8 Referências..... | 32 |
| 3. CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS, MICROBIOLÓGICAS E INTESTINAIS DE LEITÕES ALIMENTADOS COM ALGAS MARINHAS CALCÍLICAS..... | 39 |
| 3.1 Introdução..... | 41 |
| 3.2 Material e métodos..... | 42 |
| 3.3 Resultados e discussão..... | 49 |
| 3.4 Conclusões..... | 58 |
| 3.5 Referências..... | 59 |

1 INTRODUÇÃO

Estudos sobre a utilização de minerais em dietas animais (GONZÁLEZ-VEGA et al., 2014; LAGOS et al., 2019; LEE et al., 2019) têm despertado interesse, pois possibilitam a correção de desequilíbrios nutricionais, com resultados promissores tanto para prevenir quanto para curar enfermidades de origem nutricional (ROUSSEL, 2000; SUTTLE, 2010).

O cálcio (Ca^{2+}) é um macromineral necessário para o crescimento e desenvolvimento de todos os organismos vivos. Presente principalmente no esqueleto (99%), mas encontrado em tecidos e fluidos corporais como um íon livre (1%), essencial para as atividades fisiológicas dos seres vivos, como a condução nervosa e a sinalização celular. De modo geral, o cálcio é essencial para a formação de ossos, dentes, casca de ovos, pérolas e conchas de animais marinhos (PEIXOTO, 2004; SUTTLE, 2010).

Como o organismo dos animais não consegue sintetizar os minerais, estes precisam ser ingeridos na alimentação. As fontes de Ca^{2+} podem ser de origem inorgânica (rochas) e orgânica (farinhas de ossos, conchas e algas). Geralmente, as fontes de Ca^{2+} utilizadas na nutrição animal são oriundas de rochas, como o calcário calcítico, que é abundante na natureza (SÁ et al., 2004; ROSTAGNO et al., 2017). Entretanto, a extração das fontes inorgânicas de Ca^{2+} , consideradas não-renováveis, promovem impacto ambiental. Além disso, algumas fontes complexas de Ca^{2+} e fósforo, como o fosfato bicálcico, têm o custo mais elevado em comparação a fontes orgânicas, que expressam menor valor por quilograma dentre os componentes presentes na ração animal (MELO e MOURA, 2009).

Outro ponto a se considerar é a solubilidade das fontes de Ca^{2+} , que está intimamente relacionada à biodisponibilidade e à absorção intestinal pelo animal. A farinha de algas marinhas, apesar de conter menor quantidade de Ca^{2+} em comparação à farinha comercial de Ca^{2+} , apresenta maior solubilidade, o que a torna atrativa para pesquisas relacionadas ao seu uso na nutrição animal, a fim de maximizar o desempenho do animal e minimizar os custos na formulação das dietas (MELO et al., 2006).

As algas marinhas calcíticas são plantas que crescem naturalmente no meio marinho em zonas de entremarés e em profundidades de até 200 metros. Elas exercem um papel fundamental na formação de recifes por todo o mundo. Com a incidência de luz natural, essas algas tornam-se fontes renováveis permanentes de macro e microminerais (DIAS, 2000; VILLAS BÔAS; FIGUEIREDO; VILLAÇA, 2005; COUTO et al., 2008).

Dentre as algas marinhas calcárias, a *Lithothamnium calcareum* pertence à família *Corallinaceae* e é uma alga vermelha não articulada ou incrustada composta basicamente de carbonato de Ca^{2+} e magnésio, além de conter mais de 20 oligoelementos (ferro, manganês, boro, níquel, cobre, zinco, molibdênio, selênio e estrôncio, entre outros). Além de ser uma fonte natural e renovável, ela tem sido utilizada como fonte alternativa de Ca^{2+} ao calcário calcítico e a outras fontes de Ca^{2+} convencionais na alimentação animal, pois apresenta elevada biodisponibilidade dos micronutrientes que se encontram adsorvidos nas paredes celulares, sendo de fácil assimilação na nutrição animal e para plantas, quando utilizada como fertilizantes de solo (COSTA NETO et al., 2010; CARLOS et al., 2011).

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo a mensuração de características ósseas, morfológicas, microbiológicas e intestinais de leitões alimentados com algas marinhas calcárias, a fim de avaliar se existem diferenças em substituição às fontes convencionais de Ca^{2+} .

2. Revisão de literatura

2.1 A importância do Ca^{2+} na nutrição de suínos

Os avanços nas pesquisas relacionadas à produção suinícola são responsáveis pela conquista de índices zootécnicos cada vez mais satisfatórios no setor. Os esforços são direcionados ao aumento da produtividade, à redução de custos na nutrição e à manutenção dos índices conquistados na genética, sanidade e bem-estar dos animais (SANTANA et al., 2017).

Informações sobre o valor nutricional dos alimentos e das exigências nutricionais dos animais podem ser encontradas em diferentes tabelas nutricionais (NRC, 2012; ROSTAGNO et al., 2017). Dentre os requisitos nutricionais essenciais para uma alimentação adequada dos animais, os minerais são indispensáveis para o desenvolvimento das funções metabólicas e fisiológicas, pois são parte do organismo e representam até 3,2% do peso corporal do animal. O Ca^{2+} é um dos minerais mais abundantes no organismo animal e exerce importante função no metabolismo, sendo responsável pela mineralização da matriz óssea, excitação muscular e cardíaca, coagulação sanguínea, integridade da membrana celular, transmissão nervosa, controle do pH sanguíneo, estabilização da frequência cardíaca e pressão arterial, e ativação de vários sistemas enzimáticos (ARAÚJO et al., 2008; CHARLTON; EWING, 2007).

Na nutrição animal, a base da dieta é composta por grãos, que possuem teores de Ca^{2+} em quantidades insuficientes para atender o requerimento nutricional do animal. Devido à origem vegetal, o Ca^{2+} existente nos grãos está insolubilizado e sua absorção é baixa, sendo a suplementação justificável e necessária para que haja a expressão da máxima potencialidade animal (SÁ et al., 2004; GONZÁLEZ-VEGA; STEIN, 2014).

A disponibilidade relativa de Ca^{2+} foi de 99% para o fosfato bicálcico, de 84% para o calcário calcítico e de 75% para o calcário dolomítico (MUNIZ et al., 2007). A biodisponibilidade de Ca^{2+} do calcário dolomítico variou de 50 a 75%, enquanto a do calcário calcítico esteve próxima de 85% (NRC, 1994). As variações devem-se ao fato de que o calcário calcítico contém cristais com alternadas camadas de íons Ca^{2+} e carbonato (calcita), enquanto no calcário dolomítico o magnésio substitui parte do Ca^{2+} , o que resulta em cristais mais densos e menos solúveis. Além disso, o magnésio também pode ser antagonico ao Ca^{2+} , influenciando o mecanismo de absorção intestinal (MUNIZ et al., 2007).

Os ossos exercem função na estrutura e sustentação do corpo e são a maior reserva de Ca^{2+} do organismo, o que garante a manutenção do equilíbrio da concentração normal (homeostase) do Ca^{2+} e fósforo (P) nos ossos e meio extracelular. Uma suplementação mineral e vitamínica restrita durante a fase de crescimento do animal acarretará um desequilíbrio na homeostase mineral e, conseqüentemente, um desenvolvimento inapropriado (calcificação anormal) dos ossos. No entanto, o Ca^{2+} em excesso pode agir como antagonista, dificultando a absorção de ferro, cobre, zinco, magnésio, sódio, potássio, entre outros (MUNIZ et al., 2007; SUTTLE, 2010; GONZÁLEZ-VEGA; STEIN, 2014). Nesse sentido, a inclusão de minerais na dieta deve ser controlada, pois seu excesso ou escassez pode prejudicar a absorção intestinal, principalmente em relação ao Ca^{2+} e P.

Com o propósito de reduzir o uso de fontes inorgânicas de Ca^{2+} e P das rações, a adoção de estratégias nutricionais, como a utilização de ácidos orgânicos, fitase exógena e fontes de cálcio orgânicas tem sido empregada (MOREIRA et al., 2004). Diante disso, o uso de algas marinhas calcíticas como fonte orgânica de minerais e de demais nutrientes tem sido alvo de estudos na nutrição animal.

2.2. Mecanismos de regulação do Ca^{2+}

O Ca^{2+} é o cátion mais abundante no organismo e está distribuído nos tecidos mineralizados, líquido intracelular e no líquido extracelular, sendo que 99% encontram-se nos

ossos e dentes em formato de hidroxiapatita (cristal complexo de Ca^{2+} , fosfato e água), fornecendo rigidez e estrutura; e menos de 0,5% é encontrado em cristais amorfos ou solubilizados em equilíbrio dinâmico com o Ca^{2+} extracelular (SUTTLE, 2010).

A segunda maior reserva de Ca^{2+} é encontrada no meio intracelular, onde a maior parte está ligada às proteínas ou presentes em mitocôndrias e no retículo endoplasmático. Os níveis basais são mantidos por bombas dependentes de energia, localizadas na membrana, que fazem o transporte ativo do Ca^{2+} de fora do citosol para o líquido extracelular nas organelas celulares mencionadas. O Ca^{2+} do líquido extracelular desempenha uma função de equilíbrio com o Ca^{2+} de outros compartimentos, e a sua concentração extracelular está sob controle hormonal rigoroso (SUTTLE, 2010).

Nutricionalmente, o Ca^{2+} é imprescindível para o desenvolvimento do esqueleto, permitindo que os animais atinjam seu potencial de crescimento, mantendo a integridade óssea, a permeabilidade normal das células, a regulação da excitabilidade nervosa e muscular, além da homeostasia (SUTTLE, 2010).

A cinética do Ca^{2+} entre o líquido extracelular e o trato gastrintestinal, rins e ossos está sob controle restrito. Essa forte regulação é realizada principalmente pela interação hormonal do paratormônio (PTH), calcitonina e a 1,25-dihidroxicolecalciferol (vitamina D_3) com os tecidos alvos específicos: rins, ossos e intestino delgado, atuando na manutenção, aumento ou eliminação da entrada de Ca^{2+} no espaço extracelular, tendo a ação hormonal de acordo com os níveis séricos de Ca^{2+} . Em níveis baixos de Ca^{2+} plasmático, há a secreção de PTH e vitamina D_3 , enquanto que em níveis altos há a secreção de calcitonina (CASHMAN, 2002).

2.3 Absorção intestinal de cálcio

Os fatores primários de regulação interna que influenciam o metabolismo do Ca^{2+} são o fósforo (P), a vitamina D, os sistemas hormonais e a idade do animal (NUNES et al., 2006). Os vertebrados desenvolveram esse sistema endógeno para manter a homeostase do Ca^{2+} , um elemento essencial à vida. O sistema endógeno mantém constante a concentração extracelular, aumentando o fluxo do Ca^{2+} nos fluídos extracelulares quando há perda do mesmo no meio, e quando o Ca^{2+} entra no compartimento extracelular mais rápido do que é liberado, ocorre sua deposição nos tecidos moles (REECE, 2006).

O cálcio proveniente da dieta é absorvido no intestino delgado, que apresenta um pH entre 5 e 6, acarretando a ionização do cálcio em Ca^{2+} , que é a sua forma solúvel. Além disso, os

ácidos gástricos e as proteínas de ligação auxiliam na liberação do Ca^{2+} . Após a ionização, a absorção intestinal pode acontecer por dois processos: ativo através das células (transporte transcelular - saturável) e por difusão passiva (transporte paracelular - não saturável). No transporte paracelular, a absorção intestinal ocorre por meio de um gradiente eletroquímico nos espaços intercelulares dos enterócitos. Apesar dessa via ser independente do Ca^{2+} , a elevada ingestão de Ca^{2+} pode influenciar na sua atividade (GUÉGUEN; POINTILLART, 2000; GONZÁLEZ-VEGA; STEIN, 2014).

No transporte transcelular, o Ca^{2+} pode ser movido por três etapas: a entrada na célula através da membrana da borda em escova pelo lado luminal; difusão desse íon no citoplasma, onde o Ca^{2+} está sujeito a interações com outras moléculas intestinais; e extrusão do fluido extracelular no polo basolateral para o seroso da célula intestinal. A entrada do Ca^{2+} na célula pode ocorrer sem gasto de energia metabólica em virtude do gradiente químico entre o exterior e o interior da célula, que é maior do que três ordens de grandeza, mas a extrusão do Ca^{2+} da célula ocorre contra esse gradiente, sendo necessária uma bomba, a qual é acionada metabolicamente (BRONNER, 1987; SUTTLE, 2010; GONZÁLEZ-VEGA; STEIN, 2014).

A vitamina D é a principal reguladora na absorção intestinal ativa, através da sua conversão em um metabólito ativo, o 25-hidroxivitamina D [25-OH-D] e posterior conversão renal no 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D] ou a ação da [1,25(OH)₂D] diretamente no intestino, realizando o bombeamento do Ca^{2+} através dos enterócitos. Além disso, a interferência do paratormônio (PTH) e do hormônio do crescimento pode causar um aumento na absorção do Ca^{2+} . De outro modo, uma redução na absorção do Ca^{2+} decorre da ação de glicocorticoides, excesso de hormônio tireoidiano e calcitonina. O Ca^{2+} e o fósforo (P) absorvidos participam da manutenção da absorção do Ca^{2+} devido aos efeitos do Ca^{2+} sérico sobre a secreção de PTH e dos efeitos do P e PTH séricos sobre a produção renal do 1,25(OH)₂D (BROWN; KRITS; ARMBRECHT, 2005; CHANG et al., 2008; SUTTLE, 2010).

Como o transporte transcelular é dependente da ingestão de Ca^{2+} , um aumento na concentração desse mineral causa uma redução na absorção e na quantidade de proteínas transportadoras de Ca^{2+} (calbindinas), o que promove um aumento na transferência de Ca^{2+} pela via paracelular (insaturável). Isso acontece devido às alterações nos espaços entre as células intestinais na região das junções lacuna justa, que limitam o fluxo de Ca^{2+} insaturável, e nas junções intermediárias e basolaterais que são mais amplas (BRONNER, 1987; SUTTLE, 2010; BARBOZA; GUIZZARDI; TALAMONI, 2015).

A modificação na absorção intestinal de Ca^{2+} pode ocorrer pelo movimento do Ca^{2+} via transporte transcelular e paracelular, aumentando ou diminuindo a quantidade de Ca^{2+} ingerido.

Assim, o aumento ou a redução da ingestão de Ca^{2+} dietético têm efeitos opostos (antagônicos) nas duas vias de absorção, sendo ideal que os processos sejam estimulados de forma independente, visando ao aumento da absorção de Ca^{2+} . A descoberta de formas de aumentar o número de moléculas de calbindina nas células intestinais e de evitar a expressão de moléculas relacionadas à vitamina D ativa a via transcelular. O transporte paracelular é ativado com a mudança da permeabilidade das junções estreitas das células intestinais. Contudo, a alteração da absorção por meio da modulação intestinal entre a via paracelular e transcelular é teorizada, pois seu mecanismo de ação no intestino ainda não foi elucidado completamente (BRONNER, 1987; CHRISTAKOS et al., 2011; BARBOZA; GUIZZARDI; TALAMONI, 2015; ARECO et al., 2020).

O cálcio é absorvido independentemente da concentração de Ca^{2+} e P na dieta, mas em excesso, começa a ser excretado na urina. O mecanismo de excreção e reabsorção renal de Ca^{2+} permite regular os níveis plasmáticos de Ca^{2+} . Ambas as rotas paracelulares e transcelulares ocorrem nos rins. No sangue, o Ca^{2+} pode ser encontrado ligado à albumina (40%), associado a íons orgânicos (10%) e como um íon livre (50%). Como o rim não consegue filtrar a albumina, esta não pode ser reabsorvida e a reabsorção do Ca^{2+} no túbulo proximal não responde ao controle hormonal (insaturável) e equivale a cerca de 60% do Ca^{2+} filtrado, sendo que 10 a 15% são reabsorvidos na porção ascendente da alça de Henle e o restante no túbulo distal, onde, por processo ativo, se torna saturado se as concentrações plasmáticas de Ca^{2+} estiverem acima do normal. Essa homeostase ocorre com o aumento ou redução da reabsorção em caso de hipocalcemia e hipercalcemia, respectivamente (GOODMAN, 2005; STEIN; BOERSMA; PEDERSEN, 2006; TAYLOR; BUSHINSKY, 2009; STEIN et al., 2011).

2.4 O Ca^{2+} e sua relação com o tecido ósseo

Durante a fase embrionária, o tecido ósseo é o segundo a ser formado, onde o tecido mesenquimal colágeno é substituído pelo ósseo. Além de ser o principal constituinte do esqueleto, também tem função de suporte, proteção dos tecidos moles e órgãos, locomoção do corpo, como reserva metabólica de lipídeos e minerais e como órgão hematopoiético (BLAND, 2016; SETIAWATI; RAHARDJO, 2019).

Visualmente é possível distinguir dois tipos de tecidos ósseos: o esponjoso (trabecular) e o compacto (cortical). O tecido ósseo esponjoso apresenta uma área de superfície grande devido aos espaços intercomunicantes entre as estruturas trabeculares, sendo de grande importância na

homeostase do Ca^{2+} e P. O tecido ósseo cortical constitui a parte externa do osso, sendo mais compacto, forte e pesado (YOUNG; HEATH, 2000; BLAND, 2016).

Todo o tecido ósseo é composto por uma matriz extracelular bifásica, ou seja, sua estrutura é composta por uma porção proteica (orgânica) e uma porção mineral (inorgânica). (FOGAÇA, 2007). A fração orgânica, constituída por colágeno e proteínas não colágenas (glicoproteínas e proteoglicanos), representa aproximadamente 30% do peso ósseo e realiza a manutenção da estrutura óssea (GONZÁLEZ-VEGA; STEIN, 2014; BLAND, 2016.)

A fração inorgânica representa cerca de 60% do peso do osso, sendo predominantemente composta pelos minerais Ca^{2+} e P, na forma de cristais de hidroxiapatita, que caracterizam a estrutura mineralizada, a qual proporciona rigidez e resistência ao osso (GONZÁLEZ-VEGA; STEIN, 2014; BLAND, 2016). Outros minerais também são encontrados, como o carbonato de cálcio e o fosfato de magnésio. Dessa forma, ocorre a troca constante desses minerais entre o osso e o plasma, podendo ocorrer a desmineralização por perda excessiva de minerais ou absorção inadequada, ou a ossificação, quando o Ca^{2+} e P se precipitam na matriz óssea (GONZÁLEZ-VEGA; STEIN, 2014; BLAND, 2016).

De modo geral, o tecido ósseo é constituído por três tipos de células: osteoblastos e osteócitos, derivados de uma célula mesenquimal primitiva, e osteoclastos, oriundos do sistema mononuclear fagocitário (FOGAÇA, 2007; VEUM, 2010; BLAND, 2016).

A partir da concentração de Ca^{2+} na matriz óssea os osteoblastos realizam a mineralização e a síntese da porção orgânica do osso, por meio da secreção de colágeno tipo I, glicoproteínas, proteoglicanos e dos prolongamentos citoplasmáticos, formando canalículos que servirão como meio de comunicação entre os osteoblastos e a superfície do osso em formação, para a passagem de fluidos e nutrientes entre a matriz, os fluidos do osso e o fluido extracelular (GAY; GILMAN; SUGIYAMA, 2000; VEUM, 2010).

Após a síntese da matriz óssea, os osteoblastos ficam aprisionados dentro das lacunas da matriz e passam a ser chamados de osteócitos (células maduras). A comunicação entre os osteócitos se dá por canalículos formados pelos osteoblastos na síntese da matriz extracelular, passando pequenas moléculas e íons entre eles, além de servirem de meio de transporte de nutrientes e metabólitos. De modo superficial, a função dos osteócitos é de auxílio na manutenção e integridade da matriz óssea, pela capacidade de sintetizá-la e removê-la. Além disso, podem secretar fatores parácrinos que regulam os osteoclastos (GAY; GILMAN; SUGIYAMA, 2000; VEUM, 2010).

Os osteoclastos são células gigantes e mononucleadas da linhagem da medula óssea que circulam na corrente sanguínea, formadas a partir da fusão de precursores da superfície óssea

(pré-osteoclastos). Os osteoclastos participam da remodelagem e absorção do tecido ósseo por desmineralização e digestão da matriz óssea, pois secretam ácido, colagenase e outras enzimas que atacam a matriz e liberam Ca^{2+} , cuja homeostase pode ser mantida (GAY; GILMAN; SUGIYAMA, 2000; VEUM, 2010).

A fosfatase alcalina é uma glicoproteína ligada ao Ca^{2+} que realiza a catálise de fosfatos orgânicos, contribuindo para a mineralização da matriz cartilaginosa. Essa enzima pode ser sintetizada pelos osteoblastos ou pelos condroblastos maduros (condrócitos), que passam pelo processo de proliferação e se tornam hipertróficos (MILLÁN, 2006).

A formação de tecido ósseo pode ocorrer por ossificação endocondral, se o tecido precursor for cartilaginoso, e intramembranosa, se o osso for formado sem a intervenção de um precursor cartilaginoso. Durante o processo de mineralização, os condrócitos (células da cartilagem) sofrem hipertrofia e, simultaneamente, os canais de difusão de nutrientes se espalham. Em seguida, os condrócitos sofrem apoptose, formando cavidades pelas quais se estendem os capilares sanguíneos e células provenientes do periósteo. Algumas dessas se tornarão células osteoprogenitoras originárias de osteoblastos, que são os centros de ossificação, com função de deposição de matriz óssea, transformando o pericôndrio em periósteo (MILLÁN, 2006; SETIAWATI; RAHARDJO, 2019).

A formação intramembranosa tem origem com as células mesenquimais indiferenciadas que se tornaram as células ósseas da matriz e do tecido ósseo propriamente dito. As células mesenquimais se reúnem com formação dos centros de ossificação, os quais são envoltos por osteoblastos. Esse processo se desenvolve do centro à periferia do osso, formando trabéculas ósseas que crescem, se fundem e formam a lâmina óssea, que é separada dos ossos adjacentes por tecido fibroso. Na periferia do tecido, cada lâmina se tornará o periósteo, até que as sucessivas camadas formadas pelos osteoblastos alcancem a espessura definitiva. Assim, com o aumento da circunferência óssea, há a ossificação do tecido fibroso circunjacente, até que se alcance o tamanho definitivo do osso (SETIAWATI; RAHARDJO, 2019). Nos ossos chatos, há o predomínio do desenvolvimento por ossificação intramembranosa, mas os curtos e longos se desenvolvem por processo endocondral (MACARI; FURLAN; GONZALES, 2002).

De outro modo, a remodelagem é a descrição dos processos de reabsorção e formação de tecido mineralizado que mantém a massa e a morfologia. A manutenção de concentrações adequadas de Ca^{2+} no sangue é prioritária para a integridade estrutural do osso (JOHNSON, 2000). A homeostase do Ca^{2+} é importante para as funções vitais em que participa e para a resistência óssea, pois esta é dependente dos níveis plasmáticos de Ca^{2+} (RATH et al., 2000).

O crescimento ósseo pode ser manipulado pela dieta, pois o aporte insuficiente de Ca^{2+} pode não atender aos requerimentos do mineral no organismo, comprometendo o desenvolvimento ósseo do animal, haja vista que o equilíbrio entre o acréscimo periosteal e a reabsorção endosteal no osso em crescimento corresponde ao estado nutricional do indivíduo. Assim, dois ossos com a mesma área podem suportar cargas diferentes, de acordo com seu estado nutricional. Da mesma forma, um excesso de mineral na dieta não acarreta, necessariamente, um aumento na força suportada (CRENSHAW, 2003).

A nutrição tem impacto direto na resistência óssea, que deve ser suficiente para suportar o peso e a locomoção do animal, as mudanças na forma, tamanho e disposição estrutural, e o manuseio da carcaça nas etapas do processo produtivo. Altas taxas de falhas ósseas em suínos ocorrem de acordo com raças e linhagens, mas no aspecto global relacionam-se à taxa de crescimento, pois animais com altas taxas de crescimento tendem a apresentar maiores problemas ósseos (CRENSHAW, 2003).

O fornecimento de quantidade adequada de Ca^{2+} na dieta visa prioritariamente ao atendimento das suas diversas funções biológicas, com a integridade estrutural do esqueleto em segundo lugar. As atividades metabólicas das células ósseas podem liberar no sangue e na urina certas células ósseas e produtos da matriz que podem servir como marcadores clinicamente úteis do metabolismo esquelético (CRENSHAW, 2003; VEUM, 2010).

Devido à importância do Ca^{2+} na saúde óssea, foram desenvolvidos métodos para avaliação de parâmetros ósseos em suínos e em outros animais, utilizando-se como base a densidade mineral óssea (DMO). A DMO é um parâmetro utilizado para mensurar o conteúdo mineral por unidade de volume do osso, possibilitando avaliar a resistência mecânica do osso e possíveis falhas e doenças ósseas. Métodos que permitem avaliar a DMO proporcionam o conhecimento do conteúdo ósseo, fornecendo dados para adoção e desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade das propriedades físicas (NAN et al., 2020).

A densitometria óptica radiográfica é um método confiável, pouco invasivo e de baixo custo, que funciona por meio da incidência fotoquímica de luz, e possibilita verificar a desmineralização do osso (LIMA et al., 2020).

Outro método empregado para mensuração da densidade do osso é o da imersão em água, considerado um dos mais precisos e confiáveis, e que possibilita a utilização de amostras com formatos irregulares, em que a perda aparente do peso do corpo imerso em líquido é igual à massa do líquido deslocado (AKAR, 2006).

Os métodos clínicos apresentam tecnologia sofisticada, com a utilização de radiação ionizante e exigem maior calibração e cuidados na execução para minimizar possíveis erros de

precisão. Os métodos laboratoriais ou métodos diretos são de fácil e simples utilização e não precisam de calibração, mas exigem que o osso seja retirado do animal, impossibilitando sua utilização *in vivo* (CUMMINGS; BATES; BLACK, 2002; AKAR, 2006).

A densitometria teve início com a utilização de radiação ionizante, sendo considerada um excelente método para quantificação do conteúdo mineral ósseo, pois o Ca^{2+} é um dos principais componentes do osso e absorve muito mais radiação que os tecidos moles (CUMMINGS; BATES; BLACK, 2002; WEBBER, 2006).

Desse modo, houve uma evolução nas pesquisas a fim de determinar uma linha que possibilitasse a avaliação óssea satisfatória. A técnica de *Dual-energy X-ray absorptiometry* (DXA), de fácil utilização, menor custo e maior precisão, utiliza a absorciometria de duplo feixe de raios X (RX) com diferentes níveis de energia, que atravessam a região estudada e são medidos por um detector de RX. Um programa computacional permite segmentar a área para quantificação, obtida por subtração entre os valores obtidos dos dois feixes de energia, convertendo-os em medidas de massa mineral óssea (EL MAGHRAOUI; ROUX, 2008).

2.5 O efeito do Ca^{2+} sobre o trato gastrointestinal de leitões

O trato gastrointestinal (TGI) dos leitões passa por várias modificações no período pós desmame até que esteja preparado para uma dieta de origem vegetal. Nesse período de transição, os leitões são expostos a fatores estressantes, fisiológicos e nutricionais, como a retirada do aporte nutricional e imunológico oriundo do leite materno (imunoglobulinas e fatores de crescimento), a mudança de ambiente e separação da matriz, o desafio do TGI aos componentes antigênicos da ração, a proliferação de bactérias no intestino e as mudanças na morfologia e funcionamento do intestino delgado, que podem promover a redução na altura das vilosidades e na atividade de enzimas digestivas e absorptivas do intestino (DONZELE; ABREU; HANNAS, 2002; KUMMER et al., 2009; SANTOS; MASCARENHAS; OLIVEIRA, 2016).

A superfície intestinal é uma importante região para a absorção dos nutrientes, pois possui grande quantidade de vilos ou projeções da mucosa intestinal. Esta, é composta por células epiteliais (enterócitos) e em sua base as criptas, que possuem células indiferenciadas que regeneram as células dos vilos, por migração até a zona apical destes (SANTOS; MASCARENHAS; OLIVEIRA, 2016; CELI et al., 2017). Enquanto migram, sofrem maturação, chegando à zona apical com capacidade máxima de absorção. Estas células formam

a superfície luminal e são responsáveis pela absorção de nutrientes oriundos da digestão dos alimentos. Quanto mais longo e fino for o vilão, maior será a área para absorção de nutrientes. Desta forma, a razão entre altura do vilão e a profundidade da cripta pode ser utilizada como um bom indicador da eficiência da absorção intestinal (RUFINO et al., 2017).

Um mecanismo que está associado à ocorrência de atrofia das vilosidades é a redução da renovação celular ou o aumento da perda de enterócitos maduros, podendo ocasionar o encurtamento do vilão e um aumento da profundidade da cripta pelo aumento da produção de células indiferenciadas (ARRUDA et al., 2008). A atrofia dos vilões e a redução da taxa de produção de células das criptas está associada à ingestão sub ótima de energia e proteína, uma vez que o nível de energia metabolizável alcançado no pós-desmame equivale a apenas 60 a 70% da energia metabolizável conseguida com o leite materno (HALL; BRYNE, 1989; LE DIVIDICH; SÈVE, 2000).

A capacidade reduzida de ingestão de ração nessa fase é um dos problemas que precisam de atenção, uma vez que é responsável por 68% da variação da altura do vilão, pois há uma relação positiva entre o consumo de matéria seca e o aumento da altura das vilosidades. As alterações negativas na morfologia intestinal de leitões ocasionam distúrbios intestinais por piora na digestão dos alimentos com consequente redução na absorção de nutrientes (DONZELE; ABREU; HANNAS, 2002).

Outro ponto de atenção é que a redução de altura de vilão reduz a ingestão e a absorção de nutrientes no lúmen intestinal, ocasionando maior passagem de nutrientes para o intestino grosso, favorecendo a proliferação de microbiota indesejada (BJÖRKSTÉN, 2006; BISCHOFF, 2011).

Há uma dinâmica e uma constante mudança de vários aspectos no trato gastrointestinal (TGI) de suínos. Até o desmame, o TGI sofre alteração de tamanho, massa e composição da microbiota, e alterações nas funções de absorção, barreira e imunológicas. Além da nutrição, a mucosa e a microbiota do TGI têm ação direta na saúde intestinal do animal (PLUSKE; TURPIN; KIM, 2018).

A microbiota intestinal está intimamente relacionada à funcionalidade de barreira mucosa, à síntese de nutrientes e proteínas benéficas, à conversão nutricional da dieta em energia e ao impacto negativo das inflamações e patologias (CELI et al., 2017).

As bactérias constituem o principal grupo da microbiota intestinal e são classificadas em transientes, as que são ingeridas e excretadas sem danos ao organismo, não sendo capazes de colonizar, residir e se multiplicar no intestino, e residentes, as que colonizam e se multiplicam no intestino (PLUSKE et al., 2003). Estima-se que 90% da microbiota intestinal sejam

compostas por bactérias benéficas, aeróbicas ou anaeróbicas, produtoras de ácido lático como a *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, além de outras anaeróbicas como a *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.* e *Eurobacterium spp.* Os outros 10% são compostos por bactérias potencialmente patogênicas como a *Escherichia coli* e *Clostridium spp.* (NÉVOA et al., 2013).

O Ca^{2+} e o P disponíveis no lúmen ao longo do TGI têm função de tamponamento e atuam como citoprotetores, precipitando ácidos biliares, ácido lático e ácidos graxos voláteis, que são fatores que influenciam diretamente na microbiota intestinal. Como esses minerais são essenciais no metabolismo bacteriano ou como nutrientes, as variações de disponibilidade no TGI permitem o crescimento de gêneros comensais no intestino do suíno, como o *Citrobacter* e o *Klebsiella*, e as espécies de *Clostridium cluster XI*, *Clostridium sensu strictu* na mucosa ileal. Dessa forma, um aumento dessas bactérias na microbiota intestinal aumenta a competição e reduz a presença de bactérias patogênicas causadoras de diarreia. Outro ponto é o aumento de espécies de *Lactobacillus* à mucosa gástrica, que são indicativos de saúde gástrica e geral do intestino (MANN et al., 2014).

2.6 Fontes de Ca^{2+} na formulação de dietas para suínos

Os grãos e farelos utilizados como base na alimentação animal apresentam baixa disponibilidade de Ca^{2+} , pois o cátion quelado sob a forma de fitato ou oxalato não consegue ser absorvido pelo organismo. Devido à baixa solubilização, há a necessidade de suplementação de Ca^{2+} na alimentação animal a fim de corrigir seu *déficit* e fornecê-lo em quantidades adequadas (SÁ et al., 2004).

Há uma grande variedade de fontes minerais de Ca^{2+} na natureza que podem ser utilizadas na alimentação animal. As fontes de Ca^{2+} mais utilizadas são as inorgânicas, derivadas de rochas, como o calcário calcítico, o dolomítico e o fosfato bicálcico (ROSTAGNO et al., 2017; MELO e MOURA, 2009).

As fontes utilizadas na alimentação animal influenciam na quantidade, solubilidade e características físico-químicas do Ca^{2+} . O fosfato bicálcico apresentou a maior disponibilidade de Ca^{2+} (99%), seguido do calcário calcítico (90%) e do dolomítico (50 a 70%). Estas variações são oriundas de características inerentes a cada fonte. Os cristais de calcário calcítico apresentam camadas alternadas de íons Ca^{2+} e calcita. No dolomítico, a quantidade de magnésio substitui parte do Ca^{2+} , formando cristais mais densos e menos solúveis, além do antagonismo entre os dois, que pode influenciar na absorção intestinal do Ca^{2+} (SÁ et al., 2004).

Atualmente têm sido empregadas fontes orgânicas de Ca^{2+} na suplementação dietética de animais como as farinhas de ossos, conchas e algas. As fontes de Ca^{2+} derivadas de algas marinhas têm despertado interesse, pois apresentam elevada biodisponibilidade e absorção intestinal, baixo custo de produção e são fontes renováveis de Ca^{2+} , tornando-se uma alternativa ao uso de fontes de Ca^{2+} inorgânicas (MELO et al., 2006; MELO e MOURA, 2009).

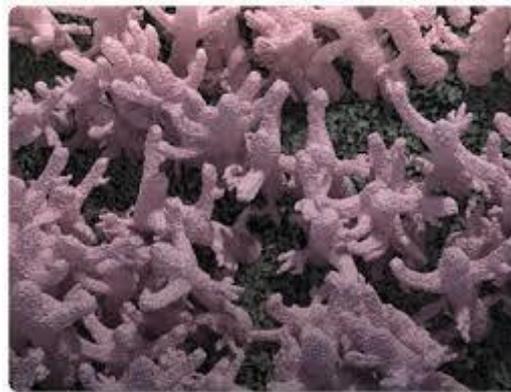
2.7 Uso das algas marinhas calcárias *Lithothamnium calcareum* em dietas para suínos

A *Lithothamnium* sp. é uma alga marinha distribuída em várias regiões do mundo e o Brasil é o detentor de uma das maiores reservas naturais (MELO e MOURA, 2009). Na pecuária, a alga *L. calcareum* vem sendo utilizada na alimentação como fonte alternativa de cálcio em diversos setores da produção animal (MELO et al., 2006; WALK et al., 2012; GONZÁLEZ-VEGA et al., 2014; GONZÁLEZ-VEGA; WALK; STEIN, 2015; SCHLEGEL; GUTZWILLER, 2016). Isso porque as algas calcárias são compostas principalmente por carbonato de cálcio e magnésio, além de conter mais de 20 oligoelementos em quantidades variáveis, como ferro, manganês, boro, níquel, cobre, zinco, molibdênio, selênio, estrôncio, entre outros (DIAS, 2000; MELO et al., 2006; SCHLEGEL; GUTZWILLER, 2016).

A *L. calcareum* é uma alga calcária vermelha pertencente ao filo *Rhodophytas*, ordem *Corallinales* e família *Corallinaceae*. Seu crescimento ocorre em camadas superpostas o que provoca a morte das camadas inferiores, que se calcificam e tornam-se acinzentadas ou levemente creme, produzindo o "granulado bioclástico marinho". Ao longo das marés, algumas dessas estruturas se soltam e são "roladas" pelo movimento das correntes, formando os "rodolitos" que, em semelhança ao que acontece com os seixos dos rios, têm formato arredondado e se acumulam em alguns locais no fundo do oceano, formando jazidas, cuja qualidade varia de acordo com a qualidade da água dos afluentes da foz dos rios da região (Figura 1) (GRAHAM; WILCOX, 2000; MELO e MOURA, 2009).



(1)



(2)

Figuras 1 e 2. Imagens de *Lithothamnium calcareum*; Fontes: Univittá Saúde Animal (2021) (Figura 1); Agroserna (2021) (Figura 2).

As algas deste gênero são ricas em carbonato de cálcio e de magnésio, e crescem em camadas superpostas que provocam a morte e "fossilização" das camadas inferiores numa velocidade de quatro mm ao ano. O processo de extração licenciado pelo IBAMA apenas permite a retirada das estruturas mortas (rodolitos), não afetando a sustentabilidade das áreas (BRASIL, 2011).

A *L. calcareum* apresenta composição média de 32 a 38% de Ca^{2+} e 2% de magnésio. Naturalmente tem sido confundida com o calcário em virtude da riqueza em Ca^{2+} e magnésio, mas sua estrutura é bastante porosa, com 60% de espaços vazios, o que proporciona uma elevada solubilidade. Sua composição é variável, complexa (mais de 40 micronutrientes) e seu balanço iônico não apresenta antagonismos, ao contrário, promove um equilíbrio iônico que pode ser considerado um tamponante orgânico (Tabela 1) (MELO et al., 2006; MELO; MOURA, 2009).

Tabela 1. Principais nutrientes da farinha de algas marinhas de *Lithothamnium calcareum*

| Nutriente | Quantidade (ppm) |
|-----------|------------------|
| Cálcio | 325000 |
| Flúor | 800 |
| Boro | 20 |
| Manganês | 20 |
| Bário | 15 |
| Iodo | 12 |
| Zinco | 11 |
| Níquel | 10 |
| Bismuto | 8 |
| Lantânio | 8 |
| Cério | 8 |

A *L. calcareum* tem sido utilizada como fonte alternativa de Ca^{2+} . A elevada disponibilidade de seus nutrientes potencializa sua atuação, pois os micronutrientes estão adsorvidos nas paredes celulares, sendo facilmente assimiláveis pelos animais (DIAS, 2000).

Ao contrário das fontes de Ca^{2+} inorgânicas, a alga marinha calcária é de renovação permanente desde que haja incidência de luz natural, tornando-a uma fonte renovável de minerais. Sua extração pode ser realizada de forma manual, por meio de sucção da alga em pó que fica acumulada nas chamadas “ilhas de areia biodentríticas”, por navio aspirador. Para sua utilização, a matéria-prima “*in natura*” passa por processo de lavagem, desidratação e moagem, para ser ensacada. O calcário resultante tem sido denominado como biogênico ou biodentrítico marinho (GOMES; PALMA; SILVA, 2000; COSTA NETO et al., 2010).

A utilização das algas marinhas em tratamentos de solo vem ocorrendo há muitos anos na Europa, com início e desenvolvimento na França, pela empresa TIMAC, ao fim da 2ª guerra mundial, adicionadas ao fertilizante NPK. Ainda, Inglaterra, Irlanda e Japão passaram a produzir pequenas quantidades para inclusão na alimentação animal (MELO et al., 2008).

No Brasil, a extração de conchas e algas marinhas acontece de forma contínua nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, com utilização restrita à agricultura. Entretanto, nos últimos anos, essa realidade se estendeu a outras áreas, como a saúde humana (formulação de cosméticos, produtos dietéticos e implantes para cirurgia óssea) e no setor pecuário, devido à utilização em suplementos minerais para ração animal à base de *L. calcareum* (GOMES; PALMA; SILVA, 2000; ALMEIDA et al., 2012).

Em virtude de suas características nutricionais, o *L. calcareum* tem sido uma fonte de Ca^{2+} para uso na alimentação animal. Em estudo de substituição do calcário por *L. calcareum* nas dietas, em que se avaliaram os parâmetros ósseos, composição da dieta, digestibilidade de Ca^{2+} e P e pH intestinal, observou-se que essa alga pode ser recomendada como fonte altamente solúvel de Ca^{2+} sem interferir no desempenho de frangos de corte (CARLOS et al., 2011; PAIVA; WALK; McELROY, 2013).

Os efeitos do Ca^{2+} e de fontes de Ca^{2+} (carbonato de cálcio e *L. calcareum*) sobre o desempenho, solubilidade mineral, resistência à ruptura óssea e concentração urinária, sérica e mineral óssea foram avaliados em leitões alimentados com dieta contendo fitase exógena. Observaram-se que os níveis de Ca^{2+} na dieta influenciaram no uso metabólico de fósforo (P) para mineralização óssea, apesar da presença das fitases exógenas. De outro modo, o uso de Ca^{2+} de *L. calcareum* e de carbonato de cálcio foram idênticos, sendo a alga recomendada como uma excelente fonte alternativa de Ca^{2+} (SCHLEGEL; GUTZWILLER, 2016).

Outra investigação referente à nutrição de leitões buscou avaliar os principais locais de absorção do Ca^{2+} , a diferença na digestibilidade padronizada de Ca^{2+} a partir de carbonato de cálcio (CaCO_3) e *L. calcareum*, e o efeito do ácido fítico sobre a digestibilidade de Ca^{2+} . Duas dietas foram elaboradas com uma fonte de Ca^{2+} , com CaCO_3 ou *L. calcareum*, e uma dieta foi livre de Ca^{2+} . A digestibilidade do Ca^{2+} não foi afetada pelo nível de ácido fítico, mas diminuiu com o aumento do nível de Ca^{2+} proveniente de *L. calcareum*. O metabolismo de Ca^{2+} e P foi semelhante ($p > 0,05$) nos leitões alimentados com dietas contendo *L. calcareum* e CaCO_3 . A absorção do Ca^{2+} do CaCO_3 ocorre principalmente antes do duodeno e a do Ca^{2+} de *L. calcareum*, no jejuno e íleo (GONZÁLEZ-VEGA et al., 2014).

Em estudo para avaliação do efeito da inclusão de fitase microbiana e de cinco dietas com diferentes fontes de Ca^{2+} , formuladas pela adição de fosfato monocálcico (FM), fosfato dicálcico (FD), carbonato de cálcio (CaCO_3), *L. calcareum* e um coproduto da beterraba com alto teor de Ca^{2+} a uma dieta basal, em detrimento do amido de milho, sobre a digestibilidade aparente e a digestibilidade estandardizada de Ca^{2+} no trato total de leitões, foi verificado que, independente da inclusão de fitase microbiana, os leitões que receberam dieta com FM apresentaram a maior digestibilidade aparente e estandardizada de Ca^{2+} no trato total. Leitões alimentados com o FD apresentaram maior digestibilidade do que os alimentados com CaCO_3 , *L. calcareum* e o coproduto da beterraba, sendo que as três últimas médias não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$). A inclusão de fitase microbiana nas dietas aumentou a digestibilidade de Ca^{2+} dos leitões (GONZÁLEZ-VEGA; WALK; STEIN, 2015).

Devido a sua composição em minerais e pela elevada disponibilidade do cálcio, a utilização da alga *Lithothamnium* spp. na nutrição animal tem despertado o interesse de muitos pesquisadores. No entanto, em razão da necessidade de investigação mais detalhada da sua inclusão em dietas para leitões, esta pesquisa tem por objetivo a avaliação da inclusão dietética de Ca^{2+} proveniente de *L. calcareum*, em substituição ao Ca^{2+} oriundo de calcário calcítico, sobre a resistência óssea, a microbiologia e a morfometria intestinal de suínos nas fases pré-inicial I, pré-inicial II e inicial, dos 21 aos 70 dias de idade.

2.8 Referências

- AGROSERNA S.L. [2021]. **Calcium amendment. 100% of marine origin and very fast absorption.** Disponível em: <<https://en.agroserna.com/wkoralsen>>. Acesso em: 16/03/2021.
- AKAR, A.; BALTAS, H.; CEVIK, U. et al. Measurement of attenuation coefficients for bone, muscle, fat and water at 140, 364 and 662 keV γ -ray energies. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, v.102, n.2, p.203-211, 2006.
- ALMEIDA, F.; SCHIAVO, L.V.; VIEIRA, A.D. et al. Gastroprotective and toxicological evaluation of the *Lithothamnion calcareum* algae. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n.5, p.1399-1404, 2012.
- ARAÚJO, J.A.; SILVA, J.H.V.; AMÂNCIO, A.L.L. et al. Fontes de minerais para poedeiras. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.53-60, 2008.
- ARECO, V.A.; KOHAN, R.; TALAMONI, G. et al. Intestinal Ca^{2+} absorption revisited: A molecular and clinical approach. **World Journal of Gastroenterology**, v.26, n.24, p.3344-3364, 2020.
- ARRUDA, A.M.V.; FERNANDES, R.T.V.; SILVA, J.M. et al. Avaliação morfo-histológica da mucosa intestinal de coelhos alimentados com diferentes níveis e fontes de fibra. **Revista Caatinga**, v.21, n.2, p.1-11, 2008.
- BARBOZA, G.D.; GUIZZARDI, S.; TALAMONI, N.T. Molecular aspects of intestinal calcium absorption. **World Journal of Gastroenterology**, v.21, n.23, p.7142-7154, 2015.
- BISCHOFF, S.C. 'Gut health': a new objective in medicine? **BMC Medicine**, v.9, n.24, p.1-14, 2011.
- BJÖRKSTÉN, B. The gut microbiota: a complex ecosystem. **Clinical and Experimental Allergy**, v.36, n.10, p.1215-1217, 2006.
- BLAND, R. Calcium homeostasis and bones. In: FIANDER, A.; THILAGANATHAN, B. (Eds.). **MRCOG part one: The official companion to the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists revision course**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2016. Cap. 8, p.91-106.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46. Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. **Diário Oficial da União**: Seção 1, Brasília, DF: Imprensa Nacional, n.194, p.4-11, 7 out. 2011.

Disponível em: <Página 1 do Diário Oficial da União - Seção 1, número 194, de 07/10/2011 - Imprensa Nacional> Acesso em: 15/03/2021.

- BRONNER, F. Intestinal Calcium Absorption: Mechanisms and Applications. **The Journal of Nutrition**, v.117, n.8, p.1347-1352, 1987.
- BROWN, A.J.; KRITS, I.; ARMBRECHT, H.J. Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.437, n.1, p.51-58, 2005.
- CARLOS, A.C.; SAKOMURA, N.K.; PINHEIRO, S.R.F. et al. Uso da alga *Lithothamnium calcareum* como fonte alternativa de cálcio nas rações de frangos de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.4, p.833-839, 2011.
- CASHMAN, K.D. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. **British Journal of Nutrition**, v.87, Suppl. 2, p.S169-S177, 2002.
- CELI, P.; COWIESON, A.J.; FRU-NJI, F. et al. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, v.234, p.88-100, 2017.
- CHANG, W.; TU, C.; CHEN, T.H. et al. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. **Science Signaling**, v.1, n.35, p.1-23, 2008.
- CHRISTAKOS, S.; DHAWAN, P.; PORTA, A. et al. Vitamin D and intestinal calcium absorption. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.347, n.1-2, p.25-29, 2011.
- COSTA NETO, J.M.; TEIXEIRA, R.G.; SÁ, M.J.C. et al. Farinha de algas marinhas ("*Lithothamnium calcareum*") como suplemento mineral na cicatrização óssea de autoenxerto cortical em cães. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n.1, p.217-230, 2010.
- COUTO, H.P.; NERY, V.L.H.; FONSECA, J.B. et al. Fontes alternativas de cálcio e fósforo para poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, n.8, p.1419-1423, 2008.
- CRENSHAW, T.D. Nutritional manipulation of bone mineralization in developing gilts. In: Allen D. Leman Swine Conference, 2003, Minnesota. **Proceedings...** Minnesota: University of Minnesota, 2003. p.183-189.
- CUMMINGS, S.R.; BATES, D.; BLACK, D.M. Clinical use of bone densitometry: Scientific review. **Journal of the American Medical Association**, v.288, n.15, p.1889-1897, 2002.
- DIAS, G.T.M. Granulados bioclásticos - algas calcárias. **Brazilian Journal of Geophysics**, v.18, n.3, p.307-318, 2000.

- DONZELE, J.; ABREU, M.L.T.; HANNAS, M.I. 2002. Recentes avanços na nutrição de leitões. In: Simpósio sobre Manejo e Nutrição de Aves e Suínos e Tecnologia da Produção de Rações, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2002. p.103-161.
- EL MAGHRAOUI, A.; ROUX, C. DXA scanning in clinical practice. **QJM: An International Journal of Medicine**, v.101, n.8, p.605-617, 2008.
- CHARLTON, S.J. EWING, W.N.; **The Minerals Directory**. 2. ed. Context Products Ltd; Leicestershire, United Kingdom, 2007. 150p.
- FOGAÇA, W.C. **Análise da integração do aloenxerto ósseo de crânio criopreservado e irradiado, adicionado de medula óssea autógena: estudo experimental em coelhos**. 2007. 142f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GAY, C.V.; GILMAN, V.R.; SUGIYAMA, T. Perspectives on osteoblast and osteoclast function. **Poultry Science**, v.79, n.7, p.1005-1008, 2000.
- GOODMAN, W.G. Calcium and phosphorus metabolism in patients who have chronic kidney disease. **Medical Clinics of North America**, v.89, n.3, p.631-647, 2005.
- GOMES, A.S.; PALMA, J.J.C.; SILVA, C.G. Causas e consequências do impacto ambiental da exploração dos recursos minerais marinhos. **Revista Brasileira de Geofísica**, v.18, n.3, p.447-454, 2000.
- GONZÁLEZ-VEGA, J.C.; STEIN, H.H. Invited review - calcium digestibility and metabolism in pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.27, n.1, p.1-9, 2014.
- GONZÁLEZ-VEGA, J.C.; WALK, C.L.; LIU, Y. et al. The site of net absorption of Ca from the intestinal tract of growing pigs and effect of phytic acid, Ca level and Ca source on Ca digestibility. **Archives of Animal Nutrition**, v.68, n.2, p.126-42, 2014.
- GONZÁLEZ-VEGA, J.C.; WALK, C.L.; STEIN, H.H. Effects of microbial phytase on apparent and standardized total tract digestibility of calcium in calcium supplements fed to growing pigs. **Journal of Animal Science**, v.93, n.5, p.2255-2264, 2015.
- GRAHAM, L.E.; WILCOX, L.W. **Algae**. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2000. 640p.
- GUÉGUEN, L.; POINTILLART, A. The bioavailability of dietary calcium. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, n.2, p.119S-136S, 2000 (Suppl).
- HALL, G.A.; BYRNE, T.F. Effects of age and diet on small intestinal structure and function in gnotobiotic piglets. **Research in Veterinary Science**, v.47, n.3, p.387-392, 1989.
- JOHNSON, L.R. **Fundamentos de Fisiologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 726p.

- KUMMER, R.; GONÇALVES, M.A.D.; LIPPKE, R.T. et al. Fatores que influenciam o desempenho dos leitões na fase de creche. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, p.195-209, 2009 (Supl.1).
- LAGOS, L.V.; LEE, S.A.; FONDEVILA, G. et al. Influence of the concentration of dietary digestible calcium on growth performance, bone mineralization, plasma calcium, and abundance of genes involved in intestinal absorption of calcium in pigs from 11 to 22 kg fed diets with different concentrations of digestible phosphorus. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.10, n.47, p.1-16, 2019.
- LE DIVIDICH, J.; SÈVE, B. Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. **Domestic Animal Endocrinology**, v.19, n.2, p.63-74, 2000.
- LEE, S.A.; LAGOS, L.V.; WALK, C.L. et al. Standardized total tract digestibility of calcium varies among sources of calcium carbonate, but not among sources of dicalcium phosphate, but microbial phytase increases calcium digestibility in calcium carbonate¹. **Journal of Animal Science**, v.97, n.8, p.3440-3450, 2019.
- LIMA, A.F.M.; LUNA, S.P.L.; RAHAL, S.C. et al. Evaluation of bone mineral density using radiographic optical densitometry of pre and postpubertal bitches submitted to ovariectomy. **Archives of Veterinary Science**, v.25, n.4, p.55-65, 2020.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. 2002. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 375p.
- MANN, E.; SCHMITZ-ESSER, S.; ZEBELI, Q. et al. Mucosa-associated bacterial microbiome of the gastrointestinal tract of weaned pigs and dynamics linked to dietary calcium-phosphorus. **PLOS ONE**, v.9, n.1, p.1-13, 2014.
- MELO, T.V.; FERREIRA, R.A.; OLIVEIRA, V.C. et al. Calidad del huevo de codornices utilizando harina de algas marinas y fosfato monoamónico. **Archivos de Zootecnia**, v.57, n.219, p.313-319, 2008.
- MELO, T.V.; MENDONÇA, P.P.; MOURA A.M.A. et al. Solubilidad *in vitro* de algunas fuentes de calcio utilizadas en alimentación animal. **Archivos de Zootecnia**, v.55, n.211, p.297-300, 2006.
- MELO, T.V.; MOURA, A.M.A. Utilização da farinha de algas calcáreas na alimentação animal. **Archivos de Zootecnia**, v.58, p.99-107, 2009.
- MILLÁN, J.L. **Mammalian alkaline phosphatase: from biology to applications in medicine and biotechnology**. Weinheim: Wiley, 2006. 337p.

- MOREIRA, J.A.; VITTI, D.M.S.S.; LOPES, J.B. et al. Fluxo biológico do fósforo no metabolismo de suínos alimentados com dietas contendo fitase. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.2066-2075, 2004 (Supl. 2).
- MUNIZ, E.B.; ARRUDA, A.M.V.; FASSANI, E.J. et al. Avaliação de fontes de cálcio para frangos de corte. **Revista Caatinga**, v.20, n.1, p.5-14, 2007.
- NAN, J.H.; YIN, L.L.; TANG, Z.S. et al. Identification of novel variants and candidate genes associated with porcine bone mineral density using genome-wide association study. **Journal of Animal Science**, v.98, n.4, p.1-8, 2020.
- NÉVOA, M.L.; CARAMORI JÚNIOR, J.G.; CORREA, G.S.S. et al. Desempenho e características bioquímicas de leitões submetidos a dietas com aditivos probióticos, prebióticos, simbióticos e antibióticos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.2, p.447-454, 2013.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of swine**. 11.ed. Washington: National Academy Press, 2012. 400p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of poultry** 9.ed. Washington: National Academy Press, 1994. 155p.
- NUNES, R.V.; POZZA, P.C.; SCHERER, C. et al. Efeito dos teores de cálcio para poedeiras semipesadas durante a fase de pré-postura e no início da postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.2007-2012, 2006.
- PAIVA, D.M.; WALK, C.L.; McELROY, A.P. Influence of dietary calcium level, calcium source, and phytase on bird performance and mineral digestibility during a natural necrotic enteritis episode. **Poultry Science**, v.92, n.12, p.3125-3133, 2013.
- PEIXOTO, E.M.A. **Cálcio**. Química Nova na Escola, 2004. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc20/v20a12.pdf>>. Acesso em: 01 mar. 2020.
- PLUSKE, J.R.; KERTON, D.J.; CRANWELL, P.D. et al. Age, sex, and weight at weaning influence organ weight and gastrointestinal development of weanling pigs. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.54, n.5, p.515-527, 2003.
- PLUSKE, J.R.; TURPIN, D.L.; KIM, J.C. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. **Animal Nutrition**, v.4, n.2, p.187-196, 2018.
- RATH, N.C.; HUFF, G.R.; HUFF, W.E. et al. Factors regulating bone maturity and strength in Poultry. **Poultry Science**, v.79, n.7, p.1024-1032, 2000.
- REECE, W.O.D. **Fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 926p.

- ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T., HANNAS, M.I. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. 4.ed. (Ed.) ROSTAGNO, H.S. Viçosa: UFV, 2017. 252p.
- ROUSSEL, A.M. New aspects on trace element metabolism disturbances in man and pet animals. **Revue de Medecine Veterinaire**, v.151, n.7, p.637-642, 2000.
- RUFINO, L.M.; NUNES, R.C.; STRINGHIN, J.H. et al. Available phosphorus reduction in weaned piglets' diets containing phytase combined with butyric and benzoic acids. **Semina**, v.38, n.3, p.1439-1450, 2017.
- SÁ, L.M.; GOMES, P.C.; ROSTAGNO, H.S. et al. Exigência nutricional de cálcio para frangos de corte, nas fases de crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.2, p.397-406, 2004.
- SANTANA, A.L.A.; CARVALHO, P.L.O.; OLIVEIRA, N.T.E. et al. Different sources of calcium for starter pig diets. **Livestock Science**, v.206, p.175-181, 2017.
- SANTOS, L.S.; MASCARENHAS, A.G.; OLIVEIRA, H.F. Fisiologia digestiva e nutrição pós desmame em leitões. **Nutritime Revista Eletrônica**, v.13, n.1, p.4570-4584, 2016.
- SCHLEGEL, P.; GUTZWILLER, A. Effect of dietary calcium level and source on mineral utilisation by piglets fed diets containing exogenous phytase. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.101, n.5, p.165-174, 2016.
- SETIAWATI, R.; RAHARDJO, P. Bone Development and Growth. In: YANG, H. **Osteogenesis and Bone Regeneration**. [S.l.]: IntechOpen, 2019. Cap. 1, p.1-20. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/osteogenesis-and-bone-regeneration/bone-development-and-growth>>. Acesso em: 01/02/2021.
- STEIN, H.H.; BOERSMA, M.G.; PEDERSEN, C. Apparent and true total tract digestibility of phosphorus in field peas (*Pisum sativum* L.) by growing pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v.86, p.523-525, 2006.
- STEIN, H.H.; ADEOLA, O.; CROMWELL, G.L. et al. Concentration of dietary calcium supplied by calcium carbonate does not affect the apparent total tract digestibility of calcium, but decreases digestibility of phosphorus by growing pigs. **Journal of Animal Science**, v.89, p.2139-2144, 2011.
- SUTTLE, N.F. **Mineral Nutrition of Livestock**. 4.ed. Cambridge: CABI, 2010. 587p.
- TAYLOR, J.G.; BUSHINSKY, D.A. Calcium and phosphorus homeostasis. **Blood Purification**, v.27, n.4, p.387-394, 2009.
- UNIVITTÁ SAÚDE ANIMAL [2021]. **O que é *Lithothamnium calcareum*? Onde é encontrada?**, Disponível em: <<https://univitta.net/blog/o-que-e-lithothamnium-calcareum-onde-e-encontrada>>. Acesso em: 16/03/2021.

- VEUM, T.L. Phosphorus and calcium nutrition and metabolism. In: VITTI, D.M.S.S.; KEBREAB, E. (Eds.). **Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals**. London: CAB International, 2010. Cap. 7, p.94-111.
- VILLAS BÔAS, A.B.; FIGUEIREDO, M.A.O.; VILLAÇA, R.C. Colonization and growth of crustose coralline algae (Corallinales, Rhodophyta) on the Rocas Atoll. **Brazilian Journal of Oceanography**, v.53, n.3/4, p.147-156, 2005.
- WALK, C.L.; ADDO-CHIDIE, E.K.; BEDFORD, M.R. et al. Evaluation of a highly soluble calcium source and phytase in the diets of broiler chickens. **Poultry Science**, v.91, n.9, p.2255-2263, 2012.
- WEBBER, C.E. Photon absorptiometry, bone densitometry and the challenge of osteoporosis. **Physics in Medicine & Biology**, v.51, n.13, p.169-185, 2006.
- YOUNG, B.; HEATH, J.W. Tecidos esqueléticos. In: YOUNG, B.; HEATH, J.W. **Wheater Histologia Funcional**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000. Cap.10, p.172-192.

3 CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS, MICROBIOLÓGICAS E INTESTINAIS DE LEITÕES ALIMENTADOS COM ALGAS MARINHAS CALCÍNICAS

RESUMO - O presente trabalho tem por objetivo avaliar as características ósseas, microbiológicas e intestinais de leitões desmamados alimentados com suplementação dietética de cálcio (Ca^{2+}) proveniente de calcário calcítico (CC) e algas marinhas calcínicas (AMC). Foram utilizados 128 leitões machos mestiços de linhagem comercial (*Landrace* x *Large White*, Agroceres♂ e DanBred♀), com peso médio inicial de 5,50 (0,49) kg e peso final de 24,39 (3,32) kg, em delineamento experimental de blocos casualizados completos com quatro tratamentos, repetidos duas vezes em quatro blocos, e quatro suínos por unidade experimental. Os tratamentos foram constituídos por quatro dietas experimentais: dieta formulada na exigência de Ca^{2+} proveniente de CC (CC); dieta formulada na exigência de Ca^{2+} proveniente de proporções equivalentes de CC e AMC (CC + AMC); dieta formulada com redução de 30% da exigência de Ca^{2+} proveniente de AMC (AMC (-30%)) e dieta formulada na exigência de Ca^{2+} proveniente de AMC (AMC). As variáveis analisadas foram: matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e concentração de Ca^{2+} (Ca^{2+}) no 3º e 4º metatarso e nos rins, coração e fígado; peso fresco (PFR), peso seco (PS), comprimento (CO), área (A), composição mineral óssea (CMO), densidade mineral óssea (DMO), índice de Seedor (IS) e resistência óssea (RO) no 3º e 4º metatarso; pH estomacal e pH e contagem de população bacteriana no jejuno, íleo, ceco e cólon; morfometria intestinal no duodeno, jejuno e íleo. Houve influência ($p < 0,05$) dos tratamentos no PFR, PS, CO, A, CMO, IS e RO dos metatarsos, na MS e Ca^{2+} do fígado, no pH do ceco, enterobactérias no jejuno e morfometria do duodeno. Leitões alimentados com AMC (-30%) apresentaram comprometimento do desenvolvimento ósseo, pois obtiveram menores médias de PFR, PS, CO, A, CMO, IS e RO em relação aos leitões que receberam dietas com CC e AMC. Para órgãos, houve maior concentração de Ca^{2+} no fígado de animais alimentados com AMC e maior porcentagem de MS no fígado de animais que receberam AMC (-30%). Leitões que receberam dietas com AMC apresentaram menor valor médio de pH no ceco e maior média ($p < 0,05$) na contagem de enterobactérias no jejuno do que leitões alimentados com dietas com CC e AMC (-30%). A utilização de AMC como fonte alternativa de Ca^{2+} em dietas de leitões em fase de creche assemelha-se à fonte convencional de Ca^{2+} , e não traz prejuízos aos parâmetros analisados, desde que a exigência nutricional de Ca^{2+} seja atendida.

Palavras-chave: calcário calcítico, cálcio, densidade óssea, exigência nutricional, *Lithothamnium calcareum*, suíno desmamado

BONE, MICROBIOLOGICAL AND INTESTINAL CHARACTERISTICS OF PIGLETS FEEDING CALCITIC SEAWEED

ABSTRACT - The present study aims to evaluate the bone, microbiological and intestinal characteristics of weaned piglets fed dietary calcium (Ca^{2+}) supplementation from limestone (L) and calcitic seaweed (CS). We used 128 crossbred male piglets of commercial lineage (Landrace x Large White, Agroceres♂ and DanBred♀), with initial average weight of 5.50 (0.49) kg and final weight of 24.39 (3.32) kg, in a randomized block design complete with four treatments, repeated twice in four blocks, and four pigs per experimental unit. The treatments consisted of four experimental diets: diet formulated in Ca^{2+} requirement from L (L); diet formulated in Ca^{2+} requirement from equivalent proportions of L and CS (L + CS); diet formulated with a 30% reduction in Ca^{2+} requirement from CS (CS (-30%)) and diet formulated in Ca^{2+} requirement from CS (CS). The variables analyzed were: dry matter (DM), ash (ASH) and Ca^{2+} concentration (Ca^{2+}) in the 3rd and 4th metatarsal bones and in the kidneys, heart and liver; fresh weight (FW), dry weight (DW), length (LEN), area (A), bone mineral composition (BMC), bone mineral density (BMD), Seedor index (SI) and bone resistance (BR) in the 3rd and 4th metatarsal bones; stomach pH and pH and bacterial population count in the jejunum, ileum, cecum and colon; morphometry in the duodenum, jejunum and ileum. There was influence ($p < 0.05$) of treatments in FW, DW, LEN, A, BMC, SI and BR of metatarsals, in DM and Ca^{2+} of the liver, on the pH of the cecum, enterobacteria in the jejunum and morphometry of the duodenum. Piglets fed CS (-30%) presented impaired bone development, as they had lower means of FW, DW, LEN, A, BMC, SI and BR in relation to piglets that received diets with L and CS. For organs, there was a higher concentration of Ca in the liver of animals fed CS and a higher percentage of DM in the liver of animals that received with CS (-30%). Piglets that received diets with CS had lower mean pH value in the cecum and higher mean ($p < 0.05$) in the enterobacteria count in the jejunum than piglets fed diets with L and CS (-30%). The use of CS as an alternative source of Ca^{2+} in diets of piglets in the nursery phase resembles the conventional source of Ca^{2+} , and does not cause harm to the analyzed parameters, since that the nutritional requirement of Ca^{2+} is met.

Keywords: bone density, calcium, limestone, *Lithothamnium calcareum*, nutritional requirement, weaned pig

3.1 Introdução

A formulação de dietas que atendam às exigências nutricionais de minerais é importante para promover o adequado crescimento dos suínos. A dieta referência dos suínos é baseada em grãos, com baixa quantidade de cálcio (Ca^{2+}) absorvível, sendo comum uma suplementação de Ca^{2+} inorgânico (GONZÁLEZ-VEGA; STEIN, 2014; GONZÁLEZ-VEGA; WALK; STEIN, 2015).

O Ca^{2+} é o mineral mais abundante no corpo e é encontrado principalmente nos ossos (96 - 99%), mas também nos fluidos e tecidos corporais. O Ca^{2+} é um mineral essencial a todos os processos fisiológicos, além de fornecer rigidez ao esqueleto e atuar no crescimento do animal (MACARI; FURLAN; GONZALES, 2002; SUTTLE, 2010; GONZÁLEZ-VEGA; STEIN, 2014).

As fontes de Ca^{2+} que são utilizadas na alimentação animal podem ser de origem inorgânica (rochas) ou orgânica, como as farinhas de ossos, de conchas e de algas marinhas calcíticas. Geralmente as dietas contêm fontes de Ca^{2+} oriundas de rochas, mais abundantes e de menor custo, como o calcário calcítico e o dolomítico, o carbonato, o sulfato e o fluoreto de cálcio, a fluorapatita e os fosfatos de rocha defluorizado (FIALHO et al., 1992). Essas fontes contêm diferentes concentrações de Ca^{2+} : o carbonato de cálcio apresenta 40% de Ca^{2+} , o calcário calcítico 38,5%, o calcário dolomítico 22,3%, o fosfato bicálcico 23,2%, o sulfato de cálcio 20% e o fosfato de rocha desfluorizado 29,5% (ARAÚJO et al., 2008).

A alga marinha *Lithothamnium calcareum* é uma fonte orgânica de Ca^{2+} que contém cerca de 32,5% de Ca^{2+} e 0,03% de fósforo. Estudos comparativos entre as fontes orgânicas e inorgânicas de Ca^{2+} demonstraram que a farinha de algas marinhas apresenta maior solubilidade em comparação ao cálcio comercial (inorgânico), devido as suas características físicas (estruturais). A solubilidade maior é uma vantagem, pois esse indicativo está relacionado à biodisponibilidade e absorção intestinal de Ca^{2+} nos animais (MELO et al., 2006).

O impacto ambiental causado pela extração de Ca^{2+} inorgânico e o maior custo para obtenção de algumas fontes de Ca^{2+} , como o fosfato bicálcico, têm despertado o interesse de pesquisadores para que investiguem outras fontes de Ca^{2+} , alternativas às fontes derivadas de rochas, e com maior biodisponibilidade, que são de grande interesse na suinocultura (ROUSSEL, 2000; MELO e MOURA; 2009).

Atualmente, as pesquisas voltadas à utilização de algas marinhas calcíticas como fonte orgânica alternativa de Ca^{2+} têm aumentado, pois esses organismos estão presentes em ambientes marinhos por todo o planeta, bem como são consideradas fontes renováveis de macro

e microminerais na presença de luz, e sua extração não causa impacto ambiental, pois são retiradas as estruturas mortas e calcificadas (DIAS, 2000; MELO e MOURA, 2009).

A *Lithothamnion calcareum* é uma alga marinha calcária vermelha, pertencente à família Corallinaceae. Devido às calcificações que se formam pela precipitação de carbonato de Ca^{2+} e magnésio nas paredes celulares, é uma ótima fonte de matéria-prima para a formulação de cosméticos, produtos dietéticos, implantes para cirurgia óssea, nutrição animal, fertilizantes e calcário para tratamento de solos, entre outros (CARLOS et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012).

Atualmente, a pecuária tem buscado novas alternativas às fontes de Ca^{2+} inorgânicas comerciais. Em vista disso, estudos voltados à aplicabilidade de Ca^{2+} presente na alga *L. calcareum* têm sido realizados com frangos de corte (CARLOS et al., 2011; PAIVA; WALK; McELROY, 2013); coelhos (EULER et al., 2010), equinos (JACOBS et al., 2020) e suínos (GONZÁLEZ-VEGA; WALK; STEIN, 2015; SCHLEGEL; GUTZWILLER, 2016).

Devido às características nutricionais das algas marinhas calcárias e a carência de informações mais detalhadas sobre sua utilização em dietas que atendam e não atendam às exigências nutricionais de cálcio dos suínos, este trabalho tem por objetivo a avaliação da inclusão dietética de Ca^{2+} proveniente de *L. calcareum*, em substituição ao Ca^{2+} oriundo de calcário calcítico, sobre os parâmetros de resistência óssea, a microbiologia e a morfometria intestinal de suínos nas fases pré-inicial I, pré-inicial II e inicial, dos 21 aos 70 dias de idade.

3.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido no setor de suinocultura da fazenda experimental Antônio Carlos dos Santos Pessoa, pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), localizada no município de Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. Os leitões foram manejados cuidadosamente para evitar desconfortos desnecessários e todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE, sob o protocolo nº 14/2016 - CEUA.

Um total de 128 leitões mestiços, machos inteiros de linhagem comercial (Landrace x Large White, Agrocercos♂ e DanBred♀), com peso corporal inicial médio de 5,50 (0,49) kg, foi utilizado em delineamento experimental de blocos casualizados completos com quatro tratamentos, repetidos duas vezes em quatro blocos, e quatro suínos por unidade experimental (UE), totalizando 32 baias (UE).

No início do período experimental, os leitões foram pesados, identificados com brincos numerados e alojados em uma sala de creche de alvenaria e telhas de cerâmica, constituída de baias suspensas com dimensão de 1,0 m de largura e 1,54 m de comprimento, com piso plástico de polietileno, providas de comedouros frontais tipo calha e bebedouros tipo chupeta na parte posterior, dispostas em duas fileiras, divididas por um corredor central, em que permaneceram até atingirem 24,39 (3,32) kg de peso corporal final médio.

A temperatura do ambiente e a umidade relativa do ar foram registradas utilizando-se um *datalogger* com mostrador digital da marca Vketech, modelo *temperature instruments*, o qual foi instalado no centro do galpão experimental. A temperatura média mínima registrada do ambiente interno foi de 22,00 (4,2) °C e a média máxima foi de 25,00 (5,1) °C. A ventilação do galpão de creche foi realizada com o auxílio de ventiladores, exaustores e janelas de vidro do tipo basculante. O aquecimento das baias experimentais foi controlado individualmente, com o uso de lâmpadas incandescentes infravermelha dotadas de campânula.

Os leitões receberam ração comercial de desmame, na quantidade de 0,5 kg por animal, fornecida durante o período de adaptação dos animais ao ambiente e manejo, entre a chegada e o início do experimento, que foi de aproximadamente de três dias.

As dietas experimentais, isoenergéticas e isoproteicas, foram formuladas à base de milho e farelo de soja para atenderem às exigências dos leitões para as fases pré-inicial I (5,50 a 9,42 kg), pré-inicial II (9,43 a 15,47 kg) e inicial (15,48 a 24,39 kg), seguindo as recomendações nutricionais propostas por Rostagno et al. (2017), exceto para o tratamento com redução de 30% da exigência de Ca^{2+} . Os tratamentos foram constituídos por quatro dietas experimentais: dieta formulada nas exigências de Ca^{2+} para leitões (0,825 e 0,85%, de acordo com a fase) e Ca^{2+} proveniente de calcário calcítico (CC); dieta formulada nas exigências de Ca^{2+} e Ca^{2+} proveniente de proporções equivalentes de CC e algas marinhas calcíticas (CC + AMC); dieta formulada com redução de 30% da exigência de Ca^{2+} para leitões (0,577 e 0,595%, de acordo com a fase) e Ca^{2+} proveniente de AMC (AMC (-30%)) e dieta formulada nas exigências de Ca^{2+} e Ca^{2+} proveniente de AMC (AMC) (Tabela 2).

Tabela 2. Composição centesimal e química das dietas para leitões na fase de creche alimentados com algas marinhas calcárias.

| Ingrediente | Tratamento | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|-------------------------------------|-------------|--------------|--------|---------------------------------------|-------------|--------------|--------|---------------------------------|-------------|--------------|--------|
| | Fase pré-inicial I (5,50 a 9,42 kg) | | | | Fase pré-inicial II (9,43 a 15,47 kg) | | | | Fase inicial (15,48 a 24,39 kg) | | | |
| | CC | CC + AMC | AMC - 30% | AMC | CC | CC + AMC | AMC - 30% | AMC | CC | CC + AMC | AMC - 30% | AMC |
| Milho 7,88% | 51,70 | 51,66 | 51,87 | 51,59 | 53,05 | 52,98 | 53,41 | 52,89 | 66,20 | 66,12 | 66,43 | 66,02 |
| Farelo soja 45,22% | 8,06 | 8,00 | 8,00 | 8,06 | 17,91 | 17,88 | 17,75 | 17,86 | 23,86 | 23,84 | 23,70 | 23,80 |
| Óleo de soja | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,65 | 0,69 | 0,55 | 0,73 | 0,14 | 0,18 | 0,09 | 0,23 |
| Farinha de peixe 54% | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 |
| Concentrado de soro 34% | 21,15 | 21,15 | 21,15 | 21,15 | 13,42 | 13,46 | 13,46 | 13,46 | - | - | - | - |
| Soja micronizada 38% | 8,00 | 8,00 | 8,00 | 8,00 | 6,00 | 6,00 | 6,00 | 6,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 |
| Calcário calcítico | 0,57 | 0,31 | - | - | 0,62 | 0,34 | - | - | 0,70 | 0,38 | - | - |
| Fosfato bicálcico | 1,21 | 1,21 | 0,86 | 1,21 | 1,08 | 1,08 | 0,77 | 1,08 | 1,20 | 1,21 | 0,86 | 1,21 |
| AMC | - | 0,31 | 0,80 | 0,68 | - | 0,31 | 0,80 | 0,74 | - | 0,38 | 0,99 | 0,83 |
| Sal comum | 0,42 | 0,42 | 0,42 | 0,42 | 0,33 | 0,33 | 0,33 | 0,33 | 0,39 | 0,39 | 0,39 | 0,39 |
| Açúcar | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | - | - | - | - |
| Premix mineral vitamínico | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| L-Lisina 54% | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,04 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,61 | 0,61 | 0,61 | 0,61 |
| DL-Metionina 99% | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,16 | 0,17 | 0,17 | 0,17 | 0,16 | 0,16 | 0,16 | 0,16 |
| L- Tryptofano 99% | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 |
| L-Treonina 98% | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,18 |
| Total (%) | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| Composição calculada (%) | | | | | | | | | | | | |
| Energia metab. (Mcal/kg) | 3,40 | 3,40 | 3,40 | 3,40 | 3,38 | 3,38 | 3,38 | 3,38 | 3,23 | 3,23 | 3,23 | 3,23 |
| Proteína bruta | 20,00 | 20,00 | 20,00 | 20,00 | 21,00 | 21,00 | 21,00 | 21,00 | 19,50 | 19,50 | 19,50 | 19,50 |
| Cálcio total | 0,85 | 0,85 | 0,595 | 0,85 | 0,825 | 0,825 | 0,577 | 0,825 | 0,825 | 0,825 | 0,577 | 0,825 |
| Fósforo disponível | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,45 | 0,45 | 0,45 | 0,45 | 0,41 | 0,41 | 0,41 | 0,41 |
| Lisina digestível | 1,45 | 1,45 | 1,45 | 1,45 | 1,33 | 1,33 | 1,33 | 1,33 | 1,21 | 1,21 | 1,21 | 1,21 |
| Treonina digestível | 0,91 | 0,91 | 0,91 | 0,91 | 0,84 | 0,84 | 0,84 | 0,84 | 0,76 | 0,76 | 0,76 | 0,76 |
| Metionina + cistina dig. | 0,81 | 0,81 | 0,81 | 0,81 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,68 | 0,68 | 0,68 | 0,68 |
| Tryptofano digestível | 0,26 | 0,26 | 0,26 | 0,26 | 0,23 | 0,23 | 0,23 | 0,23 | 0,21 | 0,21 | 0,21 | 0,21 |

CC: calcário calcítico; AMC: algas marinhas calcárias; Níveis mínimos de garantia por kg de premix (mg/kg): ácido pantotênico 2.249,99; ácido fólico 103,12; ferro 6.733,40; manganês 1.866,70; zinco 1.000,00; selênio 43,75; iodo 37,50; vitamina B₁ 224,96; vitamina B₂ 537,50; niacina 4.687,50; vitamina B₆ 437,50; biotina 16,88; vitamina K₃ 375,00; etoxiquin 206,00; (g/kg): lisina 123,76; metionina 110,25; treonina 46,64; cobre 22,07; clorohidroxiquinolina 15,00; (UI/kg): vitamina A 1.437.500,00; vitamina D₃ 262.500,00; vitamina E 4.250,00; (mcg/kg): vitamina B₁₂ 2.537,50.

Durante o período experimental de 84 dias, a água e as dietas experimentais foram fornecidas *ad libitum*. As dietas foram fornecidas aos animais numa frequência de seis porções no decorrer do dia.

Ao final do período experimental, oito animais de cada tratamento foram abatidos após jejum alimentar de seis horas, seguindo método de abate humanizado (eletroanestesia seguida de exsanguinação (BRASIL, 2008) para a coleta de dados e amostras biológicas para as análises de pH do conteúdo do trato digestório, microbiologia intestinal, morfometria do epitélio intestinal, características físico-químicas dos órgãos (coração, fígado e rim) e parâmetros ósseos (3º e 4º metatarsos). O animal abatido foi o que apresentou o peso corporal mais próximo da média do tratamento. O jejum foi realizado para diminuir a presença de resíduos nos órgãos, facilitar o manuseio e evitar danos aos tecidos que foram utilizados para análises morfométricas.

Logo após o abate, foi mensurado o pH do conteúdo do estômago (PHE), jejuno (PHJ), íleo (PHI), ceco (PHCE) e cólon (PHCO) com o auxílio de um pHmetro digital (Hanna Instruments Inc., Rhodes Island, USA, modelo HI 99163), por meio da inserção de um eletrodo unipolar (MANZANILLA et al., 2004). Ligaduras foram realizadas nas extremidades desses órgãos para que não houvesse mistura dos conteúdos e comprometimento das leituras de pH. O acesso ao conteúdo estomacal foi feito a partir de uma incisão na região esofágica, a aproximadamente dois centímetros do esôfago, e o pH foi mensurado após homogeneização do quimo. No intestino, após a homogeneização do quilo, a mensuração do pH foi feita na parte mediana do jejuno, a 150 cm da junção ileocecal, no segmento ileal (a 15 cm da junção ileocecal) e nas partes caudais do ceco e do cólon (GUO et al., 2001).

Após mensuração do pH, os órgãos digestórios (estômago, fígado e vesícula biliar, intestino delgado vazio e pâncreas, ceco e cólon vazios) e não digestórios (baço, coração e rins) foram retirados, lavados com água destilada e pesados em balança eletrônica digital, modelo 9094, marca Toledo. Com os dados absolutos, foram calculados os pesos relativos dos órgãos, considerando o peso corporal dos animais no momento do abate.

O coração, fígado e rins foram pré-secos em estufa de ventilação forçada, modelo SF-325 NM, marca Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 55 °C durante 72 horas, moídos em moinho tipo bola (modelo Star FT-60; marca Fortinox, Piracicaba, SP, Brasil) com câmara fechada e armazenados em frascos previamente identificados para posteriores análises de matéria seca (MS; %) do coração (MSCOR), fígado (MSFIG) e rins (MSRIM) em estufa de ventilação forçada (modelo SF-325 NM; marca Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 105 °C, e matéria mineral (MM; %) do coração (MMCOR), fígado (MMFIG) e rins (MMRIM), com a utilização de mufla (modelo F2 DM monofásico; marca Fornitec, São Paulo, SP, Brasil).

A concentração de cálcio (g/kg) do coração (CaCOR), fígado (CaFIG) e rins (CaRIM) foi realizada pela abertura da amostra via úmida, utilizando solução nitroperclórica (3:1) e submetidos à leitura de espectrofotometria de absorção atômica por chamas (modelo GBC 932 AA dual beam; marca Tecnal, Dandenong, VIC, Australia), no Laboratório de Química Agrícola e Ambiental da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). As análises de matéria seca, matéria mineral e concentração de cálcio das dietas e órgãos foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por Silva e Queiroz (2006).

Após o abate, foram coletadas amostras dos conteúdos do jejuno, íleo, ceco e cólon, que foram destinadas às contagens de populações de enterobactérias (ágar EMB levine, Kasvi) e bactérias ácido lácticas (ágar MRS, Acumedia). As amostras foram acondicionadas em *ependorfs* estéreis de 1,5 mL, identificadas, armazenadas em caixa térmica e transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Microbiologia da UNIOESTE.

Posteriormente, um grama de amostra dos conteúdos do trato digestório foi transferido para tubos estéreis identificados, sendo submetidas à diluição seriada em solução fisiológica a 0,9%. A diluição 10^{-1} (1 g de amostra com 9 mL de solução fisiológica) foi homogeneizada em vórtex (modelo AP 56; marca Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) por 30 segundos. As demais diluições, até 10^{-6} , foram homogeneizadas em vórtex (modelo e marca mencionados) por 10 segundos. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, uma alíquota de 100 μ L de cada diluição foi semeada por espalhamento na superfície de meios de cultura adequados ao seu crescimento (WEEDMAN et al., 2011), os quais foram cultivados em placa de Petri de poliestireno estéril. Para detectar as populações, as placas contendo o inóculo foram incubadas em estufas a 37 °C, durante a noite, sob aerobiose por 24 horas para as enterobactérias e em condição de anaerobiose por 48 horas, para as bactérias ácido lácticas.

Após as mensurações, os dados de contagens microbiológicas foram transformados para uma escala logarítmica (base dez), para avaliação no jejuno (J), íleo (I), ceco (CE) e cólon (CO) do logaritmo total (LT) de bactérias (LTJ, LTI, LTCE e LTKO), do log. de enterobactérias (E) (LEJ, LEI, LECE e LECO) e do log. de bactérias ácido lácticas (AL) (LALJ, LALI, LALCE e LALCO).

Após a retirada dos órgãos, coletaram-se segmentos de cerca de três cm de comprimento do duodeno, íleo e jejuno, para análises histológicas das estruturas do epitélio intestinal. No duodeno, os segmentos foram retirados a 15 cm da válvula pilórica. No jejuno e no íleo, foram extraídos a 15 e a 15 cm da junção ileocecal, respectivamente (GUO et al., 2001). Em seguida, os seguimentos foram lavados em solução de cloreto de sódio a 0,9%, acondicionados por 48 horas, sob refrigeração, em embalagens estéreis com solução de formol tamponado a 10%

(formol comercial a 37,5%, água destilada, fosfato de sódio mono e dibásico) e colocados em solução de álcool a 70% e transportados ao Laboratório de Histologia da UNIOESTE.

A montagem das lâminas histológicas foi procedida com a inclusão das amostras (seguintes do trato digestório) em blocos de parafina, sendo microtomizadas em micrótomo rotativo semiautomatizado (Leica RM2245, Leica Biosystems, São Paulo, Brasil) e submetidas à coloração por hematoxilina e eosina para descrição histológica (GAO; ZHAO; GREGERSEN, 2000).

As medições de altura de vilos (AV) e profundidade de cripta (PC) foram realizadas por meio de imagens geradas por um microscópio digital de luz (DM2500 M, Leica Microsystems Ltda., São Paulo, SP, Brasil), equipado com uma câmera digital (DFC295, Leica Microsystems Ltda., São Paulo, SP, Brasil). A razão entre AV e PC foi calculada (VC; μm) no duodeno (VCD), jejuno (VCJ) e íleo (VCI), e as imagens foram analisadas pelo programa Leica Application Suite - LAS V.4.1 com uma ampliação de 200x. Para cada amostra, foram geradas 15 medidas de vilos e de suas respectivas criptas. As mensurações dos vilos foram realizadas a partir da extremidade mais próxima do lúmen intestinal até o início da cripta. As medições das criptas foram feitas a partir do final das vilosidades até o final da camada de células da cripta.

Os membros posteriores coletados durante o abate foram manipulados inicialmente com o auxílio de um bisturi e tesoura cirúrgica para remover a musculatura, cartilagem e gorduras da superfície óssea e retirar o terceiro e o quarto metatarsos sem afetar o tecido ósseo. A seguir, os ossos foram imersos em água fervente por cinco minutos. Após, os ossos limpos e frescos foram transportados ao Laboratório de Nutrição Animal (LANA) da UNIOESTE para a pesagem em balança analítica e obtenção do peso fresco (PFR; g), e para a mensuração do comprimento (CO; cm), com o auxílio de um paquímetro digital (marca Lorben, com faixa de medição de 0,01 a 150 mm), e cálculo do índice de Seedor (IS; mg/mm), obtido a partir da razão entre o peso fresco e o comprimento do osso (SEEDOR; QUARTUCCIO; THOMPSON, 1991).

No terceiro e quarto metatarsos, a matéria seca (MS; %) foi mensurada em estufa a 105 °C, para obtenção do peso seco (PS; g). Posteriormente, o material foi calcinado em mufla a 600 °C, para obtenção da matéria mineral (MM; %). A concentração de cálcio (Ca^{2+} ; g/kg) dos ossos foi realizada pela abertura da amostra via úmida utilizando solução nitroperclórica (3:1), sendo a solução mineral obtida submetida a leitura de espectrofotometria de absorção atômica por chama, no Laboratório de Química Agrícola e Ambiental da UNIOESTE.

A análise de densitometria dos ossos metatarsos foi realizada em equipamento Hologic Discovery Wi[®], previamente calibrado com o uso de um phantom. Para realização do escâner, os ossos foram posicionados em vista dorsoventral e por cerca de três minutos foi realizada a

leitura com passagem de dois tipos de raios X sobre a superfície óssea, com os resultados fornecidos pelo equipamento sobre a composição mineral óssea (CMO; g), área óssea (A; cm²) e densidade mineral óssea (DMO; g/cm²).

Para avaliação da resistência óssea (RO), os ossos coletados foram previamente descongelados sem hidratação e mantidos refrigerados (4 °C). A seguir, foram posicionados com vista dorsoventral e apoiados na região das epífises, de modo que a porção média da diáfise permanecesse livre de apoios, para receber a força que foi aplicada na região central da diáfise e no mesmo ponto em todos os ossos. Em seguida, procedeu-se um ensaio de flexão de uma força mecânica em três pontos, com velocidade de 5 mm/min, pré-carga de 500 N com tempo de acomodação de 30 s e uma distância entre os pontos de 60 mm, com o auxílio de uma máquina universal de ensaios mecânicos (marca EMIC, modelo DL 10.000, com célula carga-EMIC de 200 kgf). Os dados coletados por computador diretamente acoplado à máquina foram expressos em Newton (N) e depois transformados para quilograma-força (kgf) (ASABE, 2017).

A normalidade dos erros experimentais e a homogeneidade de variâncias residuais entre os tratamentos para as características foram avaliadas previamente utilizando-se os testes de Shapiro-Wilk e de Levene do SAS® *University Edition* software (SAS, 2020), respectivamente. Em seguida, foi verificada, por meio de análise de variância (ANOVA), a não influência ($p > 0,05$) dos tratamentos sobre o peso corporal inicial do animal amostrado na baía (PCIA), para a indicação do PCIA como covariável e correção dos valores de médias observadas das características (BANZATTO; KRONKA, 2013).

Foi procedida a análise de covariância (ANCOVA), para verificação dos efeitos das classes de dieta e de PCIA sobre as características. Quando detectado o efeito de PCIA ($p < 0,05$), o modelo estatístico utilizado foi expresso por $Y_{ijk} = m + T_i + B_j + \beta(X_{ijk} - \bar{X}_{...}) + \varepsilon_{ijk}$, em que: Y_{ijk} = observação média da variável dependente em cada parcela, medida na i -ésima classe de dieta, no j -ésimo bloco e na k -ésima repetição; m = efeito da média geral; T_i = efeito das classes de tratamentos, para $i = (1, 2, 3 \text{ e } 4)$; B_j = efeito dos blocos, para $j = (1, 2, 3 \text{ e } 4)$; β = coeficiente de regressão de Y sobre X (PCIA); X_{ijk} = observação de PCIA em cada parcela, medida na i -ésima classe de dieta, no j -ésimo bloco e na k -ésima repetição; $\bar{X}_{...}$ = média geral para a covariável X e ε_{ijk} = erro aleatório da parcela associado à cada observação Y_{ijk} .

Posteriormente, para as características em que não foi detectado o efeito ($p > 0,05$) de PCIA, foi procedida a ANOVA para verificação dos efeitos dos tratamentos, adotando-se o modelo estatístico descrito anteriormente, sem a utilização de covariável.

Para as características em que houve efeito ($p < 0,05$) de PCIA, foi realizado o teste de homogeneidade dos coeficientes de regressão linear de 1º grau (betas), um dos pré-requisitos para o uso da ANCOVA, em que se verificaram se as inclinações das retas de regressão para os quatro tratamentos foram equivalentes. Esse procedimento foi realizado ajustando-se o modelo de ANCOVA descrito anteriormente e adicionando-se o termo de interação entre a covariável PCIA e os tratamentos ($PCIA * T_i$). A homogeneidade dos quatro betas foi detectada quando não se rejeitou a hipótese de nulidade $H_0: \beta_{T1} = \beta_{T2} = \beta_{T3} = \beta_{T4}$ ao se aplicar o teste F.

Para características em que houve heterogeneidade dos betas, foram estimados os betas dos valores de Y em função dos valores de X (PCIA), considerando as repetições de cada tratamento, para se estabelecer contrastes ortogonais entre grupos de tratamentos e entre tratamentos, visando comparar inclinações entre os grupos pré-estabelecidos. A detecção de significância ($p \leq 0,05$) para um contraste, ao se aplicar o teste t, indicou a necessidade de se modelar diferentes coeficientes de regressão para os respectivos grupos de tratamentos.

A modelagem de diferentes coeficientes de regressão para tratamentos distintos foi procedida utilizando-se a variável auxiliar binária “*dummy* de tratamento (DT)”, cuja codificação foi associada aos grupos de tratamentos homogêneos. O valor zero para DT representou a codificação para um grupo de tratamentos e o valor um, para o outro grupo de tratamentos. A estimação dos betas para cada grupo homogêneo e a verificação da significância dos tratamentos sobre tais características foram realizadas ajustando-se um modelo de ANCOVA incluindo como fatores os efeitos da média geral, blocos, tratamentos, PCIA e interação entre PCIA e DT ($PCIA * DT$). A significância ($p \leq 0,05$) para a interação $PCIA * DT$ indicou a adequabilidade do modelo de ANCOVA com betas heterogêneos e o aumento da precisão experimental, com menores valores de coeficiente de variação em relação à ANOVA e ANCOVA com betas homogêneos.

Quando constatado o efeito dos tratamentos ($p < 0,05$) na ANCOVA ou ANOVA, suas médias de quadrados mínimos (*lsmeans*) foram comparadas por meio do teste t.

O nível de 5% de significância foi adotado em todos os testes de hipóteses. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o SAS® *University Edition* software (SAS, 2020).

3.3 Resultados e discussão

Os erros experimentais das características modeladas pela ANOVA e ANCOVA apresentaram distribuição normal de probabilidades ($p > 0,05$) e homogeneidade de variâncias

dos tratamentos ($p > 0,05$). A normalidade dos erros experimentais e a homogeneidade de variâncias dos tratamentos são pré-requisitos para utilização das análises de variância e de covariância (BANZATTO; KRONKA, 2013), o que permite a utilização correta de estatísticas tabeladas dos testes de hipóteses e a possibilidade para se realizar inferências mais precisas, por meio de intervalos de confiança. Os resultados mostraram a viabilidade para se utilizar a ANOVA e ANCOVA para a verificação dos efeitos dos tratamentos.

Não houve efeito ($p = 0,4371$) dos tratamentos sobre o peso corporal inicial do animal amostrado na baía (PCIA). Esse resultado indicou que houve independência entre o PCIA e os tratamentos, ou seja, o PCIA pode ser utilizado como covariável para correção das características. Os valores de média e desvio-padrão do PCIA de acordo com os tratamentos foram: 5,27 e 0,42 (CC); 5,40 e 0,68 (CC + AMC); 5,68 e 0,50 (AMC (-30%)) e 5,32 e 0,51 (AMC), respectivamente.

Não houve efeito ($p > 0,05$) da covariável PCIA sobre a MSO, MMO, CaO, DMO, MMCOR, MMFIG, MSRIM, MMRIM, CaCOR, CaFIG, CaRIM, PHE, PHJ, PHI, PHCE, PHCO, VCD, VCI, no logaritmo da contagem total de bactérias no jejuno (LTJ), íleo (LTI) e ceco (LTCE), e no logaritmo da contagem de bactérias ácido lácticas do jejuno (LALJ), íleo (LALI) e cólon (LALCO). Para essas características, foi procedida uma análise de variância (ANOVA) para verificação dos efeitos das classes de ração, não havendo a correção dos valores médios observados das características considerando os valores da covariável PCIA.

De outro modo, ao se proceder a análise de covariância (ANCOVA) observou-se efeito ($p < 0,05$) de PCIA no PFR, PS, CO, A, CMO, IS, RON, ROK, MSCOR, MSFIG, VCJ, LTCO, LALCE, LEJ, LEI, LECE e LEC. Para essas características, os efeitos dos tratamentos foram verificados na ANCOVA e as médias observadas foram corrigidas pelos valores de PCIA.

Os coeficientes de regressão (coeficientes angulares) homogêneos, estimados na ANCOVA a partir dos valores das variáveis dependentes sobre os valores da covariável PCIA, foram de 1,3086 (PFR), 0,8972 (PS), 5,4232 (CO), 0,4379 (A), -99,1835 (RON), -10,1126 (ROK), 0,3431 (VCJ), 0,0221 (LTCO), 0,0551 (LALCE), 0,0230 (LEJ), 0,0219 (LEI), 0,0466 (LECE) e 0,0404 (LENTCO).

Os valores dos coeficientes de regressão heterogêneos, obtidos de acordo com o tratamento ou grupo de tratamentos, foram de 0,2581 (CC) e 0,0755 (CC + AMC; AMC (-30%) e AMC) para CMO; -3,9870 (CC) e -1,2255 (CC + AMC; AMC (-30%) e AMC) para MSCOR; -1,1626 (CC + AMC) e 25,3866 (CC, AMC (-30%) e AMC) para IS; e -0,8080 (CC + AMC) e -4,1112 (CC, AMC (-30%) e AMC) para MSFIG.

Não foi obtido efeito dos tratamentos sobre a matéria seca (MS; $p = 0,7451$), matéria mineral (MM; $p = 0,1439$) e concentração de cálcio (Ca^{2+} ; $p = 0,2005$) no terceiro e quarto metatarsos de leitões (Tabela 3). Os resultados mostraram que os tratamentos AMC e CC foram similarmente eficientes em manter a deposição mineral óssea, possivelmente pela AMC ser de fonte orgânica e apresentar maior concentração de minerais como ferro, zinco, cobre, cobalto quando comparada ao calcário calcítico (AVELAR et al., 2009), o que pode explicar o fato de os leitões alimentados com AMC (-30%) manterem valores relevantes sobre as variáveis MM e concentração de Ca^{2+} .

Tabela 3. *Lsmeans* de características de composição química, peso fresco, peso seco e comprimento dos metatarsos de leitões de acordo com os tratamentos

| Característica | Tratamento ¹ | | | | CV (%) ² | p ³ |
|-----------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------|
| | CC | CC + AMC | AMC (-30%) | AMC | | |
| Matéria seca osso (%) | 76,28 | 74,37 | 73,38 | 71,01 | 13,10 | 0,7451 |
| Matéria mineral (%) | 46,51 | 50,89 | 52,10 | 48,29 | 10,27 | 0,1439 |
| Cálcio (g/kg) | 164,22 | 167,23 | 169,51 | 157,86 | 6,73 | 0,2005 |
| Peso Fresco (g) | 5,84 ^a | 5,80 ^a | 3,97 ^b | 5,36 ^a | 21,02 | 0,0120 |
| Peso Seco (g) | 4,71 ^a | 4,68 ^a | 3,16 ^b | 4,09 ^a | 18,42 | 0,0023 |
| Comprimento (mm) | 54,73 ^a | 52,70 ^a | 45,24 ^b | 50,81 ^a | 9,09 | 0,0048 |

¹*Lsmeans* seguidas por letras distintas na linha diferem entre si, pelo teste t, em nível de 5% de probabilidade; CC: calcário calcítico; AMC: algas marinhas calcíticas; ²CV: coeficiente de variação; ³p: probabilidade de significância.

Além de exercerem função na estrutura e sustentação do corpo, os ossos são a maior reserva de cálcio do organismo, garantindo a manutenção da homeostase do cálcio nos ossos e meio extracelular. Santana et al. (2017) utilizaram diferentes fontes de cálcio na alimentação de leitões e encontraram valores semelhantes aos do presente trabalho, com médias de 146,73 g/kg para concentração de Ca^{2+} nos metatarsos de suínos e 46,10% de matéria mineral. Saraiva et al. (2009) utilizaram nível de 0,68% de Ca^{2+} , com redução da exigência nutricional de cálcio do animal, e obtiveram valores de 50,37% para matéria seca e de 163,4 g/kg para concentração de Ca^{2+} nos metatarsos, valores semelhantes aos encontrados no presente estudo.

No entanto, observou-se efeito dos tratamentos no peso fresco (PFR; $p = 0,0120$), peso seco (PS; $p = 0,0023$) e comprimento dos metatarsos ($p = 0,0048$) de leitões (Tabela 3). O peso e o comprimento ósseo se devem à quantidade de mineral depositada, de forma que leitões alimentados com AMC (-30%) apresentaram menores PFR (3,97 g), PS (3,16 g) e CO (45,24 mm) dos metatarsos do que leitões alimentados com as demais dietas, mostrando que a redução do fornecimento prejudicou a deposição da quantidade mineral necessária para o bom desenvolvimento ósseo dos animais (Tabela 3).

Na literatura, há escassez de resultados referentes a parâmetros ósseos para suínos em fase inicial; entretanto, Cruz (2013) obteve 8,31 g para o PFR do metatarso, e Santana et al. (2017) obtiveram valor semelhante à literatura citada (8,98 g).

Diferente do resultado encontrado neste estudo, Crenshaw (2003) não encontrou diferença no comprimento ósseo de suínos que receberam dietas restritivas, que variaram de 72 a 93% de ingestão *ad libitum*, com incrementos de 7%, e àqueles alimentados sem dieta restritiva. O autor explicou que apesar da restrição, as rações eram ricas em lisina, que promove a absorção de cálcio, refletindo na composição óssea.

Não foi apresentado efeito dos tratamentos na DMO ($p = 0,2423$), mas houve efeito dos tratamentos sobre a área ($p = 0,0013$) e CMO ($p = 0,0114$). Leitões que se alimentaram com dietas contendo AMC (-30%) obtiveram menores ($p < 0,05$) médias de área e CMO do que leitões que receberam dietas contendo CC e CC + AMC (Tabela 4), possivelmente pela menor ingestão de Ca^{2+} , comprometendo o crescimento e o desenvolvimento normal do esqueleto (ANDREOLI et al., 2001).

Tabela 4. *Lsmeans* de características de densitometria, densidade e resistência dos metatarsos de leitões de acordo com os tratamentos

| Característica ¹ | Tratamento ² | | | | CV (%) ³ | p ⁴ |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|
| | CC | CC + AMC | AMC (-30%) | AMC | | |
| Área (cm ²) | 3,30 ^a | 2,87 ^b | 2,47 ^c | 2,92 ^b | 11,72 | 0,0013 |
| CMO (g) | 0,52 ^a | 0,46 ^{ab} | 0,39 ^c | 0,44 ^{bc} | 13,61 | 0,0114 |
| DMO (g/cm ²) | 0,14 | 0,16 | 0,15 | 0,15 | 8,76 | 0,2423 |
| IS (mg/mm) | 107,77 ^a | 109,53 ^a | 83,90 ^b | 106,46 ^a | 15,38 | 0,0142 |
| RO (N) | 401,68 ^b | 587,90 ^a | 370,16 ^b | 520,79 ^a | 15,78 | <0,0001 |
| RO (kgf) | 40,96 ^b | 59,95 ^a | 37,75 ^b | 53,11 ^a | 15,79 | <0,0001 |

¹CMO: conteúdo mineral ósseo; DMO: densidade mineral óssea; IS: índice de Seedor; RO: resistência óssea expressa em Newton e em kgf; Valores médios de CMO e IS corrigidos para o valor médio da covariável (peso inicial do animal na baía = 5,42 kg); ²*Lsmeans* seguidas por letras distintas na linha diferem entre si, pelo teste t, em nível de 5% de probabilidade; CC: calcário calcítico; AMC: algas marinhas calcíticas; ³CV: coeficiente de variação; ⁴p: probabilidade de significância.

A densidade mineral óssea (DMO) é resultante de um processo dinâmico, a remodelação óssea, sendo a manutenção importante para a prevenção de desconformidades ósseas (CADORE; BRENTANO; KRUEL, 2005). As modificações no CMO normalmente geram modificações passíveis de mensuração na DMO. Apesar disso, os valores de DMO não apresentaram diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Esse resultado pode ser explicado, tendo em vista que o DMO não depende apenas do CMO, mas também de outros processos fisiológicos relacionados a células ósseas, como proliferação de osteoblastos, estimulados por

fator químico liberado pelos osteoclastos que funcionam como sensores mecânicos e respondem ao estresse detectado, promovendo um incremento ósseo (ANDREOLI et al., 2001).

O cálcio dietético é um dos fatores de maior relevância para a saúde óssea, o que torna importante a caracterização do efeito da sua alteração dietética sobre o esqueleto e fatores que influenciam na sua absorção e utilização, conseqüentemente na composição mineral óssea, refletindo na saúde óssea animal (BUZINARO; ALMEIDA; MAZETO, 2006).

Houve efeito dos tratamentos sobre o IS ($p = 0,0142$), RON ($p < 0,0001$) e ROK ($p < 0,0001$). Para o índice de Seedor (IS), foram obtidos os valores médios de 107,77, 109,53 e 83,90 e 106,46 mg/mm para os leitões que receberam os tratamentos CC, CC + AMC, AMC (-30%) e AMC, respectivamente. Houve comprometimento da resistência óssea para os leitões alimentados com CC e AMC (-30%) em relação aos demais tratamentos (Tabela 4). Esse resultado está relacionado à baixa concentração de Ca^{2+} absorvível presente na dieta (GONZÁLEZ-VEGA; STEIN, 2014).

O teor de cinza óssea está diretamente relacionado à mineralização, porém a relação com a integridade estrutural geralmente falha, uma vez que a integridade estrutural envolve a aplicação de testes mecânicos no osso. Os resultados de resistência óssea e IS para leitões que receberam o tratamento com AMC (-30%) corroboram a literatura, uma vez que existe um potencial aparecimento de prejuízo ósseo em virtude de subnutrição, além de que, os resultados obtidos em uma amostra de osso, refletem a mesma característica para todo o esqueleto (CRENSHAW; RORTVEDT; HASSEN, 2011).

De acordo com Suttle (2010), os suínos são animais de crescimento acelerado e o manejo nutricional deficiente dos minerais na dieta pode ocasionar problemas de resistência óssea, uma vez que o esqueleto é o maior reservatório de cálcio e depende desse mineral em quantidades adequadas para manter sua integridade. Dessa forma, o metatarso de suínos é um osso de crescimento rápido, possibilitando o seu uso para medir a resistência óssea por meio de testes mecânicos, capazes de refletir a deficiência no crescimento e formação óssea em caso de deficiência na deposição de minerais como o cálcio.

Santana et al. (2017) encontraram valores de resistência óssea superiores (545,28 N) para suínos em fase inicial que receberam dietas à base de calcário calcítico (CC). A baixa resistência óssea apresentada pelos leitões alimentados com AMC (-30%) corresponde à concentração mineral óssea que, prejudicada pela baixa ingestão de cálcio dietético, reflete modificações no tamanho, forma e células da matriz que possibilitam alterações negativas na resistência óssea (BARCELLOS et al., 2007).

Esses resultados corroboram os de Rufino et al. (2017), que relatou menor resistência óssea para metacarpos de suínos com *déficit* de ingestão de cálcio nas fases pré-inicial e inicial em comparação com suínos que consumiram cálcio atendendo à exigência nutricional.

Não foi obtido efeito dos tratamentos sobre a MSCOR ($p = 0,1080$), MMCOR ($p = 0,6013$), CaCOR ($p = 0,7324$), MMFIG ($p = 0,5352$), MSRIM ($p = 0,7428$), MMRIM ($p = 0,2090$) e CaRIM ($p = 0,7539$) dos leitões. No entanto, foi apresentado efeito dos tratamentos sobre a MSFIG ($p = 0,0450$) e no CaFIG ($p = 0,0433$) dos leitões (Tabela 5).

Tabela 5. *Lsmeans* de matéria seca, matéria mineral e cálcio do coração, fígado e rins de leitões de acordo com os tratamentos

| Característica ¹ | Tratamento ² | | | | CV (%) ³ | p ⁴ |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------|
| | CC | CC + AMC | AMC (-30%) | AMC | | |
| MSCOR | 20,60 | 21,51 | 21,30 | 21,29 | 4,80 | 0,1080 |
| MMCOR | 5,56 | 5,23 | 5,39 | 5,13 | 12,37 | 0,6013 |
| CaCOR | 2,03 | 2,03 | 1,98 | 2,07 | 7,93 | 0,7324 |
| MSFIG | 25,93 ^b | 26,22 ^{ab} | 27,24 ^a | 26,80 ^{ab} | 6,15 | 0,0450 |
| MMFIG | 5,84 | 5,66 | 6,53 | 6,67 | 26,65 | 0,5352 |
| CaFIG | 1,98 ^b | 2,02 ^b | 2,00 ^b | 2,26 ^a | 10,20 | 0,0433 |
| MSRIM | 20,68 | 20,33 | 20,04 | 19,93 | 7,31 | 0,7428 |
| MMRIM | 7,90 | 7,56 | 8,39 | 8,32 | 10,65 | 0,2090 |
| CaRIM | 2,14 | 2,18 | 2,13 | 2,21 | 8,08 | 0,7539 |

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; Ca: cálcio; COR: coração; FIG: fígado; RIM: rins; Valores médios de MSCOR e MSFIG corrigidos para o valor médio da covariável (peso inicial do animal = 5,42 kg); ²*Lsmeans* seguidas por letras distintas na linha diferem entre si, pelo teste t, em nível de 5% de probabilidade; CC: calcário calcítico; AMC: algas marinhas calcíticas; ³CV: coeficiente de variação; ⁴p: probabilidade de significância.

Com resultados semelhantes, Santana et al. (2017) obtiveram valores maiores quanto à porcentagem de matéria mineral no fígado ao utilizarem farinhas orgânicas como fontes de Ca²⁺ quando comparadas às fontes inorgânicas. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de alguns minerais terem especificidade de armazenamento no fígado e rins, como o zinco, ferro e cobalto. Apesar disso, a porcentagem de matéria mineral encontrada nos órgãos do trabalho supracitado foi significativa apenas para os rins. Isso porque há a possibilidade de os minerais absorvidos não terem sido utilizados pelo metabolismo, aumentando a sua concentração nos rins e contribuindo para o aumento significativo no teor de matéria mineral.

A concentração de Ca²⁺ nos tecidos é variável, sendo retido principalmente no retículo endoplasmático e mitocôndrias. Além da composição dos ossos, 0,6% do Ca²⁺ encontra-se nos tecidos moles (BOURDEAU et al., 1994). Em ordem sequencial, o tecido ósseo e o coração apresentaram uma maior concentração de Ca²⁺ do que outros tecidos (MOREIRA et al., 2004).

Os resultados obtidos não são suficientes para explicar essa diferença, uma vez que há uma escassez de dados referentes à matéria seca e matéria mineral para tecidos suínos e na literatura não há indícios que esclareçam satisfatoriamente o fato de os animais, com uma ingestão de Ca^{2+} abaixo da exigência, apresentarem resultados superiores de matéria seca no fígado em relação aos leitões alimentados com CC, que ingeriram Ca^{2+} na exigência.

Não foi obtido efeito dos tratamentos sobre o pH do estômago ($p = 0,6403$), jejuno ($p = 0,2008$), íleo ($p = 0,7171$) e cólon ($p = 0,2191$). Todavia, verificou-se efeito dos tratamentos sobre o ceco ($p = 0,0126$) dos leitões (Tabela 6).

Tabela 6. *Lsmeans* de pH do estômago, jejuno, íleo, ceco e cólon, e do logaritmo da contagem de bactérias ácido lácticas, de enterobactérias e do total de bactérias no intestino de leitões de acordo com os tratamentos

| Característica | Tratamento ¹ | | | | CV (%) ² | p ³ |
|---|-------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|------------------------|----------------|
| | CC | CC + AMC | AMC (-30%) | AMC | | |
| pH | | | | | | |
| Estômago | 3,95 | 4,08 | 3,59 | 3,80 | 20,26 | 0,6403 |
| Jejuno | 5,97 | 6,24 | 6,36 | 5,87 | 8,11 | 0,2008 |
| Íleo | 6,08 | 6,07 | 5,81 | 5,76 | 12,05 | 0,7171 |
| Ceco | 5,59 ^a | 5,39 ^{bc} | 5,47 ^{ab} | 5,26 ^c | 3,49 | 0,0126 |
| Cólon | 5,85 | 6,13 | 5,97 | 5,77 | 6,05 | 0,2191 |
| Microbiologia intestinal (\log_{10} UFC/g) | | | | | | |
| Bactérias ácido lácticas | | | | | | |
| Jejuno | 4,796 | 4,792 | 4,783 | 4,792 | 0,763 | 0,4867 |
| Íleo | 4,807 | 4,812 | 4,788 | 4,812 | 0,481 | 0,2501 |
| Ceco | 4,816 | 4,819 | 4,822 | 4,822 | 0,320 | 0,2521 |
| Cólon | 4,827 | 4,82 | 4,814 | 4,819 | 0,347 | 0,4242 |
| Enterobactérias | | | | | | |
| Jejuno | 4,797 ^b | 4,813 ^{ab} | 4,796 ^b | 4,824 ^a | 0,389 | 0,0204 |
| Íleo | 4,800 | 4,808 | 4,806 | 4,82 | 0,293 | 0,0635 |
| Ceco | 4,799 | 4,786 | 4,787 | 4,763 | 0,643 | 0,1499 |
| Cólon | 4,809 | 4,795 | 4,796 | 4,789 | 0,534 | 0,4758 |
| Contagem bacteriana total | | | | | | |
| Jejuno | 4,809 | 4,806 | 4,803 | 4,795 | 0,388 | 0,9025 |
| Íleo | 4,817 | 4,816 | 4,822 | 4,794 | 0,603 | 0,1411 |
| Ceco | 4,784 | 4,776 | 4,804 | 4,791 | 0,550 | 0,8405 |
| Cólon | 4,802 | 4,801 | 4,799 | 4,815 | 0,420 | 0,5318 |

¹*Lsmeans* seguidas por letras distintas na linha diferem entre si, pelo teste t, em nível de 5% de probabilidade; CC: calcário calcítico; AMC: algas marinhas calcíticas; ²CV: coeficiente de variação; ³p: probabilidade de significância.

Os valores de pH encontrados neste trabalho corroboram os relatados por Rufino et al. (2017), que não encontraram diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos no pH das porções intestinais de leitões que consumiram dietas que atendiam às exigências de cálcio e fósforo e para dietas com redução desses minerais.

Observou-se efeito ($p = 0,0204$) dos tratamentos sobre o logaritmo da contagem de enterobactérias no jejuno (LEJ). Leitões alimentados com AMC apresentaram maior ($p < 0,05$) média de LEJ do que as médias alcançadas por leitões que receberam ração com AMC (-30%) e com ração contendo CC (Tabela 6).

O pH reduzido é importante porque inibe o crescimento de bactérias patogênicas como a *E. coli* e *Salmonella sp.*, incapazes de prejudicar o trato gastrintestinal, pois sua curva de crescimento varia de 4,1 a 9,2 (BLANCHARD, 2000). Porém, o pH do conteúdo do jejuno encontrado nesta pesquisa é favorável para o crescimento e proliferação de enterobactérias, o que pode ter favorecido o aumento na contagem de enterobactérias no jejuno.

Não houve efeito ($p > 0,05$) dos tratamentos sobre a contagem de bactérias ácido lácticas e a contagem bacteriana total em todas as porções intestinais, e sobre a contagem de enterobactérias no íleo, ceco e cólon. Esses resultados foram similares aos encontrados por Utiyama et al. (2006), que - ao alterarem a microbiota intestinal com adição de prebióticos, probióticos e extratos vegetais como alternativa aos agentes antimicrobianos - não encontraram diferença ($p > 0,05$) na contagem de microrganismos totais e enterobactérias ao comparar com a dieta controle, a qual não havia adição de promotores de crescimento.

Apesar da ausência de diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos, com exceção da contagem de enterobactérias no jejuno, na literatura é sugerido que a quantidade de bactérias ácido lácticas seja superior à quantidade de bactérias patogênicas em uma microbiota intestinal balanceada (JONSSON; CONWAY, 1992). Pode-se observar que a contagem de bactérias ácido lácticas e enterobactérias foi numericamente similar em todas as porções mensuradas do intestino, o que pode ser explicado principalmente pelo pH, que se manteve dentro da faixa que permite a bactérias patogênicas colonizarem várias porções do intestino.

A composição da microbiota intestinal pode apresentar variações ao longo do trato gastrintestinal, pois a população, a quantidade e a distribuição microbiana vivem em constante mudança de seu equilíbrio natural devido às variações mínimas no estado fisiológico do animal como pH, secreção biliar e enzimática, e interações microbianas, de forma que quaisquer alterações no procedimento de coleta e cultura podem influenciar no resultado (PEDROSO et al., 2005; OETTING et al., 2006).

Não houve efeito dos tratamentos sobre a razão VCJ ($p = 0,9453$) e VCI ($p = 0,1618$) dos leitões. No entanto, observou-se efeito dos tratamentos sobre a VCD ($p = 0,0418$). O valor médio obtido para leitões alimentados com ração contendo AMC (-30%) de Ca^{2+} foi maior ($p = 0,0050$) do que a média de VCD de leitões que receberam ração com CC + AMC (Tabela 7).

Tabela 7. *Lsmeans* da razão entre altura de vilos e profundidade de criptas do duodeno, jejuno e íleo de leitões de acordo com os tratamentos

| Característica ¹ | Tratamento ² | | | | CV (%) ³ | p ⁴ |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|----------------|
| | CC | CC + AMC | AMC (-30%) | AMC | | |
| VC duodeno | 2,67 ^{ab} | 2,50 ^b | 2,81 ^a | 2,68 ^{ab} | 7,48 | 0,0418 |
| VC jejuno | 2,76 | 2,69 | 2,71 | 2,76 | 10,23 | 0,9453 |
| VC íleo | 2,62 | 2,70 | 2,92 | 2,97 | 12,35 | 0,1618 |

¹VC: razão entre altura de vilos e profundidade de criptas; ²*Lsmeans* seguidas por letras distintas na linha diferem entre si, pelo teste t, em nível de 5% de probabilidade; CC: calcário calcítico; AMC: algas marinhas calcíticas; ³CV: coeficiente de variação; ⁴p: probabilidade de significância.

A relação favorável entre altura de vilo e profundidade de cripta ocorre quando os vilos se apresentam altos e as criptas pouco profundas, proporcionando melhorias na digestão e absorção de nutrientes (COSTA et al., 2011). Se o processo de reposição celular for adequado, o valor da relação altura de vilo e profundidade de cripta é maior, indicando presença de maior número de enterócitos maduros e funcionais (TUCCI et al., 2011).

Segundo Hampson (1986), após o desmame ocorrem alterações estruturais no intestino como encurtamento das vilosidades, que é um indicativo da destruição dos enterócitos, e aumento da lâmina própria, um indicativo de aumento da profundidade das criptas, proliferação celular e imaturidade de enterócitos. O encurtamento das vilosidades causa perda de enzimas digestivas e redução da área absorptiva do trato digestório.

3.4 Conclusões

A deposição mineral óssea de leitões que recebem calcário calcítico e algas marinhas calcíticas é eficiente e similar. Elas podem ser utilizadas integralmente ou parcialmente, como alternativa para suprir as exigências nutricionais de cálcio, em dietas para leitões na fase de creche. A oferta de dieta com redução de 30% da exigência de cálcio compromete o desenvolvimento ósseo de leitões na fase de creche.

De modo geral, a composição química dos órgãos, a morfometria intestinal, o pH e a contagem total, de enterobactérias e de bactérias ácido lácticas no trato gastrintestinal de leitões na fase de creche não são alterados pela redução das exigências de cálcio, tampouco pelo uso de calcário calcítico ou de algas marinhas calcíticas nas dietas.

3.5 Referências

- ALMEIDA, F.; SCHIAVO, L.V.; VIEIRA, A.D. et al. Gastroprotective and toxicological evaluation of the *Lithothamnion calcareum* algae. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n.5, p.1399-1404, 2012.
- ANDREOLI, A.; MONTELEONE, M.; VAN LOAN, M. et al. Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.33, n.4, p.507-511, 2001.
- AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL ENGINEERS - ASABE. ANSI/ASAE S459 MAR1992 (R2017) Approved February 1993; reaffirmed January 2017 as an American National Standard. **Shear and three-point bending test of animal bone**. St. Joseph, Missouri, USA, 2017. Disponível em: <Shear and Three-Point Bending Test of Animal Bone (asabe.org)>. Acesso em 17/03/2021.
- ARAÚJO, J.A.; SILVA, J.H.V.; AMÂNCIO, A.L.L. et al. Fontes de minerais para poedeiras. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.53-60, 2008.
- AVELAR, A.C.; FERREIRA, W.M.; BRITO, W. et al. Composição mineral de fosfatos, calcário e farinha de ossos usados na agropecuária brasileira. **Archivos de Zootecnia**, v.58, n.224, p.737-740, 2009.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2013. 237p.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; LIPPKE, R.T.; BOROWSKI, S.M. et al. O problema da osteocondrose na suinocultura tecnificada. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.165-170, 2007 (Supl.).
- BLANCHARD, P. Less buffering, more enzymes and organic acids. **Feed Mix. Pig Progress**, v.16, p.23-25, 2000.
- BOURDEAU, J.E. Calcium metabolism. In: MAXWELL, M.H.; KLEEMAN, C.R. (Eds.) **Clinical disorders of fluid and electrolyte metabolism**. New York: McGraw-Hill, 1994. p.243-306.
- BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: Seção 1, Brasília, DF: Imprensa Nacional, n.196, p.1-2, 9 out. 2008. Disponível em: <Página 1 do Diário Oficial da União - Seção 1, número 196, de 09/10/2008 - Imprensa Nacional>. Acesso em 16/03/2021.

- BUZINARO, E.F.; ALMEIDA, R.N.A.; MAZETO, G.M.F.S. Biodisponibilidade do cálcio dietético. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.50, n.5, p.852-861, 2006.
- CADORE, E.L.; BRENTANO, M.A.; KRUEL, L.F.M. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v.11, n.6, p.373-379, 2005.
- CARLOS, A.C.; SAKOMURA, N.K.; PINHEIRO, S.R.F. et al. Uso da alga *Lithothamnium calcareum* como fonte alternativa de cálcio nas rações de frangos de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.4, p.833-839, 2011.
- COSTA, L.B.; ALMEIDA, V.V.; BERENCHTEIN, B. et al. Aditivos fitogênicos e butirato de sódio como alternativas aos antibióticos para leitões desmamados. **Archivos de Zootecnia**, v.60, n.231, p.733-744, 2011.
- CRENSHAW, T.D. Nutritional manipulation of bone mineralization in developing gilts. In: Allen D. Leman Swine Conference, 2003, Minnesota. **Proceedings...** Minnesota: University of Minnesota, 2003. p.183-189.
- CRENSHAW, T. D.; RORTVEDT, L. A.; HASSEN, Z. Triennial Growth Symposium: a novel pathway for vitamin D-mediated phosphate homeostasis: implications for skeleton growth and mineralization. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 7, p. 1957-1964, 2011.
- CRUZ, S.C.S. **Equivalência em fósforo disponível da fitase usando diferentes metodologias com frango de corte e suínos**. 2013. 106f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- DIAS, G.T.M. Granulados bioclásticos - algas calcárias. **Brazilian Journal of Geophysics**, v.18, n.3, p.307-318, 2000.
- EULER, A.C.C.; FERREIRA, W.M.; TEIXEIRA, E.A. et al. Desempenho, digestibilidade e morfometria da vilosidade ileal de coelhos alimentados com níveis de inclusão de "*Lithothamnium*". **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n.1, p.91-103, 2010.
- FIALHO, E.T.; BARBOSA, H.P.; BELLAVAR, C. et al. Avaliação nutricional de algumas fontes de suplementação de cálcio para suínos: biodisponibilidade e desempenho. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.21, n.5, p.891-905, 1992.
- GAO, C.; ZHAO, J.; GREGERSEN, H. Histomorphometry and strain distribution in pig duodenum with reference to zero-stress state. **Digestive Diseases and Sciences**, v.45, n.8, p.1500-1508, 2000.

- GONZÁLEZ-VEGA, J.C.; STEIN, H.H. Invited review - calcium digestibility and metabolism in pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.27, n.1, p.1-9, 2014.
- GONZÁLEZ-VEGA, J.C.; WALK, C.L.; STEIN, H.H. Effects of microbial phytase on apparent and standardized total tract digestibility of calcium in calcium supplements fed to growing pigs. **Journal of Animal Science**, v.93, n.5, p.2255-2264, 2015.
- GUO, M.; HAYES, J.; CHO, K.O. et al. Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. **Journal of Virology**, v.75, n.19, p.9239-9251, 2001.
- HAMPSON, D.J. Alterations in piglet small intestine structure at weaning. **Research in Veterinary Science**, v.40, n.1, p.32-40, 1986.
- JACOBS, R.D.; GORDON, M.B.E.; VINEYARD, K.R. et al. The effect of a seaweed-derived calcium supplement on gastric juice pH in the horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.95, 2020, 103265.
- JONSSON, E.; CONWAY, P. Probiotics for pigs. In: FULLER, R. (Ed.) **Probiotics: the scientific basis**. [S.l.]: Springer Science + Business Media, 1992. Cap. 11, p.259-316.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. 2002. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 375p.
- MANZANILLA, E.G.; PEREZ, J.F.; MARTIN, M. et al. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v.82, n.11, p.3210-3218, 2004.
- MELO, T.V.; MENDONÇA, P.P.; MOURA A.M.A. et al. Solubilidade *in vitro* de algumas fontes de calcio utilizadas en alimentación animal. **Archivos de Zootecnia**, v.55, n.211, p.297-300, 2006.
- MELO, T.V.; MOURA, A.M.A. Utilização da farinha de algas calcáreas na alimentação animal. **Archivos de Zootecnia**, v.58, p.99-107, 2009.
- MOREIRA, J.A.; VITTI, D.M.S.S.; LOPES, J.B. et al. Cinética do fósforo em tecidos de suínos alimentados com dietas contendo enzima fitase. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.74-80, 2004.
- OETTING, L.L.; UTIYAMA, C.E.; GIANI, P.A. et al. Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1389-1397, 2006.

- PAIVA, D.M.; WALK, C.L.; McELROY, A.P. Influence of dietary calcium level, calcium source, and phytase on bird performance and mineral digestibility during a natural necrotic enteritis episode. **Poultry Science**, v.92, n.12, p.3125-3133, 2013.
- PEDROSO, A.A.; OETTING, L.L.; UTIYAMA, C.E. et al. Variabilidade espacial da comunidade bacteriana intestinal de suínos suplementados com antibióticos ou extratos herbais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, p.1225-1233, 2005.
- ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T., HANNAS, M.I. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. 4.ed. (Ed.) ROSTAGNO, H.S. Viçosa: UFV, 2017. 252p.
- ROUSSEL, A.M. New aspects on trace element metabolism disturbances in man and pet animals. **Revue de Medecine Veterinaire**, v.151, n.7, p.637-642, 2000.
- RUFINO, L.M.; NUNES, R.C.; STRINGHIN, J.H. et al. Available phosphorus reduction in weaned piglets' diets containing phytase combined with butyric and benzoic acids. **Semina**, v.38, n.3, p.1439-1450, 2017.
- SANTANA, A.L.A.; CARVALHO, P.L.O.; OLIVEIRA, N.T.E. et al. Different sources of calcium for starter pig diets. **Livestock Science**, v.206, p.175-181, 2017.
- SARAIVA, A.; DONZELE, J.L.; OLIVEIRA, R.F.M. et al. Available phosphorus levels in diets for swine from 15 to 30 kg genetically selected for meat deposition. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.2, p.307-313, 2009.
- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM® – SAS. *University Edition* [online]. ©SAS Institute Inc.; 2019 [cited 2019 Set 20]. Available from: https://www.sas.com/en_us/software/university-edition.html
- SCHLEGEL, P.; GUTZWILLER, A. Effect of dietary calcium level and source on mineral utilisation by piglets fed diets containing exogenous phytase. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.101, n.5, p.165-174, 2016.
- SEEDOR, J.G.; QUARTUCCIO, H.A.; THOMPSON, D.D. The biophosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.6, n.4, p.339-346, 1991.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2006. 235p.
- SUTTLE, N.F. **Mineral Nutrition of Livestock**. 4.ed. Cambridge: CABI, 2010. 587p.
- TUCCI, F.M.; THOMAZ, M.C.; NAKAGHI, L.S.O. et al. Efeito da adição de agentes tróficos na dieta de leitões desmamados sobre a estrutura e ultraestrutura do intestino delgado e sobre o desempenho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.931-940, 2011.

UTIYAMA, C.E.; OETTING, L.L.; GIANI, P.A. et al. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2359-2367, 2006.

WEEDMAN, S.M.; ROSTAGNO, M.H.; PATTERSON, J.A. et al. Yeast culture supplement during nursing and transport affects immunity and intestinal microbial ecology of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.89, n.6, p.1908-1921, 2011.