

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação biológica do cálcio da casca de ovo de galinha (*Gallus Gallus*, L.) em pó em ratas (*Rattus norvegicus*, Wistar) saudáveis e com osteoporose induzida**

**Juliana dos Santos Vilar**

**2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO CÁLCIO DA CASCA DE OVO DE  
GALINHA (*Gallus Gallus*, L.) EM PÓ EM RATAS (*Rattus norvegicus*,  
Wistar) SAUDÁVEIS E COM OSTEOPOROSE INDUZIDA**

**JULIANA DOS SANTOS VILAR**

*Sob a Orientação dos Professores*

**Dr. Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Surur**

**e**

**Dr. Ruy Garcia Marques**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para a obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**, no  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
Área de Concentração em Ciência  
de Alimentos

Seropédica, RJ  
Março de 2009

636.0855

V697a

T

Vilar, Juliana dos Santos, 1983-  
Avaliação biológica do cálcio da casca  
de ovo de galinha (*Gallus gallus*, L.) em pó  
em ratas (*Rattus norvegicus*, Wistar)  
saudáveis e com osteoporose induzida /  
Juliana dos Santos Vilar - 2009.

97 f. : il.

Orientador: Armando Ubirajara Oliveira  
Sabaa Srur.

Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa  
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia  
de Alimentos.

Bibliografia: f. 50-64

1. Ave - Alimentação e rações - Teses.  
2. Cálcio na nutrição humana - Teses. 3.  
Ovos - Teses. 4. Osteoporose - Teses. I.  
Srur, Armando Ubirajara Oliveira Sabaa,  
1945-. II. Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação  
em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III.  
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**JULIANA DOS SANTOS VILAR**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Srur. DSc. USP  
(Orientador)

---

Ruy Garcia Marques. DSc. UFMG  
(Co-orientador)

---

Aloísio da Silva Pinto. (DSc.) UFV  
(Membro)

---

Maria Cristina Jesus Freitas. (DSc.) UNICAMP  
(Membro)

---

Vera Lúcia Mathias da Silva. (DSc.) UFRRJ  
(Suplente)

## **DEDICATÓRIAS**

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãs que sempre incentivaram a minha carreira, acreditaram no meu sonho e dividiram momentos de alegria e sacrifícios durante a realização deste trabalho.

Em especial, dedico à minha irmã Fabiana, por ter participado ativamente desta vitória comigo, estando ao meu lado, durante as fases mais difíceis do ensaio experimental.

"É melhor tentar e falhar,  
que se preocupar e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
do que se sentar fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver."

(Martin Luther King)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre se fez presente em todos os momentos da minha caminhada e concedeu-me saúde e fé para prosseguir dia após dia.

Ao meu orientador, Dr. Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Sur, pela possibilidade, pelas palavras que proporcionaram ânimo, por todo conhecimento que me foi transmitido e pelo incentivo e tempo dedicado ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Ruy Garcia Marques, meu co-orientador, que além de disponibilizar o biotério do Laboratório de Ciências Médicas da Universidade Estadual do Rio de Janeiro para a realização do ensaio biológico, sempre foi muito atencioso e solícito às minhas dúvidas e questionamentos.

Ao Dr. Gilson Telles Boaventura da Universidade Federal Fluminense que permitiu a utilização de alguns equipamentos de seu laboratório para que eu pudesse realizar a elaboração das rações experimentais.

À indústria de alimentos SOHOVOS AB Brasil - Sorocaba /SP que forneceu a matéria-prima essencial para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Aloísio da Silva Pinto pela gentileza em me receber na Universidade Federal de Viçosa para compartilhar seu conhecimento e experiência.

Aos médicos veterinários Carlos Eduardo Rodrigues Caetano e Érica Silva Lima que, além da amizade, estiveram sempre dispostos a colaborar com muito empenho e dedicação no ensaio biológico.

Ao Laboratório de Lipídes, na pessoa de José Firmino Nogueira Neto que disponibilizou o laboratório e, possibilitou assim, a realização das análises bioquímicas e hematológicas.

À Marcia Cristina da Silva, que acreditou na minha capacidade e incentivou a continuação desse processo.

Ao amigo Fábio da Silva Gomes que disponibilizou seu precioso tempo e compartilhou seus conhecimentos estatísticos para analisar os dados deste trabalho.

A Juarez Vicente, técnico do Laboratório Analítico de Alimentos e Bebidas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo auxílio nas análises de composição centesimal.

A EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos, nas pessoas do Dr. José Luís Ascheri, do Dr. Ronoel Godoy e do Sidney Pacheco pela disponibilização de equipamentos e execução de análises importantes para a obtenção de alguns resultados deste trabalho.

A Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, na pessoa do Dr. Nobert Mikeley, responsável técnico do Laboratório de Química do Instituto de Química, pela realização de análises de grande contribuição para esta pesquisa.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade concedida para a realização do curso e ao corpo docente pelo ensinamento.

Aos amigos que conquistei durante este curso, os quais faço questão de nomear: Carla da Silva Teba, Carolina Croácia, Geisa Rocha, Isabel Guimarães, John Martín e Vanessa Chagas pela companhia, pelas orações, pela torcida, pelo incentivo nos momentos de cansaço e por todo tipo de ajuda.

A Juan Antonio Ruano Ortíz pelo incentivo, compreensão, paciência e colaboração durante fases difíceis no decorrer desta jornada.

A todos que torceram por mim e pelo sucesso do meu trabalho e que porventura não tiveram seus nomes citados aqui, perdoem-me a falha e obrigada por tudo.

## **BIOGRAFIA**

Juliana dos Santos Vilar nasceu em Bonsucesso, Rio de Janeiro (RJ), no dia 24 de agosto de 1983, filha de Antonio Francisco Vilar e Joana dos Santos Vilar, concluiu o ensino médio no ano de 2001, no Instituto de Educação Santo Antônio-RJ. Foi admitida no vestibular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) em setembro de 2002, onde obteve o título de Nutricionista em agosto de 2006. Como estudante de graduação foi monitora de Bromatologia, período no qual desenvolveu atividades relacionadas com pesquisas científicas e docência. Paralelamente a isto, também desenvolvia atividades de Iniciação Científica do Laboratório de Análise de Alimentos do Instituto de Nutrição da UFRJ sob orientação do Dr. Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Srur, onde realizou trabalhos, visando avaliações químicas e físicas de diversas matérias-primas, cujos resultados foram apresentados em congressos e serviram de base para elaboração de artigo científico e sua posterior publicação. Em setembro de 2006, iniciou atividades profissionais na área de nutrição, enquanto estudava para prestar exame de seleção para curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no qual foi aprovada ao fim desse mesmo ano.

## RESUMO

VILAR, J.S. Avaliação biológica do cálcio da casca de ovo de galinha (*Gallus Gallus, L.*) em pó em ratas (*Rattus norvegicus*, Wistar) saudáveis e com osteoporose induzida. 2009. 92p Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

A casca de ovo, subproduto agro-industrial pode ser considerada potencial fonte de cálcio para o homem, sendo um dos ingredientes de multimisturas alimentares distribuídas no Brasil como estratégia de combate à desnutrição. A falta de informações químicas da casca de ovo motivou a realização deste trabalho que visou desenvolver tecnologia para obtenção deste produto na forma de pó, determinar o seu conteúdo de nutrientes e avaliar a utilização biológica da fração de cálcio em ratas saudáveis e/ou com osteoporose induzida através de ooforectomia e glicocorticoterapia. Depois de lavadas em água corrente e imersas por 15 minutos em solução clorada contendo 200 ppm de cloro residual livre (CRL), as cascas foram centrifugadas a 2.000 rpm (g = 9,80), submetidas à secagem em estufa com circulação de ar aquecido a  $55 \pm 5^\circ\text{C}$  e transformadas em pó com auxílio de um moinho de facas, tendo sido obtido um rendimento de  $98,45 \pm 0,70\%$ . Pesquisas de microorganismos: bactérias mesófilas aeróbias, bolores e leveduras, coliformes a  $35^\circ\text{C}$  e a  $45^\circ\text{C}$  e *Salmonella spp.spp*, mostraram a eficiência do processo empregado. Determinações analíticas revelaram que 100g desse produto continha baixo teor de umidade ( $1,3490 \pm 0,0274\text{g}$ ), resíduo mineral fixo equivalente a  $91,9600 \pm 0,2218\text{g}$  e baixo teor calórico ( $30,6823 \pm 4,9069\text{ Kcal}$ ), provenientes de  $4,3693 \pm 0,3977\text{g}$  de proteínas,  $0,7837 \pm 0,0560\text{g}$  de lipídios e  $1,5379 \pm 0,7029\text{g}$  de carboidratos totais, além de  $30,263,72\text{mg}$  de cálcio. Rações para manutenção de ratos Wistar adultos foram preparadas (controle), nas quais a fonte de cálcio foi substituída pela casca de ovo e suplementadas ou não com vitaminas D e K (experimentais). Ratas saudáveis ou com osteoporose induzida, divididas em 8 grupos receberam ração e água *ad libitum*, durante 33 dias. Foram avaliados os parâmetros morfológicos, bioquímicos e hematológicos das cobaias. As ratas do grupo 7 (ração sem vitamina D) apresentaram fêmures significativamente mais pesados do que os dos animais do grupo 6 (ração sem vitamina K), o que pode sugerir a maior importância da vitamina D em relação a vitamina K no processo de formação óssea. Quanto ao peso dos rins, diferenças distintas entre os órgãos direito e esquerdo foram encontradas. A média dos pesos dos rins das ratas do grupo 3 (ração com cálcio da casca) apresentou-se, significativamente, maior do que os rins dos demais animais utilizados no experimento. Em relação ao fósforo contido nos ossos animais do grupo 6 (ração sem vitamina K) diferiram dos animais do grupo controle, apresentando níveis de fósforo ósseo semelhantes ao grupo basal e inferiores aos grupos 2 (osteoporótico + ração de manutenção), 8 (ração suplementada com cálcio da casca e vitaminas D e K) e controle. Em relação ao magnésio e cálcio ósseos, os animais dos grupos 2 e 8 não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos animais do grupo controle, e os animais do grupo 5 (ração sem vitaminas D e K) apresentaram menor teor de cálcio ósseo em comparação com os demais grupos ( $p<0,05$ ). Com relação ao teor de cálcio retido nos ossos, os teores médios encontrados nos fêmures dos animais dos grupos 2 e 8 não diferiram significativamente do grupo controle. A utilização biológica de cálcio não diferiu entre os animais dos grupos controle, 2 e 8, mostrando que o tratamento no qual não foi realizado a incorporação da casca de ovo como fonte de cálcio respondeu de forma similar aquele em que a suplementação de cálcio foi realizada concomitantemente com a das vitaminas D e K. Quando a suplementação

de cálcio foi realizada com a casca de ovo em pó e utilizando-se as vitaminas D e K em níveis basais, ou na ausência dessas vitaminas, o efeito observado foi de uma utilização biológica de cálcio menor em comparação ao grupo controle. Os resultados das análises hematológicas e de fosfatase alcalina e cálcio sérico dos grupos estudados, em sua maioria, foram similares aos do grupo controle. Os animais do grupo 3 (ração com casca) foram os únicos que apresentaram resultados que diferiram dos animais do grupo controle no que diz respeito a concentração média de fósforo sérico.

**Palavras-chave:** casca de ovo, cálcio, osteoporose.

## ABSTRACT

VILAR, J. S. **Biological evaluation of calcium from chicken eggshell (*Gallus Gallus, L.*) powder in healthy and osteoporosis induced female rats (*Rattus norvegicus, Wistar*).** 2009. 122p Dissertation (Master Science in Food Technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The eggshell, agroindustrial by-product can be considered like a potential source of calcium for human, being one of the ingredients of food multimixtures distributed in Brazil like a strategy to combat malnutrition. The lack of chemical informations about eggshell caused the realization of this work that aimed to develop a technology to obtain a product in a powder form, determine its content of nutritious and evaluate the biological use of its fraction of calcium in healthy female rats and/or osteoporosis induced by castration and glucorticoid therapy. After washed in water and immersed in 200 ppm sodium hypochlorite solution for 15 minutes, the shles were centrifugated to 2.000 rpm ( $g=9,80$ ), dried with heated air circulation to  $55 \pm 5^\circ\text{C}$  and turned into a powder with a mill, obtained a profit of  $98,45 \pm 0,70 \%$ . Investigations of total bacterial aerobic counts, mold and yeasts, coliforms  $35^\circ\text{C}$  and  $45^\circ\text{C}$  and *Salmonella* spp., showed the efficiency of the process employed. Analytical determinations showed that 100g of this product contained low moisture ( $1,3490 \pm 0,0274\text{g}$ ), ash equivalent to  $91,9600 \pm 0,2218\text{g}$  and low caloric value ( $30,6823 \pm 4,9069 \text{ Kcal}$ ), originated from  $4,3693 \pm 0,3977\text{g}$  of proteins,  $0,7837 \pm 0,0560\text{g}$  of lipídis and  $1,5379 \pm 0,7029\text{g}$  of total carbohydrates, besides  $30,263,72 \text{ mg}$  of calcium. Diet for maintenance to adult rats Wistar were prepared (control), in which the source of calcium was substituted by egghell powder and supplemented or not with vitamins D and K (experimentals). Healthy or osteoporosis induced rats, divided into 8 groups received diet and water *ad libitum*, during 33 days. Morphological, biochemical and hematological parameters were evaluated. Rats of group 7 (without vitamin D) presented femurs significantly more heavy than rats of group 6 (without vitamin K), what could suggest the biggest importance of the vitamin D compared to vitamin K in the process of bone formation. For the kidneys were observed differences between the right and left organ. These organs of group 3 (diet with calcium of the shell) presented average of weights significantly bigger than the other experimental groups. Relate to bone contents of phosphorus, animal of group 6 (diet without vitamin K) were different from the animals of control group, with similar levels to basal group and inferiors to the groups 2 (osteoporosis induced + diet of maintenance), 8 (diet supplemented with calcium of the shell and vitamins D and K) and control group. Relate to bone contents of magnesium and calcium, the animals of the groups 2 and 8 did not present significant differences compared to control group, and the animals of group 5 (diet without vitamins D and K) presented less contents of calcium in their bones compared to other groups ( $p < 0,05$ ). The calcium present in the bones of groups 2 and 8 did not defer significantly of the group control. The biological use of calcium did not defer between the animals of the groups control, 2 and 8, showing that the treatment in which there was used eggshell like a source of calcium was similar that in which the suplementation of calcium with vitamins D and K were done. When the suplementation of calcium from eggshell powder using vitamins D and K in basal levels, or without these vitamins was done, the biological use of calcium was low in comparison to control group. The results of hematological analysis, alkaline phosphatase and calcium serum of the groups studied, in most of all results, were similar to control group. The animals of the group 3 (diet

with calcium of the shell) were the only one who presented results to phosphorus serum that differed from the animals of control group.

**Key words:** eggshell, calcium, osteoporosis.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Rações oferecidas aos diferentes grupos experimentais.....	22
<b>Tabela 2.</b> Composição centesimal e VET da casca de ovo de galinha em pó.....	30
<b>Tabela 3.</b> Comparação dos resultados de composição centesimal e VET encontrados na casca de ovo de galinha em pó com os resultados obtidos por SANT'ANA et al. (2000).....	31
<b>Tabela 4.</b> Perfil de aminoácidos essenciais presentes na casca de ovo em pó e a comparação com a proteína padrão estabelecida pela FAO (1985).....	31
<b>Tabela 5.</b> Valores médios do teor de minerais (mg/100g) presente na casca de ovo.....	33
<b>Tabela 6.</b> Necessidade de consumo de casca de ovo em pó (g) para atender as demandas nutricionais magnésio, sódio, fósforo e potássio para adultos.....	34
<b>Tabela 7.</b> Concentrações de minerais encontrados na casca de ovo em pó e comparação com cascas de ovo em pó de origem eslovaquia e alemã.....	35
<b>Tabela 8.</b> Teores de metais pesados encontrado na casca de ovo em pó e a comparação com concha de ostra pequena e grande e os limites estabelecidos pela legislação.....	37
<b>Tabela 9:</b> Microbiologia da casca de ovo <i>in natura</i> , desidratada e higienizada com solução clorada.....	37
<b>Tabela 10.</b> Rendimento do processo de obtenção da casca de ovo.....	38
<b>Tabela 11.</b> Teores médios de umidade de equilíbrio (UE) em função da temperatura e umidade relativa (UR).....	39
<b>Tabela 12.</b> Valores de média e desvio padrão do peso corpóreo (g) dos animais na cirurgia, no sacrifício e ganho de peso total no período de 33 dias.....	41
<b>Tabela 13.</b> Valores de média e desvio padrão dos pesos dos fêmures e rins nos grupos de animais experimentais.....	43
<b>Tabela 14.</b> Valores de média e desvio padrão dos teores de fósforo, magnésio, cálcio ósseos, cálcio retido no fêmur e utilização biológica de cálcio nos grupos de animais experimentais.....	44
<b>Tabela 15.</b> Valores de média e desvio padrão dos teores séricos de fosfatase alcalina, cálcio e fósforo nos grupos de animais experimentais.....	45
<b>Tabela 16.</b> Valores de média e desvio padrão das análises hematológicas (série vermelha) dos grupos de animais experimentais.....	47
<b>Tabela 17.</b> Valores de média e desvio padrão das análises hematológicas (série branca) dos grupos de animais experimentais.....	48

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Fatores que contribuem para perda óssea.....	4
<b>Quadro 2.</b> Teor de cálcio em leite e derivados em 100 g de alimento.....	9
<b>Quadro 3.</b> Ingestão Dietética de Referência (DRI) para humanos, em diversas faixas etárias.....	9
<b>Quadro 4.</b> Soluções saturadas utilizadas para a obtenção das respectivas umidades relativas.....	21

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática para obtenção das umidades de equilíbrio.....	21
<b>Figura 2.</b> Área abdominal tricotomizada do animal em decúbito dorsal após anestesia.....	24
<b>Figura 3.</b> Aspecto do local e dimensão da laparotomia mediana.....	25
<b>Figura 4.</b> Aspecto da incisão e dissecção do plano muscular.....	25
<b>Figura 5.</b> Aspecto da exposição e identificação dos ovários.....	26
<b>Figura 6.</b> Aspecto do pinçamento e excisão do ovário.....	26
<b>Figura 7.</b> Aspecto da ligadura da parte superior da trompa de Falópio.....	26
<b>Figura 8.</b> Aspecto da sutura no plano envolvendo peritônio e musculatura.....	27
<b>Figura 9.</b> Aspecto da sutura no plano envolvendo tecido subcutâneo e pele.....	27

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Curva de adsorção e desorção (NaOH).....	39
<b>Gráfico 2.</b> Curva de adsorção e desorção ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ).....	39
<b>Gráfico 3.</b> Curva de adsorção e desorção (NaBr).....	39
<b>Gráfico 4.</b> Curva de adsorção e desorção(NaCl).....	39
<b>Gráfico 5.</b> Curva de adsorção e desorção ( $[(NH_4)_2SO_4]$ ).....	40
<b>Gráfico 6.</b> Curva de adsorção e desorção ( $K_2CrO_4$ ).....	40
<b>Gráfico 7.</b> Distribuição granulométrica, em volume, das partículas da casca de ovo em pó.	40

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Tabela do tamanho das partículas da casca de ovo em pó.....	60
<b>Anexo 2.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos pesos iniciais dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	61
<b>Anexo 3.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos pesos nos animais, após a morte, entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	62
<b>Anexo 4.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças no ganho de peso entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	63
<b>Anexo 5.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos pesos dos fêmures direitos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	64
<b>Anexo 6.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos pesos dos fêmures esquerdos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	65
<b>Anexo 7.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos pesos dos rins direitos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	66
<b>Anexo 8.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos pesos dos rins esquerdos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	67
<b>Anexo 9.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de fósforo ósseo dos fêmures esquerdos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	68
<b>Anexo 10.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de magnésio ósseo nos fêmures esquerdos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	69
<b>Anexo 11.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de cálcio ósseo nos fêmures esquerdos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	70
<b>Anexo 12.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças na utilização biológica de cálcio dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	71
<b>Anexo 13.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de cálcio retido nos fêmures esquerdos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	72
<b>Anexo 14.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de fosfatase alcalina sérica dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais....	73
<b>Anexo 15.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de cálcio sérico dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	74
<b>Anexo 16.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de fósforo sérico dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	75
<b>Anexo 17.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de hemácias dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	76
<b>Anexo 18.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de hemoglobina dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	77
<b>Anexo 19.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de hematórito dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	78
<b>Anexo 20.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de VGM dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	79
<b>Anexo 21.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de HGM dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	80

<b>Anexo 22.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de CHGM dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	81
<b>Anexo 23.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de RDV' SD dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	82
<b>Anexo 24.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de RDW CV dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	83
<b>Anexo 25.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de leucócitos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	84
<b>Anexo 26.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de linfócitos (contagem relativa) dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	85
<b>Anexo 27.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de linfócitos (contagem absoluta) dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	86
<b>Anexo 28.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de eosinófilos, basófilos e monócitos (contagem relativa) dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	87
<b>Anexo 29.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de eosinófilos, basófilos e monócitos (contagem absoluta) dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	88
<b>Anexo 30.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de neutrófilos (contagem relativa) dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	89
<b>Anexo 31.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de neutrófilos (contagem absoluta) dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	90
<b>Anexo 32.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de plaquetas dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	91
<b>Anexo 33.</b> Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores do volume plaquetário médio dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.....	92

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	1
1.1	<b>Justificativa.....</b>	2
1.2	<b>Objetivos.....</b>	2
1.2.1	<b>Objetivo geral.....</b>	2
1.2.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	2
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	3
2.1	<b>Tecido ósseo e osteoporose.....</b>	3
2.2	<b>Fatores de risco para osteoporose.....</b>	5
2.3	<b>Cálcio: aspectos gerais, metabolismo e adequação.....</b>	8
2.4	<b>Osteoporose induzida por glicocorticoides.....</b>	13
2.5	<b>Tratamento da osteoporose.....</b>	14
2.6	<b>Biodisponibilidade de minerais.....</b>	15
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	17
3.1	<b>Materiais.....</b>	17
3.1.1	<b>Matéria-prima.....</b>	17
3.1.2	<b>Animais de experimentação.....</b>	17
3.1.3	<b>Biotério.....</b>	17
3.2	<b>Métodos.....</b>	17
3.2.1	<b>Manuseio das cascas de ovos.....</b>	17
3.2.1.1	<b>Higienização das cascas de ovos.....</b>	17
3.2.1.2	<b>Obtenção do pó de casca de ovo.....</b>	17
3.2.3	<b>Determinação da Composição Centesimal.....</b>	18
3.2.3.1	<b>Umidade.....</b>	18
3.2.3.2	<b>Resíduo mineral fixo (RMF) ou cinzas.....</b>	18
3.2.3.2	<b>Nitrogênio total e proteína bruta.....</b>	18
3.2.3.3	<b>Fração Nifext.....</b>	18
3.2.3.4	<b>Extrato etéreo total ou lipídios.....</b>	18
3.2.4	<b>Valor energético total (VET).....</b>	18
3.2.5	<b>Perfil em aminoácidos essenciais.....</b>	18
3.2.6	<b>Determinação do teor de minerais.....</b>	19
3.2.7	<b>Analise microbiológica da casca de ovo em pó.....</b>	19
3.2.7.1	<b>Bactérias mesófilas aeróbias.....</b>	19
3.2.7.2	<b>Bolores e leveduras.....</b>	19
3.2.7.3	<b>Coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C.....</b>	20
3.2.7.4	<b><i>Salmonella spp.</i>.....</b>	20
3.2.8	<b>Avaliação do rendimento da casca de ovo em pó.....</b>	21
3.2.9	<b>Curva de adsorção e desorção da casca de ovo em pó.....</b>	21
3.2.10	<b>Tamanho das partículas da casca de ovo em pó.....</b>	22
3.2.11	<b>Avaliação biológica do cálcio da casca de ovo em pó.....</b>	22
3.2.11.1	<b>Preparação das rações.....</b>	22
3.2.11.2	<b>Modificações nas misturas salina e vitamínica.....</b>	23
3.2.11.3	<b>Ensaio Experimental.....</b>	23
3.2.11.3.1	<b>Obtenção dos dados basais.....</b>	24
3.2.11.3.2	<b>Indução da osteoporose.....</b>	24
3.2.11.2.3	<b>Administração das rações experimentais.....</b>	28

3.2.11.2.4	<b>Coleta de parâmetros bioquímicos e hematológicos.....</b>	28
3.2.11.3.5	<b>Avaliação biológica do cálcio da casca de ovo em pó.....</b>	28
3.2.12	<b>  Análise estatística dos dados.....</b>	28
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	30
4.1	<b>  Composição centesimal e valor energético total.....</b>	30
4.2	<b>  Perfil de aminoácidos essenciais.....</b>	31
4.3	<b>  Minerais.....</b>	32
4.4	<b>  Microbiologia.....</b>	37
4.5	<b>  Rendimento do processo de obtenção da casca de ovo em pó.....</b>	38
4.6	<b>  Curvas de adsorção e desorção da casca de ovo em pó.....</b>	38
4.7	<b>  Tamanho das partículas da casca de ovo em pó.....</b>	40
4.8	<b>  Ensaio Biológico.....</b>	40
5	<b>CONCLUSÕES.....</b>	49
6	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	50
7	<b>ANEXOS.....</b>	60

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar de conter teores consideráveis de vitaminas e sais minerais, a utilização de partes não tradicionais de matérias-primas na alimentação, geralmente desprezadas, com o propósito de promover o seu uso nas dietas é a base da alimentação alternativa.

Esse tipo de alimentação começou a ser utilizado para grupos que apresentavam deficiências nutricionais, como a desnutrição energético-protéica, a anemia e as hipovitaminoses. Algumas dessas partes não tradicionalmente consumidas de matérias-primas como alimentos foram difundidas pela alimentação alternativa, como os farelos de trigo e de arroz, pós de folha de mandioca e outras folhas verdes, pós de casca de ovo e de algumas sementes, tais como gergelim, girassol, melancia, entre outros.

Essas porções incluídas na alimentação alternativa por apresentarem um potencial benéfico à nutrição humana, além de promoverem uma prática de grande importância econômica, social e ambiental, através do aproveitamento de subprodutos, são comumente utilizadas na ração animal ou descartados como resíduo industrial.

Dentre esses resíduos, merece destaque a casca de ovo de galinha, totalmente desprezada durante as preparações culinárias, pelas Unidades de Alimentação Coletivas no decorrer da elaboração das refeições e pelas indústrias nos processos fabris para produção de maioneses, ovos pasteurizados ou em pó.

A média *per capita* de consumo anual de ovo de galinha integral no Brasil é de 141 unidades (UBA, 2006) e a produção dessa matéria-prima atingiu cerca de 20.470 bilhões de ovos no ano de 2008 (IBGE, 2008), o que representa 102,35 toneladas (megagramas) de casca de ovos.

A casca de ovo é um dos ingredientes de multimisturas alimentares distribuídas no Brasil por organizações não-governamentais, como uma estratégia de combate à fome e à desnutrição. Apesar da carência de dados sobre a qualidade nutricional da casca de ovo, sabe-se que o cálcio encontra-se presente na forma de carbonato de cálcio na proporção de 40% do produto.

O cálcio é um mineral de extrema importância para o organismo, sobretudo para a mineralização óssea. A única fonte disponível desse mineral para o organismo humano é proveniente da alimentação, pelo consumo de alimentos naturalmente ricos nesse mineral, tais como o leite e produtos derivados, alimentos fortificados ou, ainda, por meio de suplementos dietéticos, sendo importante prover uma ingestão adequada do mineral para o completo crescimento e maturação óssea.

A ingestão inadequada de cálcio, fato muito comum entre adolescentes, idosos e indivíduos que consomem dietas nutricionalmente desequilibradas, compromete a mineralização e a manutenção óssea, favorecendo, dessa forma, o processo de perda óssea e subsequente desenvolvimento de osteoporose, enfermidade mais prevalente em mulheres no período pós-menopausa e em idosas, sendo observada também entre adolescentes com amenorréia e em indivíduos adultos vegetarianos.

Um dos meios mais eficazes de prevenir a perda de massa óssea em idades mais avançadas é garantir uma boa formação óssea, sendo importante adquirir o máximo de massa óssea durante o crescimento, uma vez que o período de maior retenção de mineral ocorre durante a adolescência. Sendo assim, nota-se a necessidade e importância do suprimento constante de cálcio dietético nessa fase do desenvolvimento humano para maximizar e manter o pico da massa óssea, assim como minimizar a perda óssea em fase posterior da vida.

A ingestão adequada de cálcio favorece uma melhor saúde óssea, por isso, torna-se interessante buscar novas alternativas economicamente viáveis e eficientes para promover o consumo desse mineral de forma a atingir as demandas nutricionais. Neste contexto, a casca de ovo de galinha, em função do alto teor de cálcio, poderia ser mais uma opção farmacológica ou alimentar para ajudar a minimizar osteopenia e/ou controlar a osteoporose, já que estudos sobre o valor nutritivo do cálcio da casca de ovo, incluindo a biodisponibilidade e qualidade microbiológica do produto, são escassos e pouco conclusivos.

## **1.1 Justificativa**

A dificuldade de adequação das demandas nutricionais de cálcio devido a baixa ingestão desse nutriente por meio da alimentação tradicional, torna necessária a complementação ou suplementação desse nutriente mediante a utilização de fontes desse mineral, seja por meio da ingestão alimentar ou pelo uso de fármacos, alguns de elevado valor comercial e pouco acessível a população menos favorecida.

A casca de ovo, subproduto da industrialização dessa matéria-prima e que contém elevado teor desse mineral poderia ser mais uma opção, além de ser de menor valor comercial. Por isso, a avaliação da biodisponibilidade do cálcio da casca de ovo em pó, inicialmente em cobaias e, posteriormente, em humanos, representaria uma importante contribuição para a alimentação preventiva e para portadores de osteoporose.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo geral**

Desenvolver processo tecnológico para obtenção de casca de ovo de galinha (*Gallus gallus*, L.) em pó e avaliar sua utilização biológica, como fonte de cálcio, em ratas (*Rattus norvegicus* albinus, linhagem Wistar) saudáveis e com osteoporose induzida.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Determinar a curva de adsorção e desorção da casca de ovo em pó.
- Determinar a granulometria da casca de ovo em pó.
- Avaliar as condições microbiológicas da casca de ovo em pó.
- Determinar o rendimento do processo de obtenção da casca de ovo em pó.
- Determinar a composição centesimal da casca de ovo em pó.
- Determinar o perfil de minerais da casca de ovo em pó.
- Determinar o perfil aminoácidos essenciais da casca de ovo em pó.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Tecido ósseo e osteoporose

Os ossos são constituídos por materiais orgânicos, minerais e água que corresponde cerca de 20% do tecido ósseo. A parte inorgânica da matriz óssea, que corresponde a cerca de 65%, é composta por cálcio e fosfato, que formam uma estrutura cristalina denominada hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , e por outros íons, como sódio, potássio, magnésio e carbonato em diferentes proporções. A porção orgânica, que corresponde 35% desse tecido, é composta aproximadamente por 90% de colágeno, mucopolissacarídeos e células ósseas, os osteoblastos, responsáveis pela formação da matriz óssea, os osteócitos, que são osteoblastos não-funcionais presentes na matriz óssea mineralizada e os osteoclastos que são células multinucleadas, responsáveis pela reabsorção óssea (KALFAS, 2001).

O tecido ósseo é um tipo de tecido altamente especializado e dinâmico, que está em contínuo processo de formação e reabsorção, atividade conhecida como remodelagem óssea (KALFAS, 2001).

Existem dois tipos de ossos: o cortical, que é composto por lamelas primárias, secundárias e sistemas Haversianos que são responsáveis pela nutrição e inervação óssea e o trabecular, composto de 20% de massa óssea e 70% de volume ósseo. O seu compartimento central consiste de barras paralelas verticais e transversais denominadas trabéculas, as quais são preenchidas pela medula óssea e tecido adiposo. Esses são encontrados principalmente nas vértebras, colo do fêmur e interior dos ossos longos (DHARMARAJAN e MANALAC, 2000).

Durante todas as fases da vida, o tecido ósseo é remodelado e o equilíbrio do processo de remodelação óssea permite a manutenção da massa óssea. Quando esse processo sofre uma alteração, modificações na massa óssea são promovidas, como por exemplo, em casos de diminuição da atividade osteoblástica ou aumento da atividade osteoclastica, ocorre redução da massa óssea (PARFITT, 1988).

O processo de remodelação óssea dura três semanas, isto se dá pela ativação dos osteoclastos, que formam um túnel no interior do osso cortical ou nas lacunas na superfície do osso trabecular. Essas células reabsorvem as substâncias ósseas, dissolvendo tanto a substância osteóide como os depósitos minerais. Os osteoclastos desaparecem ao migrar para a circulação e em seguida, os osteoblastos são atraídos às cavidades resultantes da reabsorção e começam a produzir osteóides que são posteriormente mineralizados (PEAKE *et al.*, 2000).

Se essa ação se repete continuamente por vários meses, novo conteúdo ósseo é depositado em círculos concêntricos de camadas sucessivas (lamelas) nas superfícies internas das cavidades. Isso ocorre até que o local seja preenchido e a deposição é interrompida quando o osso começa invadir os canais de Havers (PEAK *et al.*, 2000).

Na senescência, há menor deposição de ossos nos ciclos de remodelação, levando a menor espessura das paredes ósseas, especialmente nos ossos trabeculares (PARFITT *et al.*, 1997; MANOLAGAS 2000). Apesar de algumas alterações ocorridas com o avanço da idade se confundirem com deficiências hormonais, a menor taxa de nascimento de células ósseas (osteoblastos e osteoclastos), assim como o menor tempo de vida dos osteócitos são característicos da idade avançada (JILKA *et al.*, 1996; D'IPPOLITO *et al.*, 1999 e MANOLAGAS, 2000).

Os dados epidemiológicos e densitométricos permitem individualizar duas doenças, que fazem parte de um mesmo processo: a osteopenia, caracterizada por maior rarefação óssea em relação à idade, situação que é descrita algumas vezes, como osteoporose pré-clínica

ou pré-fratura, na qual há necessidade de intervenção terapêutica; e osteoporose, caracterizada por menor densidade óssea e existência de fraturas axiais ou periféricas. A intervenção terapêutica tem a finalidade de estabilizar ou restaurar a massa óssea prevenindo recidivas (BORELLI, 1994).

A osteoporose pode ser dividida em dois tipos: tipo I que corresponde à osteoporose pós-menopausa, com alta reabsorção óssea pelo fato da atividade osteoclástica estar acelerada em função da insuficiência estrogênica no climatério. A velocidade da perda de massa óssea é observada mais no osso trabecular que no cortical, pois o primeiro apresenta maiores superfícies de reabsorção, e os efeitos desse tipo de osteoporose são mais evidentes na coluna e em alguns ossos periféricos, predispondo a fraturas da porção proximal do fêmur, corpos vertebrais e promovendo cifose dorsal. No tipo II a reabsorção é normal, ou ligeiramente aumentada, associada à atividade osteoblástica diminuída, correspondendo à osteoporose senil ou de involução, agindo tanto no osso trabecular como no cortical, podendo ocorrer fraturas em qualquer osso (KAPLAN, 1995).

A osteoporose ocorre quando os osteoclastos criam uma cavidade excessivamente profunda que não consegue ser preenchida suficientemente ou quando os osteoblastos não conseguem preencher uma cavidade de reabsorção normal, reduzindo a massa óssea, como observado em mulheres durante a menopausa (PAPLER, 1997). Assim, a osteoporose é uma desordem esquelética caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea, que é uma combinação entre qualidade e densidade óssea, predispondo indivíduos ao risco aumentado de desenvolver fraturas (CDC, 2001).

Existem alguns fatores que podem contribuir para a perda de massa óssea e, consequentemente, aumento da probabilidade de desenvolver osteoporose, conforme demonstrado no quadro 1.

**Quadro 1.** Fatores que contribuem para perda óssea.

Fatores não modificáveis	Fatores modificáveis
Idade avançada	Fumo
Sexo feminino	Ingestão baixa de cálcio
Raça caucasóide e faia (orientais)	Ingestão baixa de vitamina D
História familiar de osteoporose	Baixa exposição solar
História familiar de fratura de quadril	Sedentarismo
Intolerância à lactose	Índice de massa corpórea baixo
Desordens osteometabólicas	Corticoterapia
Malignidades (mieloma, linfomas)	Depressão/estresse

Fonte: YAZBEK e MARQUES-NETO, 2008

O aumento da expectativa de vida das populações tem feito com que a osteoporose tenha uma distribuição universal, com altas estimativas de prevalência, dado que é uma doença relacionada ao envelhecimento (KALACHE *et al.*, 1987).

Em geral, do ponto de vista econômico e social, a osteoporose é uma enfermidade que atinge todos os países, independente de serem desenvolvidos ou não e traz grandes prejuízos, quer pela incapacitação dos pacientes, quer pelo tratamento prolongado das fraturas decorrentes dela. Um terço dos indivíduos que fraturam o colo do fêmur ficam incapacitados definitivamente para caminhar, enquanto que essas fraturas reduzem o tempo de vida entre 10% a 20%, ocorrendo a morte nos primeiros seis meses depois da fratura (MELTON, 1988).

A expectativa de vida da população brasileira apresentada, entre 1980 a 1985, foi de 63,4 anos. Para os anos de 2020 a 2025 essa estimativa é de até 72,1 anos, incluindo-se,

portanto, entre estes indivíduos maiores associados ao envelhecimento (KALACHE *et al.*, 1987).

Dados oficiais sobre a incidência de osteoporose na população brasileira são escassos, porém estudos evidenciam que a partir dos 50 anos de idade, 30% das mulheres e 13% dos homens sofrerão algum tipo de fratura devido à osteoporose (RADOMINSKI *et al.*, 2002).

O número de fraturas osteoporóticas aumenta particularmente em mulheres (OHE, 1990). Segundo MARQUES-NETO (2001), em um grupo etário de 50 anos, foi verificado que para cada cinco mulheres acometidas por osteoporose existia um homem com essa doença. Essas são especialmente vulneráveis, em decorrência da progressiva redução da função ovariana e, consequentemente, da produção de seus hormônios esteróides (HALBE, 1995; ALDRIGHI, 1996). Esse processo inicia-se a partir dos 35 anos, quando a mulher apresenta redução lenta de massa óssea, acentuando-se após os 50 anos, momento em que comumente ocorre a menopausa (OMS, 1996). JUNQUEIRA (2001) estimou que mais de 200 milhões de mulheres no mundo tenham osteoporose e que o número de fraturas de quadril decorrentes da osteoporose, que ocorrem a cada ano, irá passar de 1,66 milhões para 6,26 milhões em 2050.

ELFFORS (1998) estimou que nos EUA a cada vinte e cinco minutos, uma morte era provocada pela osteoporose, com um custo financeiro direto e indireto de 7,5 bilhões de dólares/ano. Nesse mesmo estudo previu que das fraturas que ocorrem em indivíduos acima de 45 anos, 70% eram relacionadas à osteoporose e que 1/3 das mulheres com idade em torno de 65 anos apresentariam fratura vertebral, enquanto que, aos 80 anos, uma entre cada três mulheres e um entre cada seis homens desenvolverão fraturas de quadril, dados que apontam para 25 a 30 milhões de pessoas acometidas pela osteoporose naquele país. Também na população brasileira este fenômeno está sendo observado. De 7.540 milhões de idosos atualmente, chegar-se-á em 2020 a 17,9 milhões, dos quais, potencialmente, 20% desenvolverão osteoporose (IBGE, 2004).

## 2.2 Fatores de risco para osteoporose

A diminuição progressiva da massa óssea que predispõe o indivíduo à osteoporose e suas consequências, está associada a diversos fatores que influenciam a densidade mineral óssea, tais como: idade, sexo, raça, hábitos de vida, entre outros.

Segundo JANZ (2002), a massa óssea aumenta substancialmente desde o nascimento até os primeiros anos de vida, sendo que na puberdade, esse incremento é mais rápido em garotos do que em garotas, sendo nessa faixa etária que alcançam o maior pico de massa.

No início da idade adulta, os ossos do esqueleto apendicular são maiores em homens e eles têm um córtex ósseo mais espesso (GARN e BOECHAT, 1970). A área seccional transversa nas vértebras é, também, 25% maior em homens (GILSANZ e BOECHAT, 1994).

A forma como a massa óssea é diminuída parece diferir entre homem e mulher tanto no esqueleto apendicular quanto no axial, primeiramente, mulheres perdem mais osso ao longo da vida do que o homem, principalmente, após a menopausa (RIGGS, 2000) e o córtex ósseo da mulher torna-se mais poroso (GARN e BOECHAT, 1970).

Mesmo que osteoporose seja mais freqüente em mulheres, os maiores fatores de risco para osteoporose em homens são hipogonadismo, corticoesteróides, excesso de álcool e mieloma múltiplo (PHILIPS e BRADDON, 2004).

O Instituto Nacional de Traumato-Ortopedia, do Ministério da Saúde, divulgou os dados do Programa de Osteoporose Masculina em 2004. O levantamento revelou que dos homens maiores de 50 anos que procuraram tratamento, 19,5% tinham osteoporose. Entre os homens com 80 anos ou mais, o número percentual de pacientes acometidos pela doença

chegava a 36,4%, enquanto que o grupo de homens com idade entre 50 e 59 anos apresentavam 11,6% de incidência (BRASIL, 2005).

Sabe-se que quanto maior a sobrevida do indivíduo, maior é o risco de desenvolver osteoporose, doença que acomete preferencialmente indivíduos idosos (SZEJNFELD, 2001).

Fatores genéticos também são responsáveis pelas variações na massa óssea em diferentes grupos étnicos e raciais. Indivíduos da raça negra possuem maior pico de massa óssea e, portanto, são menos predispostos a sofrerem de osteoporose que brancos e asiáticos (RADOMINSKI *et al.*, 2002).

As mulheres brancas possuem baixos índices de pico de massa óssea na idade adulta e apresentam maior prevalência de osteoporose. A incidência de fraturas de fêmur em mulheres brancas é duas vezes maior do que em mulheres negras (SZEJNFELD, 2001).

Os hormônios sexuais que mediam diretamente as ações dos osteoclastos e osteoblastos, inibindo o recrutamento dos osteoclastos, e consequentemente a perda óssea, também estão envolvidos nesse processo. O nível reduzido de estrogênio e androgênio interfere no cálcio intestinal e está associado a um negativo balanço de cálcio, resultando em um aumento na reabsorção óssea (HELGE e KANSTRUP, 2002).

Além disso, o estrogênio modula a homeostase do cálcio em vários sítios, incluindo a secreção do hormônio paratireoidano (PTH), metabolismo da vitamina D, síntese e secreção de absorção intestinal e renal de cálcio (NOTELOVITZ, 2002; PERRIEN, 2002).

Em situações de hipocalcemia o PTH atua sobre os ossos, rins e tubo digestivo. Nos ossos, age estimulando osteoclastos e osteócitos, que removem cálcio e fósforo através do processo de reabsorção óssea (VIANNA, 1988; ACOSTA-MARTÍNEZ e CARTER-BARTLETT, 1992). Nos rins, promove aumento da eliminação de fósforo e retenção de cálcio, respectivamente por redução e aumento da reabsorção tubular, e no intestino, favorece a absorção de cálcio indiretamente, via vitamina D ativa (VIANNA, 1988).

Outra situação relevante é a menopausa, que se inicia entre 45 e 55 anos de idade, é evento singular que ocorre devido à deficiência estrogênica e promove uma série de transformações ao organismo feminino (SZEJNFELD, 2001; CERQUEIRA e REZENDE, 2002). No início da deficiência ovariana, uma mulher perde 3 a 5% de massa óssea por ano (PRIOR *et al.*, 1997).

Nesta fase da vida, a perda de massa óssea nas mulheres é relacionada ao declínio agudo da produção ovariana de estrógeno, hormônio que tem ação protetora sobre o osso, por suprimir sua reabsorção, prevenindo a perda óssea e reduzindo o risco de fraturas (WHEDON, 1981; SZEJNFELD, 2001 e 2003; NCP, 2003). Esse efeito ocorre devido ao estrógeno que melhora a absorção de cálcio no trato intestinal, além de diminui a perda de cálcio pela urina (HEANEY *et al.*, 1989), promove aumento da forma ativa de vitamina D na circulação quando ele está em níveis elevados e também estimula a produção de calcitonina, que previne a remoção de cálcio do osso (RICHART e LINDSAY, 1987).

Alguns hábitos de vida podem contribuir para a ocorrência da osteoporose. O fumo, por exemplo, inibe a proliferação de células osteoprogenitoras (WADE, 2001; NOTELOVITZ, 2002). Sabe-se que mulheres fumantes apresentam níveis reduzidos de estrogênio e iniciam a menopausa mais precocemente do que mulheres não-fumantes (SZEJNFELD, 2001).

O consumo regular de álcool, como por exemplo, mais de dois drinques diárias, pode ser prejudicial para o tecido ósseo para ambos os sexos, pois o álcool é tóxico aos osteoblastos e acomete o ciclo de remodelação óssea (SZEJNFELD, 2001; YUAN *et al.* 2001).

A probabilidade de desenvolver osteoporose aumenta também com ingestão de duas ou mais xícaras de café por dia, quando combinada com uma baixa ingestão de cálcio. A alta ingestão de cafeína de qualquer fonte (café, chá, refrigerantes e outras bebidas), acelera a perda de cálcio na urina, aumentando o risco de fratura óssea (NIEVES, 2005).

Outro fator que interfere no processo de remodelação óssea e regulação de cálcio absorvido no osso é o uso de glicocorticoides. Eles estimulam as células osteoclásticas e inibem as osteoblásticas, reduzem a produção de estrogênio, com consequente diminuição da deposição de cálcio na matriz pelos osteoblastos (ISHIDA e HEERSCHE, 1998), conforme será descrito posteriormente.

Nesse contexto, a ingestão de vitamina D também é importante. Essa vitamina exerce várias funções, tais como a absorção de cálcio pelo intestino e auxílio no controle da deposição de cálcio no osso, além de promover o transporte ativo desse íon através do epitélio, aumentando a formação de proteína de ligação do cálcio nas células epiteliais do intestino, o que ajuda na absorção do mineral (RAYA, *et al.*, 2001).

A síntese de vitamina D<sub>3</sub> ocorre primariamente nos queratinócitos (células da epiderme da pele). Sob a influência da luz solar, o 7-desidrocolesterol é foto-convertido à pré-vitamina D<sub>3</sub> que é hidroxilada no fígado pela enzima 25-DH-D<sub>3</sub>, em reação dependente e NADPH e oxigênio, e transportada do fígado para o rim, onde ocorre outra hidroxilação, formando a 1,25 (OH<sub>2</sub>)-D<sub>3</sub>, que é a forma ativa, cuja função relaciona-se com o metabolismo de cálcio, conforme citado anteriormente (RAYA E TORRES, 2001; BLANCHET *et al.*, 2002).

Outro nutriente merece destaque no que diz respeito ao metabolismo ósseo. Trata-se da vitamina K, reconhecida por seu papel na cascata de coagulação sanguínea, mas que vem sendo apontada como tendo possível papel na prevenção da perda de massa óssea (WEBER, 1997).

Existem duas proteínas que contêm o ácido gama carboxiglutâmico (Gla) que são dependentes de vitamina K e estão associadas com a formação óssea: a osteocalcina e a proteína-Gla da matriz (PGM). O ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para PGM tem sido encontrado em vários tecidos, incluindo condrocitos, tecido vascular e epitélio, apresentando forte ação inibitória da calcificação tecidual (DORES e PAIVA, 2001).

A osteocalcina é sintetizada principalmente nos osteoblastos (DORES e PAIVA, 2001), representando em torno de 80% do conteúdo de Gla do tecido ósseo maduro. A osteocalcina humana carboxilada contém três resíduos de Gla que conferem alta afinidade aos íons de cálcio da molécula de hidroxiapatita (WEBER, 1997).

Além da g-carboxilação da osteocalcina, a vitamina K parece afetar outros parâmetros do metabolismo ósseo, tais como: excreção urinária de cálcio, produção de prostaglandinas E2 e interleucina-6 (WEBER, 1997).

Apesar de estudos apontarem possível papel da vitamina K na saúde óssea, resultados com pacientes em uso de anticoagulantes orais tendem a sustentar essa hipótese, já que o uso constante do medicamento, mantém um relativo estado de deficiência da vitamina e, por isso, deveriam apresentar riscos de desordens ósseas, fato que foi confirmado por CARABALLO *et al.* (1999), em um estudo no qual a exposição ao anticoagulante oral mostrou-se associada com baixa DMO na região ultradistal do osso rádio, porém não foi encontrado efeito sobre a região distal do rádio, espinha lombar ou fêmur.

O hábito da prática de atividades físicas promove um adequado desempenho dos sistemas cardíaco, respiratório, muscular e ósseo, contribuindo assim, para melhor qualidade de vida para o indivíduo (RITSON e SCOTT, 2001). Apesar da existência de intervenções médicas para osteoporose, atividade física é altamente recomendada como fator preventivo por reduzir a perdas e fraturas ósseas, melhorar a força muscular e prevenir quedas (CERQUEIRA e REZENDE, 2002).

Não estão totalmente esclarecidos os mecanismos pelos quais o esqueleto responde à atividade física, entretanto, sabe-se que há aumento de resistência óssea em resposta à aplicação de cargas mecânicas, assim como a diminuição da densidade óssea mineral na ausência das mesmas (CERQUEIRA e REZENDE, 2002).

Ossos e músculos respondem bem ao estresse físico, tornando-se maiores e mais fortes. Exercícios físicos provocam tensão física no corpo, ajudam a estimular o crescimento ósseo, preservar a massa óssea e, consequentemente, auxiliam na prevenção e tratamento da osteoporose (DALSKY *et al.*, 1988 e MARCUS, *et al.*, 1992).

### **2.3 Cálcio: aspectos gerais, metabolismo e adequação**

O cálcio é um mineral de extrema importância para o organismo, sobretudo para a mineralização óssea. Participa também de inúmeros processos orgânicos, tais como reações enzimáticas, liberação de hormônios e de neurotransmissores, excitabilidade neuromuscular e coagulação sanguínea (GOULDING *et al.*, 2001).

O corpo humano adulto contém aproximadamente 1.000 a 1.500 g de cálcio, dependendo do gênero, raça e tamanho do corpo, dos quais 99% são encontrados nos ossos na forma de hidroxiapatita, que confere rigidez ao esqueleto. Por essa razão, o cálcio é, provavelmente, o nutriente mais estudado na área de saúde óssea e considerado de grande relevância na prevenção e tratamento da osteoporose (DELMAS, 2002; ILICH e KERSTETTER, 2000).

Níveis adequados de cálcio podem retardar o desenvolvimento de osteoporose por duas razões. Primeiro porque o cálcio suprime a reabsorção óssea e segundo porque a calcificação ou mineralização óssea fortalece o osso. Sendo assim, para prevenir a redução da massa óssea, deve-se manter o equilíbrio entre a ingestão e absorção de cálcio e suas perdas.

Nos primeiros 20 a 25 anos de vida, a densidade mineral óssea (DMO) aumenta com a idade, até que o máximo (pico) de massa óssea seja alcançado. O pico de aquisição de massa óssea, geneticamente determinado, se dá até os 20 anos de idade, quando 90% do total é adquirido. Os 10% restantes se completam até os 35 anos de idade (KALACHE *et al.*, 1987).

Normalmente a metade da massa óssea de um adulto é adquirida durante a adolescência e, por isso, acredita-se que indivíduos com maior pico de massa óssea, alcançado nessa fase do desenvolvimento humano, podem apresentar menor risco de desenvolver osteoporose (ILICH e KERSTETTER, 2000). Assim sendo, é necessário que haja um consumo adequado de cálcio durante adolescência para garantir a massa óssea máxima dentro do perfil genético individual e a proteção dessa massa acumulada em idades avançadas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ e GARCÍA-COHEN, 2002).

A necessidade por uma dieta adequada em cálcio persiste mesmo depois que o crescimento tenha cessado, haja vista que esse mineral é perdido diariamente pelo corpo em quantidades consideráveis. Se essa perda não for compensada por uma quantidade correspondente, consumida via alimentação, o corpo rompe unidades de estrutura óssea no intuito de prover cálcio para circulação (HEANEY, 2000).

O cálcio é perdido através da pele, cabelo, unhas, suor, urina e secreções digestórias, em quantidades que vão de 4 a 8 mmol/dia, em adultos, dependendo da atividade física e de outros constituintes da dieta, como o sódio. Quando o cálcio absorvido da dieta de um adulto diminui e começa a se equilibrar com as perdas diárias, os níveis no sangue começam a decrescer, e uma cascata de eventos ocorre, começando pelo aumento da secreção de PTH, que reabsorve osso e libera os seus constituintes no sangue (HEANEY, 2000).

A inadequação da ingestão de cálcio compromete a mineralização e a manutenção óssea, promovendo, dessa forma, o agravamento da osteoporose. Alguns estudos sobre consumo alimentar mostram que, dos nutrientes avaliados, o cálcio é o que apresenta maior inadequação (GALEAZZI, *et al.*, 1997; MONTILLA *et al.*, 2003; SAMPAIO, 1997).

Algumas fontes alimentares e as recomendações nutricionais de cálcio para diversas faixas etárias estão representadas nos quadros 2 e 3, respectivamente.

**Quadro 2.** Teor de cálcio em leite e derivados em 100 g de alimento.

Alimento	Cálcio (mg)	Alimento	Cálcio (mg)
Leite de vaca desnatado	124	Iogurte natural desnatado	226
Leite em pó desnatado	1049	Leite condensado	262
Leite em pó semidesnatado	982	Queijo prato	1023
Leite em pó integral	994	Queijo tipo minas	685
Sorvete de leite	137	Queijo parmesão	1357
Iogurte semidesnatado, Com sabor de frutas	157	Queijo provolone	925

Fonte: FRANCO, 2001.

**Quadro 3.** Ingestão Dietética de Referência (DRI) para humanos, em diversas faixas etárias.

Faixa etária	mg de cálcio/dia
Lactentes: - do nascimento aos 6 meses	210
	270
Crianças: - 1 a 3 anos	500
	800
Crianças e Adolescentes: - 9 a 18 anos	1300
Adultos: - 19 a 50 anos	1000
	1200
Gestantes e Lactantes: - $\leq$ 18 anos	1300
	1000

Fonte: IOM, 2000.

Ao estudar as dietas de estudantes do período noturno de escolas do município de Santo André, de faixa etária entre 10 a 18 anos GAMBARDELLA (1995) verificou que mais de 60% das adolescentes e entre 48% a 60% dos adolescentes referiram ingerir menos de duas porções de alimentos lácteos diariamente, quantidade insuficiente para alcançar as recomendações do mineral.

O estudo realizado por LERNER *et al.* (2000) em adolescentes de Osasco-SP mostrou que apenas 6,2% dos homens e 2,8% das mulheres consumo de cálcio igual ou superior a 1.200 mg/dia. Assim como no estudo realizado por JAIME *et al.* (1997), com jovens universitários paulistas de 18 a 27 anos foi encontrado um consumo médio diário de 754,08 mg de cálcio/dia, o que representa apenas 62,84% de adequação para esse nutriente.

Um estudo feito por MONTILLA *et al.* (2003) revelou que um consumo de cálcio inadequado compromete ainda mais a saúde óssea da mulher no climatério. Esses autores verificaram a ingestão de cálcio em mulheres de 35 - 50 anos e 51 - 65 anos e observaram que 14,3% e 14,5%, respectivamente, conseguiram atingir a adequação de cálcio em suas dietas.

O mecanismo de absorção do cálcio é complexo e envolve diversos fatores, tais como: vitamina D, ATPase, fosfatase alcalina intestinal, fatores que aumentam ou diminuem sua solubilidade, proteína ligadora de cálcio no enterócito (calbindin), proteína ligadora de cálcio no plasma e outros (BOURDEAU e ATTIE, 1994; JOHNSON e KUMAR, 1994; TURNBERG e RILEY, 1993). Nesse processo, podem ser consideradas três etapas: intraluminal, intracelular e plasmática.

A quantidade de cálcio absorvida é determinada pela ingestão e pela capacidade de absorção intestinal. Se a ingestão é baixa, a absorção é alta, enquanto que em situações de alta ingestão a absorção é menor (NORMAN *et al.*, 1981).

Tem-se a absorção saturável transcelular, dependente de vitamina D, e a absorção não saturável intercelulares, que é dependente da concentração de cálcio intraluminal.

Nesta etapa há interferência de fatores na luz intestinal, aumentando ou reduzindo a absorção, tais como:

- **pH**

Para que o cálcio, mineral solúvel em meio ácido, mantenha-se em suspensão no conteúdo intestinal, meio alcalino que favorece a precipitação de cálcio, ele necessita estar preso a ligandinas (grupo carboxil ou grupos amino de proteínas e grupos quelados em cofatores ou enzimas).

Deve-se considerar, também, que em meio alcalino, aumenta a ligação cálcio-fosfato, formando fosfato de cálcio, que é insolúvel e eliminado pelas fezes. No intestino delgado, à medida que o pH aumenta em direção ao íleo, eleva-se a concentração do fosfato intestinal, havendo precipitação do cálcio e deficiência da absorção. Dessa maneira, sua maior absorção se dá ao nível de duodeno e jejuno proximal (TURNBERG e RILEY, 1993).

Em situações de acidose aumenta a concentração do íon cálcio, por haver diminuição da ligação cálcio-albumina, enquanto que na alcalose aumenta esta ligação, com consequente diminuição de cálcio iônico, que é fisiologicamente ativo (BOURDEAU e ATTIE, 1994).

- **Atividade de lactase, caseinato e citrato**

O cálcio é muito pouco solúvel em água e a forma em que é ingerido e o seu grau de solubilidade no conteúdo intestinal afetam a sua absorção. Entre 60% a 75% do cálcio ingerido diariamente estão contidos no leite e/ou derivados. Como o pH do leite é alcalino, o cálcio se mantém em suspensão pela formação de caseinato de cálcio, citrato de cálcio e complexado à lactose (CORMAN, 1993), que é um dissacarídeo formado pelos monossacarídeos glicose e galactose que, na borda em escova do enterócito, sofre ação da lactase, desdobrando-se nesses monossacarídeos e liberando o cálcio. Esses três componentes, lactose, caseinato e citrato, que mantêm a solubilidade do cálcio no leite, parecem explicar a sua melhor absorção em relação ao cálcio contido em outras formas alimentares (GRUDNER, 1997).

- **Aminoácidos e lipídios**

Dentre os aminoácidos, a lisina e a arginina favorecem a maior solubilidade do cálcio, com diminuição de formação do sal fosfato, o que favorece sua absorção (TURNBERG e RILEY, 1993).

Já em relação aos lipídios, sabe-se que os triglicerídeos de cadeia longa, presentes em ovos, manteiga, carnes gordas, leite integral, óleos e gorduras, por apresentarem um mecanismo de absorção mais complexo, diminuem o trânsito intestinal, possibilitando maior tempo de contato do cálcio com a mucosa e, consequentemente, a sua maior absorção (CORMAM, 1993). Em casos de pancreatites ou de doenças disabsortivas intestinais, nas quais a digestão de gorduras está prejudicada, ocorre a precipitação do cálcio, por formação de sais insolúveis (estearato de cálcio) e perda de vitamina D, que, sendo lipossolúvel, não é mantida em suspensão (CORMAM, 1993).

- **Ácido fítico, ácido oxálico, celulose, alginatos, álcool, antiácidos, bloqueadores da secreção ácida, colestiramina e tetraciclina**

Por meio da redução da solubilidade, esses compostos diminuem a absorção do cálcio, quer por alteração do pH, quer por formação de sais insolúveis, como fitato e oxalato de cálcio. O ácido fítico é encontrado em cascas de grão e cereais, como na aveia e soja, e se combina com o cálcio, formando fitato de cálcio. Já o ácido oxálico, encontrado no chocolate, na pimenta, em nozes, em algumas hortaliças, como folhas de beterraba, acelga, espinafre, cenoura, cebola verde, batata doce, em algumas frutas, como morango, laranja, figo e em bebidas, como chá e refrigerantes tipo “cola” (WEAVER *et al.*, 1991; AVIOLI, 1989), combina-se com o cálcio, formando oxalato de cálcio, que é um componente insolúvel e eliminado nas fezes (HEANEY, 2000).

No que diz respeito à etapa intracelular, sabe-se que absorção do cálcio intestinal ocorre 50% por mecanismos transcelulares e 50% por transferência passiva, através do espaço intercelular (JOHNSON e KUMAR, 1994). O transporte celular de cálcio é intenso no duodeno e jejuno proximal, ocorre em menor quantidade no cólon proximal, e pouco acontece no jejuno distal e no ileo, pela ausência de sistemas carreadores específicos dependentes de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (calcitriol) e de pH adequado nesses segmentos (COLSTON *et al.*, 1994; KARBACH, 1994). O transporte passivo intercelular ocorre entre as células do epitélio absorutivo, é dependente de alta concentração do cálcio intraluminal e independente de vitamina D.

O transporte transcelular de cálcio ocorre do lúmen intestinal em direção ao capilar sanguíneo, em sua maior parte por processo ativo, por diferença de potencial eletroquímico transepitelial, através da borda em escova do enterócito. Devido à alta concentração de cálcio no lúmen intestinal, em relação ao citoplasma do enterócito, há maior negatividade intracelular, com grande diferença de potencial eletroquímico favorecendo a entrada de cálcio na célula (LIANG *et al.*, 1991).

Na borda em escova, o cálcio liga-se à calbindina, importante para manutenção de cálcio em solução, já que é pouco solúvel em meio aquoso, processo regulado pela vitamina D, independentemente de transcrição genética (BOURDEAU e ATTIE, 1994).

A vitamina D interage na membrana plasmática da borda em escova, cuja camada lipídica tem baixa permeabilidade a íons bivalentes e trivalentes, abrindo os canais de cálcio (COLSTON *et al.*, 1994; JOHNSON e KUMAR, 1994). Isso parece dever-se ao aumento da síntese de fosfatidilcolina, a partir de fosfatidiletanolamina, na borda em escova, levando a aumento da fluidez da membrana citoplasmática e permeabilidade ao cálcio. Essa resposta é específica para a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e não a outros lipídios (LIANG *et al.*, 1991).

O cálcio é deslocado na célula em direção ao interior das organelas, mitocôndrias e retículo endoplasmático, onde é estabilizado e estocado em formas não cristalinas por ligandinas, como Mg-ATP e fosfocitrato (BOURDEAU e ATTIE, 1994).

Pela ação da neurotensina, serotonina e acetilcolina, há ativação da hidrólise do fosfatidil-inositol (PIP2), encontrado na membrana plasmática, originando o 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3), que se difunde para o interior da célula, estimulando a liberação do cálcio desses estoques, quando o mesmo necessita ser liberado para o exterior da célula (BOURDEAU e ATTIE, 1994).

Na membrana basolateral, o cálcio é liberado para o espaço intersticial por dois processos ativos: um dependente de Ca<sup>++</sup>-ATPase, no qual para hidrólise de cada molécula de ATP há efluxo de uma molécula de cálcio, processo este estimulado pela fosfatase alcalina intestinal, cuja atividade é aumentada pela 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e outro dependente de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-

ATPase, no qual para cada molécula de cálcio efluído há entrada de três moléculas de sódio na célula (BOURDEAU e ATTIE, 1994; JOHNSON e KUMAR, 1994).

Estes mecanismos de influxo e efluxo de cálcio e sódio regulam a concentração de cálcio intracelular. Na ausência desses mecanismos, as células não manteriam a concentração de cálcio e haveria acúmulo do íon no ambiente intracelular (BOURDEAU e ATTIE, 1994).

Trabalhos mostram que a absorção do cálcio pode ocorrer também no cólon, onde foram identificados receptores para 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> com características similares aos do delgado. Essa capacidade de absorver cálcio parece representar uma reserva funcional em situações em que há redução da absorção em consequência de ressecção ou doença extensa de delgado. Em condições normais, porém, não está bem definido se o cólon contribuiria significativamente nessa absorção (ELSHARYD *et al.*, 1995).

Ao entrar no capilar venoso, 45% a 50% do cálcio circulante apresenta-se ligado à proteína, sendo que 80% está ligado à albumina e os 20% à globulina. Outros 45% a 50% circulam em forma iônica e 8% estão complexados ao citrato, fosfato e sulfato (BOURDEAU e ATTIE, 1994).

Na circulação há três tipos de cálcio: cálcio ligado à albumina, que não é ultrafiltrável; cálcio complexado a citrato, sulfato ou fosfato, e cálcio iônico, que são ultrafiltráveis. O cálcio iônico, o único fisiologicamente ativo, conforme as necessidades orgânicas, passa para as células dos tecidos excitáveis e ao tecido ósseo (BOURDEAU e ATTIE, 1994).

A necessidade diária do mineral enfocada nesse estudo pode ser suprida pela ingestão de alimentos ricos ou suplementados com cálcio na forma biodisponível, ou através de suplementos farmacológicos ou ambos (BEDANI e ROSSI, 2005).

O NIH CONSENSUS CONFERENCE (1994), sobre o consumo adequado de cálcio, verificou que o cálcio, em doses de 1.500 mg/dia, ajuda na prevenção e no tratamento da osteoporose, concluindo que a administração de 2.000 mg de cálcio elementar/dia é segura para a maioria das pessoas. Enquanto a fonte preferencial de cálcio se dá pelo consumo de alimentos ricos em cálcio, como o leite e outros derivados, alimentos fortificados com cálcio e suplementos são outros meios pelos quais o consumo ótimo do cálcio pode ser alcançado (FISHBEIN, 2004).

Os suplementos de cálcio são geralmente apresentados na forma de sais ou combinações de sais, por exemplo, carbonato, citrato, lactato e fosfato, e em menor proporção gluconato, glubionato, gluceptato. Tais suplementos irão variar no conteúdo de cálcio, com maior percentual para carbonato de cálcio - CaCO<sub>3</sub> (40%). Outros sais, como citrato, lactato e gluconato fornecem 21%, 14% e 9,3% de cálcio, respectivamente (FISHBEIN, 2004).

Tem sido observado um aumento na eficiência de absorção de cálcio pela coingestão de CaCO<sub>3</sub> com alimentos em mulheres normais jovens e em idosos (HEANEY *et al.*, 1989).

## 2.4 Osteoporose induzida por glicocorticoides

Os glicocorticoides são hormônios de natureza esteróidica que atuam em vários órgãos e sistemas. O produto natural, o cortisol ou a hidrocortisona, é considerado o principal hormônio do córtex supra renal, e, a partir de modificações em sua molécula, foram sintetizados inúmeros derivados com atividade glicocorticóide maior e mais prolongada, cujas indicações terapêuticas são amplas (CORONHO *et al.*, 2001).

Esses hormônios, além de apresentarem vários efeitos sobre a resposta imune, propriedade antiinflamatória e imunosupressiva, quando administrados terapeuticamente, também estão associados com a perda óssea e um subsequente aumento de fraturas em humanos (PATTSCHAN *et al.*, 2001).

Os efeitos dos glicocorticoides sobre o tecido ósseo podem ser devido a diversos fatores, incluindo aumento da eliminação de cálcio renal e diminuição da absorção de cálcio

intestinal. Um balanço negativo de cálcio devido a mudanças no transporte de cálcio renal e intestinal é responsável pelo hiperparatireoidismo secundário em pacientes tratados com glicocorticoides (BIKLE e PILLAI, 1993; KLEIN *et al.*, 1977; LUKERT e RAISZ, 1990; REID, 1997). Sabe-se que a corticoterapia influencia negativamente o metabolismo renal de cálcio, aumentando a sua excreção urinária, devido à redução da reabsorção tubular renal (SEGAL e LANE, 1997).

No trato intestinal, a influência mais evidente é a diminuição de sua absorção, através da inibição do transporte ativo transcelular secundário ao antagonismo sobre a vitamina D. Entretanto, parece existir uma associação entre os níveis de glicocorticoides e a absorção de cálcio pelo duodeno, de tal forma que doses baixas aumentam, enquanto doses elevadas reduzem sua absorção (SEGAL e LANE, 1997).

O efeito estimulatório direto de glicocorticoides sobre a síntese e secreção de PTH tem sido observado *in vitro*: administração de dexametasona aumenta a secreção de PTH de células da paratireóide de cultura bovina e a secreção de PTH estimulada por cortisol de culturas de glândulas de paratiróide de rato (AU, 1976).

Concentrações baixas de esteróides sexuais na circulação em mulheres após a menopausa ou ovariectomizadas levam ao aumento da perda óssea. Entretanto, reposição hormonal pode prevenir essas mudanças. Na ausência de reposição hormonal, a osteoporose pode se desenvolver como um resultado de uma redução na formação óssea e estimulação na reabsorção óssea (DUCY *et al.*, 2000; SCHOT e SCHUURS, 1990; WEINSTEIN *et al.*, 2000). O efeito inibitório dos glicocorticoides sobre a síntese e secreção de hormônios sexuais também contribui para a osteoporose induzida por glicocorticoides.

Os glicocorticoides modificam a atividade metabólica e proliferativa das células ósseas. Eles inibem a osteoblastogênese e osteoclastogênese e reduzem a meia vida dos osteoclastos. Eles também são potentes repressores da função osteoblástica e provavelmente estimuladores da maturação dos osteoclastos. Em conjunto, estas mudanças conduzem à osteoporose induzida por glicocorticóide, principalmente devido à formação óssea reduzida. Um aumento na reabsorção óssea parece estar menos envolvido (PATTSCHAN *et al.*, 2001).

## 2.5 Tratamento da osteoporose

No Brasil, somente uma pessoa em três com osteoporose é diagnosticada, e destas, somente uma em cinco recebe algum tipo de tratamento (ZABAGLIA *et al.*, 2001).

Tanto para a prevenção como para o tratamento da osteoporose são recomendadas dietas ricas em cálcio. Mulheres na pré-menopausa, mulheres na pós-menopausa e homens necessitam ingerir cerca de 1000 a 1500 mg de cálcio/dia (SZEJNFELD, 2004).

MEINÃO *et al.* (1998) relatam que a suplementação de cálcio nas doses de 1.000 mg/dia em mulheres na pós-menopausa diminui a perda de massa óssea em até 50%. Mulheres que receberam 1.000 a 2.000mg de cálcio por dia durante um ano, quando comparadas a mulheres que receberam placebo apresentaram uma diminuição significativa da perda óssea em coluna lombar, entretanto esse efeito benéfico se perdeu no segundo ano da terapêutica.

Além da ingestão adequada de cálcio, recomenda-se exposição solar e ingestão de alimentos ricos em vitamina D que assegurem o mínimo recomendado de 400 a 800 UI/dia (ZABAGLIA *et al.*, 2001).

Na terapia de tratamento de osteoporose muitas vezes se faz necessário o uso de fármacos, dentre estes o estrogênio, calcitonina, raloxifeno, alendronato e risedronato.

Os estrogênios atuam na diminuição da reabsorção óssea, previnem a perda de osso trabecular e cortical, reduz em 50% o risco de fratura em qualquer sítio esquelético e aumentam a densidade óssea da coluna (5 a 6%) e fêmur (2 a 3%). Os maiores efeitos

ocorrem em mulheres com perda óssea recente ou acelerada. Esta terapia de reposição hormonal (TRH) pode ser utilizada em qualquer momento após a menopausa, porém é mais eficaz quando ministrada a mulheres mais jovens nos primeiros anos após a menopausa quando ainda não ocorreu grande perda da densidade óssea (ZABAGLIA *et al.*, 2001).

Embora existam evidências de que os estrogênios em doses adequadas sejam eficazes no tratamento da osteoporose, tem sido estabelecida uma relação entre TRH e maior risco de ocorrência de câncer de pulmão e problemas cardíacos. Assim, atualmente, recomenda-se doses baixas de TRH para reduzir sintomas próprios da menopausa e prevenir a perda de massa óssea (YASUI *et al.*, 2003).

A calcitonina altera a motilidade citoplasmática dos osteoclastos inibindo sua atividade de reabsorção óssea. A calcitonina utilizada atualmente na prática clínica é um hormônio sintético proveniente do salmão, considerado 50-100 vezes mais potente que a calcitonina humana. Deve ser utilizada em homens ou mulheres após a menopausa com osteoporose de coluna, associada ou não a fratura aguda vertebral. Estudos sugerem que doses de 200 UI/dia de calcitonina reduzem o risco de novas fraturas vertebrais em 30%, sem, no entanto, qualquer efeito sobre as fraturas não vertebrais (ZABAGLIA *et al.*, 2001).

Outro fármaco é o raloxifeno que reduz a reabsorção óssea, previne a perda óssea na coluna e fêmur, aumenta a densidade óssea da coluna (1,5%) e do fêmur (1,5%) e reduz em 50% o risco de fratura na coluna. Sua utilização foi aprovada apenas para a prevenção da osteoporose e não para o tratamento da osteoporose estabelecida (ZABAGLIA *et al.*, 2001).

O alendronato foi o primeiro bisfosfonato largamente utilizado que apresentou dados convincentes sobre sua eficácia na redução de fraturas de pacientes com osteoporose. Ele diminui o número e a atividade dos osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea, aumenta a densidade óssea da coluna (3 a 5%) e do fêmur (2 a 3%) e reduz a perda óssea do antebraço em 50%. Cerca de 86% dos pacientes apresentam algum aumento de densidade óssea (ZABAGLIA *et al.*, 2001). O alendronato reduz significativamente a incidência de todas as fraturas clínicas em pacientes com história de fraturas vertebrais (DELMAS, 2002).

Outro bisfosfonato é o risedronato que também revela ser eficaz na redução de fraturas de pacientes osteoporóticos. Esse fármaco é capaz de reduzir o risco de novas fraturas vertebrais em 49% em comparação com o grupo-controle após três anos de tratamento, com redução de 61% no primeiro ano de terapêutica. O risco de fraturas não vertebrais foi reduzido em 33% após três anos de tratamento. O risedronato tem ação mais rápida e é mais bem tolerado que o alendronato. Ambos são contra-indicados em pacientes com doença gastrintestinal ativa ou com alterações estruturais do esôfago (ZABAGLIA *et al.*, 2001).

A teriparatida, que é a fração amino-terminal do hormônio da paratireóide (PTH), é um medicamento que se propõe a reverter alterações esqueléticas que ocorrem na osteoporose através do estímulo direto sobre a formação óssea, ativando osteoblastos da superfície óssea e prolongando a vida média dos osteoblastos ativos. Sua ação se dá tanto no osso cortical quanto no trabecular (ZABAGLIA *et al.*, 2001). Estudo multicêntrico que incluiu 1.637 mulheres na pós menopausa portadoras de fraturas vertebrais prévias, seguidas por um período de 21 meses, demonstrou ganho de massa óssea em 10% dos casos e redução de 65% de fraturas vertebrais e 53% de fraturas extraverterbrais (NEER *et al.*, 2001).

## 2.6 Biodisponibilidade de minerais

A composição dos alimentos é uma indicação muito significante do seu valor nutritivo, contudo não é suficiente para uma caracterização completa do ponto de vista nutritivo, isso porque raríssimos são os nutrientes que, contidos nos alimentos, tornam-se totalmente disponíveis ao organismo após a sua ingestão (COZZOLINO, 1997).

A porção disponível de qualquer nutriente é aquela que é absorvida em uma forma que possa ser utilizada pelo organismo em seu metabolismo celular (COZZOLINO, 1997). Os fatores mais importantes que interferem na biodisponibilidade dos nutrientes são: digestibilidade, absorção, complexação e presença de substâncias tóxicas (SANTOS *et al.*, 2004).

Em relação aos minerais, existe uma grande variação de disponibilidade biológica que depende, principalmente de: natureza química do composto mineral; complexação com outras substâncias contidas nos alimentos; natureza química do composto formado; e competição de dois ou mais elementos pelo mesmo sítio de ação ou mecanismo de absorção (SGARBIERI, 1987).

A importância da determinação da biodisponibilidade de minerais em dietas está centralizada no estabelecimento das recomendações de ingestão desses elementos em função das necessidades dos indivíduos. Assim, os estudos da biodisponibilidade de nutrientes devem ser específicos para cada região, tendo em vista a grande diversidade de dietas e de indivíduos (COZZOLINO, 1997).

O teor e a biodisponibilidade de cálcio variam muito nos diversos alimentos, sendo que um grande número de fatores influencia no aproveitamento desse elemento presente nas refeições. Por exemplo, o leite de vaca e derivados se constituem nas fontes mais ricas e com maior percentual de absorção desse mineral. Porém, outros alimentos, quando ingeridos em quantidades adequadas, podem contribuir consideravelmente para o fornecimento de cálcio, de forma aproveitável, aos indivíduos (COZZOLINO, 1997).

Diversos fatores podem prejudicar o aporte adequado de cálcio, dentre eles, podem-se citar as interações negativas que ocorrem entre o mineral e demais componentes dos alimentos, como o ferro, proteínas, sódio e fitatos, acarretando redução de sua biodisponibilidade na dieta (WEAVER e HEANEY, 2003).

Devido à relação entre deficiência de cálcio e osteoporose, a suplementação deste macromineral tem sido utilizada em mulheres adultas com vistas a minimizar perdas ósseas associadas à idade e ao desenvolvimento da osteoporose (DAWSON-HUGHES *et al.*, 1986). Da mesma forma, produtos alimentícios têm sido fortificados com cálcio, especialmente leite e produtos a base de leite (WOOD e ZHENG, 1997). Entretanto, um potencial efeito adverso do cálcio quando oferecido com a refeição é a diminuição na absorção de minerais traços (DAWSON-HUGHES *et al.*, 1986).

Os efeitos da suplementação de cálcio sobre a absorção do ferro têm sido documentados em alguns estudos. DAWSON-HUGHES *et al.* (1986) verificam os efeitos da suplementação de 500mg de cálcio elementar (carbonato de cálcio e hidroxiapatita) sobre a absorção de 3,6mg de ferro não-heme em mulheres pós-menopausa. Os mesmos observaram uma redução de 50% a 60% na absorção do ferro de uma refeição (café da manhã) marcada extrinsecamente com Fe, contendo também 227mg de cálcio.

Da mesma forma, COOK *et al.* (1991) observaram uma redução na absorção do ferro não-heme de uma refeição composta por hambúrguer quando da suplementação de 600mg de cálcio na forma de citrato de cálcio ou fosfato de cálcio. Na forma de carbonato de cálcio não houve redução na absorção.

A interação entre cálcio e zinco também foi estudada por DAWSON-HUGHES *et al.* (1986). Esses autores avaliaram o efeito de suplementação de 500mg de cálcio elementar (carbonato de cálcio e hidroxiapatita) sobre o zinco (3,62mg), porém não foi observada redução na absorção deste mineral.

Segundo WOOD e ZHENG (1997), estudos sobre o assunto têm mostrado resultados controversos. Os mesmos autores avaliaram o efeito da ingestão de grandes quantidades de cálcio sobre a absorção do zinco em mulheres pós-menopausa que receberam uma dieta padronizada contendo 17,6mg de zinco e 890mg de cálcio por dia e, após 12 dias, receberam

mais 468mg de cálcio na forma de um alimento ou de um suplemento (fosfato de cálcio). O balanço de zinco foi significativamente reduzido durante o tratamento com altas doses de cálcio. Em um segundo estudo, a ingestão de 600mg de cálcio junto com a refeição diminuiu a absorção de zinco em 50%, concluindo que as dietas com altos teores de cálcio parecem aumentar as necessidades de zinco em adultos.

Outro mineral que está intimamente associado ao cálcio na nutrição humana é o fósforo. Para ajudar a manter o equilíbrio normal sérico cálcio-fósforo, a quantidade de fósforo na dieta devem ser equilibradas na proporção 1:1. Entretanto, suplementos de cálcio ou mesmo elevadas ingestões de cálcio podem comprometer este equilíbrio e alterar a absorção do fósforo (WILLIAMS, 1997).

Os efeitos do cálcio no metabolismo do fósforo foram estudados em adultos por SPENCER *et al.* (1984), utilizando 200, 800 e 2000 mg/dia de cálcio e 200 e 800mg/dia de fósforo. A adição de diferentes quantidades de cálcio levou a uma significante diminuição na excreção urinária de fósforo e a um aumento na excreção fecal de fósforo.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Matéria-prima

Cascas de ovos de galinha (*Gallus gallus*, L.) oriundas de processo fabril foram fornecidas pela indústria de alimentos Sohovos AB Brasil - Sorocaba - SP para a realização deste trabalho. Foram coletadas, acondicionadas em caixas térmicas de Isopor® com gelo seco e transportadas até o Laboratório de Processamento de Alimentos do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### 3.1.2 Animais de experimentação

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 63 ratas adultas (*Rattus norvergicus*), da linhagem *Wistar*, variedade *Albinus*, ordem *Rodentia mammalia*, família *Muridae*, provenientes da colônia do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (LCE/UERJ), local onde receberam ração apropriada para ratos e água *ad libitum*, até atingirem o peso ideal para o início do experimento.

#### 3.1.3 Biotério

O biotério do LCE/UERJ era dotado de sistema de exaustão e fotoperiodismo (ciclo claro e escuro de 12 em 12 horas), climatizado, com temperatura constante de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , bancadas para o manuseio de animais e sala para realização de procedimentos cirúrgicos.

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Manuseio das cascas de ovos

##### 3.2.1.1 Higienização das cascas de ovos

As cascas de ovos foram inicialmente lavadas em água corrente sob pressão até a remoção completa das sujidades macroscopicamente visíveis. Em seguida, foram imersas por 15 minutos em água clorada com 150 ppm de cloro residual livre (CRL), cujo pH foi ajustado para 6 com HCl. Posteriormente à drenagem da água clorada, as cascas foram imersas em água declorada até a remoção total do CRL, avaliado pelo método colorimétrico da o-tolidina (PALIN, 1950). Após a remoção total do CRL, as cascas foram centrifugadas a 2.000 rpm durante 8 minutos para drenagem máxima da água declorada.

##### 3.2.2 Obtenção da casca de ovo em pó

Devidamente higienizadas, as cascas foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar aquecido a  $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Depois de desidratadas, foram trituradas com auxílio de moinho de facas até que as partículas atravessassem peneiras de malhas 0,25 mm. O pó obtido foi acondicionado em sacos de polietileno com alta barreira ao vapor d'água e armazenado à temperatura ambiente e na presença de luz.

### **3.2.3 Determinação da composição centesimal**

Para determinação da composição centesimal foram mensurados os teores de umidade, cinzas, extrato etéreo total, proteína bruta e carboidratos, conforme detalhamento abaixo. As dosagens foram realizadas em triplicata, sendo registradas as médias encontradas.

#### **3.2.3.1 Umidade**

A umidade foi determinada por gravimetria e constou de pesagens de alíquotas em pesa-filtros. Cada pesa-filtro foi previamente tarado, adicionado da amostra e aquecido em estufa a  $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$  até a obtenção de peso constante (IAL, 2005). Os resultados foram expressos em g de umidade/100g de amostra.

#### **3.2.3.2 Resíduo mineral fixo (RMF) ou cinzas**

Foi determinado através de prévia carbonização de alíquotas até a formação de carvão e posterior incineração em mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  a fim de eliminar completamente o carvão (IAL, 2005). Os resultados foram expressos em g de cinzas/100g de amostra.

#### **3.2.3.2 Nitrogênio total e proteína bruta**

Para determinação do nitrogênio total, alíquotas foram submetidas as etapas de digestão, destilação e titulação de acordo com os procedimentos sugeridos pelo método de Kjeldahl (IAL, 2005). O teor de proteína bruta foi calculado através da multiplicação do teor de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,25. Os resultados foram expressos em g de proteína total ou bruta/100g de amostra.

#### **3.2.3.3 Fração Nifext**

A fração Nifext foi determinada pela diferença entre 100 e o somatório dos teores dos demais macronutrientes (IAL, 2005). Os resultados foram expressos em g de carboidratos/100g de amostra.

#### **3.2.3.4 Extrato etéreo total ou lipídios**

A extração da fração lipídica foi realizada com auxílio de um extrator de Soxhlet, sendo utilizado éter etílico como solvente e a quantificação foi realizada por gravimetria (IAL, 2005). Os resultados foram expressos em g de lipídeos totais/100g de amostra.

#### **3.2.4 Valor energético total (VET)**

O VET foi calculado através da soma dos produtos do número de gramas de proteínas e de carboidratos multiplicada por quatro (4 kcal/g), e do número de gramas de lipídios multiplicada por nove (9 kcal/g), sendo o resultado desta soma expresso em kcal/100g de amostra (KRAUSE e MAHAN, 2002).

#### **3.2.5 Perfil em aminoácidos**

A determinação do perfil de aminoácidos foi realizada no laboratório da EMBRAPA-Agroalimentos do Rio de Janeiro segundo a metodologia preconizada pela AOAC (2000). Os

aminoácidos foram obtidos após hidrólise de alíquotas de casca de ovo em pó com HCl 6M por 24h a  $110 \pm 1^\circ\text{C}$  em ampolas seladas a vácuo. Os hidrolisados foram evaporados em dessecador contendo pastilhas de NaOH e, posteriormente, suspensos em tampão citrato pH 2,2. Então foi realizada a determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção fluorimétrica após derivatização com 6-aminoquinolyl-N-succinimidyl carbamate, em coluna de resina de troca catiônica e derivatização pós-coluna com ninidrina em auto-analisador de aminoácidos Hewlett Packard, modelo 1090M, equipado de coluna de 200mm de comprimento, contendo resina de troca iônica de sódio, com a injeção de 25 $\mu\text{L}$  da amostra e operando em condições para hidrolisados protéicos (fluxo de 1mL/min, à temperatura de 25 $^\circ\text{C}$ ) (SPACKMAN *et al.*, 1958). Os resultados foram expressos em g de aminoácidos por 100 gramas (g/100g).

### **3.2.6 Determinação do teor de minerais**

A determinação do perfil de minerais foi realizada no Laboratório de espectrofotometria do Instituto de Química da Pontifícia Universidade Católica (PUC) do Rio de Janeiro. As amostras secas, pesando  $5 \pm 0,0035\text{g}$ , foram calcinadas em mufla a 550 $^\circ\text{C}$ , por período mínimo de 2 horas e as cinzas obtidas foram dissolvidas em HCl 2mol/L. Então foram analisadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado no modo semi-quantitativo, utilizando o equipamento ELAN 6000 da Perkin Elmer-Sciex (AOAC, 2000). Os resultados foram expressos em mg do mineral correspondente/100g de casca de ovo em pó.

### **3.2.7 Análise microbiológica da casca de ovo em pó**

A casca de ovo em pó foi submetida a análises microbiológicas realizadas no Departamento de Tecnologia de Alimentos do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sendo pesquisados bactérias mesófilas aeróbias, bolores e leveduras, coliformes a 35  $^\circ\text{C}$  e a 45  $^\circ\text{C}$  e *Salmonella spp.*, conforme procedimentos descritos a seguir:

#### **3.2.7.1 Bactérias mesófilas aeróbias**

A pesquisa de bactérias mesófilas aeróbias (contagem total em placa) foi feita baseada no método descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (MORTON, 2001).

Amostras de 10 g de casca de ovo em pó foram retiradas assepticamente das embalagens e homogeneizadas com 90 mL de água peptonada para o preparo de diluições até 10<sup>-6</sup>. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram pipetadas em placas de Petri estéreis, em duplicita. O meio de cultura ágar padrão para contagem (PCA), pH 7,0, foi vertido sobre a alíquota já pipetada e homogeneizada em movimentos suaves. Após a solidificação do ágar à temperatura ambiente, as placas foram incubadas em posição invertida a 35 - 37  $^\circ\text{C}$  /48 horas. Depois da incubação, somente placas de mesma diluição que apresentaram entre 25 - 250 colônias foram consideradas para a contagem. Os resultados foram expressos em UFC/g de casca de ovo em pó.

#### **3.2.7.2 Bolores e leveduras**

A pesquisa de bolores e leveduras foi realizada com base no método descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (BEUCHAT e COUSIN, 2001).

Amostras de 10 g de casca de ovo em pó foram retiradas assepticamente das embalagens e homogeneizadas com 90 mL de água peptonada para o preparo de diluições até  $10^{-6}$ . Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram pipetadas em placas de Petri estéreis, em duplicata. O meio de cultura usado foi o ágar batata dextrose (ABD), acidificado com solução esterilizada de ácido tartárico a 10% para ajuste de pH, a  $3,5 \pm 0,1$ , que foi vertido em placas de Petri estéreis e homogeneizado em movimentos suaves. Após a solidificação do ágar à temperatura ambiente, as placas foram incubadas em posição invertida, a  $20 - 25^{\circ}\text{C}$  por 3 a 5 dias. Após incubação, foram consideradas para a contagem, somente placas de mesma diluição que apresentassem entre 25 - 250 colônias. Os resultados foram expressos em UFC/g de casca de ovo em pó. A contagem não foi expressa separadamente para bolores e leveduras e as análises foram feitas em duplicata.

### **3.2.7.3 Coliformes a $35^{\circ}\text{C}$ e coliformes a $45^{\circ}\text{C}$**

A pesquisa de coliformes a  $35^{\circ}\text{C}$  e a  $45^{\circ}\text{C}$  foi efetuada em meios de cultura líquidos, por colorimetria, através da técnica do número mais provável (NMP) em duplicata, método descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (KORNACKI e JOHNSON, 2001). As três etapas que foram realizadas: Teste presuntivo para detectar a presença de microorganismos do grupo coliforme; Teste confirmativo para inibir o crescimento de bactérias que não fossem do grupo coliforme; e Teste de coliformes a  $45^{\circ}\text{C}$ , para detectar a presença de coliformes fecais.

Amostras de 10 g de casca de ovo em pó foram retiradas assepticamente das embalagens e homogeneizadas com 90 mL de água peptonada para o preparo de diluições até  $10^{-6}$ . Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram pipetadas para uma série de três tubos de caldo lauril sulfato triptose (LST), pH 6,8. Após a homogeneização e incubação dos tubos a  $35^{\circ}\text{C}/48$  horas foram observados a produção de gás, sendo considerados positivos os tubos que assim apresentaram. Com auxílio da tabela do número mais provável (NMP) para 3 diluições com 3 tubos em cada diluição, os resultados foram expressos em NMP de coliformes/10 g de casca de ovo em pó.

### **3.2.7.4 *Salmonella* spp.**

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi baseada na metodologia proposta no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (WALLACE *et al.*, 2001) e realizada em duplicata.

Foram transferidos, assepticamente, 25 g de casca de ovo em pó para 225 mL de caldo lactosado e incubado a  $35 - 37^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas. Após o período de pré-enriquecimento, 10 mL desse meio foram transferidos, assepticamente, para 90 mL de caldo selenito-cistina, pH 7,0 e para 90 mL de caldo tetracionato verde brilhante (Caldo TT). Após completa homogeneização foram incubados a  $42,5^{\circ}\text{C}$  por 24 h em banho maria. Partindo do enriquecimento seletivo, com auxílio de alça de platina, foram feitas estrias nos meios: ágar verde brilhante (Ágar BG); ágar xilose lisina-desoxicolato (Ágar XLD); ágar para enterobactérias segundo Hektoen, pH  $7,5 \pm 0,1$ ; ágar *Salmonella-Shigella* (Ágar SS), pH  $7,0 \pm 0,1$  e ágar Rambach, pH  $7,3 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . Todas as placas foram incubadas a  $35 - 37^{\circ}\text{C}$  por 24 h e depois avaliadas para verificar a presença de colônias características.

### 3.2.8 Avaliação do rendimento da casca de ovo em pó ( $\eta$ )

O rendimento do processo de obtenção da casca de ovo em pó foi obtido pela razão entre a massa de cascas de ovos em pó produzido (mf) e a massa de cascas de ovos antes da secagem (mi), calculado pela equação 01.

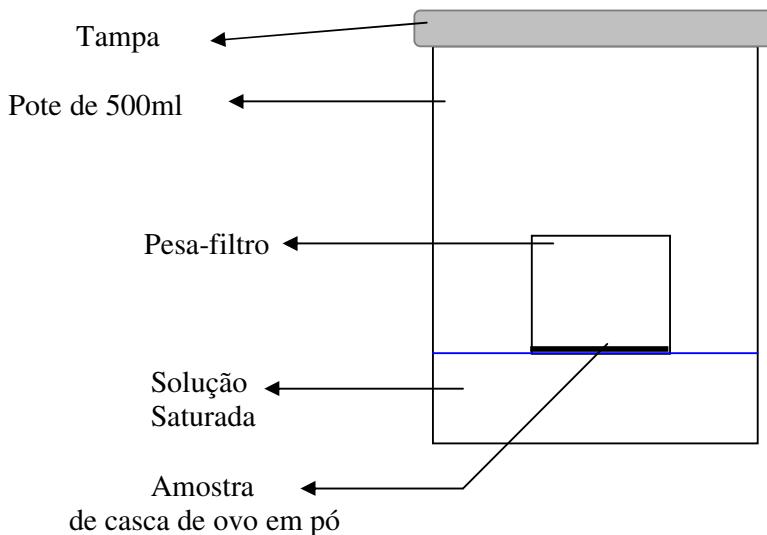
$$\eta = mf/mi$$

**Equação 01.** Cálculo do rendimento do processo de obtenção da casca de ovo em pó.

### 3.2.9 Curvas de adsorção e desorção da casca de ovo em pó

A curva de adsorção da casca de ovo em pó foi determinada a partir da obtenção da umidade de equilíbrio entre a amostra e o ar. A metodologia utilizada está ilustrada na Figura 1 e se fundamenta na modificação do método estático dos dessecadores sob vácuo, proposto por KIMURA (1992) e já utilizado por PENA *et al.* (1994) e TOSTES *et al.* (1994).

Foram utilizados potes de vidro de 500 mL, e cada um deles, recebeu uma solução saturada (Quadro 4) que propiciou a obtenção de umidades relativas na faixa de 7% a 87%, nas quais as amostras foram expostas.



**Figura 1.** Representação esquemática para obtenção das umidades de equilíbrio.

**Quadro 4.** Soluções saturadas utilizadas para a obtenção das respectivas umidades relativas.

Sais utilizados	Umidade relativa (%)
NaOH	7
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	33
NaBr	57
NaCl	75
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	81
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	87

**Fonte:** KIMURA, 1992; PENA *et al.*, 1994 e TOSTES *et al.*, 1994.

### 3.2.10 Tamanho das partículas da casca de ovo em pó

A análise da distribuição do tamanho das partículas da casca de ovo em pó seguiu os procedimentos descritos por ASCHERI *et al.*, 2006. A determinação realizada na unidade de dispersão líquida do equipamento Laser Particle Sizer Analysette 22 (Fritsch, Idar-Oberstein, Alemanha), o qual utiliza o princípio da difração a laser, produzindo laser hélio-neon no comprimento de onda de 632 nm. As frações granulométricas foram adicionadas lentamente, usando álcool isopropílico como agente dispersor, sob agitação constante, até que 7% de obscuridade do feixe de laser fosse alcançada para início da leitura.

### 3.2.11 Avaliação da utilização biológica do cálcio da casca de ovo em pó

#### 3.2.11.1 Preparação das rações

Foram preparadas sete rações para ratos adultos no Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal Fluminense, tendo sido adotado como padrão dietético o protocolo para manutenção de cobaias de laboratório do Instituto Americano de Nutrição de 1993 (AIN 93 M) (REEVES *et al.*, 1993).

As misturas salina e a vitamínica para o grupo controle (grupo 1) e para o grupo 2 seguiram os padrões da AIN 93 M, enquanto que para os demais grupos foram diferenciadas conforme apresentado na tabela 1.

Inicialmente, para cada tipo de ração, foi realizada a pesagem de todos os ingredientes que foram transferidos a uma batedeira sob agitação constante, considerando a densidade (do mais leve para o mais pesado) como a seqüência de adição dos ingredientes. Ainda sob agitação, foi acrescentada água fervente aos poucos até formar uma massa com textura lisa que foi peletizada em formatos cilíndricos.

Os *pelletes* obtidos foram espalhados em bandejas de aço inoxidável e desidratados em secador de bandejas, onde o ar de secagem foi insuflado a 55-60°C até a obtenção de residual de umidade em torno de 5 a 8%.

**Tabela 1.** Rações oferecidas aos diferentes grupos experimentais.

Grupos de animais	Rações
Grupo 1 (Controle sem osteoporose)	Ração de manutenção para ratos adultos (AIN 93 M)
Grupo 2 (Controle com osteoporose)	Ração de manutenção para ratos adultos (AIN 93 M)
Grupo 3 (com osteoporose)	Ração de manutenção para ratos adultos (AIN 93 M), sendo o cálcio da mistura salina substituído pela casca de ovo em pó até atingir o nível de cálcio recomendado pela AIN 93 M. A mistura vitamínica não sofreu alterações.
Grupo 4 (com osteoporose)	Ração de manutenção para ratos adultos (AIN 93 M), sendo o cálcio da mistura salina substituído pela casca de ovo em pó até atingir o nível de cálcio recomendado pela AIN 93 M acrescido de 50%. A mistura vitamínica não sofreu alterações.
Grupo 5 (com osteoporose)	Ração de manutenção para ratos adultos (AIN 93 M), sendo o cálcio da mistura salina substituído pela casca de ovo em pó até atingir o nível de cálcio recomendado pela AIN 93 M acrescido de 50%. A mistura vitamínica isenta de vitaminas D e K.

Continuação - Tabela 1. Rações oferecidas aos diferentes grupos experimentais

Grupo 6 (com osteoporose)	Ração de manutenção para ratos adultos (AIN 93 M), sendo o cálcio da mistura salina substituído pela casca de ovo em pó até atingir o nível de cálcio recomendado pela AIN 93 M acrescido de 50%. A mistura vitamínica isenta de vitamina K.
Grupo 7 (com osteoporose)	Ração de manutenção para ratos adultos (AIN 93 M), sendo o cálcio da mistura salina substituído pela casca de ovo em pó até atingir o nível de cálcio recomendado pela AIN 93 M acrescido de 50%. A mistura vitamínica isenta de vitamina D.
Grupo 8 (com osteoporose)	Ração de manutenção para ratos adultos (AIN 93 M), sendo o cálcio da mistura salina substituído pela casca de ovo em pó até atingir o nível de cálcio recomendado pela AIN 93 M acrescido de 50%. A mistura vitamínica suplementada até atingir os níveis de 150% da recomendação pela AIN 93 M de vitaminas D e K

### 3.2.11.2 Modificações nas misturas salina e vitamínica

As quantidades de casca de ovo em pó adicionadas nas rações foram determinadas de acordo com o teor de cálcio encontrado no produto em estudo, sendo utilizada como substituinte da fonte de cálcio da mistura salina, tendo como base a ração de manutenção AIN 93 M. A quantidade de cálcio na ração do grupo 3 foi suficiente para atender o teor desse mineral preconizado pelo mesmo protocolo. As rações dos grupos 4,5,6,7 e 8, além da quantidade de casca de ovo em pó para atingir o nível sugerido pela AIN 93 M teve um incremento, visando promover uma suplementação desse mineral ao nível de 50%.

A suplementação de vitaminas D foi determinada com base na recomendação dessa vitamina para humanos em situações de risco para osteoporose. Homens e mulheres devem ingerir de 200 (até 50 anos) a 400 UI/dia (50-70 anos) de vitamina D, quando a exposição solar for menor que 15 minutos diários (IOM, 2000). Mulheres após os 70 anos devem receber 600 UI/dia (IOM, 2000), ou seja 3 vezes a mais do que na idade adulta. A quantidade de vitamina K adicionada seguiu o mesmo raciocínio, sendo suplementada em 3 vezes a mais em relação a recomendação na fase adulta, sendo considerado nos dois casos as recomendações da AIN 93 M (REEVES *et al*, 1993), visto que o ensaio experimental foi realizado em ratas.

### 3.2.11.3 Ensaio experimental

Conforme descrito anteriormente, para a realização do ensaio experimental realizado no LCE/UERJ e submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRRJ, sob o número de protocolo 23083.6935/2008-98, foram utilizadas 63 ratas adultas que foram mantidas em gaiolas coletivas, forradas com cama de maravilha, contendo cada gaiola sete animais que receberam ração comercial para ratos adultos e água *ad libitum* até atingirem o peso entre 200 e 230g.

#### 3.2.11.3.1 Obtenção dos dados basais

Ao atingirem o peso estipulado para o desenvolvimento do ensaio, sete animais, escolhidos aleatoriamente, foram mortos por sobredose anestésica de 30mg/kg de peso corporal de tiopental sódico, via intraperitoneal, para a determinação de cálcio, fósforo e

magnésio ósseo basal, além de dados hematológicos e bioquímicos basais, cujos métodos serão descritos posteriormente.

### 3.2.11.3.2 Indução da osteoporose

Os demais animais foram submetidos ao processo de indução da osteoporose, que consistiu em dois procedimentos. O primeiro foi o procedimento cirúrgico de ooforectomia bilateral, no qual as ratas foram anestesiadas por meio do uso de cloridrato de quetamina (40 mg/mL) e cloridrato de xilazina (10mg/mL), na proporção de 1:0,5 mL, na dose de 0,1 mL/100g de peso corporal, via intramuscular. Em seguida, foram posicionadas na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, para a realização da tricotomia abdominal, tendo-se o cuidado de limpar a área a ser tricotomizada com água e sabão neutro e assepsia com iodopovidine após o procedimento, como visto na figura 2.

Após o procedimento descrito, foi realizada uma laparotomia mediana (Figura 3). Com o auxílio do bisturi, realizou-se a incisão e dissecção do plano muscular e foi exposta a cavidade peritoneal (Figura 4). Procedeu-se a identificação dos ovários que foram expostos, identificados (Figura 5) e excisados (Figura 6), por meio da ligadura da parte superior da trompa com fio de ácido poliglicólico 2-0 (Figura 7). A parede abdominal foi fechada com sutura contínua em dois planos, um envolvendo peritônio e musculatura (Figura 8) e outro envolvendo tecido subcutâneo e pele, com fio de ácido poliglicólico 3-0 (Figura 9). Os animais do grupo controle foram submetidos a uma operação simulada, mas sem excisão de seus ovários. Nesse procedimento, houve o cuidado de manter os animais contidos pelo menor tempo possível, tendo a contenção química eficiente por esse período que durou cerca de dez minutos para cada animal.

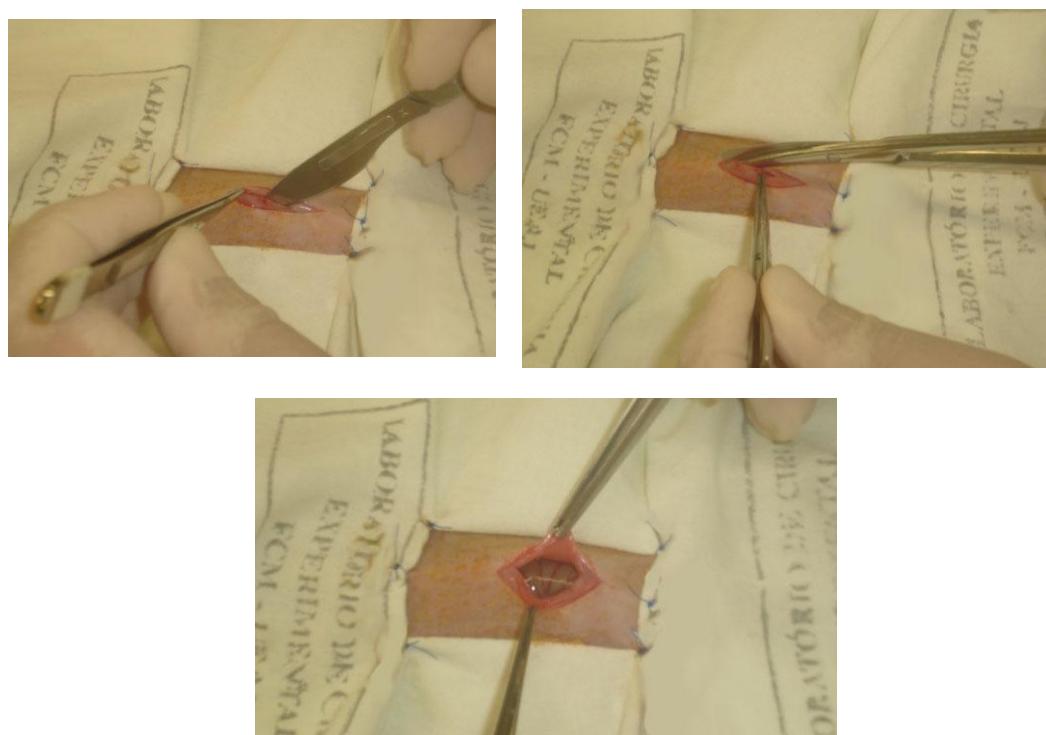
Os animais foram divididos em grupos experimentais, controle e ooforectomia + corticoterapia, com o objetivo de se isolar o efeito da privação hormonal.



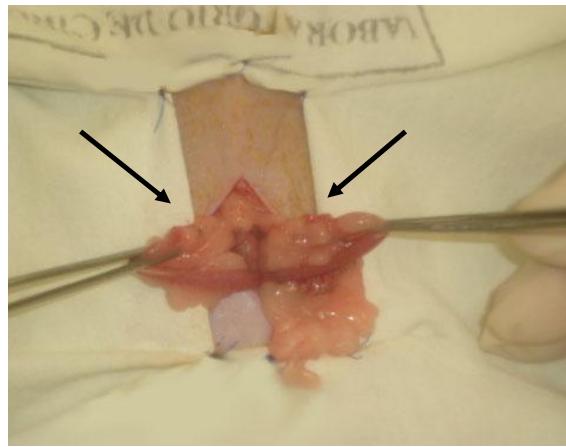
**Figura 2.** Área abdominal tricotomizada do animal em decúbito dorsal após anestesia.



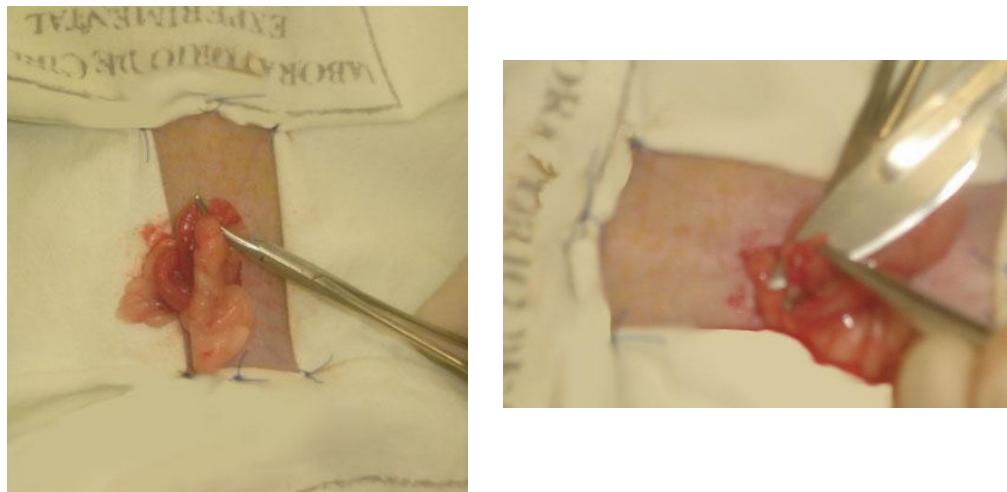
**Figura 3.** Aspecto do local e dimensão da laparotomia mediana.



**Figura 4.** Aspecto da incisão e dissecção do plano muscular.



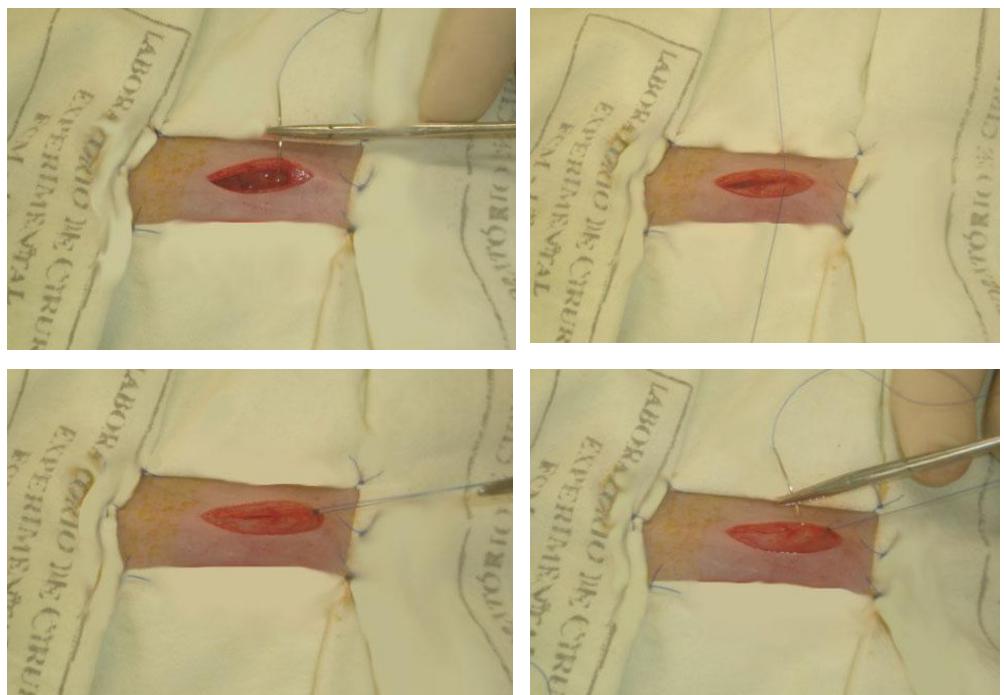
**Figura 5.** Aspecto da exposição e identificação dos ovários.



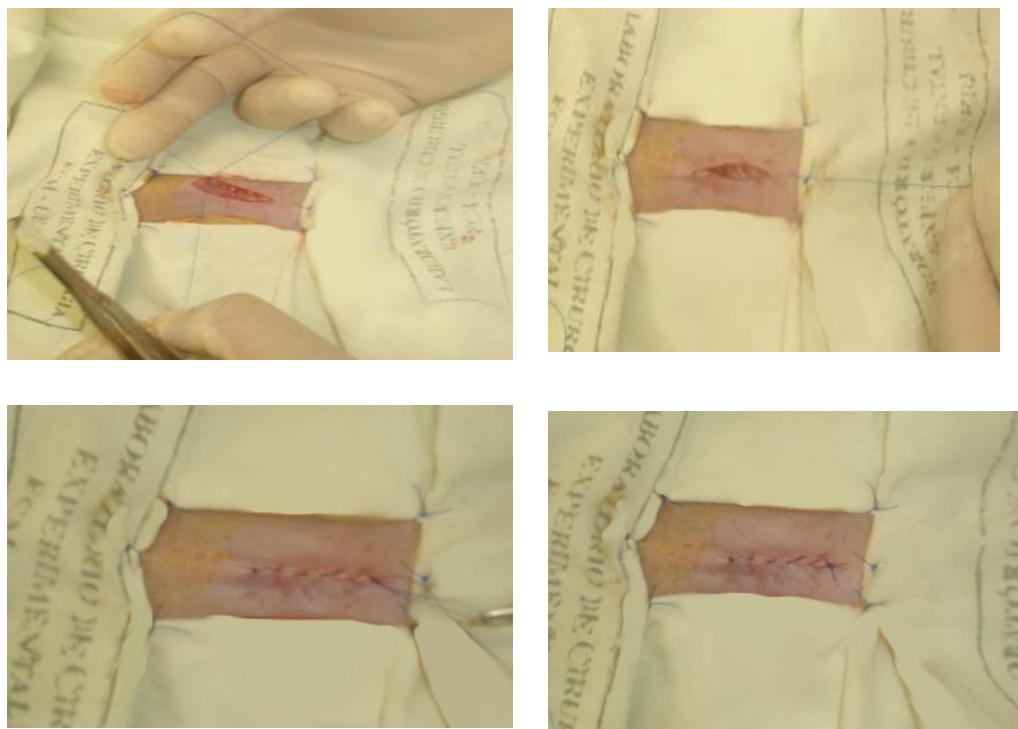
**Figura 6.** Aspecto do pinçamento e excisão do ovário.



**Figura 7.** Aspecto da ligadura da parte superior da trompa de Falópio.



**Figura 8.** Aspecto da sutura no plano envolvendo peritônio e musculatura.



**Figura 9.** Aspecto da sutura no plano envolvendo tecido subcutâneo e pele.

Aos 15 dias após o procedimento cirúrgico, os animais receberam o glicocorticóide dexametasona (Azium Solução®-Schering-Plough S/A), por via intramuscular, na dose de 7 mg/kg de peso corporal, uma vez por semana, durante quatro semanas, à exceção dos animais que constituíram o grupo controle e que receberam solução de NaCl à 0,9% em volume proporcional aos demais animais, por via intramuscular. Durante esse período foram oferecidas *ad libitum*, ração comercial para ratos adultos e águas.

### **3.2.11.2.4 Administração das rações experimentais**

Posteriormente ao período de indução, os animais foram distribuídos, de forma aleatória, em oito grupos de 7 cobaias, sendo um grupo controle, composto dos que não foram submetidos à ooforectomia e à aplicação do corticóide, e então deu-se início a administração das rações experimentais. A cada dois dias, os pesos dos ratos e a ingestão de ração foram registrados.

### **3.2.11.2.5 Parâmetros bioquímicos e hematológicos**

Aos 33 dias contados a partir da data de início da administração das rações experimentais, os animais de cada grupo foram mortos por sobredose anestésica de 30mg/kg de peso corporal de tiopental sódico, por via intraperitoneal.

Foram coletados, então, de cada animal, cerca de 4 mL de amostra de sangue, por punção cardíaca, para a realização do hemograma completo e dosagens das concentrações séricas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina. Para tal, foram utilizados kits desenvolvidos e padronizados pela BIODINÂMICA Produtos e Serviços para Laboratórios Ltda. E as análises executadas no Laboratório de Lípides (LabLip) da Instituto Piquet Carneiro.

O hemograma foi realizado em contador hematológico automatizado KX-21N Sysmex® e as determinações de cálcio total, fósforo e fosfatase alcalina foram realizadas por espectrofotometria em analisador bioquímico automatizado A15 da BioSystems®.

### **3.2.11.3.6 Utilização biológica do cálcio da casca de ovo em pó**

Os animais dos quais foram coletadas as amostras de sangue, tiveram os rins coletados e os fêmures esquerdos coletados e dissecados, tendo-se o cuidado de manter a região epifisária sem lesões.

Os materiais coletados foram acondicionado em sacos de polietileno com alta barreira ao vapor d'água e transportados em caixas térmicas de Isopor® com gelo seco até o Instituto de Química da PUC (RJ) para mensuração do teor de cálcio, fósforo e magnésio, segundo método proposto pelo IAL (2005).

O percentual de utilização biológica do cálcio da casca de ovo foi estimado segundo o protocolo de NAVES (2003) que consiste no cálculo da proporção do cálcio retido (teor de cálcio no fêmur ao final do experimento menos o cálcio ósseo basal) em função do cálcio ingerido.

## **3.2.12 Análise estatística dos dados**

Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas descritivas, segundo os diferentes grupos de tratamento, incluindo médias e desvios padrão.

Para verificar diferenças entre os grupos de animais de acordo com um determinado conjunto de variáveis analisadas simultaneamente foi adotada a Análise de Variância Multivariada (MANOVA – Multivariate Analysis of Variance) (JOHNSON e WICHERN,

2002). Para avaliar os modelos de MANOVA foi utilizada a estatística de teste de Pillai-Bartlett recomendada por HAND e TAYLOR (1987).

No entanto, como esse teste identifica apenas a diferença de forma global, a presença de mais de dois grupos distintos, impossibilita a localização dessa diferença entre todos os possíveis pares de comparação entre grupos tratamento e controle. Por essa razão, após identificar os conjuntos de variáveis que diferem significativamente segundo os grupos, foi realizada uma comparação múltipla de médias por meio do teste de Tukey (YANDELL, 1997; ZAR, 1999), calculando intervalos de confiança para as diferenças com nível de confiança de 95%. Esta análise permite localizar onde se encontram as diferenças significativas entre os grupos.

Todas as análises foram realizadas em ambiente R utilizando a versão 2.6.1 (R, 2007).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Composição centesimal e valor energético total

A composição centesimal e o valor energético total (VET) da casca de ovo em pó estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2.** Composição centesimal e VET da casca de ovo de galinha em pó.

Parâmetros analisados	Resultados (X + DP)
Umidade (g.100g <sup>-1</sup> )	1,3490 ± 0,0274
RMF (g.100g <sup>-1</sup> )	91,9600 ± 0,2218
Proteínas (g.100g <sup>-1</sup> )	4,3693 ± 0,3977
Fração Nifext (g.100g <sup>-1</sup> )	1,5379 ± 0,7029
Lipídios totais (g.100g <sup>-1</sup> )	0,7837 ± 0,0560
Valor energético total (Kcal.100g <sup>-1</sup> )	30,6823 ± 4,9069

X: média e DP: desvio padrão

Os resultados mostram que 100g desse produto contém  $1,3490 \pm 0,0274$  g de umidade, quantidade que contribui para impedir a proliferação de microorganismos, além de poder ser utilizado em formulações desidratadas que são elaboradas com insumos de reduzido teor de água livre, como por exemplo, as preparações para obtenção de sopas, pós para pudins, bebidas lácteas, encapsulados, entre outros produtos.

Deve-se ressaltar que a maior fração encontrada nesse produto foi a de RMF,  $91,9600 \pm 0,2218$  g/100g. Dessa forma, a casca de ovo em pó pode ser considerada uma das maiores fontes naturais de minerais, porém, estudos devem ser realizados para avaliar a biodisponibilidade desses minerais para os humanos.

Apesar da casca de ovo em pó apresentar  $4,3693 \pm 0,3977$  g/100g de proteína bruta, pesquisas precisam ser realizadas para revelar o perfil de aminoácidos e ensaios experimentais para determinar o coeficiente de eficácia protéica, parâmetros importantes para definir a qualidade biológica e uso dessa fração, já que se trata de um resíduo de natureza animal e as porções protéicas dessa origem tendem a revelar proteínas de alto valor biológico.

Em produtos vegetais, na fração Nifext são consideradas as fibras dietéticas e os carboidratos totais. No caso da casca de ovo, esse conteúdo corresponde ao somatório de substâncias que não estão presentes nas frações protéicas, lipídicas, de minerais e aquosa. Por ser um produto de origem animal, que têm como característica não possuir fibras, essa fração pode ser considerada como os carboidratos totais desse produto e assim como os demais nutrientes presentes pode ser comparada com os resultados encontrados por SANT'ANA *et al.* (2000) na Tabela 3.

Os teores de lipídeos encontrados nesse produto podem ser considerados irrelevantes, principalmente se for considerada a quantidade ingerida por dia por um indivíduo adulto saudável.

O VET obtido para esse pó pode ser considerado relevante principalmente para dietas hipocalóricas que necessitem de complementação ou suplementação de minerais.

**Tabela 3.** Comparação dos resultados de composição centesimal e VET encontrados na casca de ovo de galinha em pó com os resultados obtidos por SANT'ANA *et al.* (2000).

Parâmetros analisados	Resultados encontrados (X $\pm$ DP)	Resultados encontrados por SANT'ANA <i>et al.</i> , 2000 (X+DP)
Umidade (g.100g <sup>-1</sup> )	1,3490 $\pm$ 0,0274	0,63 $\pm$ 0,01
RMF (g.100g <sup>-1</sup> )	91,9600 $\pm$ 0,2218	87,71 $\pm$ 1,75
Proteínas (g.100g <sup>-1</sup> )	4,3693 $\pm$ 0,3977	4,00 $\pm$ 0,16
Carboidratos totais (g.100g <sup>-1</sup> )	1,5379 $\pm$ 0,7029	8,11
Lipídios totais (g.100g <sup>-1</sup> )	0,7837 $\pm$ 0,0560	0,09 $\pm$ 0,01
Valor energético total (Kcal.100g <sup>-1</sup> )	30,6823 $\pm$ 4,9069	49,25

X: média e DP: desvio padrão

Os resultados da composição centesimal obtidos nessa pesquisa são semelhantes aos encontrados por SANT'ANA *et al.* (2000) no que diz respeito aos teores de umidade, RMF, proteínas e lipídios, conforme pode ser observado na tabela 3, mas difere no VET em função do valor de carboidratos totais encontrados por aqueles autores. Também devem ser considerados que esses valores podem ser alterados devido a fatores que influenciam a composição do ovo, tais como: tamanho, alimentação e estado sanitário das aves.

#### 4.2 Perfil de aminoácidos

O uso de um alimento como fonte protéica depende de fatores como a concentração total de proteínas e a proporção de aminoácidos essenciais presente nas proteínas em questão (ANDRIGUETTO *et al.*, 1999).

Para avaliar a qualidade química das proteínas presente na casca de ovo foi determinado seu perfil de aminoácidos essenciais, cujos os resultados estão mostrados na tabela 4.

**Tabela 4.** Perfil de aminoácidos essenciais presentes na casca de ovo em pó e a comparação com a proteína padrão estabelecida pela FAO (1985).

Aminoácidos (AA) essenciais	g AA/100g Proteína Padrão <sup>1</sup>	g de AA/ 100g casca de ovo em pó
Histidina	-	0,43
Isoleucina	4	0,295
Leucina	7,00	0,44
Lisina	5,50	0,295
Metionina	-	N.A.
Cisteína	-	N.A.
Sulfurados totais*	3,50	N.A.

\*aminoácidos sulfurados totais = metionina + cisteína

<sup>1</sup> FAO/WHO/UNU, 1985.

N.A. = não analisado

**Continuação - Tabela 4.** Perfil de aminoácidos essenciais presentes na casca de ovo em pó e a comparação com a proteína padrão estabelecida pela FAO (1985).

Aminoácidos (AA) essenciais	g AA/100g Proteína Padrão <sup>1</sup>	g de AA/ 100g casca de ovo em pó
Fenilalanina	-	0,18
Tirosina	-	0,12
Aromáticos totais**	6,00	0,3
Treonina	4,00	0,39
Triptofano	1,00	N.A.
Valina	5,00	0,61

\*\*aminoácidos aromáticos totais = fenilalanina + tirosina

<sup>1</sup> FAO/WHO/UNU, 1985.

N.A. = não analisado

Todos os aminoácidos avaliados mostraram concentrações inferiores, quando comparado à proteína padrão sugerido pela FAO (1985). Dessa forma, o produto não deve ser considerado como uma boa fonte de proteínas, mas deve ser estudado como possível fonte de cálcio para fenilcetonúricos devido ao baixo conteúdo de fenilalanina.

O tratamento da fenilcetonúria, no que diz respeito à alimentação, engloba a limitação da ingestão de proteínas de fontes naturais que possuem alta concentração em fenilalanina. A restrição protéica natural deve ser compensada pela utilização de uma mistura de aminoácidos que não possui, ou possui pequena quantidade de fenilalanina em sua composição. A mistura de aminoácidos é, portanto, essencial ao tratamento adequado da doença. Sua ausência impede o tratamento, pois ocasiona deficiência nutricional importante, levando à quadros de desnutrição protéico-energética e de hipovitaminoses, entre outros, já que a dieta é extremamente restritiva sob vários aspectos (ELSAS e ACOSTA, 1988).

O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Fenilcetonúria do Ministério da Saúde estabelece que os produtos utilizados no tratamento da fenilcetonúria são complementos alimentares, fórmulas isentas de aminoácidos, isentas de fenilalanina, sendo a característica básica dos produtos a muito baixa concentração de fenilalanina, que não pode ser superior a 0,1 g ou 100 mg de fenilalanina por 100 g do produto (BRASIL, 2002), valor próximo ao encontrado nesse estudo (0,18g/100g de casca de ovo em pó).

#### 4.3 Minerais

Os resultados do perfil de minerais (Tabela 5) sugerem que a casca de ovo é uma fonte concentrada de minerais que deve ser nutricionalmente considerada, apesar de que estudos sobre a biodisponibilidade desses elementos necessitam ser realizados.

Dentre os minerais pesquisados, o cálcio apresentou o maior teor, além de conter certa quantidade de magnésio, sódio, estrôncio, fósforo e potássio (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores médios do teor de minerais (mg/100g) presente na casca de ovo.

Minerais	Resultados (mg/100g <sup>-1</sup> )	Minerais	Resultados (mg/100g <sup>-1</sup> )
Li	0,0061	Te	0,0008
Be	< 0,002	I	< 0,8
Na	117,475	Cs	< 0,0005
Mg	351,1	Ba	3,9739
Al	< 0,5	La	< 0,001
K	41,971	Ce	< 0,005
Ca	30263,72	Pr	< 0,0005
Sc	< 0,3	Nd	< 0,001
Ti	0,458	Sm	0,002
V	0,008	Eu	0,0018
Cr	< 0,1	Gd	< 0,0005
Mn	0,031	Tb	< 0,0005
Fe	1,5	Dy	< 0,0005
Co	0,052	Ho	< 0,0005
Ni	< 0,0003	Er	< 0,0005
Cu	< 0,0001	Tm	< 0,0005
Zn	0,083	Yb	< 0,0005
Ga	0,0004	Lu	< 0,0005
Ge	0,0479	Hf	< 0,0005
As	0,012	Ta	< 0,0005
Se	0,01	W	< 0,002
Rb	0,040	Re	< 0,0002
Sr	103,2	Os	< 0,0001
Y	0,001	Ir	< 0,0003
Zr	0,0005	Pt	< 0,0004
Nb	< 0,001	Au	0,0001
Mo	0,023	Hg	< 0,02
Ru	< 0,0001	Tl	0,0014
Pd	0,0684	Pb	< 0,02
Ag	< 0,002	Bi	< 0,02
Cd	< 0,02	Th	< 0,0005
In	< 0,001	P	98,2
U	< 0,001	Si	< 0,0004
Sn	< 0,04	Sb	< 0,001

SANT'ANA *et al.* (2000), em estudo realizado com a multimistura, revelaram que a casca de ovo apresenta 30810 mg de cálcio por 100g, resultado similar ao encontrado nesse estudo(30263,72 mg.100g<sup>-1</sup>). Em relação ao teor de ferro, esses autores encontraram resultado inferior a esse trabalho (0,4 mg.100g<sup>-1</sup> e 1,5 mg.100g<sup>-1</sup>, respectivamente). Quanto ao zinco, o teor encontrado por esses autores foi superior ao do presente estudo (0,3 mg.100g<sup>-1</sup> e 0,08 mg.100g<sup>-1</sup>, respectivamente). Essas variações podem ser creditadas as metodologias utilizadas e/ou alimentação das aves, dentre outros fatores.

Alguns minerais como sódio, potássio, cálcio, fósforo, cloro e magnésio são considerados macrominerais por serem necessários em grande quantidade ao organismo, ou seja, 100 mg/dia ou mais. Já os demais como ferro, zinco, cobre, molibdênio, selênio, estrôncio, iodo e flúor, por serem necessários ao organismo em pequenas quantidades são denominados de microminerais (KRAUSE e MAHAN, 2002).

A ingestão diária de cálcio recomendada para adultos é de 1000 mg e para indivíduos com mais de 50 anos é de 1200 mg (IOM, 2000), portanto, apenas 3,30g e 3,97g de casca de ovo em pó, respectivamente, supriria as necessidades diárias de cálcio, sem considerar a biodisponibilidade desse mineral na fonte em questão.

Para suprir as demandas nutricionais de outros minerais, tais como fósforo, magnésio, potássio e sódio haveria a necessidade de consumir grandes quantidades de casca de ovo em pó (tabela 6), o que não é interessante, pois o consumo de elevadas quantidades do produto promoveria uma alta ingestão de cálcio, cujo consumo acima dos níveis recomendados parece não contribuir, proporcionalmente, para a deposição de cálcio no tecido ósseo (SILVA *et al.*, 2004).

**Tabela 6.** Necessidade de consumo de casca de ovo em pó (g) para atender as demandas nutricionais magnésio, sódio, fósforo e potássio para adultos.

Minerais	Recomendação diária (mg) IOM, 2002	Consumo de casca de ovo em pó (g) para suprir as recomendações diárias
Magnésio	Homens: 19-30 anos: 400	113,9
	≥ 31 anos: 420	119,6
	Mulheres: 19-30 anos: 310	88,3
	≥ 31 anos: 320	91,1
Sódio	1500	1276,6
Fósforo	700	712,8
Potássio	4700	11.190,5

KIMURA (2002) avaliou ratos *Wistar* que consumiram ração suplementada com doses de cálcio 3 a 4 vezes superiores as recomendadas e observou redução do conteúdo ósseo mineral, sobrecarga renal e enrijecimento arterial. Dessa forma, sabendo-se que a casca de ovo apresenta grande quantidade em cálcio, talvez deva ser consumida em quantidades necessárias para atender as necessidades nutricionais.

É fundamental salientar a importância deste estudo, principalmente com relação aos altos níveis de cálcio detectados nesse produto que possivelmente pode atuar como uma fonte alternativa de cálcio. Além do aspecto econômico e ecológico, por se tratar de um resíduo, o cálcio da casca de ovo apresenta vantagens nutricionais, pois não está associado a elevadas quantidades de proteína e sódio, como acontece, por exemplo, nos queijos, que podem induzir aumento da excreção renal de cálcio. (IOM, 1997; WEINSIER e KRUMDIECK, 2000).

Segundo LERNER *et al.* (2000), ALBUQUERQUE e MONTEIRO (2002) e SILVA *et al.* (2004), crianças e adolescentes de diferentes regiões brasileiras não consomem quantidade suficiente de cálcio para um desenvolvimento desejável, fato prejudicial, pois nessa faixa etária seria necessário maior aporte desse mineral para garantir uma boa formação óssea.

A ingestão deficiente de cálcio na infância e na adolescência predispõe à osteoporose, doença de alto impacto econômico que se manifesta nos idosos (MARQUES-NETO, 2001). Considerando a importância da ingestão adequada desse mineral, o consumo da casca de ovo em pó poderia contribuir positivamente com a complementação do cálcio em dietas deficientes desse mineral, prevenindo futuramente a osteoporose. Entretanto, seu consumo

deve ser controlado, para que não ultrapasse os níveis máximos de ingestão recomendados por faixa etária.

Dentre os resultados encontrados, outro dado importante a ser ressaltado é o teor de estrôncio na casca de ovo, que juntamente com outros minerais, foram comparados aos achados de SCHAAFSMA *et al.* (2000) na tabela 7.

**Tabela 7.** Concentrações de minerais encontrados na casca de ovo em pó e comparação com cascas de ovo em pó de origem eslovaquia e alemã.

Minerais	Resultados *	Eslovaquia **	Alemã 1**	Alemã 2**	Alemã 3**
Ca (mg/g)	302,6	401	385	393	387
Mg (mg/g)	3,5	4,5	3,6	3,6	3,5
P (mg/g)	0,9	0,1	1,5	0,2	1,9
Sr (μg/g)	traços	372	380	880	320
Zn (μg/g)	traços	5,13	5,0	5,0	-
Fe (μg/g)	traços	22,4	23	23	22,5
Cu (μg/g)	traços	7,7	10	13	7,5
Cr (μg/g)	traços	0,12	0,20	0,40	0,25
Se (μg/g)	traços	23,5	45	50	53
V (μg/g)	traços	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Pb (μg/g)	traços	< 0,5	1,1	1,3	0,53
Al (μg/g)	traços	< 5	2	2	2
Cd (ng/g)	traços	< 50	18	24	3
Hg (μg/g)	traços	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2

\* Resultado encontrados no presente estudo.

\*\* Resultados encontrados por SCHAAFSMA *et al.*, 2000.

Os resultados encontrados para o teor de cálcio apresentaram-se inferiores aos obtidos por SCHAAFSMA *et al.* (2000). Em relação ao magnésio a casca de ovo alemã assemelhou-se mais com a do presente estudo e, quanto aos teores de fósforo, a casca de ovo eslovaquia e alemã 2 apresentaram resultados inferiores ao do estudo atual. Para os demais minerais, os resultados encontrados foram muito inferiores aos da literatura citada.

Dessa maneira, pode-se inferir que a composição da casca apresenta grande variabilidade quanto ao conteúdo mineral, que muitas vezes é influenciado pela alimentação das aves.

CABRERA *et al.*, (1999) realizaram estudo de revisão sobre os efeitos do estrôncio no osso de camundongos e sugerem que são dependentes da dose e, mesmo dietas de baixas concentrações de estrôncio (< 4g/L), pode ocasionar aumento da taxa de formação óssea e da densidade óssea trabecular. Essa observação pode ter aplicações terapêuticas, particularmente em condições de doenças caracterizadas por acelerado processo de remodelamento ósseo e desmineralização. Por outro lado, uma dieta com altas doses de estrôncio (> 4g/L) pode causar hipocalcemia pela inibição da síntese da 1,25 dihidroxivitamina D e da absorção intestinal do cálcio, afetando o metabolismo ósseo.

Caso a casca de ovo venha a ser incorporada na alimentação humana, o teor de estrôncio encontrado não promoveria malefícios à saúde óssea, visto que este foi encontrado em baixa concentração.

Na terapia da osteoporose suplementos de cálcio são geralmente prescritos na prevenção e tratamento da doença (BAYLINK *et al.*, 1999), sendo utilizados como adjuvantes no tratamento da osteopenia para prevenção de fraturas. No entanto, ROBERTS (1983)

revelou a ocorrência de alterações neurológicas em pacientes que faziam uso de suplementos de cálcio e apresentavam níveis relativamente elevados de chumbo no cabelo, mineral contaminante comumente encontrado nos suplementos de cálcio.

A preocupação com a contaminação foi reforçada por outros trabalhos que também revelaram a presença de níveis preocupantes de chumbo em suplementos de cálcio (BOURGOIN *et al.*, 1993; WHITING, 1994; ROSS, 1993; SCELFO e FLEGAL, 2000), o que torna os suplementos de cálcio potente fator de risco para exposição a esse metal.

No processo metabólico, devido a grande semelhança atômica e iônica entre cálcio e chumbo (POPOVIC *et al.*, 2005), ao serem absorvidos eles competem pelos mesmos sítios de ligação dos transportadores presentes na mucosa intestinal (MUSHAK, 1991) e, apesar destes apresentarem maior afinidade de ligação por chumbo, uma dieta rica em cálcio ajuda a diminuir a sua absorção (IPCS, 1995), ou seja, a absorção gastrintestinal é inversamente proporcional à quantidade de cálcio presente na dieta (GOYER, 1995).

Não foram encontrados trabalhos avaliando os níveis de chumbo em suplementos comercializados no Brasil. A Farmacopéia Brasileira estabelece que o teor máximo de metais pesados em carbonato de cálcio utilizado em insumos farmacêuticos e medicamentos deve ser de 0,002%. No estado da Califórnia o consumo superior a 1,5 µg de chumbo/1g de cálcio/dia é proibido (CALIFORNIA ATTORNEY GENERAL'S OFFICE, 1997).

Devido a importância do cálcio para o organismo humano existem diversas fontes desse mineral no mercado, que além de chumbo, podem conter outros metais pesados que ao serem consumidos podem trazer prejuízos à saúde.

De forma geral, os metais pesados são elementos químicos que por não serem biodegradáveis podem se acumular nos tecidos vivos ao longo da cadeia alimentar chegando ao ser humano principalmente através da alimentação. Sabe-se que as intoxicações por esses metais freqüentemente são causadas por alumínio, arsênio, bário, berílio, cádmio, chumbo, mercúrio e níquel. Esses elementos alteram as estruturas celulares, as enzimas e substituem metais cofatores de atividades enzimáticas (MINDELL e MUNDIS, 1996).

Alguns metais pesados como cromo, cobre e zinco, encontrados em solos, ar e água, além dos alimentos, são considerados microelementos essenciais ao metabolismo dos organismos vivos. Entretanto, o excesso ou carência desses minerais pode levar a distúrbios no organismo e, em casos extremos, até a morte. Esses minerais são essenciais à saúde humana e podem ser introduzidos nos tecidos vivos através da água, alimentos, respiração e até pela própria pele. No entanto, sabe-se que 90% da ingestão de metais pesados e outros contaminantes ocorre por meio do consumo de alimentos (IPCS, 1992).

Na tabela 8, pode-se observar que a presença de metais pesados na casca de ovo em pó é pequena e mostra-se adequada frente aos limites estabelecidos pela legislação (BRASIL, 1998). Quando comparada com concha de ostra em pó, comercializada em todo território nacional na forma de cápsula e muito utilizada como suplemento de cálcio, a casca de ovo mostra-se como uma melhor opção, visto que a primeira contém elevados conteúdos de chumbo, níquel, cádmio, cromo e estanho, que quando consumidos em excesso, tornam-se prejudiciais à saúde humana.

**Tabela 8.** Teores de metais pesados encontrado na casca de ovo em pó e a comparação com concha de ostra pequena e grande e os limites estabelecidos pela legislação (BRASIL, 1998).

\* Resultados do estudo atual

Metais	Casca de ovo (mg/Kg)*	Casca de ostra pequena (mg/Kg)**	Casca de ostra grande (mg/Kg)**	Limites Máximos (mg/Kg)**
Pb	< 0,1	28,17	30,43	2,0
Ni	< 0,003	16,73	19,75	5,0
Cd	< 0,2	3,05	2,91	1,0
Cr	< 1	8,89	9,67	0,1
Cu	< 0,001	1,75	8,44	30
Zn	0,8	1,64	13,64	50
Sn	< 0,4	2771,65	3145,26	250

\*\* Resultados do IDEMA, 2004.

#### 4.4 Microbiologia

Os resultados das análises microbiológicas nas amostras de casca de ovo em pó estão demonstrados na tabela 9.

**Tabela 9:** Microbiologia da casca de ovo *in natura*, desidratada e higienizada com solução clorada.

Microrganismos (UFC/g <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	Amostra in natural	Amostra desidratada	Amostra desidratada higienizada com solução clorada
Mesófilos aeróbios	>3 x 10 <sup>6</sup>	>3 x 10 <sup>6</sup>	4,6 x 10 <sup>2</sup>
Coliformes totais <sup>2</sup>	2,8	1,5	<0,3
Coliformes Termotolerantes <sup>2</sup>	<0,3	<0,3	<0,3
Bolores e leveduras	>3 x 10 <sup>6</sup>	2,0 x 10 <sup>5</sup>	3,6 x 10 <sup>2</sup>
Salmonella	Ausente em 25g	Ausente em 25g	Ausente em 25g

<sup>1</sup> UFC: unidade formadora de colônia;

<sup>2</sup> NMP: número mais provável;

Pode ser observado que a casca de ovo que não foi higienizada mostrou uma microbiota, representada por mesófilos totais e bolores e leveduras > 3 x 10<sup>6</sup> UFC/g, por coliformes totais e coliformes termotolerantes de 2,8 e < 0,3 NMP/g, respectivamente. O mesmo pode ser observado para amostras que foram desidratadas sem serem higienizadas com solução clorada, onde a população de microorganismos era também constituída de uma população de microorganismos semelhantes da casca *in natura*.

Quando a amostra foi higienizada com solução clorada, o nível de contaminação microbiana foi menor, com destaque para coliformes totais que foi bastante reduzido após esse processo (< 0,3 NMP/g), mostrando a importância do processo de higienização empregado. A presença desses microorganismos nos alimentos pode indicar contaminação de origem fecal ou ocorrência de enteropatogênicos, indicador de qualidade higiênica (FRANCO e LANDGRAF, 1999).

Não foram encontrados níveis elevados de coliformes termotolerantes nas amostras (<0,3 NMP.g<sup>-1</sup>), evidenciando que estas não tiveram contato direto ou indireto com material fecal (VARNAM e EVANS, 1991).

Em relação a bolores e leveduras, novamente é possível observar que a amostra higienizada com solução clorada apresentou menor contaminação microbiana. Além disso, as

amostras analisadas não apresentaram agentes do gênero *Salmonella*, responsáveis por diversos surtos de toxinfecções alimentares (ICMSF, 1980). A pesquisa de *Salmonella* sp. é bastante relevante, sobretudo quando a matéria-prima utilizada é o ovo e seus subprodutos.

A norma brasileira vigente sobre padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001) não estabelece padrões mínimos de tolerância para mesófilos em ovos, nem em suplementos minerais, produtos que mais se assemelham ao analisado neste estudo. Entretanto, a Portaria nº 451 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1997), revogada pela resolução RDC nº 12 (BRASIL, 2001), preconiza o limite de  $10^5$  UFC.g-1 para Contagem Padrão em Placas. Por esse parâmetro, os níveis detectados nas amostras *in natura* e desidratada ( $3 \times 10^6$  UFC.g-1) estão elevados.

#### 4.5 Rendimento do processo de obtenção da casca de ovo em pó

O processo de obtenção da casca de ovo em pó foi considerado de alta rentabilidade por ter apresentado um teor elevado de rendimento (98,45%), o que favorece pequena perda do material, contribuindo assim para menor volume de resíduo descartado no ambiente, caso esse produto venha a ser incorporado na alimentação humana, conforme observado na tabela 10.

**Tabela 10.** Rendimento do processo de obtenção da casca de ovo.

Peso pré-secagem (Kg)	Peso pó seco (Kg)	Rendimento (%)	Média (%)	DP
0,301	0,298	99,00		
0,3	0,293	97,67	98,45	0,70
0,3	0,296	98,67		

DP: desvio padrão

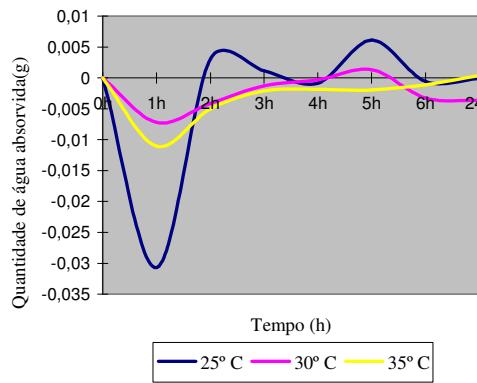
#### 4.6 Curvas de adsorção e desorção da casca de ovo em pó

Para a modelagem das curvas de umidade de equilíbrio, têm sido utilizadas relações matemáticas semi-teóricas e empíricas, uma vez que nenhum modelo teórico desenvolvido tem sido capaz de prever com precisão o teor de umidade de equilíbrio de produtos agrícolas em todas as faixas de temperatura e umidade relativa do ar (BROOKER *et al.*, 1992).

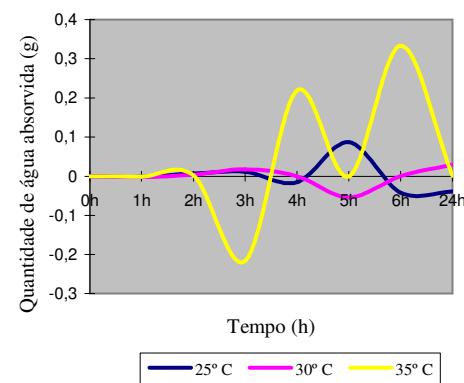
Apesar da maioria dos produtos agrícolas já terem sido estudados com relação à sua higroscopidade, não foi encontrado na literatura consultada, relato sobre umidade de equilíbrio de cascas de ovos em pó de nenhuma espécie de aves. Os dados da tabela 11 foram utilizados para a obtenção das curvas de adsorção e desorção (Gráficos 1-6) da casca de ovo em pó, que revelaram a estabilidade higroscópica mesmo em ambientes de alta umidade relativa.

**Tabela 11.** Teores médios de umidade de equilíbrio (UE) em função da temperatura e umidade relativa (UR)

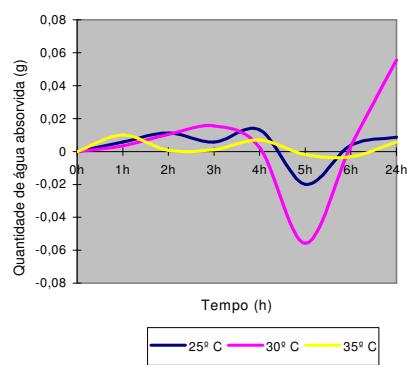
Solução utilizada	UR	EU		
		25 ° C	30 ° C	35 ° C
(NaOH)	7	-0,0001	-0,0037	0,0004
(MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	33	-0,0391	0,0299	0,0010
(NaBr)	57	-0,0020	0,0464	0,0039
(NaCl)	75	0,0087	0,0556	0,0058
[(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	81	0,1890	0,0087	0,0118
(K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> )	87	0,0154	0,0140	0,0139



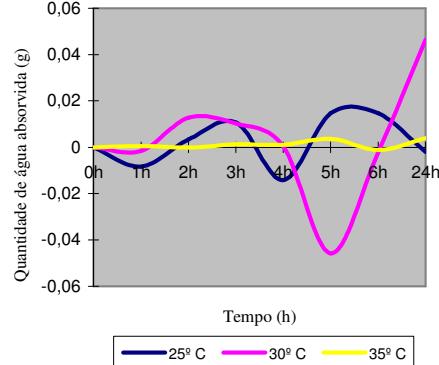
**Gráfico 1.** Curva de adsorção e desorção (NaOH).

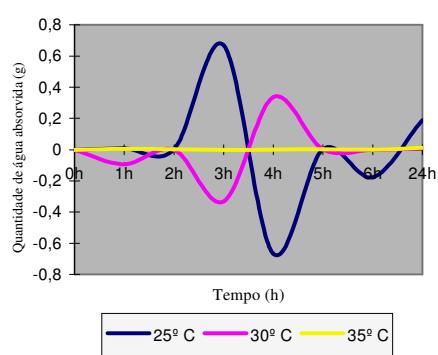


**Gráfico 2.** Curva de adsorção e desorção (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O).

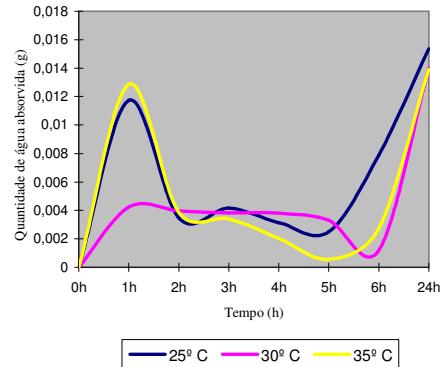


**Gráfico 3.** Curva de adsorção e desorção (NaBr) **Gráfico 4.** Curva de adsorção e desorção (NaCl).





**Gráfico 5.** Curva de adsorção e desorção  $([(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4])$ .

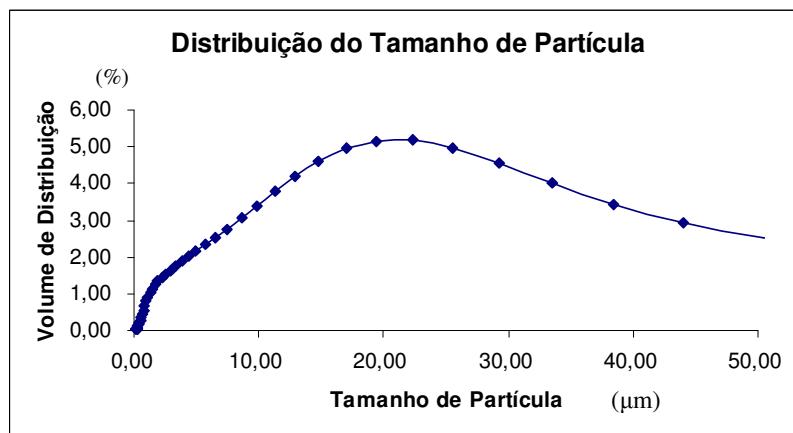


**Gráfico 6.** Curva de adsorção e desorção ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ).

#### 4.7 Tamanho das partículas da casca de ovo em pó

A determinação do tamanho das partículas foi realizada para a casca de ovo em pó com intuito de ser mais um componente para a caracterização desse produto, e que poderá servir de orientação para sua utilização na elaboração de produtos alimentícios.

Na figura 10, estão representados os resultados médios da distribuição do tamanho da partícula da casca de ovo em pó. Pode-se observar que o produto apresenta uma distribuição entre 0 a 50  $(\mu\text{m})$ , com maior concentração de partículas na faixa de 20  $\mu\text{m}$  (ANEXO 1).



**Gráfico 7.** Distribuição granulométrica, em volume, das partículas da casca de ovo em pó.

#### 4.8 Ensaio Biológico

Entre as razões da escolha do rato como animal de experimentação, neste trabalho, destaca-se a facilidade de obtenção, em biotério próprio, baixo custo de manutenção, facilidade para alojamento, alimentação e manuseio. Possui, também, sistema endócrino semelhante ao dos seres humanos, passando por período de menopausa, segundo PAZ *et al.* (1997), HUANG *et al.* (2003).

Em estudos que tenham como objetivo observar todo o ciclo biológico, da infância à senilidade, o rato apresenta ciclo de vida com tempo, bastante inferior ao do ser humano, permitindo esse tipo de delineamento (VOGEL, 1980).

Um dos primeiros autores a utilizar animais para estudar osteoporose foi SAVILLE (1969), que avaliou ratas ooforectomizadas, com vinte e um dias de vida e observou menor quantidade de cálcio por unidade de volume do osso. Desde o final da década de 50, segundo CASTRO (2000), estudos comprovaram que o rato tem a capacidade de reabsorver tecido ósseo pela ação dos osteoclastos.

No decorrer do presente experimento ocorreram óbitos de dois animais, possivelmente por complicações pós-cirúrgicas. Todos os outros animais evoluíram com ausência de infecção no local da cirurgia. Não se observou qualquer alteração de comportamento nos animais submetidos à ooforectomia ou cirurgia placebo.

A realização da comparação simultânea das médias do conjunto de variáveis estudadas, por meio da MANOVA, permitiu verificar que essas diferem significativamente entre os grupos de animais definidos segundo os distintos tipos de tratamentos ou controle ( $p<0,01$ ).

Na tabela 12 estão apresentados os valores da média e desvio padrão do peso corpóreo segundo os grupos experimentais e consumo de ração, acompanhados dos resultados da análise estatística, detalhada nos anexos 2, 3 e 4.

**Tabela 12.** Valores de média e desvio padrão do peso corpóreo (g) dos animais na cirurgia, no sacrifício e ganho de peso total no período de 33 dias.

Grupos de animais	Consumo médio de ração (g) X (DP)	Peso Inicial (g)	Peso Sacrificio(g)	Ganho de peso (g)
Basal	N.D.	205,43 <sup>a, b</sup>	205,43 <sup>a</sup>	N.D.
	N.D.	(1,90)	(1,90)	N.D.
1 (Controle)	432,40 (0,00)	212,00 <sup>a, b</sup> (6,63)	270,86 <sup>b</sup> (29,37)	58,86 <sup>a</sup> (31,91)
2	438,57 (0,00)	202,67 <sup>a, b</sup> (2,42)	260,33 <sup>b</sup> (14,19)	57,67 <sup>a</sup> (13,65)
3	504,19 (0,00)	213,71 <sup>a</sup> (8,28)	265,71 <sup>b</sup> (14,94)	52,00 <sup>a</sup> (18,83)
4	393,24 (0,00)	201,43 <sup>b</sup> (1,40)	262,86 <sup>b</sup> (33,50)	61,43 <sup>a</sup> (34,01)
5	154,90 (0,00)	204,50 <sup>a, b</sup> (7,74)	272,00 <sup>b</sup> (21,43)	67,50 <sup>a</sup> (22,32)
6	454,24 (0,00)	203,29 <sup>a, b</sup> (7,41)	268,57 <sup>b</sup> (33,42)	65,29 <sup>a</sup> (30,67)
7	500,86 (0,00)	206,29 <sup>a, b</sup> (5,82)	288,00 <sup>b</sup> (19,18)	81,71 <sup>a</sup> (22,90)
8	450,86 (0,00)	210,86 <sup>a, b</sup> (9,08)	254,00 <sup>b</sup> (30,26)	43,14 <sup>a</sup> (29,43)

- Na comparação dois a dois entre os grupos de animais; a mesma letra sobreposta indica que as médias na coluna não são significativamente diferentes e letras distintas no par indicam diferenças significantes ( $p<0,05$ ).

- Valores entre parênteses representam o desvio padrão.

- N.D.: não disponível

Em relação aos pesos iniciais dos animais, observou-se que apenas os animais dos grupos 3 (ração com cálcio da casca) e 4 (ração suplementada com cálcio da casca) apresentaram diferença significativa para esse parâmetro, sendo que os pesos no momento do sacrifício e ganho de peso foram similar entre os grupos, com exceção do grupo basal, que foi sacrificado ao início do experimento, o que não possibilitou seu desenvolvimento e ganho de peso ao longo do período experimental.

Esses resultados divergem dos relatados na literatura, pois sabe-se que animais com privação hormonal, ou seja, ooforectomizadas, tendem a ganhar peso. TIVERON (2005) observou aumento de peso nas ratas ooforectomizadas, principalmente aos nove meses pós-operatório quando comparadas ao placebo, porém aos doze meses essa diferença não foi observada.

Apesar de não ter sido possível testar a diferença das médias do consumo de cada grupo porque o valor utilizado já é a própria média, portanto, considera-se que o consumo dos animais dentro de cada grupo é idêntico, sendo assim, a variância nula, o que inviabiliza a análise de comparação das médias, observa-se que os consumos médios de ração entre os grupos apresentam valores próximo, o que representa, em média, um consumo de  $13,74 \pm 1,18$  g de ração por dia por animal, com exceção do grupo 5 (ração sem vitaminas D e K), que apresentou o consumo total de 154,90 g de ração durante todo o ensaio experimental, o que representa, aproximadamente, apenas 4,7g de ração por dia.

Para excluir o efeito da dieta sobre o peso das ratas, BARENGOLTS *et al.* (1994) forneceram apenas parte da ração para o grupo ooforectomizado em relação ao placebo e observaram ganho de peso nas ratas sem ovários em relação às controle e, concluíram assim, que a simples restrição de alimento nas ratas ooforectomizadas foi insuficiente para prevenir o ganho de peso.

Sendo assim, talvez o fato do ganho de peso, no experimento atual, não ter sido estatisticamente significativo, possa ser explicado em função do tempo do experimento, considerado pequeno, quando comparado ao do trabalho de TIVERON (2005), por exemplo.

Na tabela 13 estão representados os resultados dos aspectos morfológicos dos animais dos diversos grupos e os resultados da análise estatística detalhada nos anexos 5, 6, 7 e 8. Pode ser notado que os animais do grupo 7 (ração sem vitamina D) apresentaram fêmures direito significativamente mais pesados do que os dos animais do grupo 6 (ração sem vitamina K), sendo que para os fêmures esquerdos, este último grupo se assemelha aos demais, mas difere do grupo controle, apresentando fêmures menos pesados. Os animais do grupo 6 apresentaram menores pesos dos fêmures esquerdo em relação aos grupos 7 e 8, o que pode sugerir a maior importância da vitamina D em relação a vitamina K no processo de formação óssea, apesar da literatura consultada não enfatizar esse fato.

Quanto aos rins, diferenças distintas entre os órgãos direito e esquerdo foram encontradas. A média dos pesos dos rins das ratas do grupo 3 (ração com cálcio da casca) apresentou, significativamente, maior do que os rins dos demais animais utilizados no experimento. Os pesos dos rins esquerdos dos animais do grupo 3 e das ratas dos grupos 4 (ração suplementada com cálcio da casca) também diferiram, de forma significativa, do grupo basal, apresentando-se mais pesados.

**Tabela 13.** Valores de média e desvio padrão dos pesos dos fêmures e rins nos grupos de animais experimentais.

Grupos de Animais	Peso fêmurD (g)	Peso fêmurE (g)	Peso RimD (g)	Peso RimE (g)
Basal	1,05 <sup>a, b</sup> (0,15)	1,11 <sup>a, b</sup> (0,16)	0,67 <sup>b</sup> (0,08)	0,67 <sup>c</sup> (0,07)
1 (Controle)	1,23 <sup>a, b</sup> (0,10)	1,25 <sup>b</sup> (0,11)	0,80 <sup>b</sup> (0,07)	0,77 <sup>b, c</sup> (0,05)
2	1,13 <sup>a, b</sup> (0,09)	1,13 <sup>a, b</sup> (0,17)	0,77 <sup>b</sup> (0,12)	0,76 <sup>b, c</sup> (0,07)
3	1,20 <sup>a, b</sup> (0,11)	1,13 <sup>a, b</sup> (0,08)	1,16 <sup>a</sup> (0,21)	1,23 <sup>a</sup> (0,19)
4	1,08 <sup>a, b</sup> (0,13)	1,07 <sup>a, b</sup> (0,09)	0,86 <sup>b</sup> (0,10)	0,98 <sup>b</sup> (0,25)
5	1,15 <sup>a, b</sup> (0,09)	1,11 <sup>a, b</sup> (0,11)	0,73 <sup>b</sup> (0,08)	0,75 <sup>b, c</sup> (0,08)
6	1,02 <sup>b</sup> (0,14)	1,01 <sup>a</sup> (0,15)	0,80 <sup>b</sup> (0,19)	0,79 <sup>b, c</sup> (0,19)
7	1,31 <sup>a</sup> (0,32)	1,14 <sup>a, b</sup> (0,12)	0,77 <sup>b</sup> (0,13)	0,77 <sup>b, c</sup> (0,13)
8	1,22 <sup>a, b</sup> (0,10)	1,24 <sup>a, b</sup> (0,17)	0,72 <sup>b</sup> (0,09)	0,70 <sup>c</sup> (0,06)

- Na comparação dois a dois entre os grupos de animais; a mesma letra sobreposta indica que as médias na coluna não são significativamente diferentes e letras distintas no par indicam diferenças significantes ( $p<0,05$ ).

- Valores entre parênteses representam o desvio padrão.

Na tabela 14 são demonstrados os teores de fósforo, magnésio e cálcio nos ossos, cálcio retido nos fêmures e utilização biológica de cálcio, cujas as análises estatísticas estão detalhadas nos anexos 9, 10, 11, 12 e 13. Em relação ao fósforo contido nos ossos, animais do grupo 6 (ração sem vitamina K) diferiram dos animais do grupo controle, apresentando níveis de fósforo ósseo semelhantes ao grupo basal e inferiores aos grupos 2 (osteoporótico + ração de manutenção), 8 (ração suplementada com cálcio da casca e vitaminas D e K) e controle.

Em relação ao magnésio e cálcio ósseos (Tabela 14), os animais dos grupos 2 e 8 não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos animais do grupo controle, e os animais do grupo 5 (ração sem vitaminas D e K) apresentaram menor teor de cálcio ósseo em comparação com os demais grupos ( $p<0,05$ ).

Com relação ao teor de cálcio retido nos ossos, os teores médios encontrados nos fêmures dos animais dos grupos 2 e 8 não diferiram significativamente do grupo controle, sendo as cobaias do grupo 3 (ração com cálcio da casca) que apresentaram menor retenção de cálcio ósseo, porém, os valores eram semelhantes aos dos animais dos grupos 4, 5, 6 e 7 ( $p<0,05$ ). Os animais do grupo 3 foram os únicos que não receberam a suplementação de cálcio, que é um parâmetro associado a terapia da osteoporose.

A utilização biológica de cálcio não diferiu entre os animais dos grupos controle, 2 e 8, mostrando que o tratamento no qual não foi realizado a incorporação da casca de ovo como fonte de cálcio, respondeu de forma similar aquele em que a suplementação de cálcio foi realizada concomitantemente com a das vitaminas D e K, apesar do grupo 8 também ter se apresentado semelhante aos demais grupos quanto a esse parâmetro.

Quando a suplementação de cálcio foi realizada com a casca de ovo em pó e utilizando-se as vitaminas D e K em níveis basais, ou na ausência das vitaminas, o efeito observado foi de uma utilização biológica de cálcio menor em comparação ao grupo controle.

Se esses resultados forem comparados com os dados obtidos no estudo de NAVES (2003), no qual ratos Wistar, recém-desmamados, foram mantidos, durante 28 dias, recebendo rações formuladas, contendo: 0% de cálcio; 50% das recomendações de cálcio para ratos, tendo como fonte o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) como cálcio-padrão e cálcio do pó da casca de ovo, notaria-se que esse autor obteve resultados dos teores médios de cálcio ósseo, bem como de utilização biológica de cálcio, em valores absolutos, maiores do que os encontrados neste estudo.

Esse mesmo autor observou que a quantidade de cálcio presente nos fêmures dos animais que receberam cálcio da fonte da casca de ovo foi semelhante àquela encontrada nos ratos que consumiram o cálcio-padrão (46,23g e 46,35g, respectivamente), o mesmo ocorrendo com a utilização biológica do cálcio (cálcio-padrão: 3,27% e cálcio da casca: 3,48%). Esses dados comprovam que o cálcio na casca de ovo está tão biodisponível quanto o cálcio no  $\text{CaCO}_3$  usado como padrão, e muito presente como fonte em suplementos desse mineral.

**Tabela 14.** Valores de média e desvio padrão dos teores de fósforo, magnésio, cálcio ósseos, cálcio retido no fêmur e utilização biológica de cálcio nos grupos de animais experimentais.

Grupos de animais	Fósforo ósseo (mg)	Magnésio ósseo (mg)	Cálcio Ósseo (mg)	Cálcio retido no fêmur E (mg)	Utilização Biológica Cálcio (%)
Basal	54,98 <sup>a</sup> (5,51)	2,01 <sup>a, c</sup> (0,21)	108,48 <sup>b</sup> (11,13)	N.D.	N.D.
1 (Controle)	66,32 <sup>b</sup> (3,14)	2,37 <sup>b</sup> (0,13)	131,38 <sup>c</sup> (6,00)	26,15 <sup>b</sup> (6,00)	1,21 <sup>b</sup> (0,28)
2	63,90 <sup>b, c</sup> (5,54)	2,27 <sup>b, c</sup> (0,22)	126,26 <sup>c, e, f, g</sup> (11,01)	21,03 <sup>b, c</sup> (11,01)	0,96 <sup>b</sup> (0,50)
3	56,47 <sup>a, c</sup> (4,05)	1,95 <sup>a</sup> (0,11)	107,76 <sup>b</sup> (7,92)	2,52 <sup>a</sup> (7,92)	0,10 <sup>a</sup> (0,32)
4	55,73 <sup>a, c</sup> (3,89)	1,95 <sup>a</sup> (0,13)	110,43 <sup>b, d, f</sup> (8,03)	5,19 <sup>a</sup> (8,03)	0,18 <sup>a</sup> (0,27)
5	58,77 <sup>a, b</sup> (5,07)	1,97 <sup>a, c</sup> (0,22)	1,97 <sup>a</sup> (0,22)	6,58 <sup>a, c</sup> (9,33)	0,57 <sup>a</sup> (0,80)
6	58,29 <sup>a</sup> (4,60)	1,92 <sup>a</sup> (0,16)	110,43 <sup>b, d, g</sup> (8,82)	5,20 <sup>a</sup> (8,82)	0,15 <sup>a</sup> (0,26)
7	60,98 <sup>a, b</sup> (5,40)	2,02 <sup>a, c</sup> (0,17)	113,87 <sup>b, d, e</sup> (10,23)	8,63 <sup>a, c</sup> (10,23)	0,23 <sup>a</sup> (0,27)
8	66,73 <sup>b</sup> (6,08)	2,27 <sup>b, c</sup> (0,21)	124,43 <sup>c, d</sup> (11,85)	19,20 <sup>b, c</sup> (11,85)	0,57 <sup>a, b</sup> (0,35)

- Na comparação dois a dois entre os grupos de animais; a mesma letra sobreposta indica que as médias na coluna não são significativamente diferentes e letras distintas no par indicam diferenças significantes ( $p<0,05$ ).

- Valores entre parênteses representam o desvio padrão.

- N.D.: não disponível

- Utilização biológica de cálcio =  $\frac{\text{Cálcio retido}}{(\text{Cálcio retido/Cálcio ingerido}) \times 100}$ , sendo o Cálcio retido igual ao teor de cálcio no fêmur no fim do experimento menos – o teor de cálcio ósseo basal (NAVES, 2003).

As análises bioquímicas (Tabela 15), com detalhamento estatístico nos anexos 14, 15 e 16, revelaram que todos os animais dos grupos experimentais se assemelharam aos do grupo

controle no que diz respeito à fosfatase alcalina, sendo as que ratas dos grupos controle, 2 (osteoporótico + ração de manutenção), 4 (ração suplementada com cálcio da casca) e 7 (ração sem vitamina D) foram as que diferiram do grupo basal.

Para os resultados dos teores médios de cálcio sérico, pode ser observado que os animais dos grupos 3 (ração com cálcio da casca), 7 e 8 (ração suplementada com cálcio da casca e vitaminas D e K) não diferiram dos animais do grupo controle. Além disso, os resultados do grupo 8 também não diferiram do grupo basal. Os animais do grupo 6 (ração sem vitamina K) apresentaram a maior média de concentração de cálcio sérico em comparação aos demais grupos ( $p<0,05$ ), o que é coerente ao se comparar com os resultados de cálcio retido nos ossos e sua utilização biológica nesse grupo, que apresentaram-se inferiores aos resultados dos animais do grupo controle, sugerindo assim, que o cálcio ósseo pode ter sido mobilizado para tentar manter a homeostase mineral, conforme relatos da literatura (KRAUSE, 2002).

**Tabela 15.** Valores de média e desvio padrão dos teores séricos de fosfatase alcalina, cálcio e fósforo nos grupos de animais experimentais.

Grupos de animais	Fosfatase alcalina (U/L)	Cálcio (mg/dL)	Fósforo (mg/dL)
Basal	84,43 <sup>a</sup> (37,46)	8,26 <sup>e, f</sup> (0,34)	4,49 <sup>a, b</sup> (0,51)
1 (Controle)	367,29 <sup>b</sup> (213,74)	9,59 <sup>a</sup> (0,78)	3,76 <sup>b, c</sup> (0,54)
2	418,83 <sup>b</sup> (145,96)	8,57 <sup>b, d, e</sup> (0,20)	5,53 <sup>a, b</sup> (0,58)
3	306,86 <sup>a, b</sup> (93,41)	9,43 <sup>a</sup> (0,31)	6,09 <sup>a</sup> (0,64)
4	391,29 <sup>b</sup> (238,06)	8,44 <sup>b, d, e</sup> (0,21)	4,13 <sup>b, c</sup> (1,03)
5	350,17 <sup>a, b</sup> (98,34)	7,97 <sup>b, f</sup> (0,22)	3,97 <sup>b, c</sup> (0,92)
6	335,71 <sup>a, b</sup> (181,06)	10,49 <sup>c</sup> (0,54)	5,53 <sup>a, c</sup> (2,22)
7	368,57 <sup>b</sup> (125,29)	9,21 <sup>a, d</sup> (0,72)	4,60 <sup>a, b</sup> (1,25)
8	313,00 <sup>a, b</sup> (133,48)	8,87 <sup>a, e</sup> (0,33)	5,04 <sup>a, b</sup> (0,36)

- Na comparação dois a dois entre os grupos de animais; a mesma letra sobreposta indica que as médias na coluna não são significativamente diferentes e letras distintas no par indicam diferenças significantes ( $p<0,05$ ).

- Valores entre parênteses representam o desvio padrão.

Os animais do grupo 3 (ração com casca) foram os únicos que apresentaram resultados que diferiram dos animais do grupo controle no que diz respeito a concentração média de fósforo sérico, tendo maiores teores desse mineral no sangue, o que pode explicar o menor teor e a menor retenção de cálcio ósseos, além da baixa utilização biológica desse grupo em comparação ao controle.

É sabido que situações de hipertireoidismo alteram o metabolismo de cálcio e podem conduzir à hiperfosfatemia. Alguns autores afirmam que a hiperfosfatemia se dá pelo aumento da reabsorção óssea que causa hipercalcemia, hipoparatiroidismo e consequente aumento da reabsorção tubular de fósforo (AUWERX e BOUILLON, 1986). A diminuição da excreção

urinária de fósforo provoca o aumento do fosfato plasmático, o que por sua vez acarreta a diminuição do cálcio ionizado, com consequente elevação dos níveis de PTH (BRICKER, 1972).

A hiperfosfatemia também é característica na insuficiência renal. Apesar de não terem sido realizadas análises histomorfométricas dos rins, observou-se que os animais do grupo 3 apresentaram rins mais pesados em comparação aos grupos basal e controle, o que pode sugerir uma hiperplasia renal.

O PTH eleva-se concomitante à instalação da insuficiência renal, o que contribui para o hiperparatireoidismo secundário (BRICKER, 1972). O fósforo pode causar a diminuição da produção renal da vitamina D ativa e ter um possível efeito direto sobre as glândulas paratireoideanas (LOPEZ-HILKER *et al.*, 1990; APARICIO *et al.*, 1993). Na fase inicial de instalação da insuficiência renal crônica, verifica-se uma diminuição da atividade da 1-alfa-OH vitamina D hidroxilase, com consequente diminuição de produção de calcitriol, possivelmente pelo aumento do fosfato intracelular no epitélio tubular renal, sítio de hidroxilação da vitamina D (HSU *et al.*, 1992).

A vitamina D exerce um controle *feed-back* negativo nas glândulas paratireoideanas por ação direta na transcrição do RNAm do pré-pró-PTH e a transformação em PTH. (RUSSEL, *et al.*, 1986). Com a menor produção de vitamina D ativa, devido a hiperfosfatemia, ocorre a diminuição dos receptores de calcitriol nas glândulas paratireoideanas (MERKE *et al.*, 1987) e, consequentemente, alterações na absorção intestinal de cálcio e da mobilização do cálcio no tecido ósseo são observadas.

Os valores médios hematológicos em função dos diferentes tratamentos mostrou que na série vermelha a maioria dos parâmetros analisados não apresentaram diferenças significativas em comparação ao grupo controle (Tabela 16 e Anexos 17-24, 32 e 33).

Para a hemoglobina, o grupo 7 (ração sem vitamina D) diferiu significativamente do controle, apresentando valores superiores ao mesmo, assim como, quando comparado ao grupo 3 (ração com cálcio da casca). SANTOS *et al.* (2004) com o objetivo de avaliar a influência de uma multimistura, que continha a casca de ovo, a respeito da biodisponibilidade mineral em ratos Wistar também não observou diferenças significativas entre os animais suplementados com multimistura, no que diz respeito ao hematócrito.

O índice de anisocitose (RDW) dos grupos 3 e 8 diferiram dos grupos controle e basal ( $p<0,05$ ), tendo valores maiores, o que significa que as hemácias desses grupos apresentaram variação de tamanho.

O leucograma (Tabela 17 e Anexos 25-31) mostrou que os resultados de leucócitos do grupo 3 foram estatisticamente maiores em comparação ao grupo controle, o que pode indicar algum tipo de infecção. Em relação aos linfócitos todos os grupos assemelharam-se ao grupo basal, porém, os animais dos grupos 6 e 7 apresentaram resultados significativos maiores do que o controle para a contagem absoluta (CA) e contagem relativa (CR), respectivamente. Para MXD todos os grupos não apresentaram diferença significativa em comparação ao grupo basal ( $p<0,05$ ), porém grupos 3 a 7 apresentaram resultados significativos menores do que o controle para a CR desse parâmetro. Na CA de MXD o grupo 8 teve valores maiores aos dos grupos 4, 5, 6 e 7 ( $p<0,05$ ).

Em relação aos neutrófilos (CR) todos os grupos não apresentaram diferença significativa em comparação ao grupo controle, no entanto, os grupos 4, 5 e 6 apresentaram resultados maiores do que o grupo basal. Na CA de neutrófilos apenas o grupo 6 apresentou resultados significativamente diferentes (maiores) aos grupos basal e controle ( $p<0,05$ ).

**Tabela 16.** Valores de média e desvio padrão das análises hematológicas (série vermelha) dos grupos de animais experimentais.

Grupos de animais	Hemácias (milhões/mcl)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	Volume Global Médio (fl)	HGM (pg)	CHGM (g/dl)	RDW SD (fl)	RDW CV (%)	Plaquetas (mil/mcl)	MPV(fL)
Basal	6,99 <sup>b</sup> (0,19)	12,98 <sup>a,b,c</sup> (0,50)	39,62 <sup>a</sup> (2,11)	56,66 <sup>a</sup> (2,04)	18,54 <sup>a</sup> (0,48)	32,80 <sup>a</sup> (1,01)	28,20 <sup>a</sup> (0,71)	11,58 <sup>a</sup> (0,46)	1149,20 <sup>a</sup> (128,82)	6,78 <sup>c</sup> (0,15)
1 (Controle)	7,32 <sup>a,b</sup> (0,45)	12,87 <sup>a,c</sup> (0,67)	40,10 <sup>a</sup> (2,47)	54,79 <sup>a</sup> (0,32)	17,59 <sup>a</sup> (0,34)	32,13 <sup>a</sup> (0,56)	28,84 <sup>a,c</sup> (0,68)	12,87 <sup>a,c</sup> (0,90)	993,43 <sup>a</sup> (170,38)	7,10 <sup>a,c</sup> (0,23)
	7,41 <sup>a,b</sup> (0,15)	13,73 <sup>a,b,c</sup> (0,46)	41,98 <sup>a</sup> (1,53)	56,68 <sup>a</sup> (1,13)	18,50 <sup>a</sup> (0,54)	32,73 <sup>a</sup> (0,82)	30,85 <sup>b,c</sup> (1,66)	13,70 <sup>a,b</sup> (1,22)	1033,25 <sup>a</sup> (96,32)	8,50 <sup>b</sup> (0,48)
2 3	7,25 <sup>a,b</sup> (0,45)	12,70 <sup>a</sup> (0,48)	39,64 <sup>a</sup> (2,03)	54,74 <sup>a</sup> (1,62)	17,58 <sup>a</sup> (1,14)	32,08 <sup>a</sup> (1,55)	31,60 <sup>b</sup> (1,68)	14,82 <sup>b</sup> (1,34)	856,80 <sup>a</sup> (156,86)	7,48 <sup>a</sup> (0,22)
	7,28 <sup>a,b</sup> (0,16)	13,13 <sup>a,b,c</sup> (0,47)	40,70 <sup>a</sup> (1,66)	55,90 <sup>a</sup> (1,57)	18,04 <sup>a</sup> (0,49)	32,27 <sup>a</sup> (0,52)	30,26 <sup>a,b</sup> (1,44)	13,64 <sup>b,c</sup> (0,93)	1025,71 <sup>a</sup> (192,28)	7,00 <sup>a,c</sup> (0,32)
4 5	7,76 <sup>a</sup> (0,52)	13,80 <sup>b,c</sup> (0,73)	43,24 <sup>a</sup> (2,59)	55,74 <sup>a</sup> (0,95)	17,78 <sup>a</sup> (0,30)	31,96 <sup>a</sup> (0,38)	29,98 <sup>a,b</sup> (0,94)	13,54 <sup>a,b</sup> (0,48)	939,40 <sup>a</sup> (152,92)	7,26 <sup>a,c</sup> (0,52)
	7,83 <sup>a</sup> (0,35)	13,73 <sup>b,c</sup> (0,56)	43,34 <sup>a</sup> (2,36)	55,37 <sup>a</sup> (1,32)	17,54 <sup>a</sup> (0,52)	31,69 <sup>a</sup> (0,78)	30,63 <sup>b,c</sup> (1,15)	14,14 <sup>b,c</sup> (1,23)	963,86 <sup>a</sup> (170,65)	7,37 <sup>a</sup> (0,14)
6 7	7,66 <sup>a,b</sup> (0,19)	14,04 <sup>b</sup> (0,32)	43,74 <sup>a</sup> (0,94)	57,10 <sup>a</sup> (0,98)	18,32 <sup>a</sup> (0,43)	32,08 <sup>a</sup> (0,33)	30,14 <sup>a,b</sup> (1,34)	13,12 <sup>a,b</sup> (1,02)	820,60 <sup>a</sup> (59,71)	7,06 <sup>a,c</sup> (0,18)
	7,34 <sup>a,b</sup> (0,36)	13,25 <sup>a,b,c</sup> (1,45)	40,67 <sup>a</sup> (1,45)	55,47 <sup>a</sup> (0,99)	18,07 <sup>a</sup> (0,56)	32,58 <sup>a</sup> (1,48)	31,15 <sup>b</sup> (0,55)	14,30 <sup>b,c</sup> (0,77)	1029,33 <sup>a</sup> (252,56)	8,13 <sup>b</sup> (0,23)

- Na comparação dois a dois entre os grupos de animais; a mesma letra sobreescrita indica que as médias na coluna não são significativamente diferentes e letras distintas no par indicam diferenças significantes ( $p<0,05$ ).

- Valores entre parênteses representam o desvio padrão.

HGM: hemoglobina globular ; CHGM: concentração da hemoglobina corporcular média; RDW (SD, CV): índice de anisocitose (desvio-padrão, coeficiente de variação); MPV: volume plaquetário médio; fl: fentolitros.

**Tabela 17.** Valores de média e desvio padrão das análises hematológicas (série branca) dos grupos de animais experimentais.

Grupos de animais	LEUCÓCITOS (mil/mcl)	LINFÓCITOS Contagem Relativa (%)	LINFÓCITOS Contagem Absoluta (mil/mcl)	MXD (Eosinófilos, Basófilos e Monócitos) Contagem Relativa (%)	MXD (Eosinófilos, Basófilos e Monócitos) Contagem Absoluta (mil/mcl)	NEUTRÓFILOS Contagem Relativa (%)		NEUTRÓFILOS Contagem Absoluta (mil/mcl)
						MXD (Eosinófilos, Basófilos e Monócitos) Contagem Absoluta (mil/mcl)	NEUTRÓFILOS Contagem Relativa (%)	
Basal	4,36 <sup>c</sup> (1,27)	67,60 <sup>a,b</sup> (5,13)	3,00 <sup>a,b</sup> (0,96)	16,72 <sup>a,b</sup> (3,15)	0,76 <sup>a,b</sup> (0,29)	15,68 <sup>c</sup> (6,31)	0,60 <sup>b</sup> (0,12)	
1 (Controle)	3,74 <sup>a,c</sup> (0,79)	53,53 <sup>a</sup> (5,96)	1,99 <sup>a</sup> (0,38)	22,26 <sup>b</sup> (4,41)	0,84 <sup>a,b</sup> (0,24)	24,21 <sup>a,b,c</sup> (2,56)	0,91 <sup>b</sup> (0,29)	
2	4,03 <sup>a,b,c</sup> (0,52)	64,58 <sup>a,b</sup> (8,91)	2,63 <sup>a,b</sup> (0,54)	14,00 <sup>a,b</sup> (7,89)	0,55 <sup>a,b</sup> (0,34)	21,43 <sup>b,c</sup> (3,97)	0,85 <sup>b</sup> (0,06)	
3	5,30 <sup>b</sup> (1,27)	57,96 <sup>a,b</sup> (5,87)	3,04 <sup>a,b</sup> (0,78)	10,50 <sup>a</sup> (4,24)	0,60 <sup>a,b</sup> (0,35)	31,54 <sup>a,b</sup> (5,09)	1,66 <sup>a,b</sup> (0,32)	
4	4,64 <sup>a,b</sup> (2,40)	54,77 <sup>a</sup> (11,69)	2,44 <sup>a</sup> (0,94)	11,16 <sup>a</sup> (6,65)	0,57 <sup>a</sup> (0,65)	34,07 <sup>a</sup> (6,97)	1,63 <sup>a,b</sup> (1,10)	
5	4,32 <sup>a,b,c</sup> (1,63)	57,50 <sup>a,b</sup> (9,56)	2,38 <sup>a</sup> (0,61)	9,36 <sup>a</sup> (4,90)	0,46 <sup>a</sup> (0,43)	33,14 <sup>a</sup> (4,90)	1,48 <sup>a,b</sup> (0,79)	
6	7,56 <sup>a,b</sup> (2,71)	59,43 <sup>a,b</sup> (9,39)	4,29 <sup>b</sup> (0,90)	7,21 <sup>a</sup> (1,61)	0,56 <sup>a</sup> (0,30)	33,36 <sup>a</sup> (8,33)	2,71 <sup>a</sup> (1,64)	
7	4,70 <sup>a,b,c</sup> (1,51)	74,76 <sup>b</sup> (9,09)	3,58 <sup>a,b</sup> (1,41)	6,42 <sup>a</sup> (5,21)	0,26 <sup>a</sup> (0,18)	18,82 <sup>c</sup> (4,78)	0,86 <sup>b</sup> (0,15)	
8	5,62 <sup>a,b</sup> (1,45)	53,75 <sup>a</sup> (7,61)	3,02 <sup>a,b</sup> (0,80)	23,67 <sup>b</sup> (10,02)	1,32 <sup>b</sup> (0,53)	22,58 <sup>b,c</sup> (5,61)	1,28 <sup>a,b</sup> (0,67)	

- Na comparação de dois entre os grupos de animais; a mesma letra sobreposta indica que as médias na coluna não são significativamente diferentes e letras distintas no par indicam diferenças significantes ( $p<0,05$ ).

- Valores entre parênteses representam o desvio padrão.

## 5 CONCLUSÕES

Nas condições nas quais o trabalho foi realizado pôde-se observar que a casca de ovo de galinha em pó é um material rico em minerais, especialmente no que diz respeito ao cálcio, micronutriente bastante relevante na saúde óssea e dificilmente ingerido, pela população em geral, em quantidades necessárias para manutenção da sua homeostase, o que pode contribuir para o desenvolvimento da osteoporose.

Com o aumento da expectativa de vida das populações, em nível global, tende-se a notar a maior incidência de casos dessa doença, que atualmente já pode ser considerada como um problema de saúde pública do nosso país. Alternativas que promovem a prevenção da osteoporose perpassam pela adequação da ingestão de cálcio, o que poderia ser obtido com a contribuição da casca de ovo em pó, uma fonte economicamente viável, de fácil acesso e que praticamente não contribui energeticamente na dieta, além de apresentar baixo teor protéico, o que faz com que o produto não seja prejudicial ao metabolismo de cálcio, visto que altas doses de proteína na dieta podem acarretar no aumento de excreção renal de cálcio.

O produto elaborado deve ser melhor estudado como uma possível fonte de cálcio para pacientes portadores de fenilcetonúria, cujos teores de fenilalanina na alimentação tem que ser baixos, característica obtida no produto avaliado nesse estudo.

Vale ressaltar os baixos teores de metais pesados encontrados, fato que não expõe a população à contaminação por estes compostos a partir da utilização da casca de ovo como complemento ou suplemento de cálcio.

Os resultados encontrados no ensaio experimental revelaram que, em geral, os animais dos grupos osteoporóticos que receberam a ração sem modificação da fonte de cálcio e a ração suplementada em cálcio e vitaminas D e K, utilizando-se como fonte a casca de ovo, foram aqueles que mais se assemelharam ao grupo controle, o que sugere que a casca de ovo pode apresentar efeito como fonte de cálcio na alimentação, porém em teores suplementados em situações da doença já instalada. Animais que receberam ração contendo modificações apenas na fonte de cálcio (substituída pela casca) obtiveram menores resultados de menor retenção de cálcio ósseo, comparados ao controle. Talvez, o tempo de estudo experimental tenha sido pequeno para avaliação mais refinada do metabolismo de cálcio proveniente da casca de ovo.

Na osteoporose, além da ingestão adequada de cálcio, recomenda-se ingestão de alimentos ricos em vitamina D e a exposição solar, sendo esta última uma atividade não realizada com as cobaias. Também, em condições de baixa ou ausência da produção de estrogênio faz-se necessária a terapia de reposição hormonal, que poderia ter constituído mais um grupo experimental.

Além do fator econômico, a incorporação da casca de ovo na alimentação, cujo processo de obtenção rende, em média, 98% e gera um produto de grande estabilidade higroscópica, favorece a menor poluição ambiental por aproveitar um tipo de resíduo que é desperdiçado em grandes quantidades no ambiente. Para tal, a higienização da matéria-prima deve ser adequada para evitar que uma fonte mineral seja veiculadora de doenças de origem alimentar.

Seria interessante continuar a pesquisa com a utilização da casca de ovo como fonte de cálcio e avaliação da densidade óssea por densitometria óssea, concomitantemente com o uso de embasamento histomorfométrico.

No mais, é necessário um esforço entre os profissionais da área da saúde no sentido de estimular o aumento do consumo de alimentos ricos em cálcio de forma a prevenir ou retardar o desenvolvimento da osteoporose.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-MARTÍNEZ, N.; CARTER-BARTLETT, P. M. Metabolismo del hueso periodontal. III Control sistémico del metabolismo de hueso. **Rev. ADM**, v.49, n.4, p.203-206, 1992.
- ALBUQUERQUE, M. F. M.; MONTEIRO, A. M. Ingestão de alimentos e adequação de nutrientes no final da infância. **Revista de Nutrição**, v.15, p.291-299, 2002.
- ALDRIGHI, J. M. Balanço risco/benefício da terapêutica da reposição hormonal: direções para o futuro. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, São Paulo, v.6, p.734-738, 1996.
- ANDRIGUETTO, J. M., *et al.* **Nutrição Animal, as bases e os fundamentos da nutrição animal: Os alimentos**, São Paulo: Editora Nobel, 1999, 395p.
- APARICIO, M., *et al.* In advanced renal failure, dietary phosphorus restriction reverses hyperparathyroidism independent of changes in the levels of calcitriol. **Nephron**, v.63, p.122-123, 1993.
- ASCHERI, D. P. R.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. Caracterização da farinha de bagaço de jaboticaba e propriedades funcionais dos extrusados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.26, n.4, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC international**. 17.ed. Washington: AOAC, 2000.
- AU, W. Y. Cortisol stimulation of parathyroid hormone secretion by rat parathyroid glands in organ culture. **Science**, v.193, n.4257, p.1015-1017, 1976.
- AUWERX J, BOUILLON R. Mineral and bone metabolism in thyroid disease: a review. **Q J Med**, v.60, p.737-52, 1986.
- AVIOLI, L. V. **La controversia sobre el calcio y la ración dietética recomendada.** In **El Síndrome Osteoporótico - Detección, Prevención y Tratamiento**, Madrid, Ediciones CEA, S.A., p. 45-52, 1989.

BARENGOLTS, E. I., *et al.* Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. **Bone Miner**, v.26, p.133- 40, 1994.

BAYLINK, D. J.; STRONG, D. D.; MOHAN, S. The diagnosis and treatment of osteoporosis: future prospects. **Molecular Medicine**, v.1, p.133-140, 1999.

BEDANI, E.; ROSSI, E. A. O consumo de cálcio e a osteoporose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v.26, n.1, p.3-14, 2005.

BEUCHAT, L. R. e COUSIN, M. A. Yeasts and Molds. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, D. C.: American Public Health Association, chapter 20, p. 209-215, 2001.

BIKLE, D. D.; PILLAI, S. Vitamin D, calcium and epidermal differentiation. **Endocrine Reviews**, v.14, n.1, p.3-19, 1993.

BLANCHET, Claudine; GIGUÈRE, Yves; PRUD'HOMME, Denis; DUMONT, Marcel; ROUSSEAU, François, and DODIN, Sylvie. Association of Physical Activity and Bone: Influence of Vitamin D Receptor Genotype. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 34, n.1, p.24-31, 2002. BORELLI, A. Considerações sobre os termos osteoporose e osteopenia. **Rev Bras Med**, v.51, p.743-744, 1994.

BOURDEAU, J. E.; ATTIE, M. F. Calcium metabolism. In Maxwell e Kleeman's: **Clinical disorders fluids and eletrolites metabolism**, 5<sup>a</sup> ed., p.234-306, 1994. BOURGOIN, B.P. *et al.* Lead content in 70 brands of dietary calcium supplements. **American Journal of Public Health**, v.83, p.1155-1160, 1993.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos-DINAL. **Portaria nº 685 de 27 de agosto de 1998 que fixa limites máximos de tolerância de contaminantes químicos em alimentos.** Disponível em: <<http://www.anvisa.com.br>>. Acesso em: 01 ago. 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Análise de corretivos, fertilizantes e inoculantes:** métodos oficiais. Brasília: LANARV, 1988. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 1997. **Portaria nº 451, de dezenove de setembro de 1997, que aprova os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos.** Disponível em: <<http://www.anvisa.com.br>>. Acesso em: 01 ago. 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2001. **Resolução RDC nº 12, de dois de janeiro de 2002, que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Disponível em: <<http://www.anvisa.com.br>>. Acesso em: 01 agos. 2008

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas - Fenilcetonúria - fórmula de aminoácidos isenta de fenilalanina.** Portaria nº 847 de 06 de Novembro de 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde revela realidade da osteoporose masculina. **Saúde, Brasil**, n.109, p.3, 2005.

BRICKER, N. S. On the pathogenesis of uremic state. an exposition of the trade-off hypothesis. **N Engl J Med.**, v.286, p.1093-99, 1972.

BROOKER, D. B.; BAKKER-ARKEMA, F. W.; HALL, C. W. **Drying and storage of grains and oilseeds.** New York: The AVI, 1992. 450p.

CABRERA, W. E., *et al.* Strontium and bone. **J Bone Miner Res**, v.14, p.661-668, 1999.  
CALIFORNIA ATTORNEY GENERAL'S OFFICE. Superior court settlement. nº984503. San Francisco, CA, 15 May 1997.

CARABALLO, P. J., *et al.* Changes in bone density after exposure to oral anticoagulants. A meta-analysis. **Osteoporos Int**, v.9, p.441-8, 1999.

CASTRO, C. H. M. Modelos animais em osteoporose. In: SZEJNFELD VL. Osteoporose diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000. p. 46- 53.

CERQUEIRA, F. S., REZENDE, L.F. Atuação da fisioterapia na melhora da qualidade de vida da mulher no climatério e menopausa. **Femina**, v.30, n.7, p.477-479, 2002.

COLSTON, K., *et al.* Localization of vitamin D receptor in normal human duodenum and in patients with coeliac disease. **Gut**, v.35, p.1219-1225, 1994.

CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE (CDC). **Jama**, n.285, p.785-795, 2001.

COOK, J. D., DASSENKO, S.A, WHITTAKER, P. Calcium supplementation: effect on iron absorption. **Am J Clin Nutr**, v.53, p.106-111, 1991.

CORMAN, L. C. Nutrição clínica. **Clin Med Am Norte**, v.4, p. 958-969, 1993.

COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de minerais. **Rev. Nutr. PUCCAMP**, v.10, n. 2, p. 87-98, 1997.

DALSKY, G. P., *et al.* Weight-bearing exercise training and lumbar bone mineral content in post-menopausal women. **Annals of Internal Medicine**, v.108, p. 824-828, 1988.

DAWSON-HUGHES, B.; SELIGSON, F.H.; HUGHES, V.A. Effects of calcium carbonate and hydroxyapatite on zinc and iron retention in postmenopausal women. **Am J Clin Nutr**, v.44, p.83-88, 1986.

DELMAS, P. D. Treatment of postmenopausal osteoporosis. **Lancet**, London, v.359, p.2018-2026, 2002.

DHARMARAJAN, T.S.; MANALAC, M. M. An understanding of osteoporosis. **Geriatr Med.**, v.1, p.1-12, 2000.

D'IPPOLITO, G.*et al.* Age-related Osteogenic Potential of Mesenchymal Stromal Stem Cells from Human Vertebral Bone Marrow. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.14, n.7, p.1115-1122, 1999.

DORES, S. M. C., PAIVA, S. A. R., CAMPANA, A. O. Vitamina K: metabolismo e nutrição. **Rev Nutr Campinas**, v.14, n.3, p.207-218, 2001.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1501-1504, 2000.

ELFFORS, L. Osteoporotic fractures due to osteoporosis. Impacts of a frilty pandemic in an aging world. **Aging**. Milano, v.10, p.191-204, 1998.

ELSAS, L. J.; ACOSTA, P. B. Nutrition support of Inherited metabolic diseases. In: Shils, ME & Young VR. Modern Nutrition in Health and Disease. Philadelphia, LEA & Febiges 7<sup>th</sup> ed. 1988.

FISHBEIN, L. Multiple sources of dietary calcium - some aspects of its essentiality. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 39, p. 67-80, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Energy and Protein Requirements**. Report of a Joint FAO/WHO/UNU. Expert Consultation. Technical Reports Series 724. Geneva: WHO, 1985, p.65.

FRANCO, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2001.  
FRANCO, G. M. e LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2000.  
GALEAZZI, M.; DOMENE, S.M.A.; SICHIERE, R. Estudo multicêntrico sobre consumo alimentar. **Cadernos de debate - Revista do Núcleo de Estudos e Pesquisas em alimentação**, São Paulo, 1997.

GAMBARDELLA, A. M. D. **Adolescentes, estudantes de período noturno: como se alimentam e gastam suas energias**. São Paulo, 1995. 81p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.

GARN, S. M. Bone Loss as an General Phenomenon In Man. **Fed. Proc**, v.26, p.1729–1736, 1970.

GILSANZ, V.; BOECHAT, M. I.. Gender Differences in Vertebral Size in Adults; Biomechanical Implications. **Radiology**, v.190, p. 678–683, 1994.

GOULDING, A., *et al.* Bone mineral density and body composition in boys with distal forearm fractures: a dual-energy x-ray absorptiometry study. **J Pediatr.**, v.139, p.473-475, 2001.  
GOYER, R. A. Nutrition and metal toxicity. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.61 (suppl), p. 646S-650S, 1995.

HALBE, H. W. Filosofia do atendimento da mulher menopausal. In: PINOTTI, J. A. **Menopausa**. São Paulo: Roca; 1995. p.221-226.

HAND, D. J.; TAYLOR, C. C. **Multivariate analysis of variance and repeated measures**. London: Chapman and Hall, 1987.

HEANEY, R. P. Calcium, dairy products and osteoporosis. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v.19, p.83-99, 2000.

HEANEY, R. P. *et al.* Meal effects on calcium absorption. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.49, p.372-376, 1989.

HELGE, E. W. e KANSTRUP, I. Bone Density in Female Elite Gymnasts: Impact of Muscle Strength and Sex Hormones. **Medicine Science in Sports & Exercise**, v.34, n.1, p. 174-180, 2002.

HSU, C. H.; PATEL, S. R.; YOUNG, E. W. Mechanism of decreased calcitriol degradation in renal failure. **Am J Physiol.**, v.262, p.192-198, 1992.

HUANG, T. H., *et al.* Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. **J Appl Physiol.**, v.95, n.1, p.300- 307, 2003.

ILICH, J. Z.; KERSTETTER, J. E. Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v.19, p.715-737, 2000.

INSTITUTO DE DEFESA DO MEIO AMBIENTE (IDEMA). **Relatório do Zoneamento Ecológico Econômico da região costeira do estado do Rio Grande do Norte em 2004**. Disponível em: <<http://www.idema.rn.gov.br>>. Acessado em 12 jan 2009.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). Food and Nutrition Board. **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc (2000)**; **Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorous, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride (1997)**; **Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate (2004)**. Washington: National Academy Press.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4.ed. São Paulo: IAL, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa da Produção de Ovos de Galinha no Brasil em 2008**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 jan. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Projeção da população do Brasil: Brasil já tem mais de 180 milhões de habitantes**, 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 12 dez 2008.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF). 1980. Ecología microbiana de los alimentos 1: factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. España: Acribia, 332p.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). Environmental Health Criteria 165 - Inorganic lead. World Health Organization, Geneva, Suíça, WHO, 1995.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). Environmental Health Criteria 134 - Cadmium.. Geneva, Switzerland. 1992.

ISHIDA, Y. e HEERSCHE, J. N. M. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Both in Vivo and in Vitro Concentrations of Glucocorticoides Higher than Physiologic Levels Attenuate Osteoblast Differentiation. **J. Bone Miner Res.**, v.13, n.12, p.1822-1826, 1998.

JAIME, P. C.; MOTOIE, E.; CERVATO, A. M. Relação cálcio/fósforo na dieta habitual de adultos jovens. In: CONGRESO DE LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE NUTRICIÓN "DR. ABRAHAM HORWITZ", Guatemala, 1997.

JANZ, K. Physical Activity and Bone Development During Childhood and Adolescence. **Minerva Pediatrica**, v. 54, n. 2, 2002.

JILKA, R. L., *et al.* Linkage of Decreased Bone Mass with Impaired Osteoblastogenesis in a Murine Model of Accelerated Senescence. **Journal of Clinical Investigation**, v..97, n.7, p.1732-1740, 1996.

JOHNSON, R. A; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. Upper Saddle River: Prentice Hall; 2002.

JOHNSON, J. A.; KUMAR, R. Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D- dependent binding proteins. **Semin Nephrol**, v.14, p.119-128, 1994.

JUNQUEIRA, P. A. A. Utilização de recursos e custos em osteoporose. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.47, n.4, 2001.

KALACHE, A.; VERAS, R. P.; RAMOS, L. R. O envelhecimento da população mundial, um desafio novo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.21, n.3, p.200-210, 1987.

KALFAS, I. H. Principles of bone healing. **Neurosurgery Focus** v.10, 2001.

KAPLAN, F. S. Prevenção e tratamento da osteoporose. **Rev Clin Symp**, v.47, p. 3-37, 1995.

KARBACH, U. Neuere befunde über mechanismen und regulation des intestinalen kalziuntransport. **Z Gastroenterol**, v.32, p.500-513, 1994.

KIMURA, I. A. **Contribuição ao estudo da atividade de água e isotermas de adsorção de umidade em alimentos.** 1992. 106p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

KIMURA, M. Osteoporosis induced by over calcium intake. **American Journal Clin. Nutr.**, v.75, p. 384-392, 2002.

KLEIN, G. R., *et al.* Intestinal calcium absorption in exogenous hypercortisolism. **Journal of Clinical Investigation**, v.60, n.1, p.253-259, 1977.

KORNACKI, J. L. e JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, D. C.: American Public Health Association, chapter 6, p. 69-82, 2001.

KRAUSE, M.V.; MAHAN, L.K. **Alimentos, Nutrição & Dietoterapia.** 6<sup>a</sup>ed. São Paulo: Ed. Roca, 2002. 981p.

LERNER, B. R., *et al.* O cálcio consumido por adolescentes de escolas públicas de Osasco, São Paulo. **Revista de Nutrição**, v. 13, p. 57-63, 2000.

LIANG, C. T., *et al.* Alterations of duodenal vitamin D calcium-binding contents and calcium uptake in brush border membrane vesicles in aged Wistar rats: role of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. **Endocrinology**, v.128, p.1780-1784, 1991.

LOPEZ-HILKER, S., *et al.* Phosphorus restriction reverses hyperparathyroidism in uremia independent of changes in calcium and calcitriol. **Am J Physiol.**, v.259, p.432-37, 1990.

LUKERT, B.; RAISZ, L. G. Glucocorticoid-induced osteoporosis pathogenesis and management. **Annals of Internal Medicine**, v.112, n.5, p.352-364, 1990.

MANOLAGAS, S. C. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. **Endocrine Reviews.**, v.21, p.115-137, 2000.

MARCUS, R., *et al.* Osteoporosis and exercise in women. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.24, n.6, 1992.

MARQUES-NETO, J. F. Resultados da campanha nacional de prevenção da osteoporose. **BG Cultural**, São Paulo: Merck Sharp e Dohme, p.15-52, 2001.

MEINÃO, I. M., *et al.* Doenças Osteometabólicas. In: MOREIRA C.; CARVALHO, M. A. P. **Noções práticas de reumatologia**. Belo Horizonte: Health, v.2, p.379-404, 1998.

MELTON, L. J. Epidemiology of fractures. In: RIGGS, B. L; MELTON, I. I. I. **Osteoporosis: etiology, diagnosis and management**. New York: Raven Press, 1988. p.133-154.

MERKE, J., *et al.* Diminished parathyroid 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> receptors in experimental uremia. **Kidney Int.**, v.32, p.350-3, 1987.

MINDELL, E.; MUNDIS, H. **Vitaminas: guia prático das propriedades e aplicações**. Trad. R. J. Schneider. São Paulo: Melhoramentos. Viver com saúde. 1996.

MONTILLA, R. N. G.; MARUCCI, M. F. N.; ALDRIGHI, J. M. Avaliação do estado nutricional e do consumo alimentar de mulheres no climatério. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v.49, p.91-95, 2003.

MORTON, R. D. Aerobic Plate Count. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington, D. C.: American Public Health Association, chapter 7, p. 63-67, 2001.

MUSHAK, K. Gastro-intestinal absorption of lead in children and adults: overview of biological and biophysico-chemical aspects. **Chemical Speciation and Bioavailability**. v. 3, p. 87-104, 1991.

NATIONAL CONSENSUS PROPOSAL (NCP). **Osteoporosis-basic diagnosis and therapeutic elements**. São Paulo Med J 1995; 113 Suppl: 7-18 apud Costa-Paiva L, Horovitz AP, Santos AO, Fonsechi-Carvasan GA, Pinto-Neto AM. 2003.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH) CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OPTIMAL CALCIUM INTAKE. **Jama**, 272, p.1942-1948, 1994.

NAVES, M. M. V. Pó da casca de ovo como fonte de cálcio: qualidade nutricional e contribuição para o aporte adequado de cálcio. **Revista da UFG**, Goiânia, v.5, n.1, 2003.

NEER, R. M., *et al.* Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. **N Engl J Med**, v.344, p.1434-41, 2001.

NIEVES, J. W. Osteoporosis: the role of micronutrients. **Am J Clin Nutr.**, v.81, n.5,p.1232-1239, 2005.

NORMAN, D. A.; FORDTRAN, J. S.; BRINKLEY, L. J. Jejunal and ileal adaptation to alterations in dietary calcium. **Clin Invest**, v.67, p. 1599-1603, 1981.

NOTELOVITZ, M. Overview of Bone Mineral Density in Postmenopausal Women. **Journal of Reproductive Medicine**, v. 47, p.71-81, 2002.

OFFICE HEALTH ECONOMICS (OHE). **Osteoporose e o risco de fratura**. Tradução na íntegra de: Office Health Economics. Copyright cedido por OHE. 12 Whitehall London SW1 A 2DY; 1990. p.3-40.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Investigaciones sobre la menopausia en los años novientan**. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1996.

PALIN, A. T. A study of the Chloro Derivatives of Ammonia and Related Compounds with Special Reference to Their Formation in the Chlorination of Natural and Polluted Waters. **Water Eng.**, v.248, 1950.

PAPLER, P. G. Osteoporose e exercícios. **Revista do Hospital das Clínicas**, São Paulo, v. 52, p.163-170, 1997.

PARFITT, A. M., *et al.* Effects of Ethnicity and Age or Menopause on Osteoblast Function, Bone Mineralization, and Osteoid Accumulation in Iliac Bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.1.12, n.11, p.1864-1873, 1997.

PARFITT, A. M. Bone remodeling. In: RIGGS, B.L. e MELTON, L. J. **Osteoporosis**, New York: Raven, 1988.

PATSCHEK, D.; LODDENKEMPER, K.; BUTTGEREIT, F. M. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Bone**, v.29, n.6, p.498-505, 2001.

PAZ, L. H. B. C; JORGETTI, V.; YOSHINARI, N. H. Modelos animais de osteoporose. **Rev Hosp Calem Fac Med**, São Paulo, v.52, n.2, p.86-89, 1997.

PEAKE, M. A., *et al.* Cellular Responses to Mechanical Stress Selected Contribution: Regulatory Pathways Involved in Mechanical Induction of c-fos Gene Expression in Bone Cells. **J. Appl. Physiol.**, v.89, p.2498-2507, 2000.

PENA, R. S.; RIBEIRO, C. C.; GRANDI, J. G. Levantamento de isotermas de adsorção de umidade à 25°C, do guaraná em pó, obtido por automização em spray drier. **Anais do III Congresso de Engenharia Mecânica Norte-Nordeste**. Belém: UFPA, 1994. p.1383-1388.

PERRIEN, D. S., *et al.* Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Antagonists Attenuate Ethanol-Induced Inhibition of Bone Formation in a Rat Model of Distraction Osteogenesis. **J. Pharmacol. Exp. Therap**, v.303, n.3, p.904-908, 2002.

PHILIPS, P.; BRADDON, J. Osteoporosis-Diagnosis, Treatment and Management. **Australian Family Physician**, v.33, n.3, 2004.

POPOVIC, M. *et al.* Impact of occupational exposure on lead in women. **Environmental Health Perspectives**. v.113, n.4, p.478-484, 2005.

PRIOR, J. C., *et al.* Spinal bone loss and ovulatory disturbances. **N Engl J Med** 1990; 323:1222-7 apud KRAHE, C., FRIEDMAN, R., GROSS, J. L. Risk factors for decreased bone density in premenopausal women. **Braz J Med Biol Res**, v.30, n.9, p.1061-1066, 1997.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2007.

RADOMINSKI, S. C, PINTO-NETO, A.M., MARINHO, R.M. **Osteoporose pós-menopausa: Diretrizes da Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, 2002.

RAYA, M. P., *et al.* Vitamin D Insufficiency, Bone Density, and Metabolism in Healthy. **J. Bone Miner Res.**, v.16, p.1408-1415, 2001.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the Ain-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.

REID, I. R. Glucocorticoid osteoporosis mechanisms and management. **European Journal of Endocrinology**, v.137, n.3, p.209-217, 1997.

RICHART, R. M.; LINDSAY, R. **Osteoporosis and its relationship to estrogen.** **Contemporary Ob/Gyn**, v.24, p.201-224, 1984 apud AISENBREY, J.A., 1987.

RIGGS, B. L. The Mechanics of Estrogen Regulation of Bone Resorption. **J. Clin. Invest.**, v.106, p.1203-1204.

RITSON, F.; SCOTT, S. **Physiotherapy for osteoporosis: a pilot study comparing practice and knowledge in Scotland and Sweden.** Physiotherapy 1996; 82(7) apud Rennó ACM, Driusso P, Ferreira V. 2001.

ROBERTS, H.J. Potential toxicity due to dolomite and bone-meal. **Southern Medical Journal**. v. 76, p. 556-559, 1983.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M. A.; GARCÍA-COHEN, E. C. Role of  $\text{Ca}^{2+}$  and vitamin D in the prevention and treatment of osteoporosis. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.93, p.37-49, 2002.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis-A perspective for the 1990s. **Nature**. v.362, n.6423, p.801-809, 1993.

SAMPAIO, L. R. **Avaliação da dieta de idosos residentes no município de São Paulo.** 1997. 86p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana Aplicada) - Universidade de São Paulo.

SANT'ANA, L. F.R; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; GOMES, M. R. A. Valor nutritivo e fatores antinutricionais de multimisturas utilizadas como alternativa alimentar. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3, p.129-135, 2000.

SANTOS, H. B. *et al.*. Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais numa dieta enriquecida com multimistura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.4, p.613-618, 2004.

SAVILLE, P. D. Changes skeletal mass and fragility which castration in the rat: a model of osteoporosis. **J Am Geriatric Soc**, v.17, p.155- 66, 1969.

SCELFO, G. M.; FLEGAL, R. Lead in calcium supplements. **Environmental Health Perspectives**, v.108, p.309-313, 2000.

SCHAAFSMA, A. I., *et al.* Mineral, Amino Acid, and Hormonal Composition of Chicken Eggshell Powder and the Evaluation of its Use in Human Nutrition. **Poultry Science**, v.79, p.1833-1838, 2000.

SCHOT, L. P. C.; SCHUURS, A. H. W. M. Pathophysiology of bone loss in castrated animals. **Journal of Steroid Biochemistry na Molecular Biology**, v.73, n.3, p.461-465, 1990.  
SEGAL, L. G.; LANE, N. E. Controlling steroids osteoporosis. **Journal of Musculoskeletal Medicine**, v.14, n.1, p.43-56, 1997.

SGARBieri, V.C. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas:UNICAMP, 1987.

SILVA, C. C.; TEIXEIRA, A. S.; GOLDBERG, T. B. L. Impacto da ingestão de cálcio sobre a mineralização óssea em adolescentes. **Revista de Nutrição**, v.17, n.3, p.351-359, 2004.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**. v.30, n.7, p.1190-1206, 1958.  
SPENCER, H; KRAMER, L.; OSIS, D. Effect of calcium on phosphorus metabolism in man. **Am J Clin Nutr**, v.40, n.2, p.219-25, 1984.

SZEJNFELD, V. L. Osteoporose. **Rev Bras Med**, v.61, n.7, p.417-28, 2004.

SZEJNFELD, V. L. **Alterações ósseas: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento**. In: FERNANDES, C. E. Menopausa: diagnóstico e tratamento. 1<sup>a</sup>ed. São Paulo: Seguimento, 2003.

SZEJNFELD, V. L. **Reumatologia**. In: PRADO, F. C; RAMOS, J.; VALLE, J. R. Atualização terapêutica. 20<sup>a</sup>ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

TIVERON, M. B. **Estudo clínico, biomecânico e histológico do efeito da menopausa induzida por ooforectomia no tecido ósseo. Modelo experimental em ratas.** 2005. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.

TOSTES, E. S. L.; RIBEIRO, C. C.; GRANDI, J. G. Isoterma de Adsorção de Umidade à 15°C do pó de Marapuama Obtido em spray drier. **Anais do XXXIV Congresso Brasileiro de Química. Porto Alegre.** Rio Grande do Sul, 1994.

TURNBERG, L. A.; RILEY, S. A. Digestion and absorption of nutrients and vitamins. In Slesinger & Fordtran: **Gastrointestinal Disease**, 5<sup>a</sup> ed, Saunders, 1993. p. 977-1008.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA). **Consumo de ovos: Em 2006, o brasileiro consumiu 141 ovos.** Disponível em: <<http://www.aviculturaindustrial.com.br>>. Acesso em 15 nov. 2008.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. **Food bone pathogens an illustrated text.** Wolf Publishing, London. 1991. 577 p.

VIANNA, U. Histofisiologia do tecido ósseo. **Rev. Bras. Clin. Ter.**, v.17, n.10, p.331-339, 1988.

VOGEL, H. G. Influence of maturation and aging on biomechanical properties of connective tissue in rats. **Mech Ageing Dev**, v.14, p.283- 92, 1980.

WADE, J. P. Rheumatology: Osteoporosis. **Can. Med. Assoc. J.**, v.165, n.1, p.45-50, 2001.

WALLACE, H. *et al. Salmonella*. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** Washington, D. C.: American Public Health Association, chapter 37, p. 357-380, 2001.

WEAVER, C. M., HEANEY, R. P. Cálcio. In: SHILS, M. E., OLSON, J. A., SHIKE, M., ROSS, A. C. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.** 9<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 2003. p.153-167.

WEAVER, C. M., *et al.* Human calcium absorption from whole-wheat products. **J Nutr**, v.121, p.1769-1975, 1991.

WEBER, P. Management of osteoporosis: is there a role for vitamin K? **Int J Vitam Nutr Res**, v.67, n.5, p.350-6, 1997.

WEINSIER, R. L.; KRUMDIECK, C. L. Dairy foods and bone health: examination of the evidence. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, n. 3, p. 681-689, 2000.

WHEDON, G. D. Osteoporosis. **N Engl J Med**, v.6, p.397-8, 1981.

WHITING, S.J. Safety of some calcium supplements questioned. **Nutrition Reviews**. v.52, p. 95-97, 1994.

WILLIAMS, S. R. **Fundamentos de nutrição e dietoterapia**. Porto Alegre: Artmed Editora; 1997. 668p.

WOOD, R. J.; ZHENG, J. J. High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans. **Am J Clin Nutr**, v.65, p.1803-9, 1997.

YANDELL, B. S. **Practical data analysis for designed experiments**. London: Chapman & Hall; 1997.

YASUI, T., *et al.* Hormone replacement therapy in postmenopausal women. **J Med Invest**, v.50, n.3-4, p. 136-45, 2003.

YAZBEK, M. A.; MARQUES-NETO, J. F. Osteoporose e outras doenças osteometabólicas no idoso. **Einstein**, v.6 (Supl 1), p.74-78, 2008.

YUAN, Z., *et al.* Effects of Alcohol-Related on Hip Fracture and Mortality: a Retrospective Cohort Study of Hospitalized Beneficiaries. **Journal of Public Health**, v.91, p.1089-1093, 2001.

ZABAGLIA, C. S. F, *et al.* Is tubal ligation a risk factor for a reduction of bone mineral density in postmenopausal women? **RevBras Ginecol Obstet**, v.23, n.10, p.621-626, 2001.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Upper Saddle River: Prentice Hall; 1999.

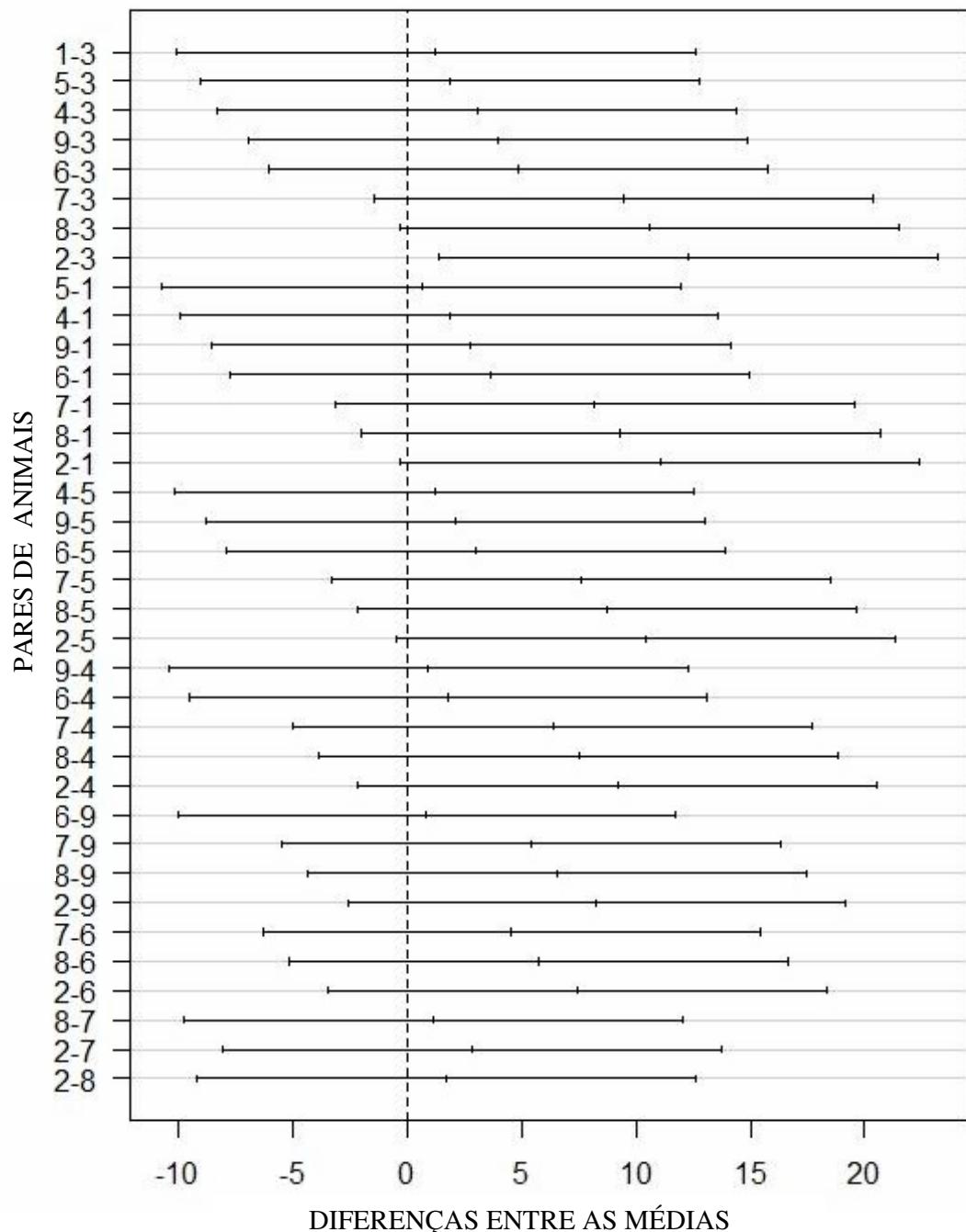
## 7 ANEXOS

**Anexo 1.** Tabela do tamanho das partículas da casca de ovo em pó

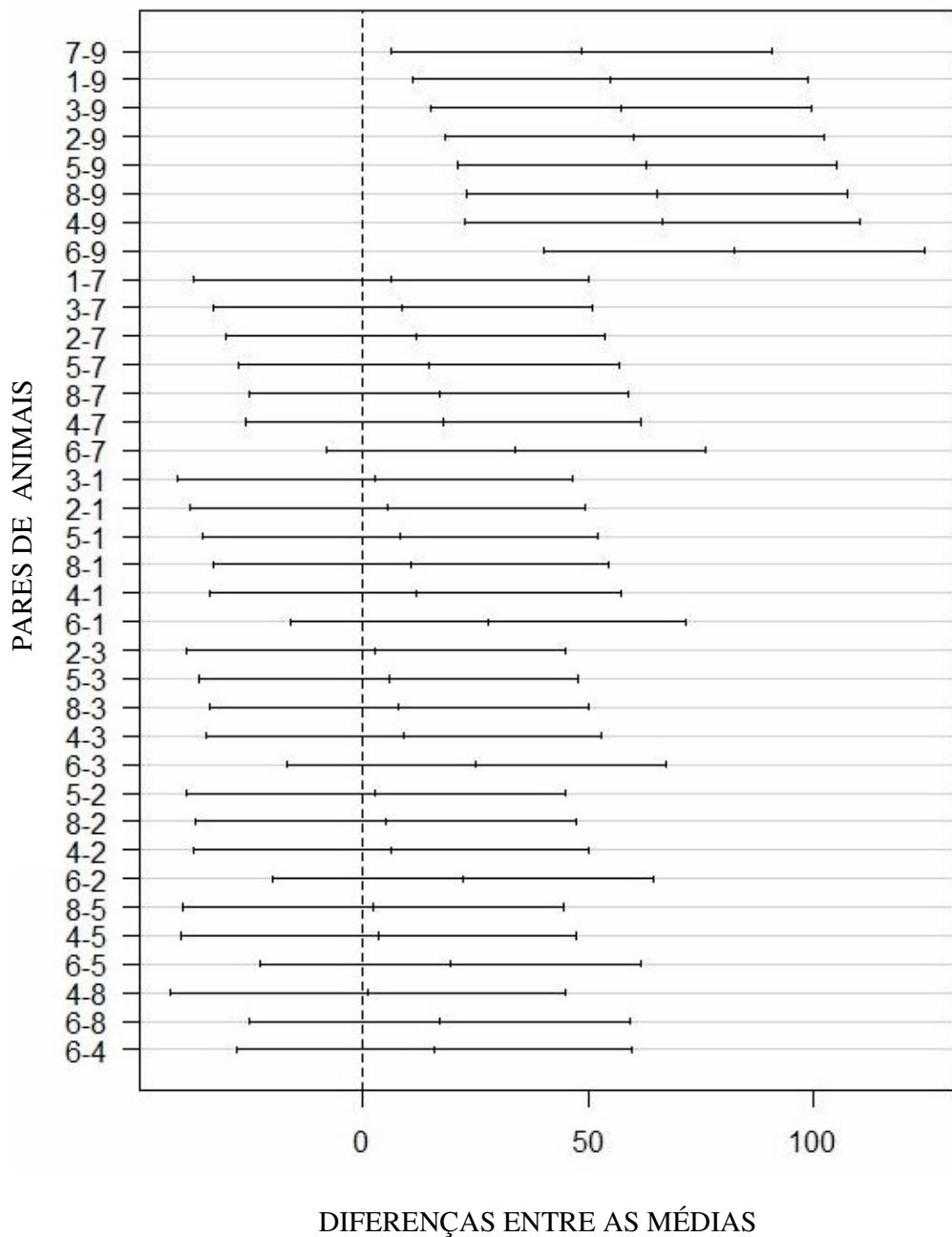
TP (µm)	Freqüência	TP (µm)	Frequência
0,16	0,02	11,27	4,20
0,19	0,02	12,92	4,69
0,22	0,03	14,80	5,16
0,25	0,05	16,97	5,54
0,29	0,08	19,44	5,76
0,33	0,11	22,28	5,77
0,37	0,16	25,53	5,51
0,43	0,21	29,25	5,02
0,49	0,28	33,52	4,36
0,56	0,37	38,41	3,65
0,65	0,47	44,01	2,97
0,74	0,58	50,44	2,38
0,85	0,70	57,79	1,87
0,97	0,84	66,23	1,43
1,11	0,97	75,89	1,05
1,28	1,11	86,96	0,73
1,46	1,24	99,65	0,47
1,68	1,37	114,19	0,26
1,92	1,49	130,85	0,00
2,20	1,60	149,94	0,00
2,52	1,71	171,82	0,00
2,89	1,82	196,89	0,00
3,31	1,94	225,61	0,00
3,79	2,06	258,53	0,00
4,35	2,20	296,25	0,00
4,98	2,36	339,48	0,00
5,71	2,54	389,01	0,00
6,54	2,75	445,77	0,00
7,49	3,02	510,80	0,00
8,59	3,35	585,33	0,00
9,84	3,75	670,73	0,00

**OBS:** Os números das combinações dos pares dos grupos de animais representado difere dos números de grupos distribuídos conforme a ração oferecida. Para tal, vale esclarecer que os grupos basal e rações experimentais 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 equivalem, respectivamente aos grupos 9, 8, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

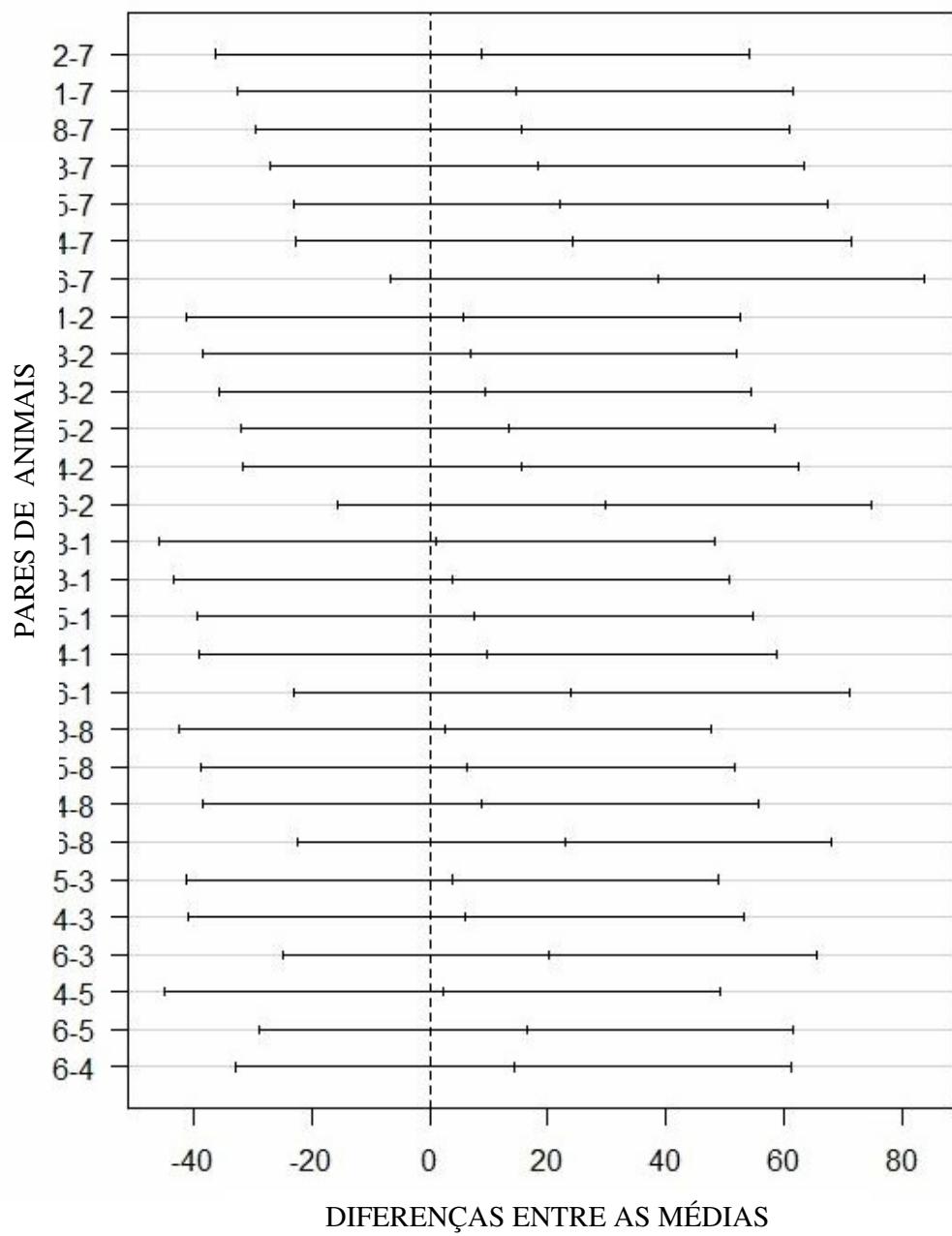
**Anexo 2.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos pesos iniciais dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



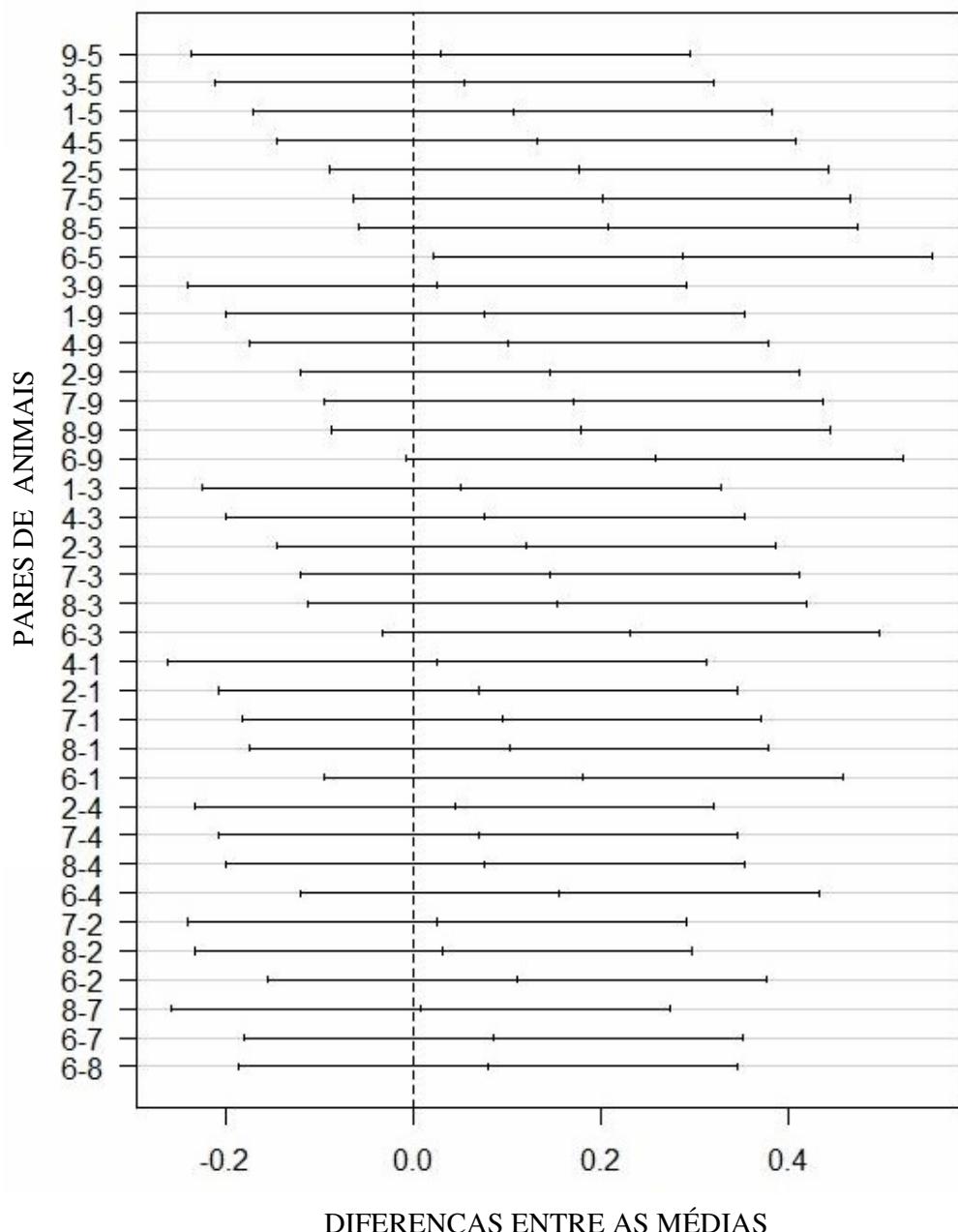
**Anexo 3.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos pesos dos animais, após a morte, entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



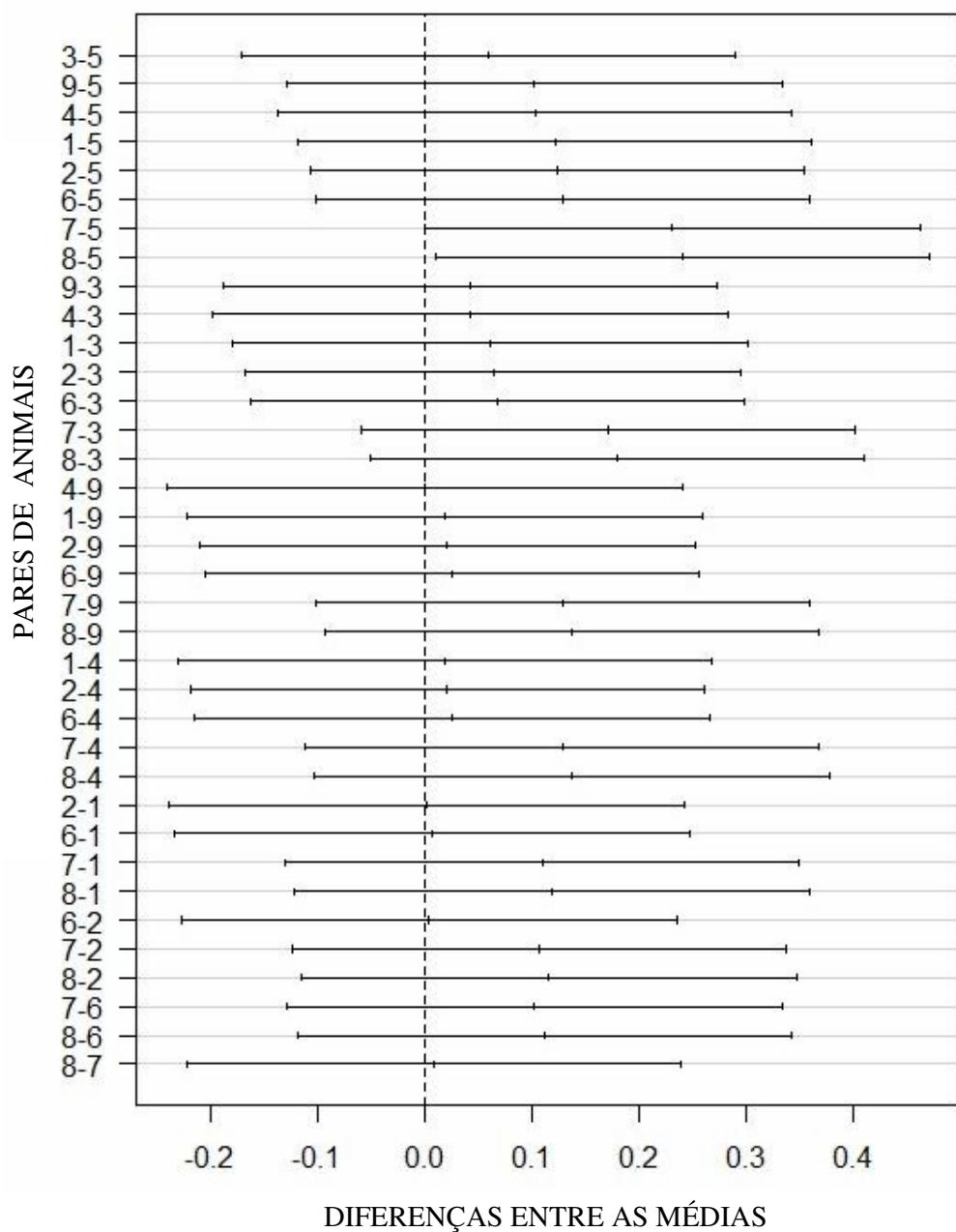
**Anexo 4.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças no ganho de peso entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



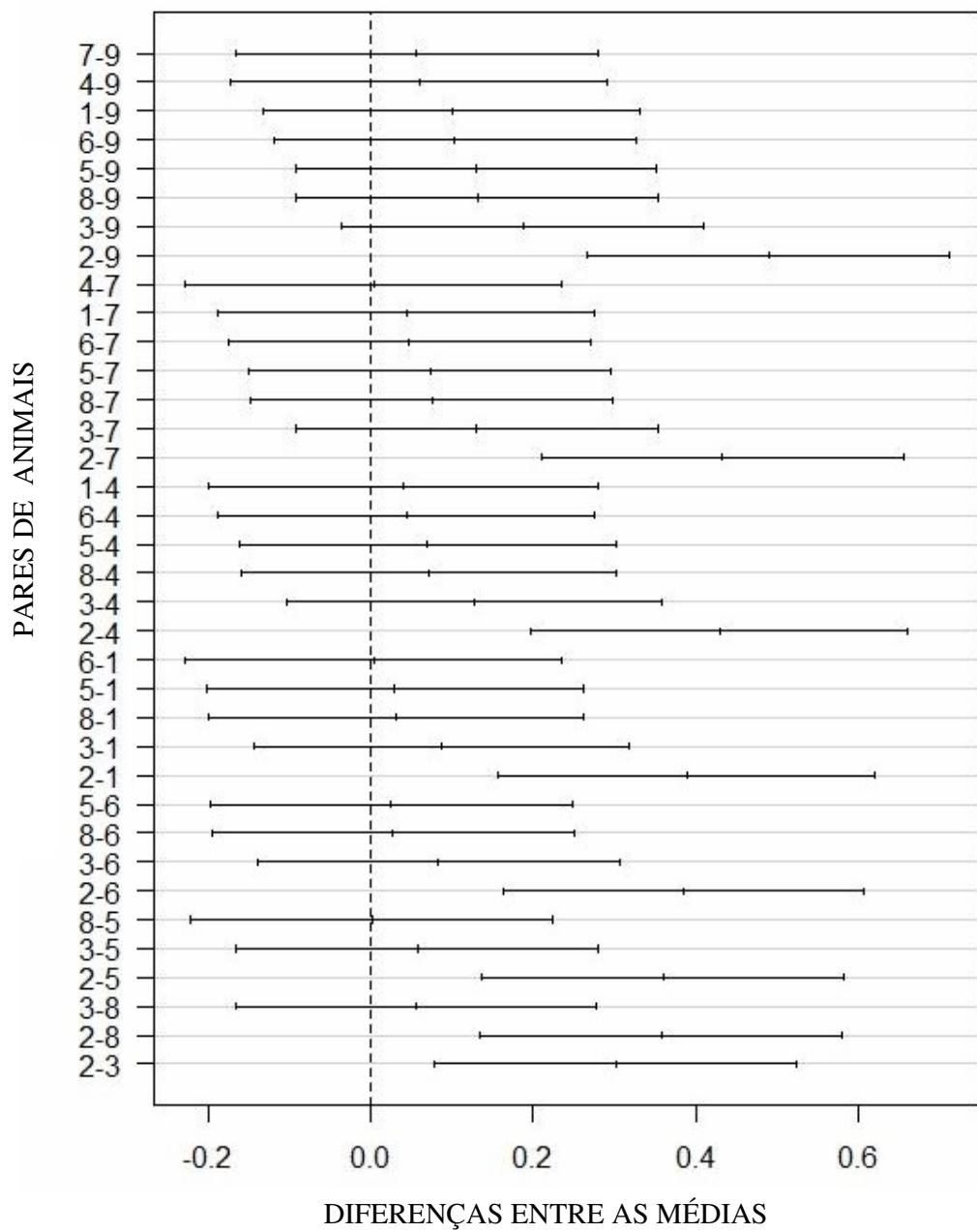
**Anexo 5.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos pesos dos fêmures direitos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



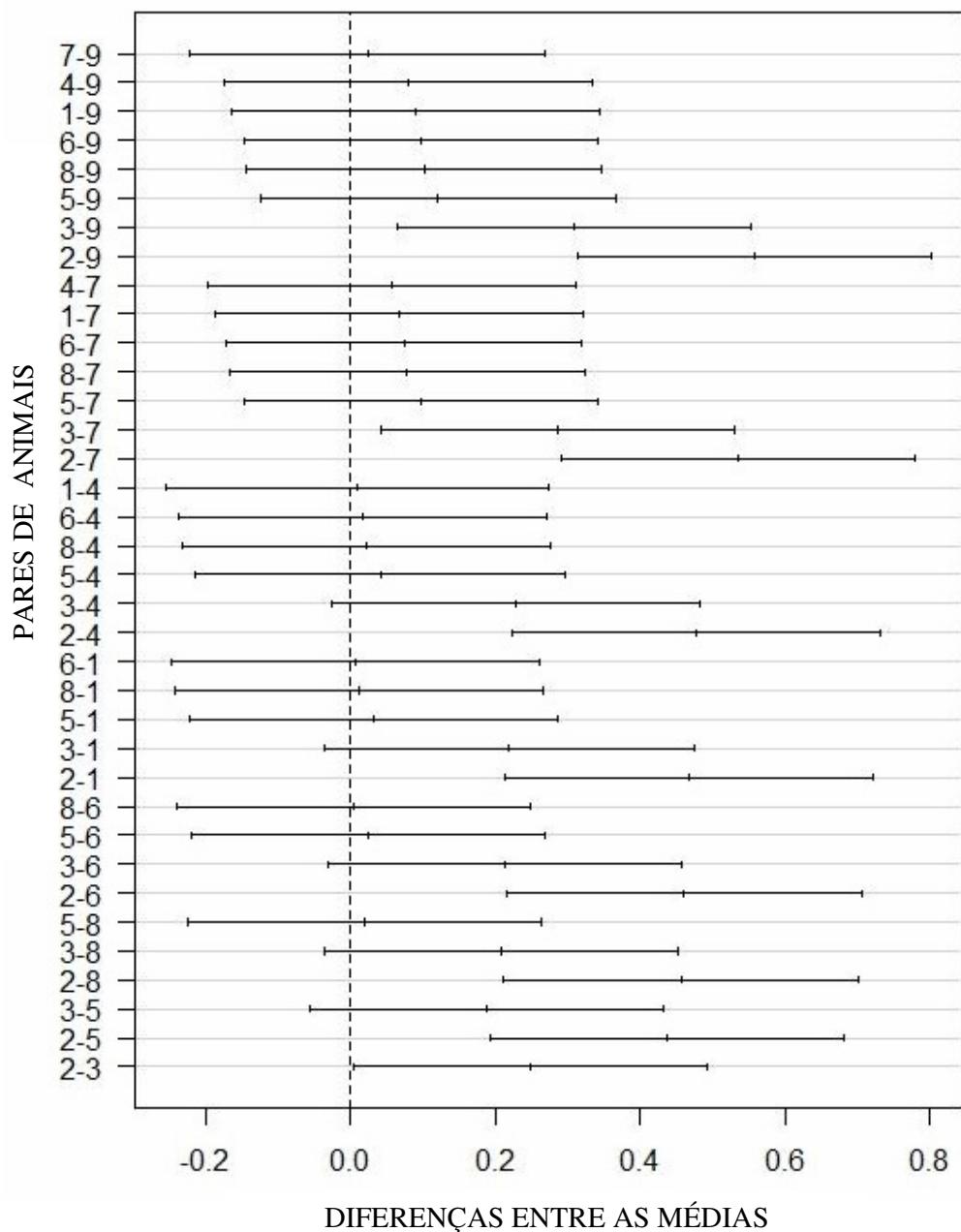
**Anexo 6.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos pesos dos fêmures esquerdos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



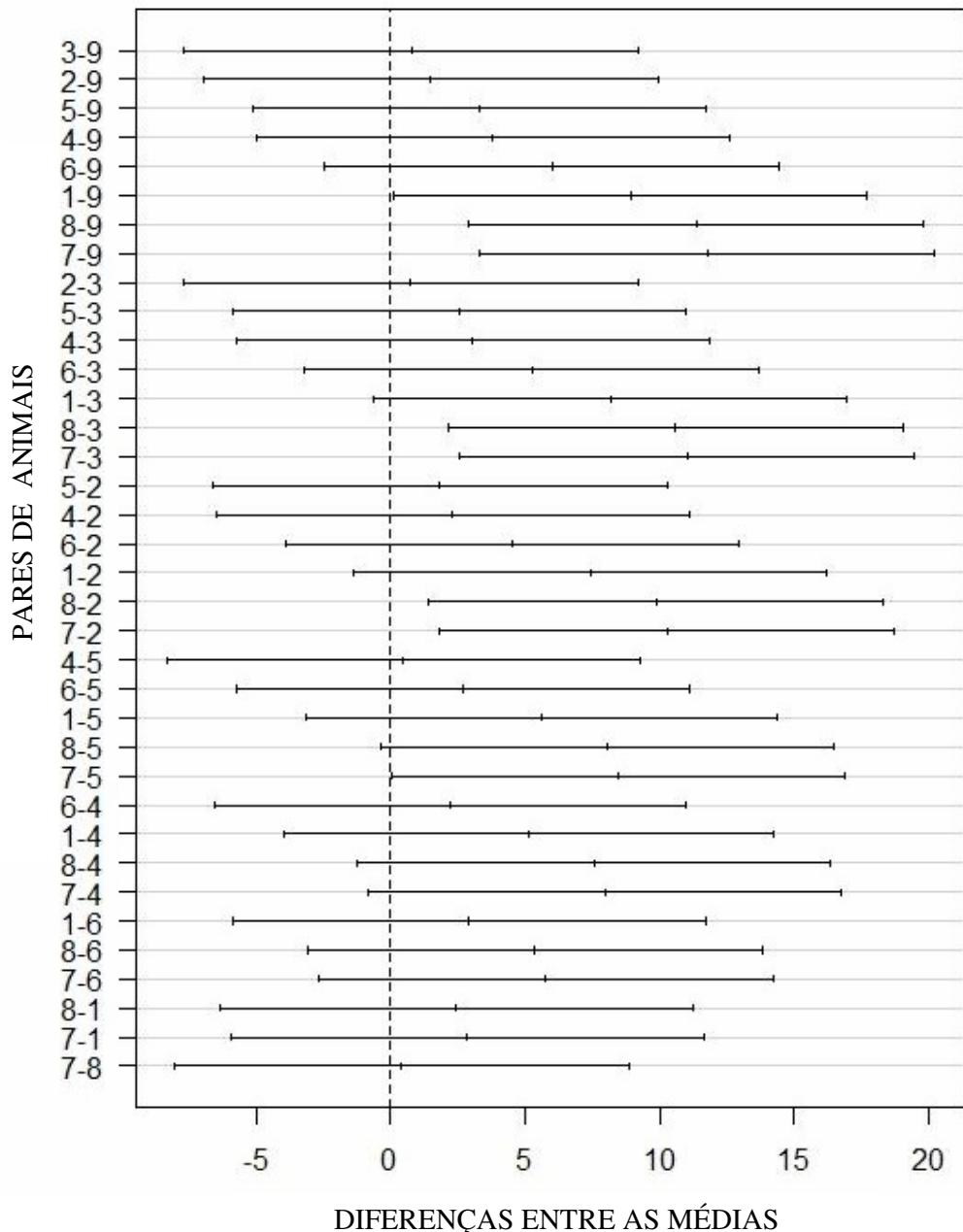
**Anexo 7.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos pesos dos rins direitos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



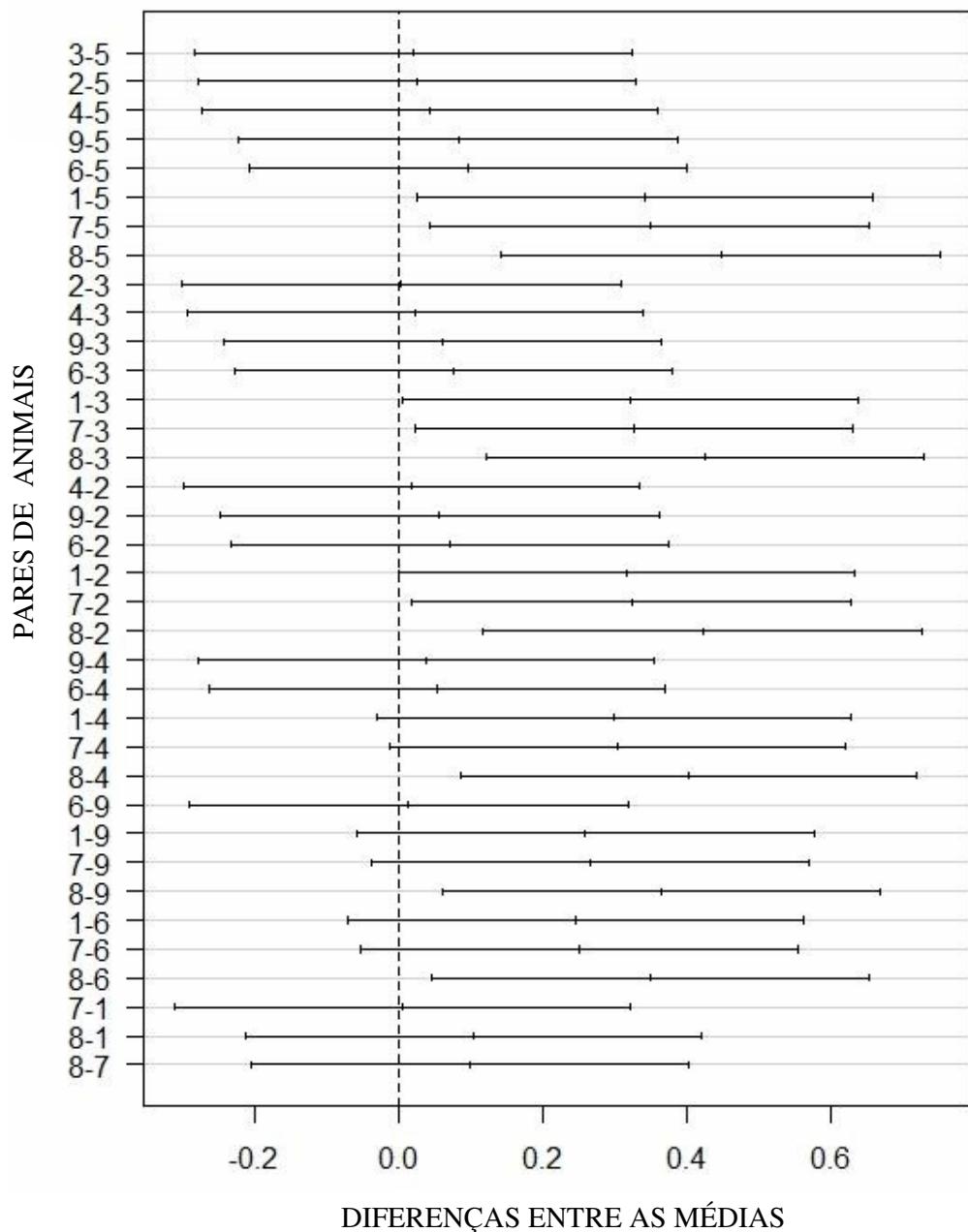
**Anexo 8.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos pesos dos rins esquerdos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



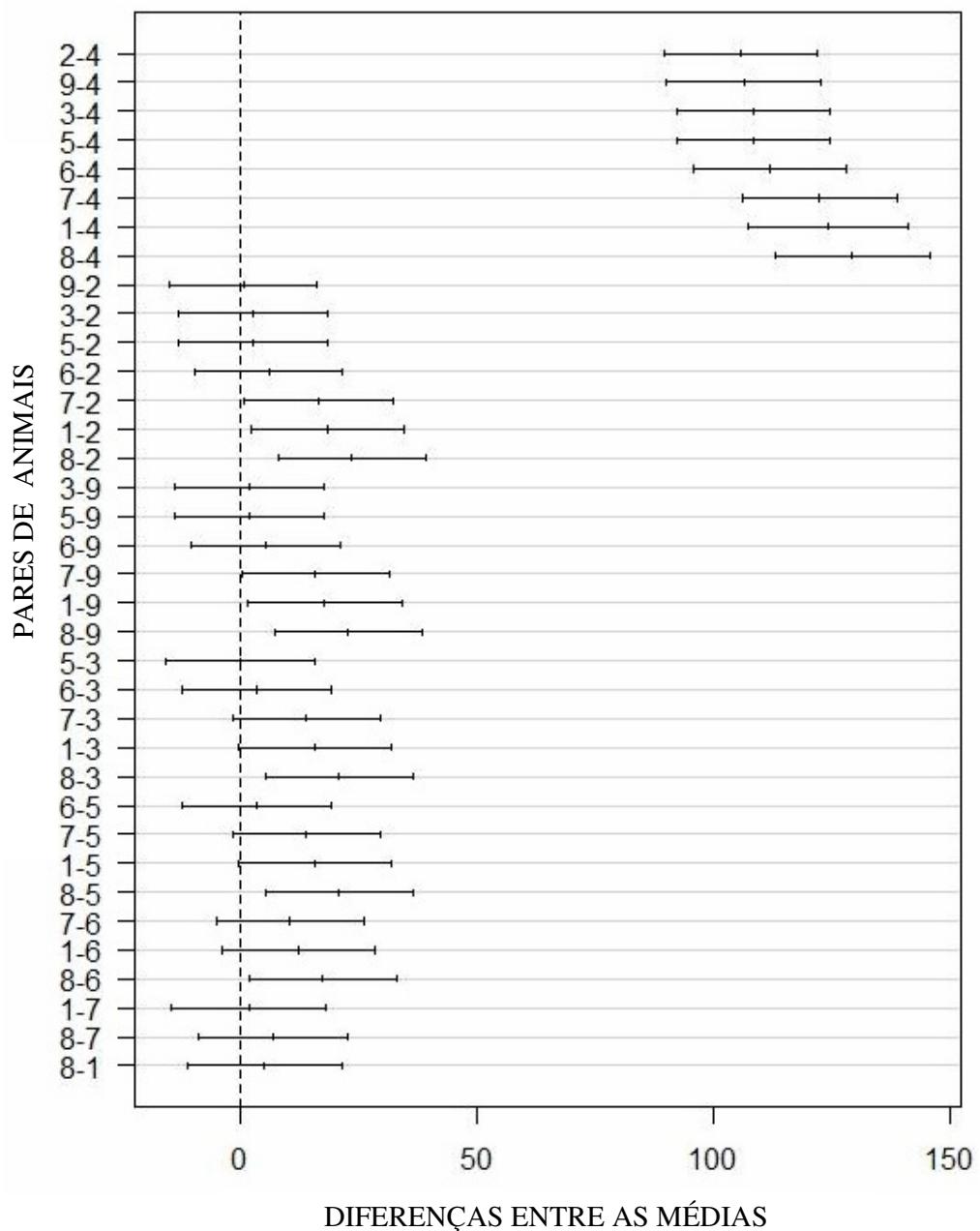
**Anexo 9.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de fósforo ósseo dos fêmures esquerdos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



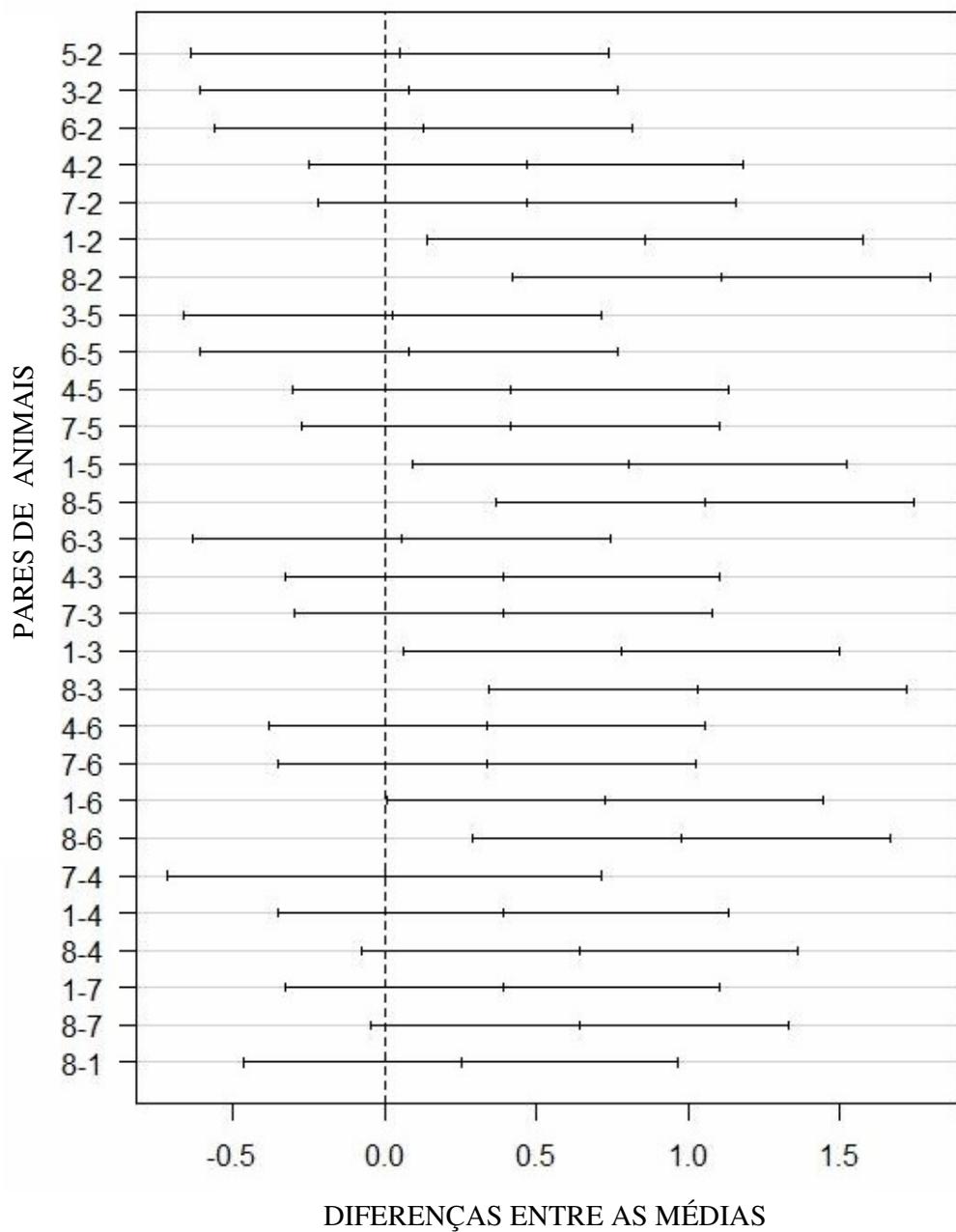
**Anexo 10.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de magnésio ósseo nos fêmures esquerdos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



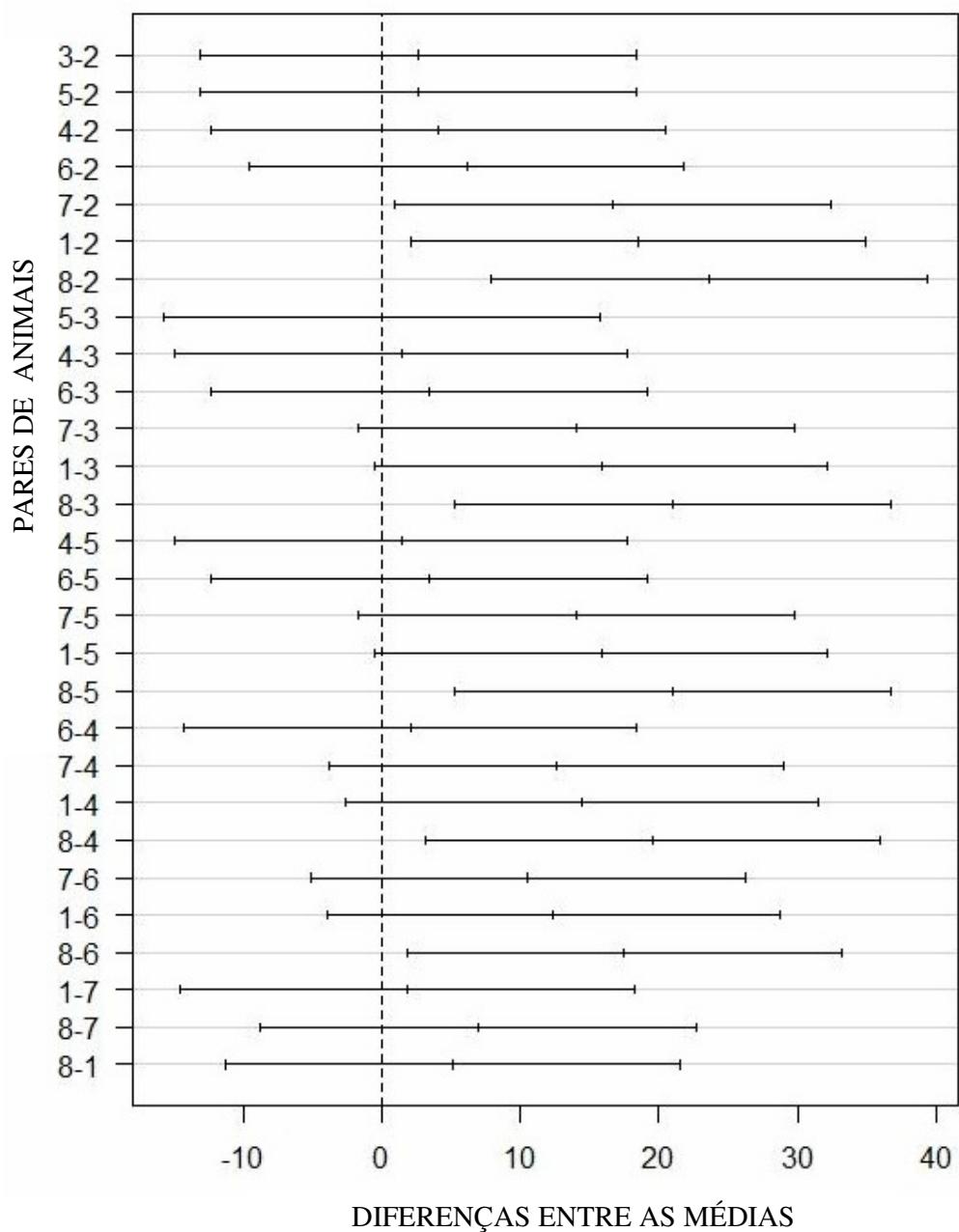
**Anexo 11.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de cálcio ósseo nos fêmures esquerdos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



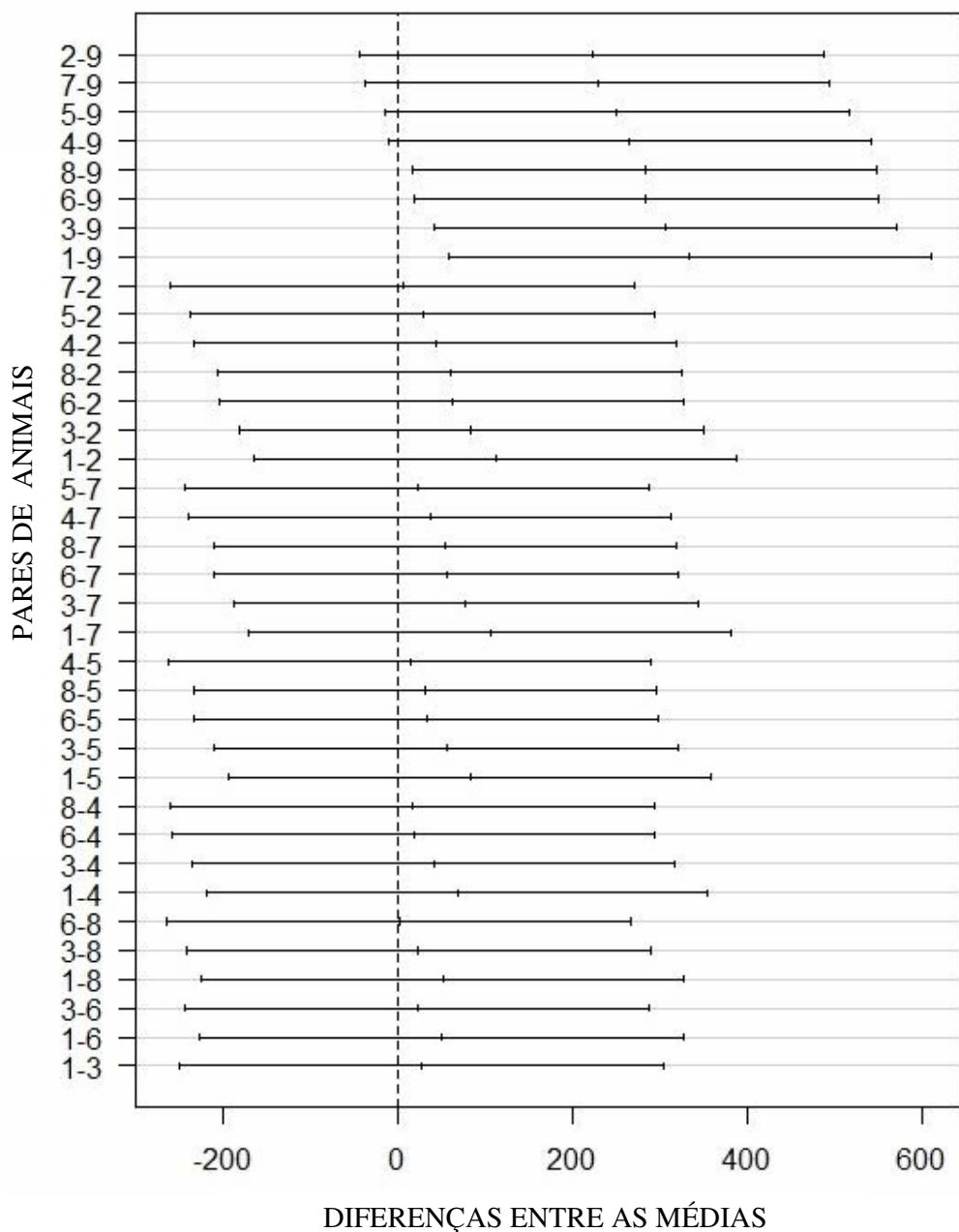
**Anexo 12.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças na utilização biológica de cálcio dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



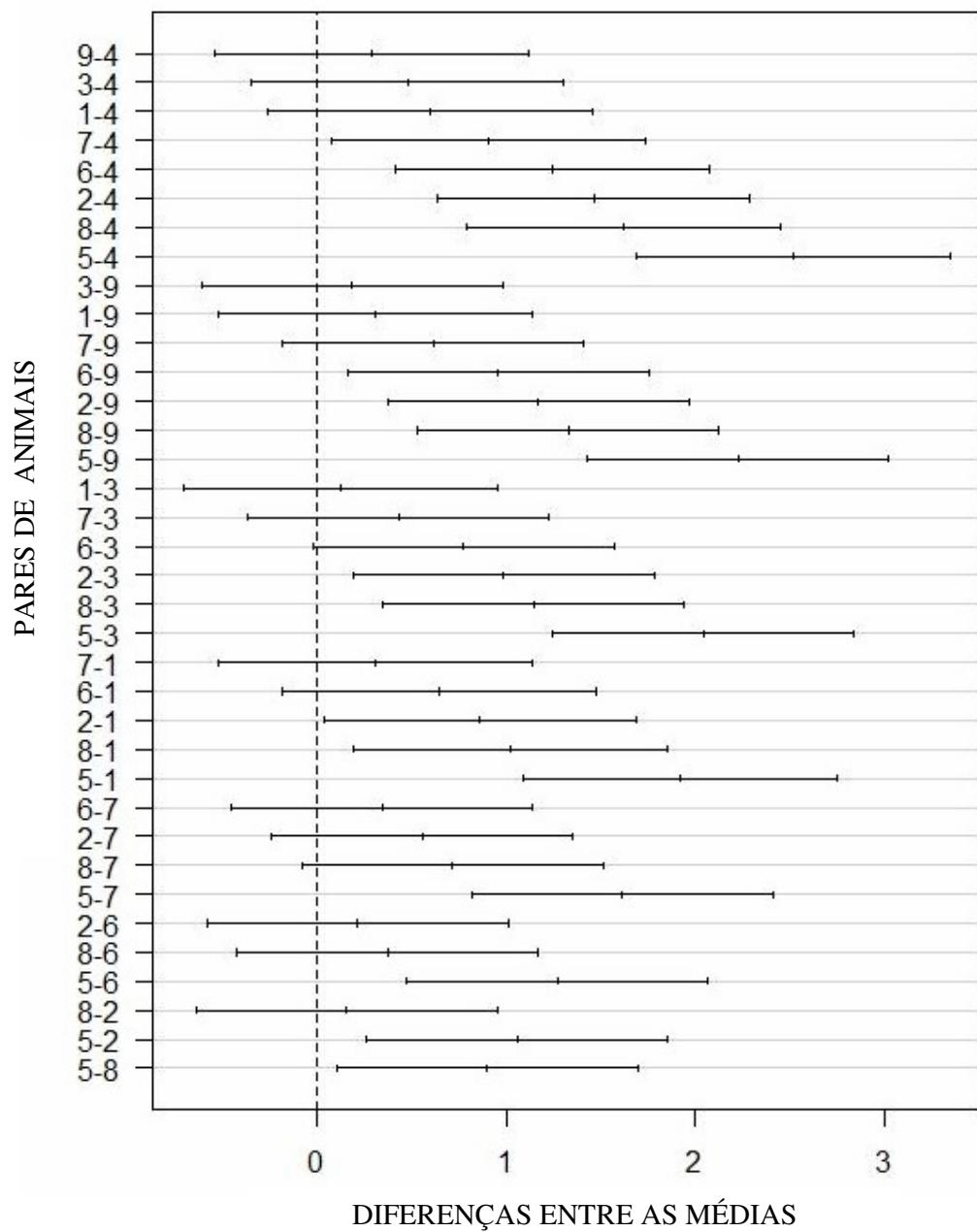
**Anexo 13.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de cálcio retido nos fêmures esquerdos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



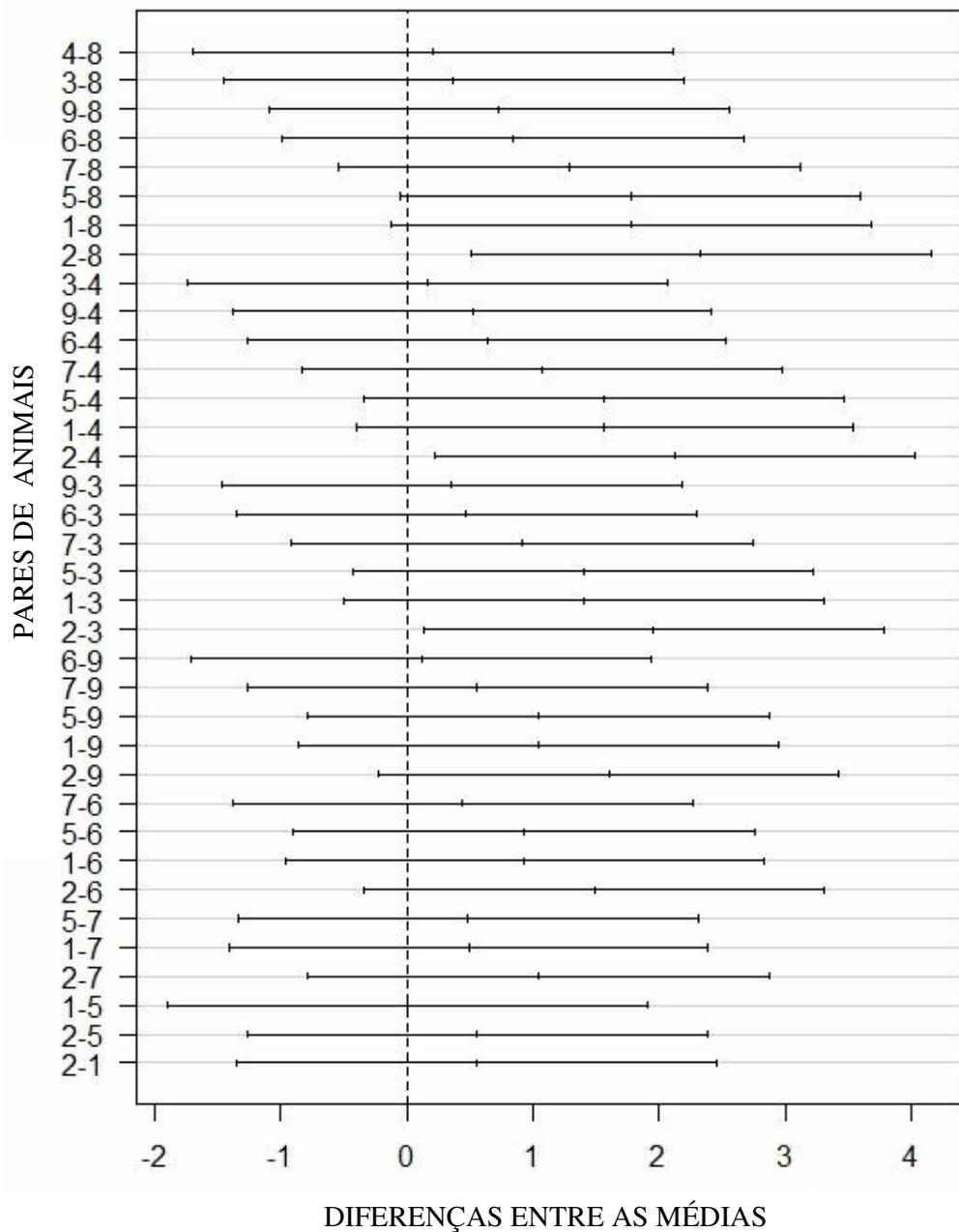
**Anexo 14.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de fosfatase alcalina sérica dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



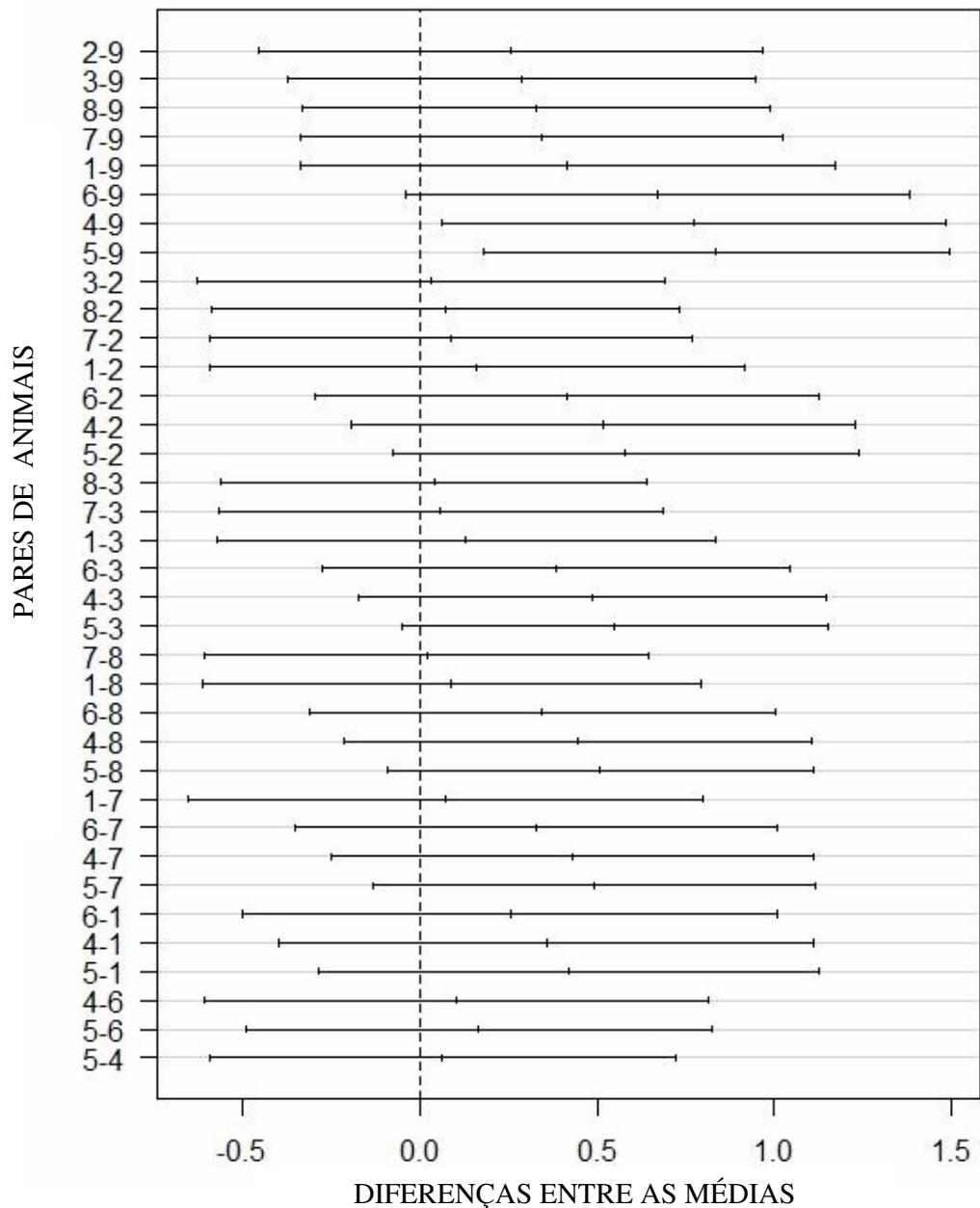
**Anexo 15.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de cálcio sérico dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



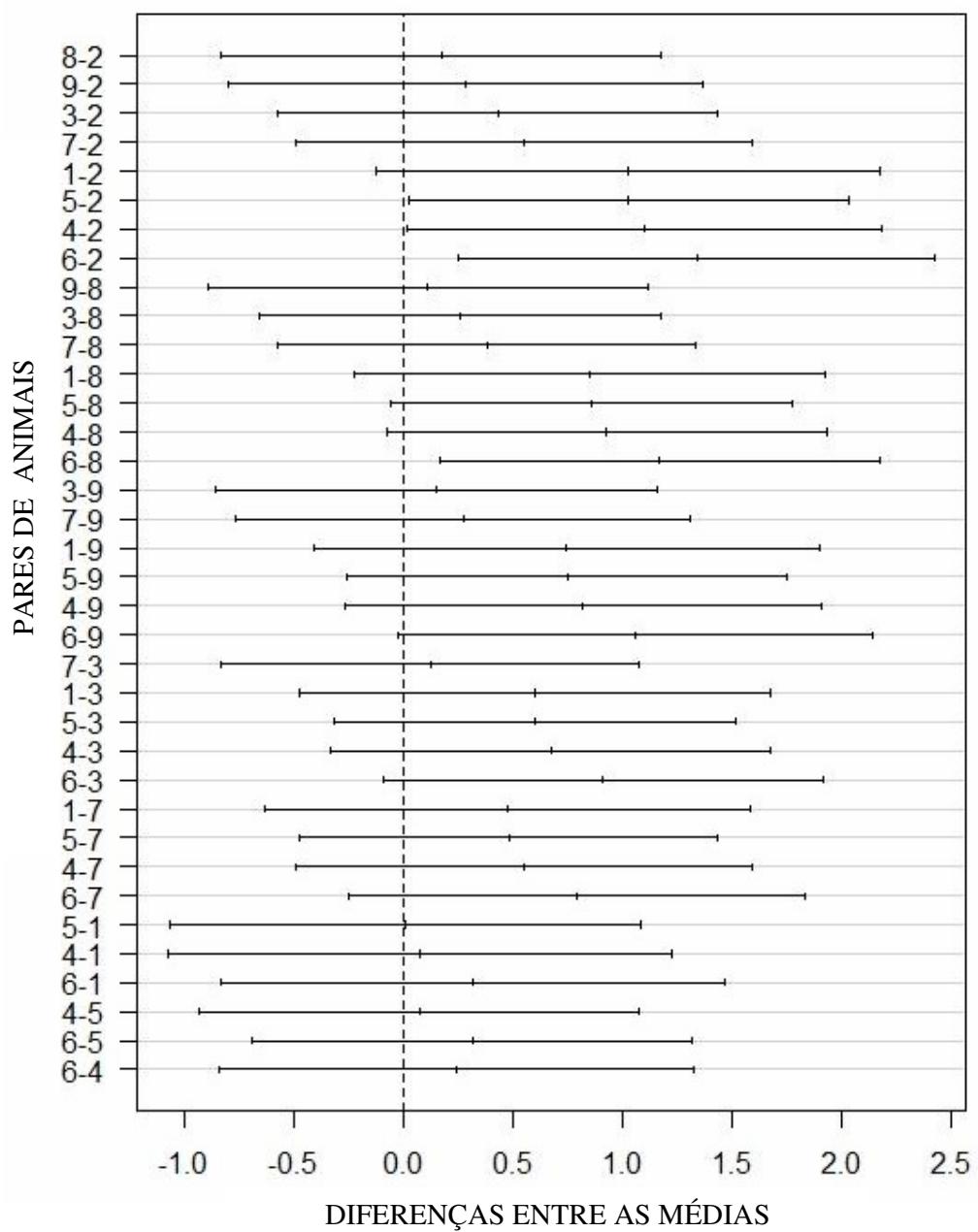
**Anexo 16.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de fósforo sérico dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



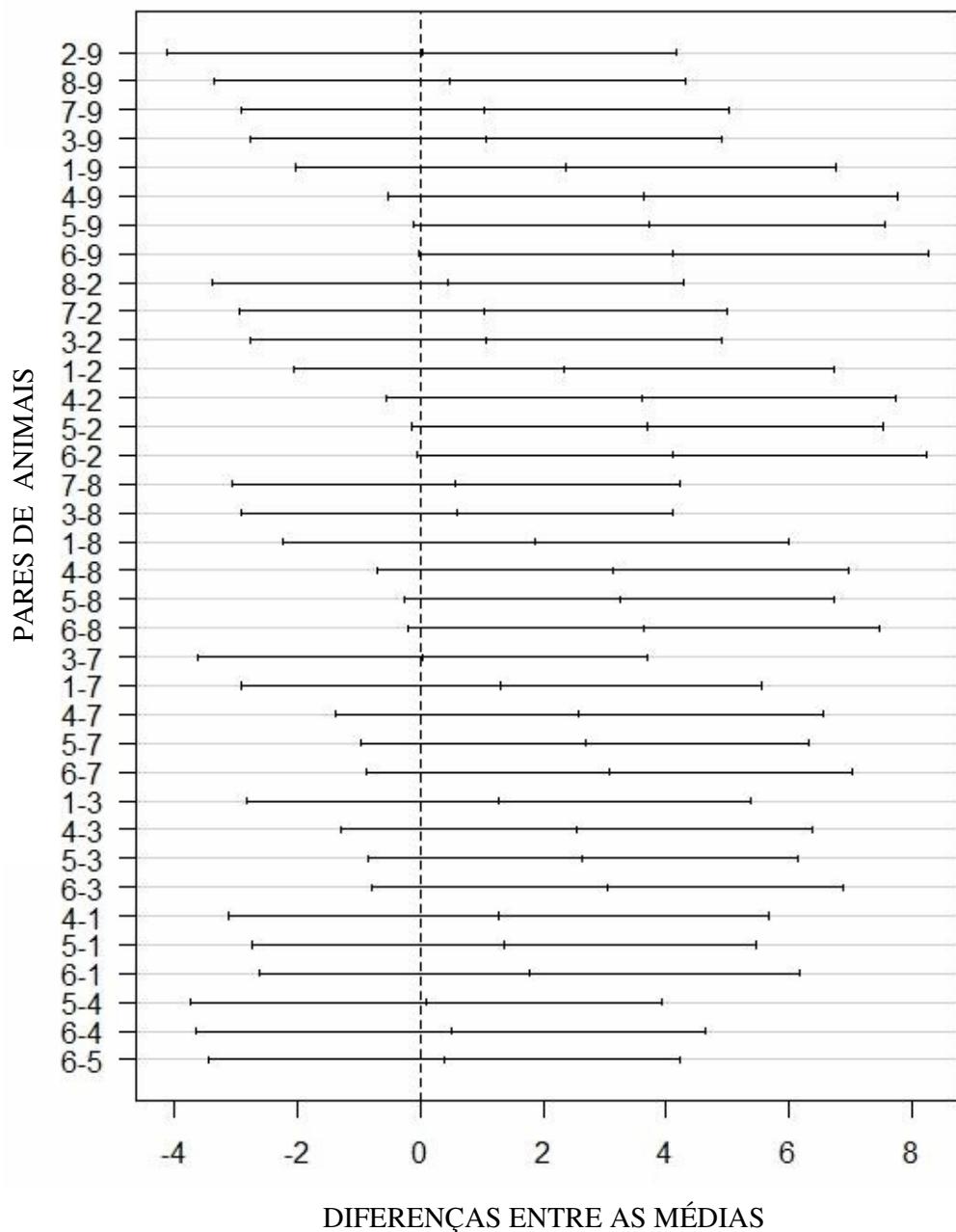
**Anexo 17.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de hemácias dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



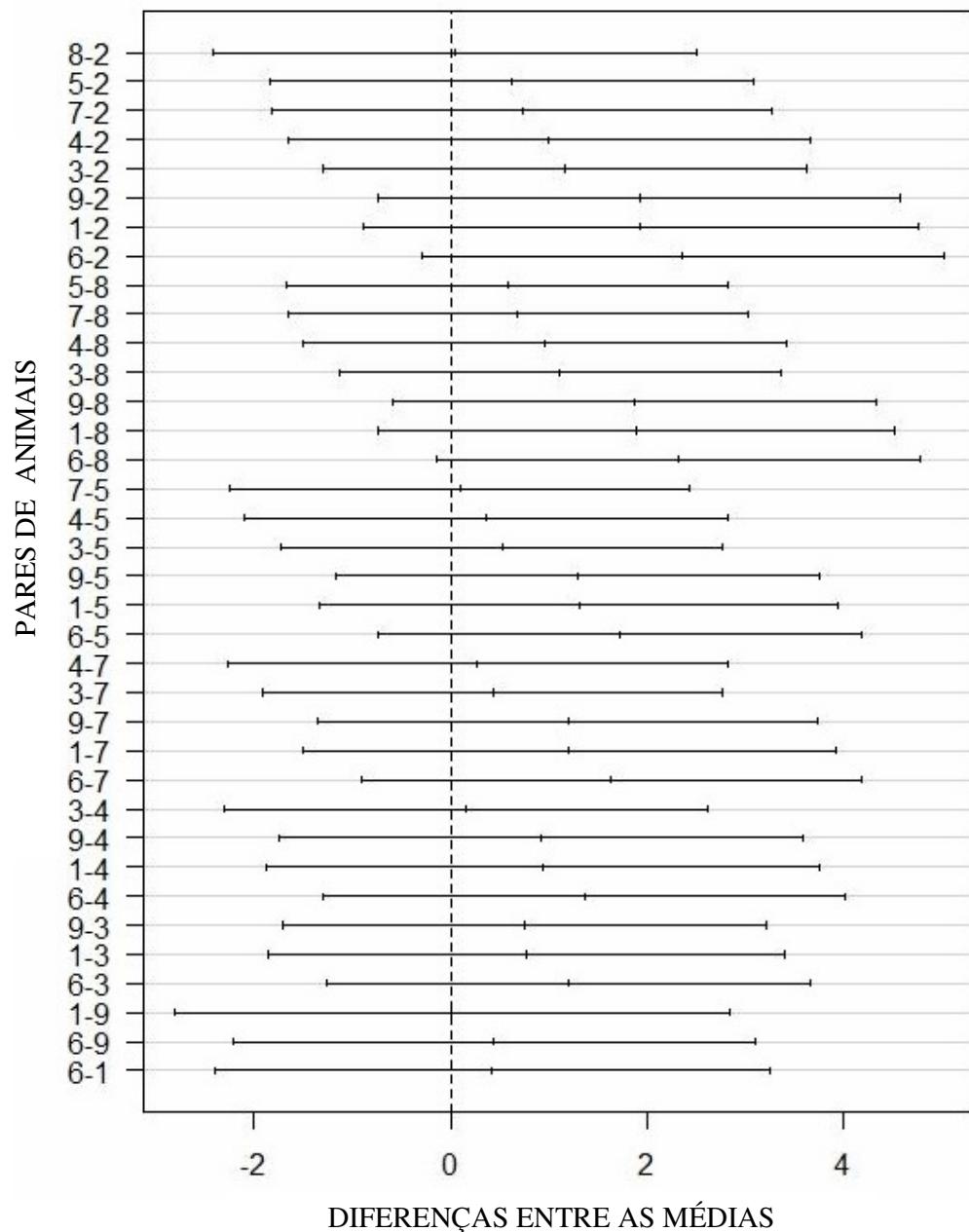
**Anexo 18.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de hemoglobina dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



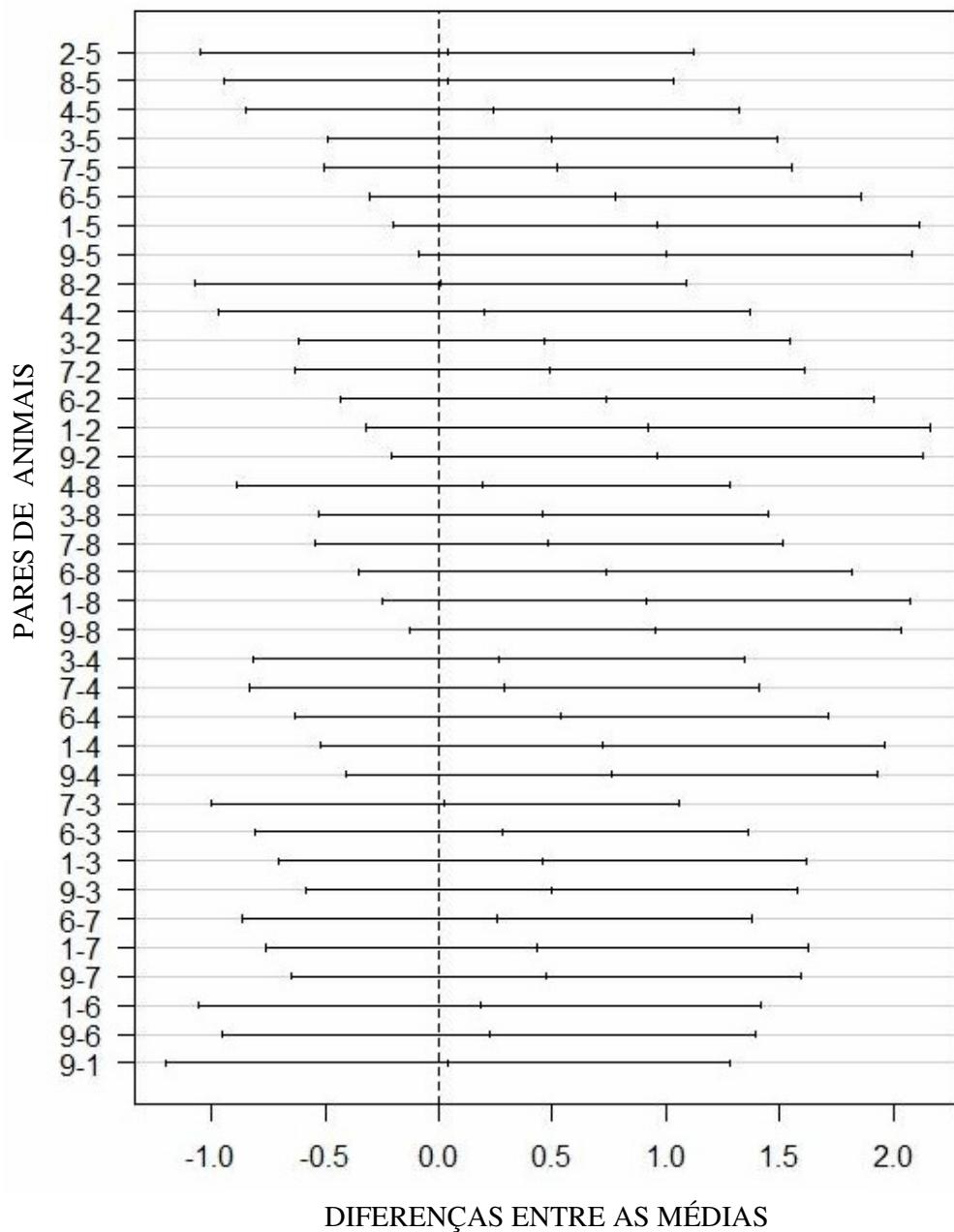
**Anexo 19.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de hematócritos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



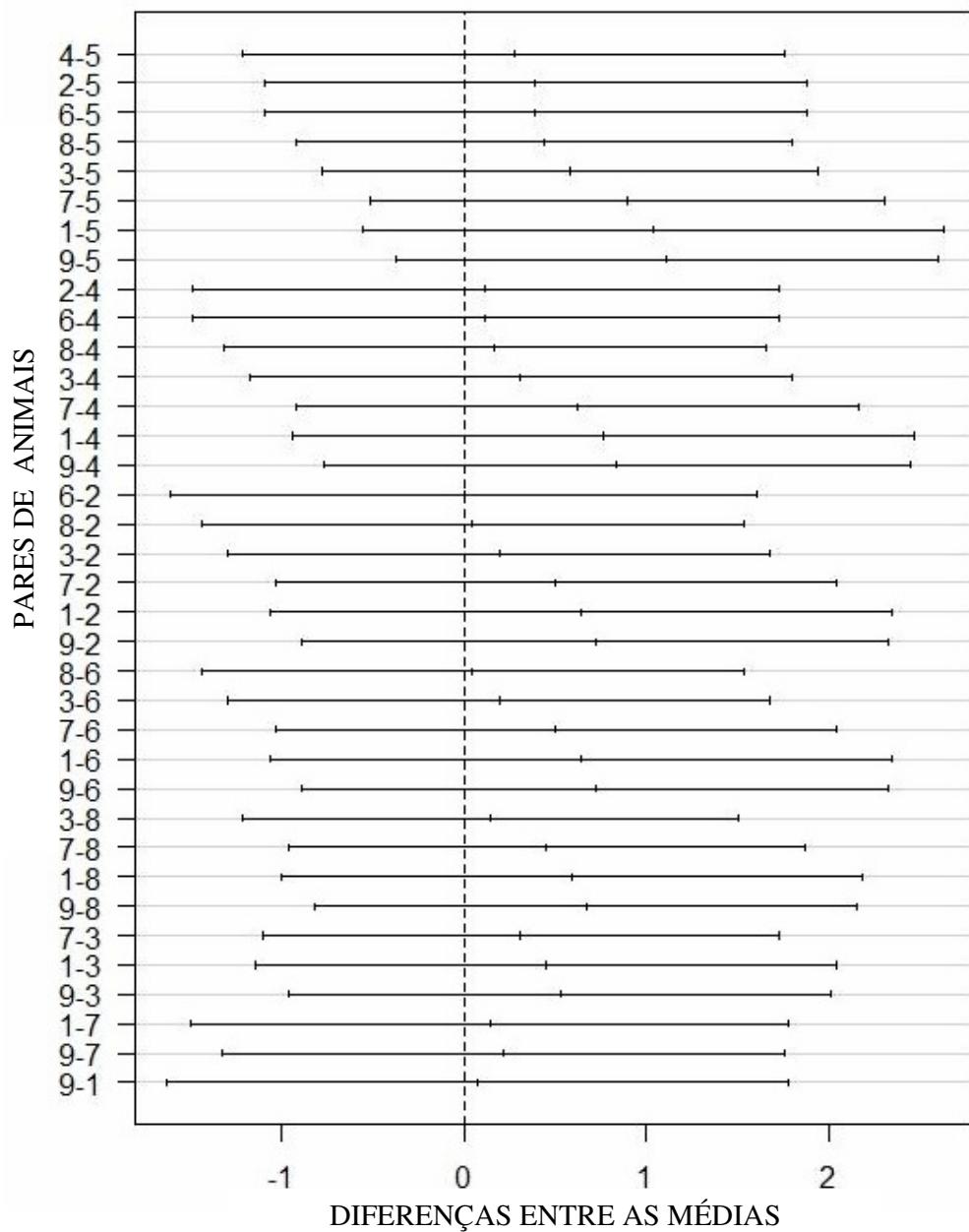
**Anexo 20.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de VGM dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



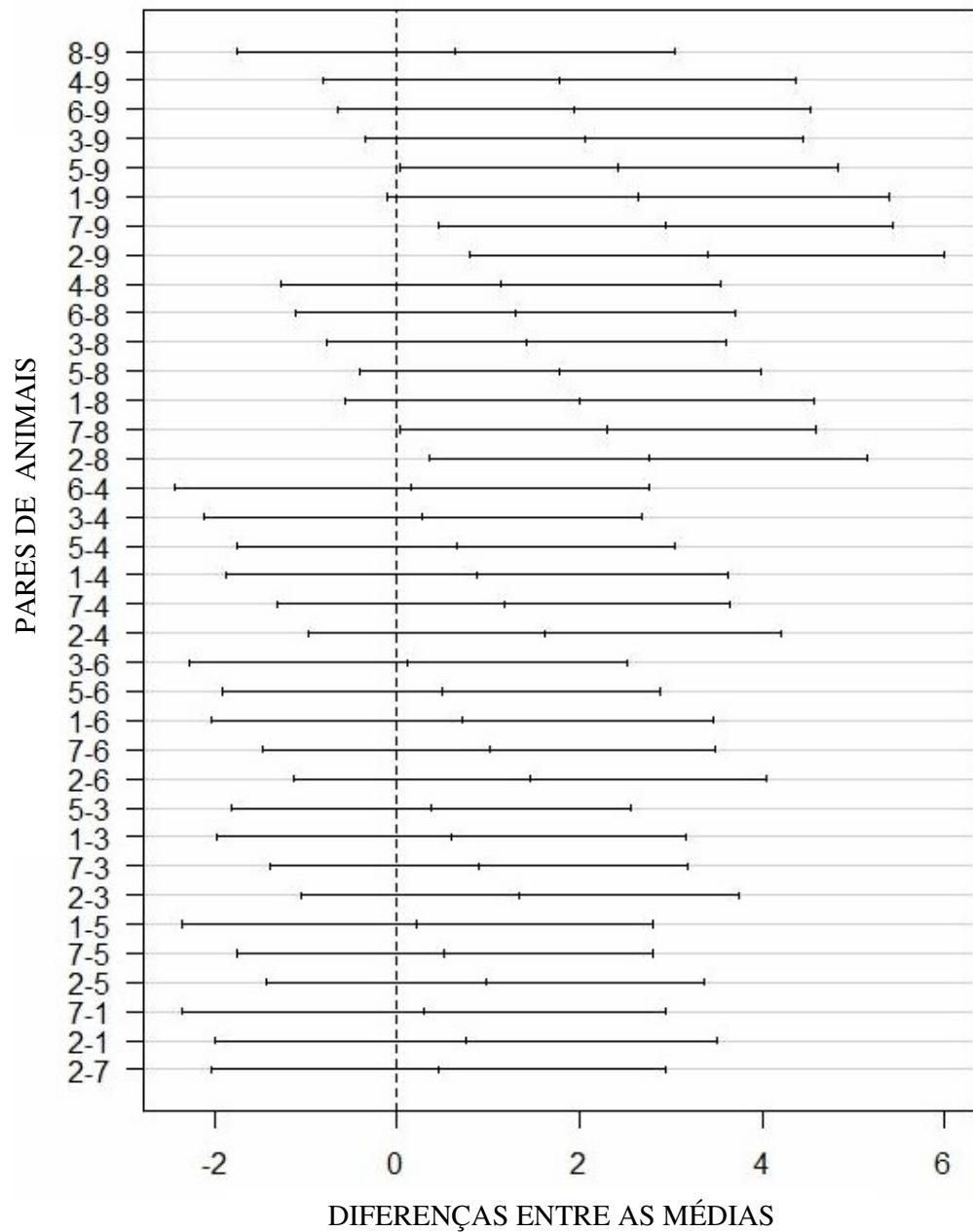
**Anexo 21.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de HGM dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



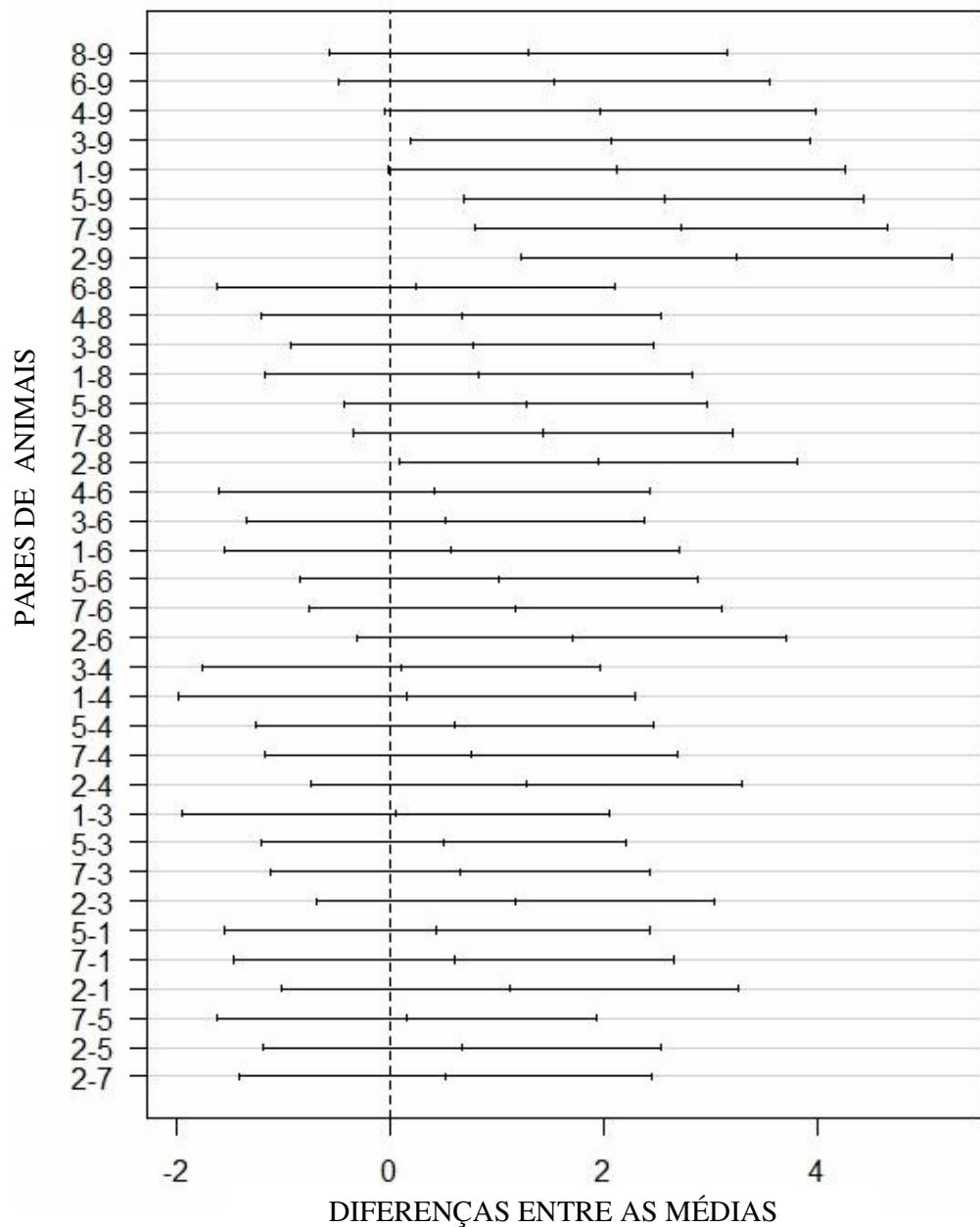
**Anexo 22.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de CHGM dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



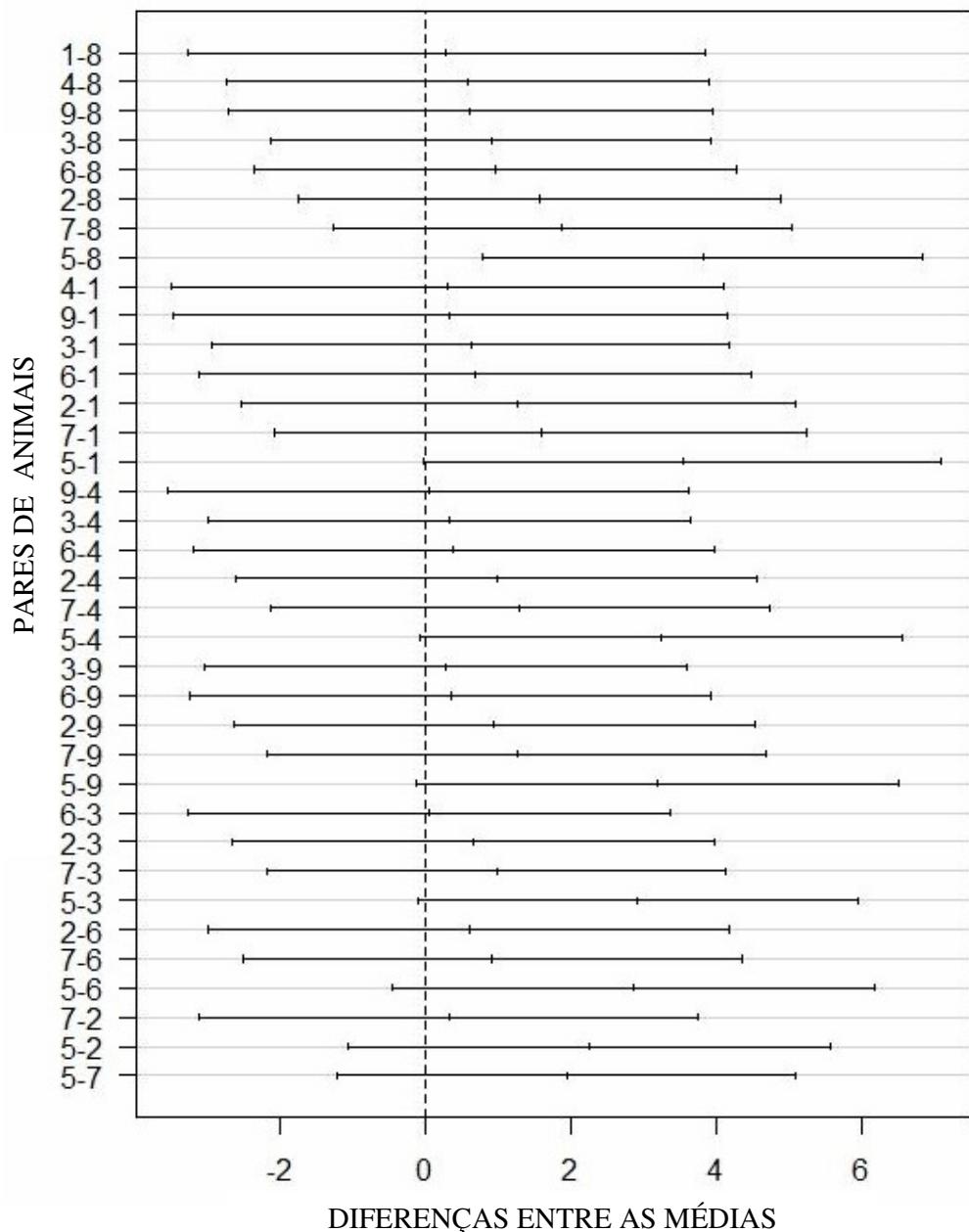
**Anexo 23.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de RDW SD dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



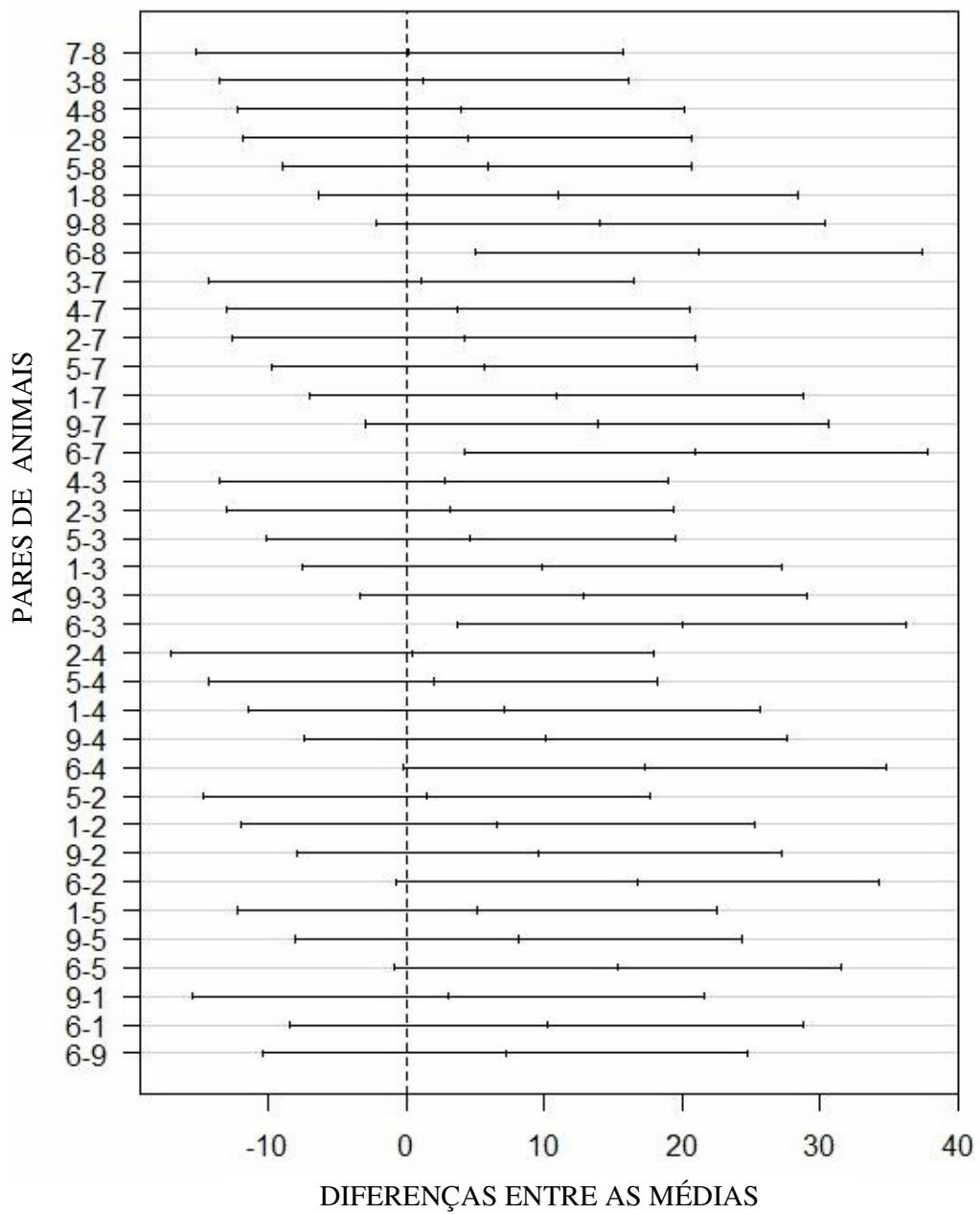
**Anexo 24.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de RDW CV dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



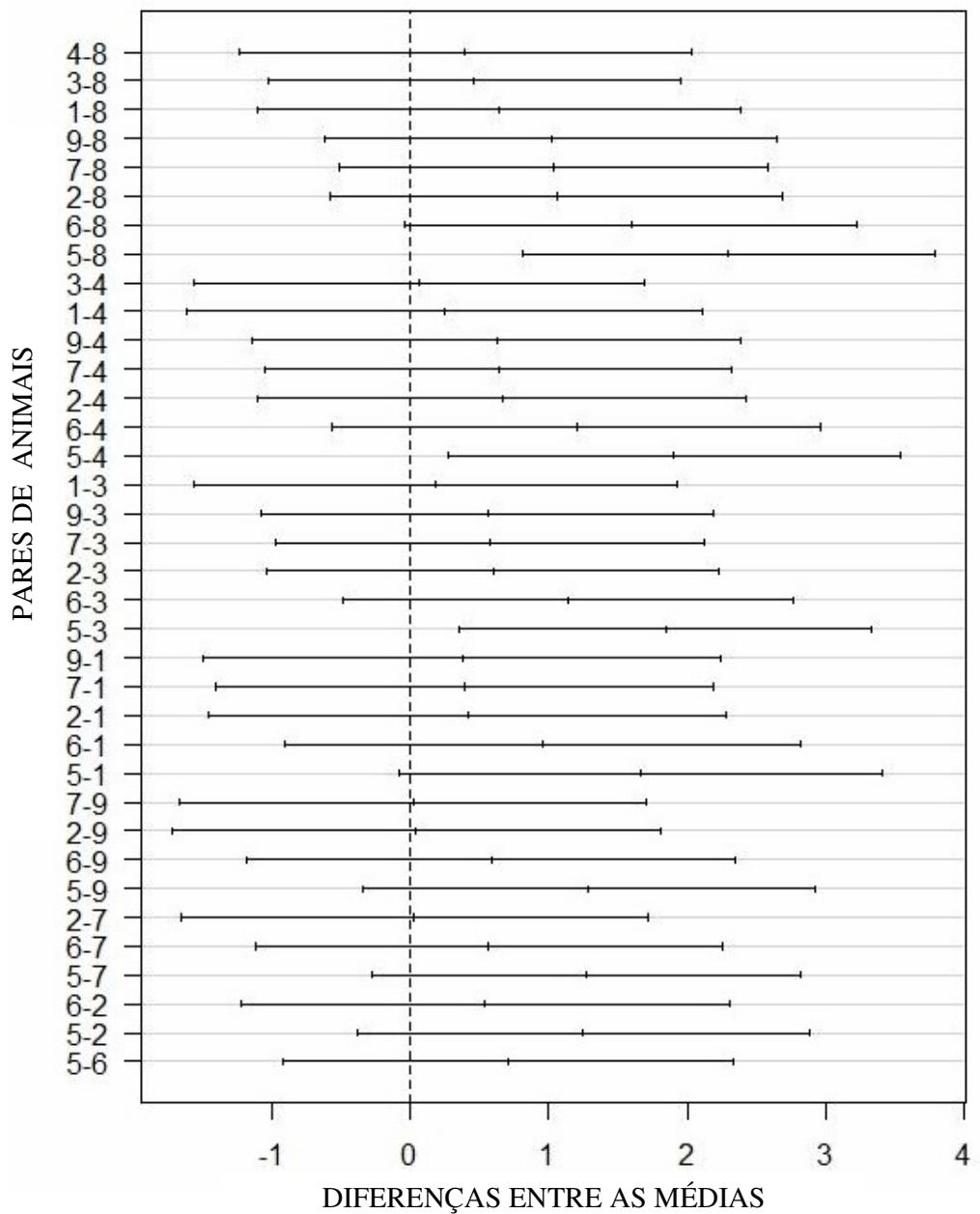
**Anexo 25.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de leucócitos dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



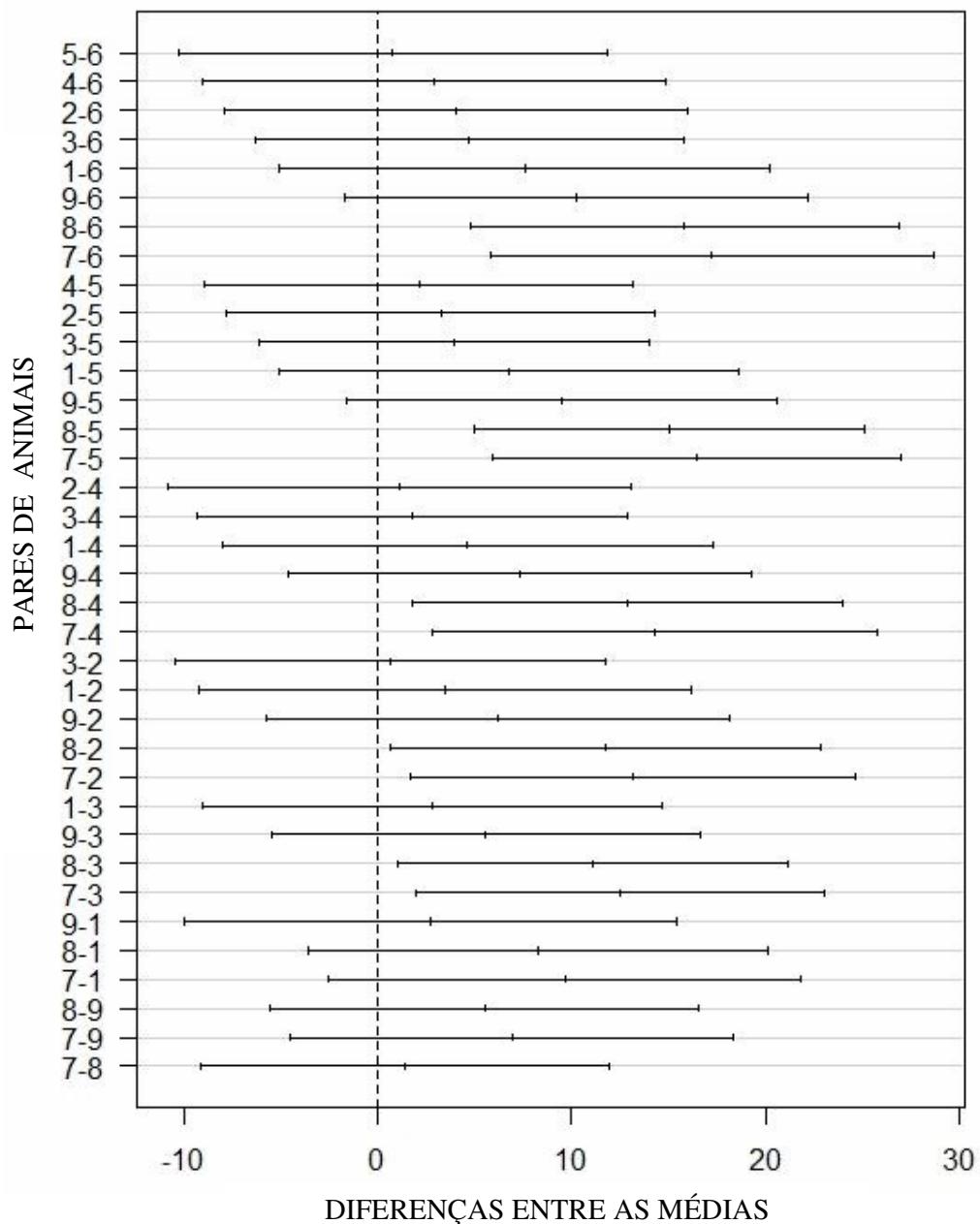
**Anexo 26.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de linfócitos (contagem relativa) dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



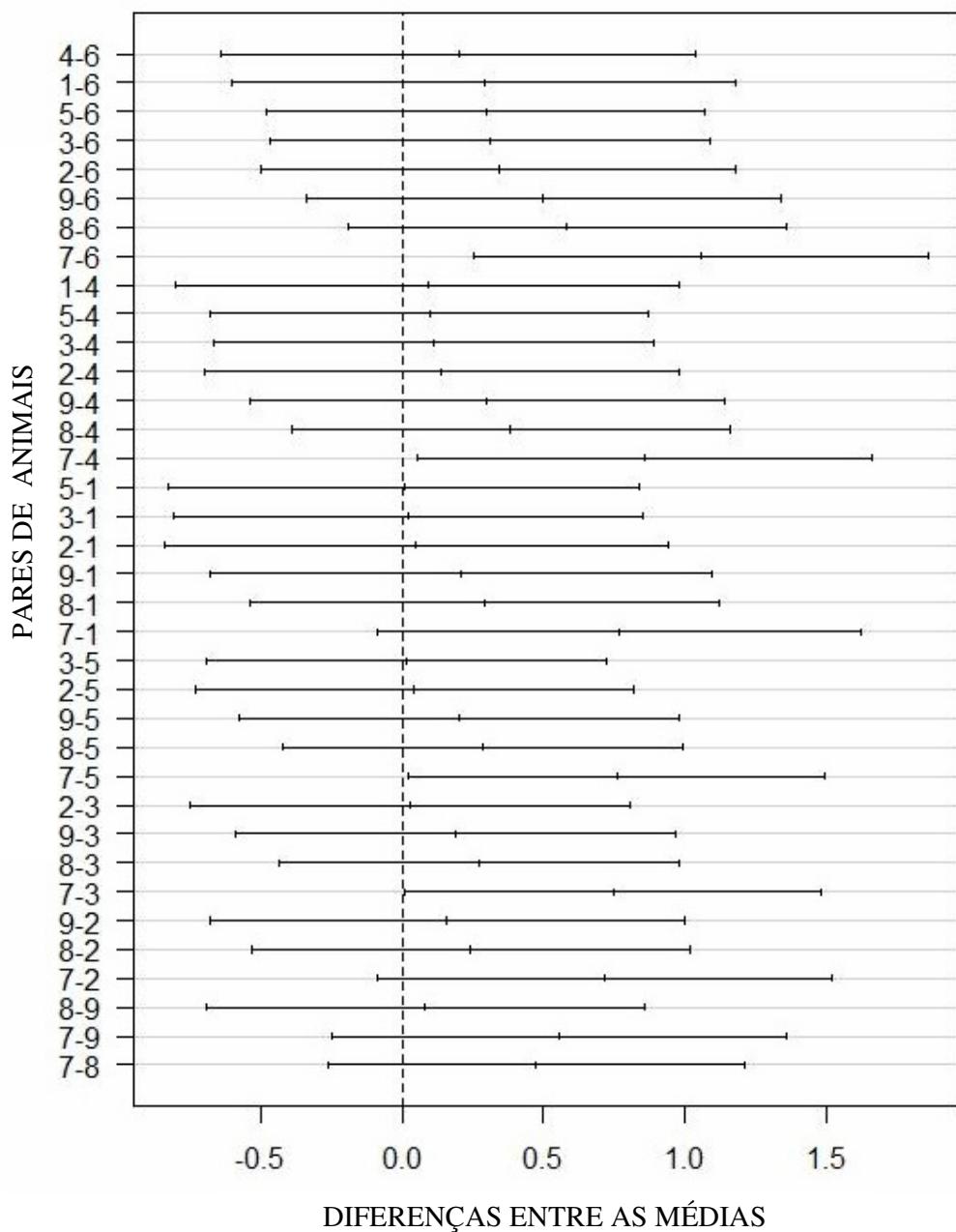
**Anexo 27.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de linfócitos (contagem absoluta) dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



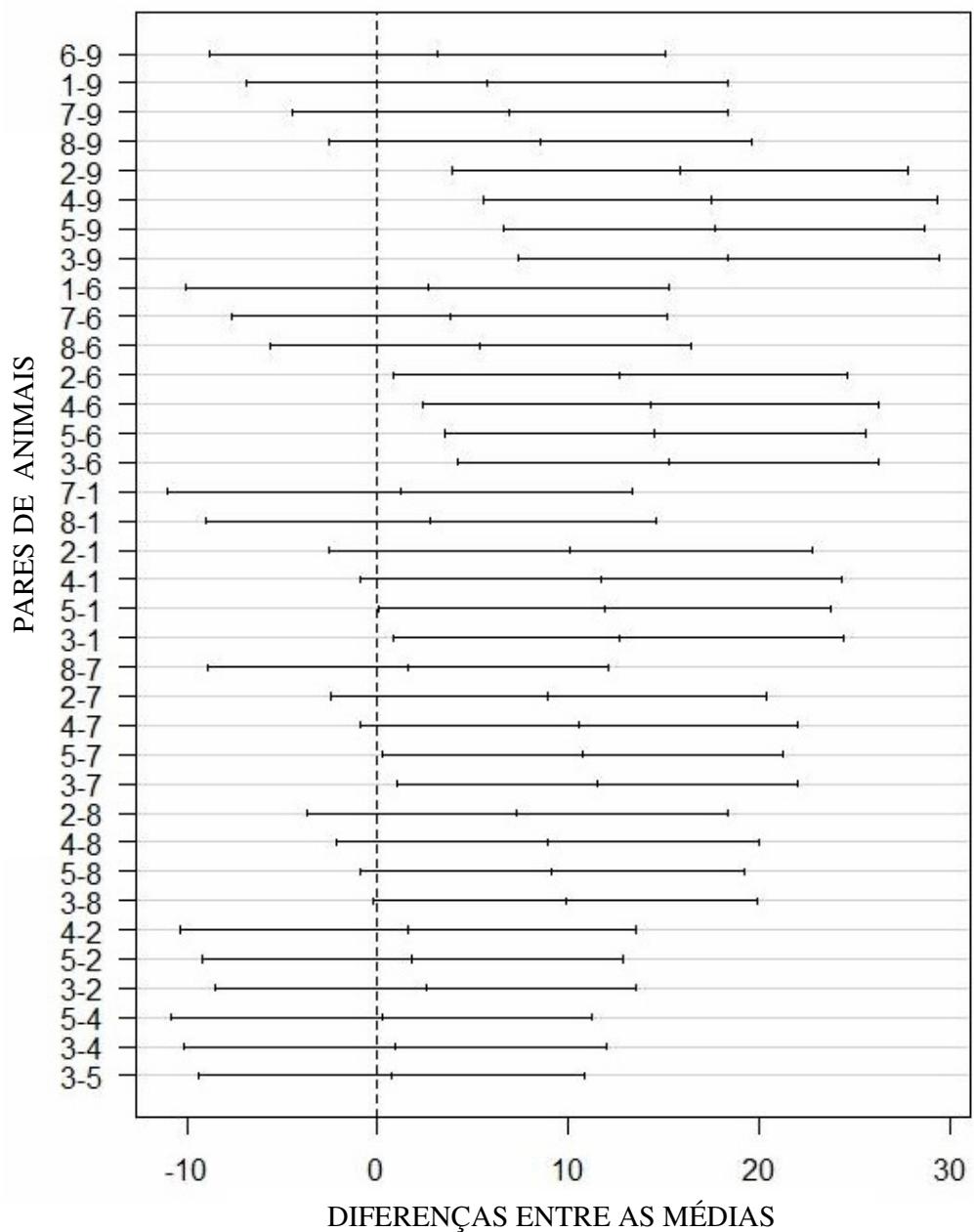
**Anexo 28.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de eosinófilos, basófilos e monócitos (contagem relativa) dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



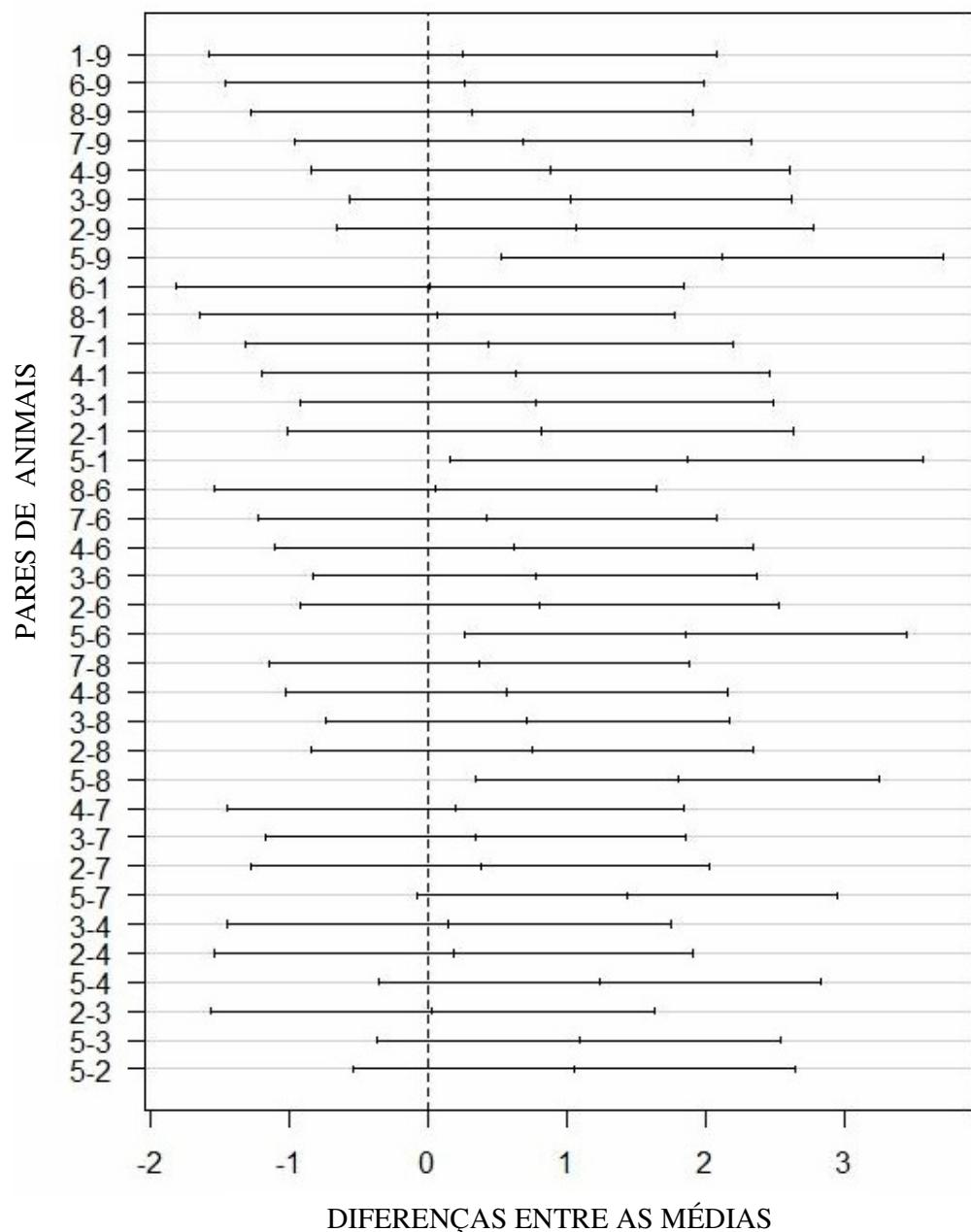
**Anexo 29.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de eosinófilos, basófilos e monócitos (contagem absoluta) dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



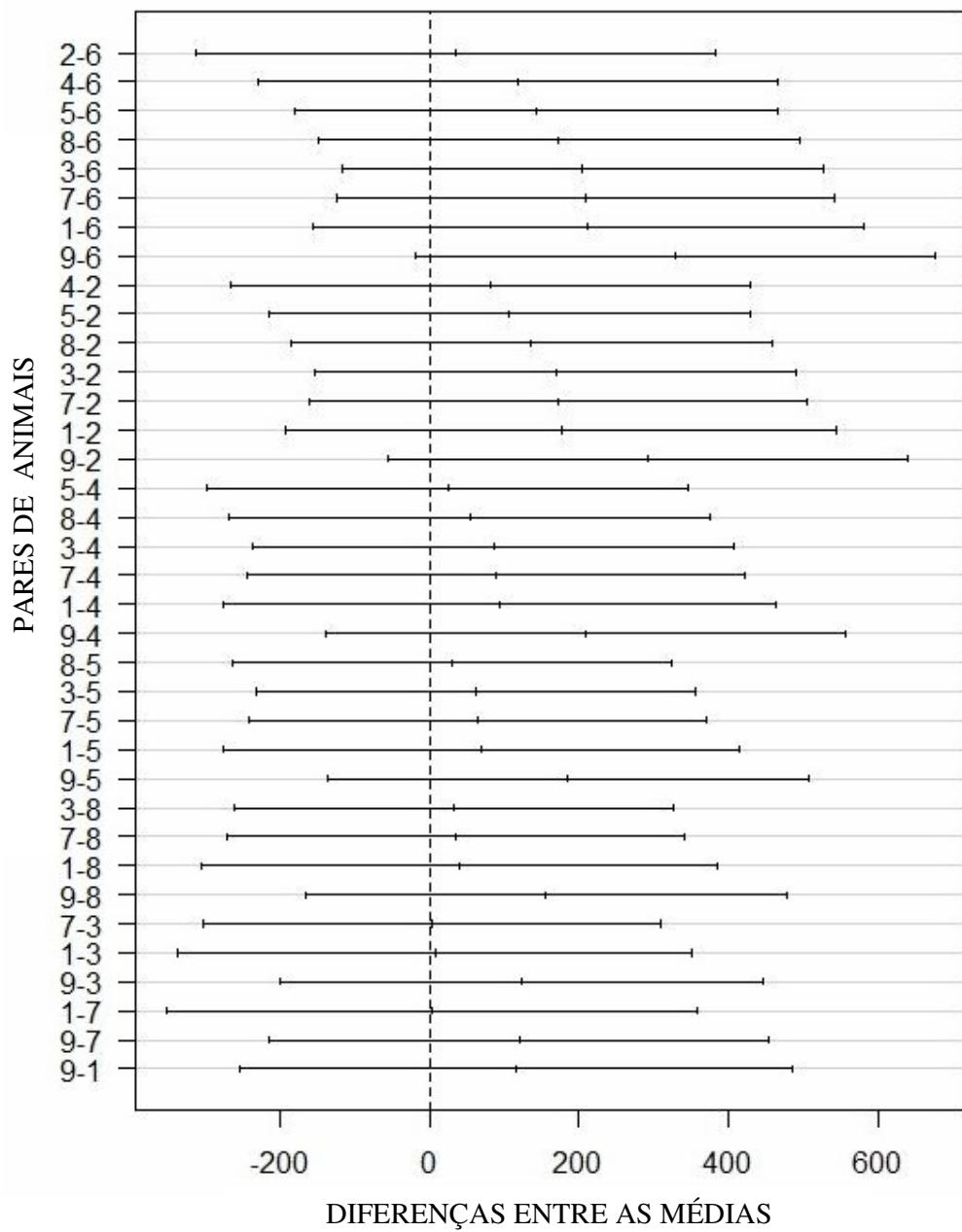
**Anexo 30.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de neutrófilos (contagem relativa) dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



**Anexo 31.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de neutrófilos (contagem absoluta) dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



**Anexo 32.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores de plaquetas dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.



**Anexo 33.** Gráfico dos intervalos de confiança (95%) das diferenças nos teores do volume plaquetário médio dos animais entre todos os possíveis pares de grupos de animais.

