

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos cursos de Pós-Graduação

TÂNIA MOTA GONÇALVES

**DINÂMICA SÉRICA, DIGESTIBILIDADE DA DIETA
E MICROBIOTA INTESTINAL DE CÃES
SUPLEMENTADOS COM *LITHOTHAMNIUM CALCAREUM***

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2013

TÂNIA MOTA GONÇALVES

**DINÂMICA SÉRICA, DIGESTIBILIDADE DA DIETA E MICROBIOTA
INTESTINAL DE CÃES SUPLEMENTADOS COM *LITHOTHAMNIUM
CALCAREUM***

Dissertação apresentada à UFMG, como
requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Zootecnia
Área: Nutrição Animal
Orientador: Walter Motta Ferreira

Gonçalves, Tânia Mota, 1985-
G635d Dinâmica sérica, digestibilidade da dieta e microbiota intestinal de cães suplementados com Lithothamnium calcareum / Tânia Mota Gonçalves. – 2013.

61 p. : il.

Orientador: Walter Motta Ferreira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Cão – Alimentação e rações – Teses. 2. Dieta em veterinária – Teses. 3. Suplemento alimentar – Teses. 4. Digestibilidade – Teses. 5. Nutrição animal – Teses. I. Ferreira, Walter Motta. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.708 5

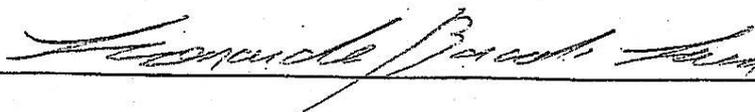
Dissertação defendida e aprovada em 28 de fevereiro de 2013 pela Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros:



Walter Motta Ferreira (Orientador)



Flavia Maria Oliveira Borges Saad



Leonardo Boscoli Lara

“ALEA JACTA EST”
Julio Cesar

**Dedico esta dissertação à
minha mãe, por todo amor e
dedicação me dado até hoje e,
principalmente, por não ter me
deixado parar de estudar na 7^a
serie.**

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar, a Deus e a minha mãe, pois sempre estiveram ao meu lado.

Ao professor Walter Motta pela confiança nesses dois anos.

Meu pai, meus irmãos, cunhados e sobrinho pela paciência e apoio ao longo desses dois anos.

Um agradecimento especial à Nutriave Alimentos e ao Centro de Tecnologia Animal (CTA) pelo financiamento e condução do experimento respectivamente.

A todos os amigos da pós por estarem presente na minha vida nesses dois anos. Guardarei a amizade e o companheirismo de cada um para sempre. Nunca esquecerei o que fizeram por mim, quando precisei me ausentar por conta de uma cirurgia.

Aos professores pelos ensinamentos, aos animais pelo carinho e paciência, a todos os funcionários do CTA, à professora Célia Alencar e seus alunos de pós-graduação pela paciência, ensinamento na análise de DGGE.

Aos meus amigos de graduação e de Miracema e ao Delorme, por estarem sempre ao meu lado e entendendo minhas ausências em datas especiais.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudo.

Às meninas da secretária, por estar sempre dispostas a me ajudar.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Departamento de Zootecnia e funcionários da Escola de Veterinária, pelas oportunidades.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente participaram dessa minha caminhada.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL | 14 |
| CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA..... | 15 |
| 2.1.Lithothamnium calcareum | 15 |
| 2.2. Fosfatase Alcalina..... | 18 |
| 2.3Fósforo | 19 |
| 2.4. Cálcio | 20 |
| 2.5 Albumina | 21 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 22 |
| CAPÍTULO III - DINÂMICA SÉRICA DE FOSFATASE ALCALINA, FÓSFORO, CÁLCIO TOTAL, CÁLCIO AJUSTADO, CÁLCIO IÔNICO E ALBUMINA EM CÃES SUPLEMENTADOS COM FARINHA DE ALGAS MARINHAS (<i>LITHOTHAMNIUM CALCAREUM.</i>) | 25 |
| RESUMO | 25 |
| ABSTRACT | 25 |
| 3.1 INTRODUÇÃO..... | 26 |
| 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 27 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 29 |
| 3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 37 |
| 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 37 |
| CAPÍTULO IV- EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LITHOTHAMNIUM CALCAREUM NA DIGESTIBILIDADE DE PROTÉINA, EXTRATO ETÉREO, MATÉRIA SECA E ENERGIA BRUTA PARA CÃES | 40 |
| RESUMO | 40 |
| ABSTRACT | 40 |
| 4.1 INTRODUÇÃO..... | 41 |
| 4.2 MATERIAIS E METÓDOS..... | 42 |
| 4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO..... | 45 |

| | |
|--|----|
| 4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 48 |
| 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |
| CAPÍTULO V-ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA DE CÃES SUPLEMENTADOS COM <i>LITHOTHAMNIUM CALCAREUM</i> | 51 |
| RESUMO | 51 |
| ABSTRACT | 51 |
| 5.1 INTRODUÇÃO..... | 52 |
| 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 53 |
| 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 55 |
| 5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 59 |
| 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO III - DINÂMICA SÉRICA DE FOSFATASE ALCALINA, FÓSFORO, CÁLCIO TOTAL, CÁLCIO AJUSTADO, CÁLCIO IÔNICO E ALBUMINA EM CÃES SUPLEMENTADOS COM FARINHA DE ALGAS MARINHAS (*LITHOTHAMNIUM CALCAREUM*)

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Composição nutricional da dieta experimental..... | 28 |
| Tabela 2. Regressão geral para análise de cálcio total da coleta dentro suplementação de <i>Lithothamnium calcareum</i> | 29 |
| Tabela 3. Regressão geral para análise de cálcio total da suplementação de <i>Lithothamnium calcareum</i> dentro da coleta..... | 29 |
| Tabela 4. Desdobramento da tabela 3 e da tabela 4..... | 29 |
| Tabela 5. Regressão geral para análise cálcio ajustado à albumina da coleta dentro suplementação de <i>Lithothamnium calcareum</i> | 30 |
| Tabela 6. Regressão geral para análise de cálcio ajustado à albumina da suplementação de <i>Lithothamnium calcareum</i> dentro da coleta. | 30 |
| Tabela 7. Desdobramento da tabela 6 e da tabela 7..... | 30 |
| Tabela 8. Regressão geral para análise de albumina sérica total da coleta dentro suplementação de <i>Lithothamnium calcareum</i> | 31 |
| Tabela 9. Regressão geral para análise de albumina sérica total da suplementação de <i>Lithothamnium calcareum</i> dentro da coleta. | 31 |
| Tabela 10. Regressão geral para análise de cálcio ionizado da coleta dentro suplementação de <i>Lithothamnium calcareum</i> | 31 |
| Tabela 11. Regressão geral para análise cálcio ionizado da suplementação de <i>Lithothamnium calcareum</i> dentro da coleta. | 31 |
| Tabela 12. Desdobramento da tabela 10 e da tabela 11..... | 31 |
| Tabela 13- Regressão geral para análise de fosfatase alcalina da coleta dentro suplementação de <i>Lithothamnium calcareum</i> | 32 |
| Tabela 14. Regressão geral para análise fosfatase alcalina da suplementação de <i>Lithothamnium calcareum</i> dentro da coleta. | 32 |
| Tabela 15- Regressão geral para análise de fósforo total da coleta dentro suplementação de <i>Lithothamnium calcareum</i> | 32 |

Tabela 16. Regressão geral para análise fósforo total da suplementação de *Lithothamnium calcareum* dentro da coleta..... 32

Tabela 17. Desdobramento da tabela 15 e da tabela 16..... 32

Tabela 18. Média dos desdobramentos nas análises de sangue, fosfatase alcalina(fosf.alc), cálcio (Ca), cálcio corrigido à albumina (Ca. Alb), cálcio ionizado (Ca.I), albumina (Alb) e fósforo (P)..... 33

Tabela 19. Média dos parâmetros sanguíneos das análises de sangue, fosfatase alcalina (Fosf. Alc), cálcio (Ca), cálcio corrigido à albumina (Ca. Alb), cálcio ionizado (Ca. I), albumina (Alb) e fósforo (P).....34

CAPÍTULO IV- EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LITHOTHAMNIUM CALCAREUM NA DIGESTIBILIDADE DE PROTÉINA, EXTRATO ETÉREO, MATÉRIA SECA E ENERGIA BRUTA PARA CÃES

Tabela 1. Análise bromatológica do *Lithothamnium calcareum* na matéria natural..... 42

Tabela 2. Composição da ração 43

Tabela 3. Tabela que representa os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDMS), proteína bruta (CDPB), energia bruta (CDEB), extrato etéreo em hidrólise ácida (CDEE) e coeficiente de digestibilidade de matéria mineral (CDMM)..... 46

Tabela 4. Tabela da correlação entre as variáveis estudadas (Pearson) 46

Tabela 5. Resultados das análises de regressão para o coeficiente de digestibilidade da CDMS, CDEB, CDPB, CDEE, e CDMM. 47

CAPÍTULO V-ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA DE CÃES SUPLEMENTADOS COM *LITHOTHAMNIUM CALCAREUM*

Tabela 1. Cada tratamento com suas diferentes inclusões de de *Lithothamnium calcareum* , e as posições dos animais no gel de agarose e no DGGE 57

Tabela 2. Valores da Taxa_S (riqueza), expressos como o número de UTOs no gel de DGGE, valores dos índice de diversidade genética (Shann_H ou H') e valores de Berger_Parker, da comunidade de Eubacteria em fezes de cão. Os dados foram obtidos pela análise do perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de Eubacteria, com o auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths)..... 58

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO V-ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA DE CÃES SUPLEMENTADOS COM *LITHOTHAMNIUM CALCAREUM*

- Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação por PCR dos fragmentos dos rDNA 16S de bactérias de fezes de cães. M – marcado 100bp DNA ladder (PROMEGA). 1 a 16 – amostras de fezes. 56
- Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação por PCR dos fragmentos dos rDNA 16S de bactérias de fezes de cães. M – marcado 100bp DNA ladder (PROMEGA). Amostras de fezes que tiveram de ser repetidas. 56
- Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação por PCR dos fragmentos dos rDNA 16S de bactérias das fezes do cão número 13. M – marcado 100bp DNA ladder (PROMEGA). A diluição 1:50 foi a escolhida para ser aplicada no DGGE. 57
- Figura 4. Perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias totais presentes nas fezes de cães, obtido após amplificação por PCR utilizando primers universais para a Eubacteria. M: marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S de organismos de referência. 58

**DINÂMICA SÉRICA, DIGESTIBILIDADE DA DIETA E MICROBIOTA
INTESTINAL DE CÃES SUPLEMENTADOS COM *LITHOTHAMNIUM
CALCAREUM***

RESUMO

Com o objetivo de estudar a dinâmica sérica de variáveis bioquímicas após administração de *Lithothamnium calcareum*, foi realizado um experimento onde se avaliou a suplementação em cápsulas para cães contendo *Lithothamnium calcareum* nos seguintes níveis 0; 0,5; 1 e 1,5 g/dia. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições, tendo sido utilizados cães da raça Fox Paulistinha, totalizando-se 16 animais. Para tanto, foi analisada a dinâmica sérica do cálcio total, cálcio ionizado e cálcio ajustado à albumina, albumina, fósforo e fosfatase alcalina. Foi também avaliada a digestibilidade aparente da dieta com a suplementação de *Lithothamnium calcareum*, além de verificar a influência do produto sobre a diversidade genética das fezes dos cães. Pôde-se concluir que os níveis séricos de fosfatase alcalina e albumina não se ajustaram aos modelos matemáticos estudados, os níveis de cálcio total, cálcio ionizado e cálcio ajustado à albumina apresentaram os mesmos comportamentos quadrático e cúbico, o nível sérico de fósforo gerou equações cúbicas nos níveis de suplementação 0,5 e 1,5 g/dia e constatou-se que o fósforo e o cálcio se comportaram da mesma forma. Não foram encontradas equações de regressão significativas ($P>0,05$) para digestibilidade de proteína, extrato etéreo em hidrólise ácida, energia bruta e matéria seca total que se associassem com a suplementação de *Lithothamnium calcareum* na dieta para cães até em 1,5 g/dia. Podendo-se então, concluir que o *Lithothamnium calcareum* não alterou a digestibilidade da dieta. A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) foi adequada para análise do DNA da microbiota fecal dos cães, e constatou-se que a administração de até 1,5 g/dia de *Lithothamnium calcareum* não alterou a microbiota fecal desses animais.

Palavras chave: cães, *Lithothamnium calcareum*, suplementação.

**DYNAMIC SERUM, DIGESTIBILITY DIET AND GUT MICROBIOTA
SUPPLEMENTED WITH DOGS *LITHOTHAMNIUM CALCAREUM***

ABSTRACT

With the aim to study the dynamics of serum after administration of the *Lithothamnium calcareum*, an experiment was made which evaluated the supplementation capsules of the diet of dogs containing *Lithothamnium calcareum* in the following levels 0, 0.5, 1 and 1.5 g / day. The experimental design was completely randomized with four treatments and four

repetitions and dogs of the breed *Fox Paulistinha* were used, totaling 16 animals. Therefore, we analyzed the dynamics of serum of the total calcium, ionized calcium and albumin adjusted calcium, albumin, phosphorus and alkaline phosphatase. It was also assessed the apparent digestibility of diet with supplementation of *Lithothamnium calcareum*, besides verifying the influence of *Lithothamnium calcareum* on the genetic diversity of dogs' feces. It can be concluded that the levels of serum albumin and alkaline phosphatase did not fit the mathematical models studied, the levels of total calcium, ionized calcium and albumin adjusted calcium showed the same quadratic and cubic behaviors, the serum phosphorus level generated cubic equations in the supplementation levels 0.5 and 1.5 g / day and it was found that the phosphorus and calcium behaved similarly. There were no significant regressions ($P < 0.05$) for digestibility of protein, ether extract, gross energy and total dry matter which were associated with supplementation of *Lithothamnium calcareum* in diet for dogs up to 1.5 g / day of supplementation in the diet. We can conclude that the *Lithothamnium calcareum* did not alter digestibility of the diet. The technique of gel electrophoresis with denaturing gradient (DGGE) was suitable for DNA analysis of the dog's fecal microbiota, and it was found that administration of up to 1.5 g / day of *Lithothamnium calcareum* did not alter the fecal microbiota of these animals.

Key-words: dogs, *Lithothamnium calcareum*, supplementation

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

A nutrição dos cães tem passado por modificações ao longo dos anos; ela difere dos outros animais não ruminantes, onde na maioria das vezes se espera um maior ganho de peso em menor tempo, pois os animais apresentam uma menor expectativa de vida, ao contrário do que acontece com os cães.

Os cães, no Brasil, representam um papel importante na sociedade, por ser ainda a preferência nacional, apesar de os gatos representarem a preferência mundial. A condição mudou nos últimos tempos: se antes os animais eram criados em quintais com a finalidade apenas de serem os guardiões de seus lares e de seus donos, hoje em dia eles viraram os melhores amigos e até filhos de muitas famílias, que diminuíram seu número de filhos e optam por ter um animal de companhia, e esses pais que possuem seus filhos de quatro patas, estão cada vez mais dispostos a proporcionar uma melhor qualidade de vida a seus cães. Tudo isso vem criando uma exigência no âmbito nutricional para estudar alimentos que proporcionem maior e melhor qualidade de vida aos cães.

A expectativa média de vida de um cão de médio porte está em aproximadamente 12 anos, com isso a nutrição tem um papel importante em todas as fases da vida desse animal. Do mesmo jeito que os humanos os cães envelhecem e apresentam doenças semelhantes a dos humanos e toda nutrição recebida ao longo da fase da vida do animal pode influenciar sua senilidade e por isso os nutricionistas estão buscando alimentos com melhor funcionalidade para aumentar a expectativa de vida desses animais.

Com essa busca o *Lithothamnium calcareum* foi o escolhido para ser estudado neste trabalho devido ao fato de ter apresentados algumas vantagens, nos animais de produção, em relação a outras fontes de cálcio. O *Lithothamnium calcareum* foi pesquisado em cães no âmbito de recuperação de fraturas e teve resultados favoráveis. Uma das vantagens do *Lithothamnium calcareum* é ser uma fonte renovável, natural e apresentar uma alta porosidade que melhora a sua biodisponibilidade para os animais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a suplementação de *Lithothamnium calcareum* em cães da raça Fox Paulistinha através de parâmetros sanguíneos como: fosfatase alcalina, cálcio, cálcio iônico, cálcio ajustado à albumina, albumina e fósforo, digestibilidade total na matéria seca e análise da microbiota fecal através de análise de DGGE.

CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Lithothamnium calcareum*

Os granulados bioclásticos marinhos, no Brasil, são formados principalmente por algas calcárias. Apenas as formas livres (*free-living*) das algas calcárias, tais como rodólitos, nódulos e seus fragmentos, são viáveis para a exploração econômica, pois constituem depósitos sedimentares inconsolidados, facilmente coletados através de dragagens (Dias, 2001).

O *Lithothamnium calcareum*, é uma alga calcária, geralmente, vermelha em razão da presença de phyco-eritrina, enquanto a alga morta é de coloração cinza azulada. Ele pertence ao grupo das algas vermelhas ou rodofíceas, da família das Corallineacea, tendo aspecto calcário, pois absorve o carbonato de cálcio e o magnésio. O seu esqueleto se constitui de 95 a 99% de minerais, majoritariamente de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio, como também de outros minerais e em quantidades não negligenciáveis, sendo usado principalmente na agricultura e na alimentação animal, mas está igualmente presente em certos complementos alimentares humanos (Assoumani, 1997; Melo e Moura, 2009).

As algas marinhas são vegetais que crescem naturalmente no meio marinho e se desenvolvem em grandes profundidades desde que exista a presença de luz (Dias, 2001; Melo e Moura, 2009).

A alga calcária é extraída do seu meio por dois processos: manuais e mecânico, sendo extraídas de forma manual por meio de redes de pesca ou por mergulhadores, ou ainda, colhidas de forma mecânica (navio aspirador) pela sucção da alga em pó, acumuladas em “ilhas de areia biodentrítica”. São utilizadas em seu estado natural, após passarem por processo de lavagem, desidratação e moagem. A matéria prima *in natura* é lavada, desidratada e moída e, em seguida, ensacada. É uma fonte exclusiva de elementos minerais (macro e micro elementos). Administrado em proporções fracionadas, em veículo alimentício ou sal, atua como biocatalizador, corretivo mineral e orgânico do organismo vivo (Melo et al., 2006; Carlos et al., 2011). Na nutrição animal pode ser utilizado em diversas espécies, melhorando a saúde dos animais, seu ciclo reprodutivo e a qualidade dos derivados (carne, leite, queijos e ovos), Melo et al., (2006) citam que o *Lithothamnium calcareum* pode ser usado em aves como uma fonte alternativa de cálcio

As algas calcárias são compostas, basicamente, por carbonato de cálcio e magnésio contendo ainda mais de 20 oligoelementos, presentes em quantidades variáveis, tais como Fe, Mn, B, Ni, Cu, Zn, Mo, Se e Sr. (Zanini et al., 2000).

Lithothamnium calcareum pode ser aplicado no estado natural ou após secagem e moagem. As principais características que potencializam a atuação deste produto são atribuídas ao seguinte: disponibilidade dos micronutrientes que se encontram adsorvidos nas paredes celulares e por apresentar elevada porosidade (> 40%) que propicia maior superfície específica de atuação (Dias, 2001).

Na alimentação de aves e suínos, o cálcio possui importante papel, principalmente para poedeiras, que necessitam de grande concentração de cálcio disponível para formação da casca dos ovos e para os frangos de corte, por possuírem uma alta taxa de crescimento em

pouco tempo, acarretando problemas na formação dos ossos, principalmente displasia tibial. Zanini et al., (2000), utilizando farinha de algas calcárias como fonte de cálcio na ração de frangos de corte, concluíram que o uso de farinha de algas pode substituir totalmente o calcário sem prejudicar o desempenho dos animais, porém deve-se atentar sobre o custo final desta substituição. Já na observação das características de carcaça de frangos, não foi verificado efeito significativo do uso de farinha de algas calcárias sobre a composição da carcaça de frangos de corte (Zanini et al.,2002).

De acordo com Airhart et al., (2002), o cálcio proveniente do *Lithothamnium calcareum* apresentou maior biodisponibilidade do que aquele proveniente do calcário, resultando em melhor conversão alimentar em frangos de corte.

Pope et al., (2002), ao observarem os efeitos da conversão alimentar em frangos de corte suplementados com *Lithothamnium calcareum*, verificaram que os mesmos apresentaram maior ganho de peso e melhor rendimento de peito, devido a melhoria observada na conversão alimentar. Estes resultados observados na melhora da conversão alimentar podem estar relacionados à maior solubilidade do cálcio proveniente *Lithothamnium calcareum*, fato este observado por Melo et al., (2006), quando avaliaram a solubilidade in vitro de diversas fontes de cálcio(farinha de algas marinhas, farinha de concha de ostras, farinha casca de ovo, calcário e fosfato bicálcio. Estes autores observaram, ainda, que a farinha de algas calcárias *Lithothamnium calcareum* apresentou valores maiores de solubilidade do que as demais fontes estudadas.

Carlos et al., (2011), avaliando o uso de *Lithothamnium calcareum* para pintos de corte de 1 a 21 dias e de 21 a 42 dias, que receberam rações contendo o calcário calcítico e a alga *Lithothamnium calcareum* (colhida de inteira e na forma de areia biodentrítica), na fase de 1 a 21 dias os animais do tratamento controle apresentaram melhores resultados. No período de 21 a 42 dias e considerando as duas fases não houve efeitos entre os tratamentos.

Pelícia et al., (2006) estudando o efeito da combinação de diferentes fontes de cálcio sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais, concluíram que é possível a inclusão em até 45% de cálcio marinho *Lithothamnium calcareum* na dieta de poedeiras em substituição ao calcário calcítico, sem que ocorram prejuízos ao desempenho e qualidade dos ovos, desde que seja economicamente viável. Trabalhando com codornas japonesas (*Coturnix japonica*). Perali et al.,(2003) referenciaram aumento na produção de ovos em 4,16 pontos percentuais em relação ao tratamento controle na adição de 0,25% deste produto. O mesmo aumento na produção de ovos não foi observado por Melo et al., (2008a; 2008b), os quais avaliaram a utilização da farinha de algas calcárias, *Lithothamnium calcareum*, no desempenho e qualidade de ovos de codornas japonesas. Esses mesmo autores observaram que o suplemento mostrou evidências de melhoria na casca dos ovos e um aumento significativo no peso da gema, porém as características de desempenho não foram influenciadas pela utilização da farinha de algas calcárias.

Efeitos de melhora na conversão alimentar também foram observados por Fialho et al., (1992), avaliando algumas fontes de suplementação de cálcio para suínos, os autores relataram que as dietas tanto para crescimento como para terminação, podem ser suplementadas com cálcio provenientes do calcário calcítico, farinha de ostras, gesso ou *Lithothamnium calcareum*.

Leonard et al., (2010) estudaram o efeito da suplementação com óleo de peixe e farinha de algas marinhas, em porca a partir do 109º dia de gestação até o desmame. No estudo,

foram utilizadas quatro dietas: uma controle, com óleo de peixe (100g/d), com farinha de algas marinhas (10g/d), e uma com a associação de óleo de peixe (100g/d) e farinha de alga marinhas (10g/d). As variáveis estudadas foram: composição do leite e colostro, resposta imune do 5^o ao 12^o dias de lactação e desempenho dos leitões lactantes. Além dessas variáveis foram também analisadas a atividade fagocitária do sangue e dos linfócitos. Os animais que receberam a suplementação com a farinha de algas marinhas tiveram maiores concentrações de imunoglobulina G (IgG) no colostro e maior proteína no leite aos 12 dias de lactação comparados com os que não receberam a suplementação. Leitões suplementados com farinha de algas marinhas tiveram maiores concentrações de IgG e imunoglobulina A (IgA) no soro sanguíneo comparadas com os que não receberam a suplementação. A suplementação com óleo de peixe teve um efeito supressor na IgA no soro de leite aos 5^o dia de lactação e um aumento na quantidade de 3-n de ácido graxo poliinsaturado no leite e no soro sanguíneo de leitões desmamados. Porcas lactantes suplementadas com farinha de algas marinhas tiveram maiores concentrações de *Escherichia coli* fagocitária de leucócitos e uma menor taxa de *Escherichia coli* fagocitária de linfócitos, enquanto que a suplementação com óleo de peixe aumentou a taxa de *Escherichia coli* e linfócitos fagocitários comparados com as que não receberam a suplementação. O ganho de peso e o peso médio dos leitões não foram influenciados pela dieta das porcas. A associação da farinha de alga marinha e óleo de peixe não teve efeito significativo nas respostas imune.

Em um estudo com ratos, Assoumani (1997) relatou que a farinha de algas marinhas calcárea apresentou vantagens em relação ao calcário no crescimento do osso fêmur e na biodisponibilidade de cálcio, sugerindo que, provavelmente, a concentração de magnésio e a porosidade da alga seriam os responsáveis por estas diferenças.

Euler et al., (2010) avaliaram o potencial da farinha de algas marinhas na nutrição de coelhos, na qual foram incluídos diferentes níveis de *Lithothamnium calcareum* (0,25%; 0,50%; 0,75% e 1,00%), e os mesmos não interferiram nas variáveis estudadas que foram: consumo, coeficiente de digestibilidade da matéria seca, proteína e energia, ganho de peso, rendimento de carcaça e peso de vísceras comestíveis. Entretanto, o nível de inclusão de 1% afetou negativamente a largura e o comprimento das vilosidades ileais.

Ucrós et al., (2012) avaliaram os efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* na consolidação de osteotomia experimental em coelhos, por meio de exames radiográfico e histológico. Foram utilizados 10 coelhos machos da raça Nova Zelândia, de quatro a cinco meses de idade, com massa corporal média de 2,5kg, os quais foram submetidos à osteotomia do terço médio da tíbia direita e à fixação interna com dois pinos intramedulares. Os coelhos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais (A e B) com cinco animais cada. O grupo A recebeu diariamente dieta contendo 0,75% de *Lithothamnium calcareum*, e o grupo B constituiu o controle sem o tratamento. Concluiu-se que embora tenha ocorrido a consolidação clínica e a radiográfica aos 60 dias em todos os casos, histologicamente o grupo-controle (B) foi melhor, mostrando que o organismo sadio não necessita de estímulo para o processo de reparação óssea.

Costa Neto et al., (2010) trabalhando com cães, verificaram a influência da farinha de algas marinhas (*Lithothamnium calcareum*) como suplemento mineral na cicatrização de falha óssea cortical reconstituída com auto enxerto cortical. Os animais foram divididos em dois grupos: um controle e um recebendo a suplementação com *Lithothamnium calcareum*, concluiu-se que a suplementação à base de algas marinhas *Lithothamnium calcareum*

contribuiu para um melhor desempenho cicatricial, uma vez que tanto o grau de radiopacidade como o número de osteoclastos foram maiores nos animais tratados com o *Lithothamnium calcareum*.

2.2. Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (FA) inclui uma família de fosfatase, que têm atividade de fosfatase em um ambiente alcalino. Muitas membranas celulares têm atividade de FA, mas apenas umas poucas produzem FA suficiente para aumentar a atividade sérica da FA. Os papéis da FA não são claramente estabelecidos e podem variar de um tecido para o outro. A L- FA pode estar envolvida na degradação de endotoxinas e a B- FA está envolvida na mineralização óssea, em mamíferos domésticos. Parece haver dois genes para a produção de isoenzimas; (1) I-FA e (2) FA não específica de tecidos. A modificação pós –traducional da FA não específica cria diferentes isoformas de FA: L- FA de hepatócitos e epitélio biliar e B- FA dos osteoblastos. Não foi comprovado que a I- FA aumenta a atividade sérica da FA. A C-FA é uma enzima canina singular que é produzida pelos hepatócitos quando estimulados por corticosteroides. Do ponto de vista químico, sua sequência de aminoácidos é a mesma da I- FA. Porém ela é altamente glicosilada. Em teste de rotina, a atividade medida da FA representa atividade total da FA e tipicamente inclui atividades de L- FA e B- FA(além de C- FA em cães). A contribuição relativa para a atividade total da FA varia de acordo com a idade dos animais, a C- FA contribui de 10-30% da atividade da FA total (Stockham e Scott, 2011).

A fosfatase alcalina é uma enzima que catalisa a hidrólise de ésteres de fosfato, com vida média no sangue de 24 a 48 horas. Sua concentração sérica tem sido amplamente utilizada como marcador da remodelagem óssea; em humanos, é um marcador útil. Embora a medida de sua atividade envolva grande variedade de isoenzimas que se originam dos intestinos, rins, pâncreas, placenta, fígado e osso, as duas maiores fontes desta enzima são o osso (osteoblasto) e o fígado (células endoteliais) (Teixeira et al., 2005).

Durante muitos anos, a fosfatase alcalina foi a única indicadora bioquímica de atividade osteoblástica disponível. A função desta enzima não é muito bem conhecida, porém ela está ligada ao desenvolvimento ósseo e associada com a membrana plasmática do osteoblástico. A fosfatase alcalina pode ser envolvida na degradação extracelular de pirofosfato, um potente inibidor da deposição de fosfato de cálcio. A fosfatase alcalina pode ser medida em soro com simples métodos colorimétricos, que envolvem geralmente a hidrólise do fosfato de p nitrofenil-incolor pela enzima sob condições fortemente alcalinas libertar o p-nitrofenol amarelo.(Risteli e Risteli, 1993; Martins et al., 2006)

A avaliação da atividade sérica da fosfatase alcalina óssea é um marcador ósseo que fornece informações úteis do remodelamento ósseo na osteoporose, na doença de Paget e no acompanhamento de terapias preventivas, de reposição hormonal ou de outras terapias antiabsortivas. A fosfatase alcalina contida no plasma humano é fisiologicamente a somatória de várias isoenzimas que provêm do osso, do fígado, do intestino e da placenta, durante a gravidez. Esta enzima é codificada pelo gen, tecido não-específico, que é localizado no cromossomo 1. Em condições normais, as duas formas predominantes em circulação (>90% do total) de fosfatase alcalina, são a óssea e a hepática, em quantidades equivalentes. A outra forma circulante, em concentrações significativas, é a forma intestinal, que representa menos de 5% do total. Durante muitas décadas a medida da atividade total de fosfatase alcalina foi base do estudo de patologias tanto ósseas como hepáticas, partindo-se do pressuposto de que o aumento da atividade total seria devido à isoenzima específica da patologia. Um aspecto relativo ao uso e interpretação dos valores

de fosfatase alcalina óssea é o fato de que eles não aumentam exclusivamente com o aumento da formação óssea, mas também na osteomalácia. Esta observação torna a enzima um marcador do tratamento da osteomalácia com vitamina D. Além do mais, a detecção da fosfatase alcalina óssea pode indicar a presença de tecido ósseo derivado de condições patológicas malignas (Martins et al., 2006).

2.3 Fósforo

O fósforo (P) está diretamente envolvido no metabolismo essencial funções do organismo animal. Como um componente estrutural de ácidos nucleicos e fosfolípidios, é essencial para o crescimento e diferenciação das células e contribui para a integridade e fluidez das membranas celulares. Associado a outros elementos, fósforo é importante para a manutenção da pressão osmótica e equilíbrio ácido-básico, é um dos mais importantes minerais para a formação e a mineralização da matriz orgânica do osso. O fósforo participa das diversas funções do metabolismo vital e é necessário proporcionar níveis adequados deste mineral na dieta, para que o animal possa expressar todo seu desempenho. Ele é importante para um rápido crescimento, necessário para o bom desenvolvimento dos ossos, dentes e aumentar a atividade de enzimas (Campos et al., 2012).

O fósforo é o sexto elemento mais abundante no organismo, entre suas inúmeras funções, pode ser destacado o fornecimento de energia para as atividades celulares. Para tanto, o fosfato orgânico ocorre sob a forma de compostos de alta energia tais como creatina fosfato e o ATP. Cerca 85% do fosfato estão contidos nos ossos sob forma de hidroxiapatita, 14% estão nas células de tecidos moles como constituintes de compostos orgânicos e 1% está presente no líquido extracelular. Do total de fosfatos no sangue, 30% apresentam-se sob forma orgânica como constituintes moleculares das hemácias e 70% são íons plasmáticos livres sob formas denominadas fosfato inorgânico (Pi) (Berndt e Knox 1992; Knochel 1992 citado por Martínez e Carvalho, 2010).

Arouca et al., 2010 trabalhando com suínos, concluíram que uma relação cálcio:fósforo 1,65:1 melhora a conversão alimentar dos animais do que o normalmente usado na alimentação animal onde comumente se usa a proporção 2:1 de cálcio e fósforo.

A utilização do fósforo pelos animais pode ser verificada através da dinâmica sérica ou ensaios de biodisponibilidade e, quando se testam várias fontes, uma é considerada padrão. A metodologia normalmente utilizada nas pesquisas é a biodisponibilidade que pode ser traduzida como a capacidade de a fonte de fósforo fornecer o elemento para o animal de forma absorvível e utilizável no seu metabolismo (Euler, 2009).

Muito pouco fósforo é secretado na saliva de animais não ruminantes, sendo a maior parte secretada nos rins, sendo essa a principal via do controle homeostático. Em todos os animais, uma pequena quantidade de fósforo é secretada para o lume gastrointestinal junto com a bile e os sucos gástricos, intestinal e pancreáticos. O intestino delgado é o sítio de absorção da maior parte de fósforo ingerido ou endógeno, particularmente no jejuno. Menores quantidades podem ser ingeridas no estômago, pré-estômago e intestino grosso, isso provavelmente ocorre por difusão passiva. Para a absorção no intestino delgado dois mecanismos têm sido demandados: um não saturável, passivo; e outro saturável, ativo e dependente de vitamina D (Nunes, 1998).

2.4. Cálcio

O cálcio é o cátion mais abundante do corpo sendo que 99% estão na forma mineral presente no esqueleto e 1% se encontra em tecidos, sangue e fluido extracelular. A deposição de cálcio na matriz orgânica do osso contribui para uma rigidez e resistência do osso. O cálcio complexa com o fósforo e maximiza a taxa de mineralização óssea, uma deficiência de cálcio resulta num agravamento da calcificação óssea, o que pode causar raquitismo, osteoporose e osteomalacia nos animais. O osso funciona como um reservatório de cálcio, que está prontamente disponível para as suas funções fisiológicas em múltiplos processos bioquímicos, incluindo o funcionamento neuromuscular, a coagulação, a permeabilidade celular da enzima de ativação da secreção do funcionamento hormonal (Avioli e Birge, 1978 citado por Emkey e Emkey 2012; Fialho et al.,1992; Nunes,1998).

O cálcio representa um dos minerais mais essenciais para os animais, tendo a sua função básica na formação de ossos e dentes. Ele desempenha várias outras funções nos diferentes processos fisiológicos, que são elas: coagulação sanguínea, (o cálcio é necessário para a conversão da protombina em trombina; o fibrinogênio, na presença de trombina se transforma em fibrina, está que é a proteína essencial para a formação dos coágulos de sangue); responsável também pela aceleração da atividade lipolítica da lipase pancreática na luz intestinal; ativação de sistemas enzimáticos, o que inclui ser responsável pela contração muscular; produção de leite e produção de ovos (Nunes, 1998).

A concentração total de cálcio no sangue é composta por três frações: cálcio ionizado, o qual é o cálcio livre e representa a forma biologicamente ativa; cálcio complexado, que é normalmente ligado a fosfato, lactato, sulfato, bicarbonato, citrato, e; e ligado às proteínas de cálcio, o qual está ligado principalmente à albumina (Kogika et al., 2006). O cálcio no fluido celular se encontra 50% ionizado, sendo 40% unidos às proteínas, e 10% unidos a fosfatos, citratos, ácidos orgânicos e sulfatos. Do cálcio unidos às proteínas, 80% estão unidos à albumina e 20% à globulina (Cruz, 2009).

Há várias formas de se corrigir o cálcio disponível, uma é através da albumina e outra, de proteína total. Essas fórmulas tentam prever se há ou não hipocalcemia nos animais, mas, de acordo com Sharp et al., 2009, os valores de cálcio ajustado não devem ser usados pra prever cálcio iônico em análises clínicas, pois ele pode subestimar a hipocalcemia ou superestimar a concentração de cálcio.

Cães com acidose e alcalose metabólica podem apresentar aumento ou diminuição na fração de cálcio ionizado apesar de não alterar a concentração de cálcio total no animal (Kogika et al., 2006).

Em humanos uma maior ingestão de cálcio no início da vida resulta em um maior pico de massa óssea na maturidade esquelética, e a ingestão de cálcio no início da vida é considerada uma medida de profilaxia, uma vez que previne a osteoporose na idade adulta (Lee et al.,1994).

Cães com 30 kg ou mais são mais propensos a sofrer com excesso de cálcio na dieta quando as proporções cálcio e fósforo (2:1) não estão perfeitamente estabelecidos (Dobenecker et al., 2011). Dietas com altas relações de cálcio e fósforo reduzem a biodisponibilidade de fósforo para os cães, dietas com deficiência em cálcio reduzem a digestibilidade de energia e proteína (Dobenecker, 2009).

Durante o período em que se aproxima o parto, a cadela tem um aumento da demanda por cálcio proveniente do esqueleto, para a ossificação dos fetos e início da lactação, ocorrendo um aumento da atividade muscular que gera um maior aporte de cálcio e, de acordo com pesquisas, foi relatado que o cálcio sérico para cadelas interfere no número de filhotes natimortos (Hollinshead et al., 2009).

O cálcio entra no corpo através da ingestão de alimentos, e absorção intestinal de cálcio é determinada pela quantidade de cálcio presente neste alimento, sua absorção é realizada por duas rotas uma rota paracelular e um transcelular e pela absorção capacidades do próprio intestino, em nível do duodeno e uma parte superior do jejuno. Quando a quantidade de cálcio introduzido com dieta for inferior a 200 mg / dia, a absorção intestinal líquida é praticamente zero, uma vez que cerca da mesma quantidade diária é secretada para o lúmen gastrointestinal e perdido nas fezes. Quando o cálcio dietético é superior a 200 mg / dia, a quantidade absorvida irá variar entre 15% e 40%, por meio de mecanismos de transporte passivo e ativo. São principalmente reguladas pelos níveis circulantes de 1,25 (OH) 2D3 (Sheikh et al., 1988). O mais importante local regulador da excreção de cálcio é o rim. Soro com altos níveis de cálcio é filtrado no nível glomerular (cerca de 10 g / dia), em seguida, é quase completamente reabsorvido (cerca de 9,85 g / dia), e apenas cerca de 1-3% do cálcio filtrado é excretado na urina. Este mecanismo é regulado por PTH (Suki e Rouse, 1996).

2.5 Albumina

Albumina de soro humano (HSA), é a proteína mais abundante no plasma, o que representa o principal determinante da pressão osmótica plasmática e o principal modulador de distribuição de fluido entre os compartimentos corporais. HSA apresenta uma capacidade extraordinária de ligação, adequando um depósito a um transportador para muitos compostos endógenos e exógenos. De fato, HSA representa o principal transportador de ácidos graxos, afeta a farmacocinética de muitas drogas, proporciona a modificação metabólica de alguns ligantes, tornando potenciais toxinas inofensivas, responsável pela maior parte da capacidade antioxidante de plasma humano, e exibe (pseudo-) propriedades enzimáticas. HSA é um biomarcador valioso de muitas doenças, incluindo o cancro, a artrite reumatoide, a isquemia, a pós-menopausa, obesidade grave, doença do enxerto-versus-hospedeiro aguda e doenças que necessitam de monitoramento do controle glicêmico. Além disso, a HSA é largamente utilizada clinicamente para o tratamento de várias doenças, incluindo hipovolemia, choque, queimaduras, perda de sangue cirúrgica, trauma, hemorragia, doença cardiopulmonar, síndrome da angústia respiratória aguda, hemodiálise, insuficiência hepática aguda, doença hepática crônica, apoio nutricional, reanimação, e hipoalbuminemia (Fanali, 2012).

A albumina tem sido a proteína mais comumente utilizada para análise de doença renal crônica em humanos. No entanto, vários fatores como idade, comorbidades, hipervolemia e perdas corpóreas podem influenciar as concentrações séricas de albumina (Santos et al., 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRHART, J.C., TAYLOR, S.J., PURSER, K.W. et al., The bioavailability in chicks of calcium in a product derived from calcified seaweed (Marigro). In: The Southern Poultry Science Society, 23rd Annual Meeting and The Southern Conference on Avian Diseases, 43rd Annual Meeting. S.32, p.118, 2002.

AROUCA, C.L.A., FONTES, O.D., SILVA, O.C.F. et al., Níveis de fósforo disponível para suínos machos castrados dos 60 aos 95 kg. *R. Bras Zootec.*, v.39, n.12, p.2646-2655, 2010.

ASSOUMANI, M.B. Aquamin, a natural calcium supplement derived from seaweed. *Agro-food-Industry Hi Tech*. September/October 1997.

CAMPOS, F.P., SILVA, O.C.F., FERREIRA, S.A., et al., Available phosphorus in diets with or without ractopamine for late finishing Gilts. *R. Bras. Zootec.*, v.41, n.3, p.630-635, 2012

CARLOS, A.C., SAKOMURA, N.K., PINHEIRO, S.R.F et al., Uso da alga *Lithothamnium calcareum* como fonte alternativa de cálcio nas rações de frangos de corte. *Ciênc. Agrotec.*, v. 35, n. 4, p. 833-839, jul./ago., 2011.

COSTA NETO, J.M., TEIXEIRA, R.G, SÁ, MARCELO JORGE, C.L., et al., Farinha de algas marinhas ("*Lithothamnium calcareum*") como suplemento mineral na cicatrização óssea de autoenxerto cortical em cães. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim*, v.11, n.1, p.217-230, 2010.

CRUZ, S.C.S. Digestibilidade do cálcio de alimentos avaliadas em frangos de corte e em suínos com diferentes métodos. 2009. 70 f. Tese. (Doutorado em nutrição animal). Universidade Federal de Viçosa.

DIAS, G.T.M. Granulados Bioclásticos – Algas Calcárias. *Braz. Journal. Geoph.*, v.18, p.301-318, 2001.

DOBENECKER, B., Factors that modify the effect of excess calcium on skeletal development in puppies. *British Journal of Nutrition*, v.106, p.142– 145, 2011.

DOBENECKER, B., FRANK, V., KIENZLE, E. High calcium intake differentially inhibits nutrient and energy digestibility in two different breeds of growing dogs. *Journal of Animal Physiology and Animal nutrition*, v.94, p.109–114. 2009

EMKEY, D.R., EMKEY, R.G, Calcium Metabolism and Correcting Calcium Deficiencies. *Endocrinol Metab Clin N Am.*, v.41, p. 527–556, 2012

EULER, A.C.C. FERREIRA, W.M., TEIXEIRA, E.A. et al., Desempenho, digestibilidade e morfometria da vilosidade ileal de coelhos alimentados com níveis de "*Lithothamnium*". *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim*, v.11, n.1, p.91-103, 2010.

EULER, C.C.A. Utilização digestiva, metodologias de avaliação "in vitro" de dietas e caracterização da microbiota cecal em coelhos suplementados com *Lithothamnium sp.* 2009. 82f. Tese (Doutorado em nutrição animal). Universidade Federal de Minas Gerais.

FANALI,G., MASI,A., TREZZA,V., et al., Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* v.33, p. 209–290, 2012

FIALHO, E.T., BARBOSA,H.; BELLAVER, P C.; et al., Avaliação nutricional de algumas fontes de suplementação de cálcio para suínos. Biodisponibilidade e desempenho. *Rev. Bras. Zootec*, v.21, p. 891-905,1992.

HOLLISNSHEAD,K.F., HANLON,W.D., GILBERT,O.R.,et al., Calcium, parathyroid hormone, oxytocin and pH profiles in the whelping bitch. *Theriogenology* ,v.73 p.1276–1283, 2010.

KOGIKA,M. M., LUSTOZA,D.M., NOTOMI,K.M., et al., Serum ionized calcium in dogs with chronic renal failure and metabolic acidosis. *Vet Clin Pathol*. v. 35, p. 441–445, 2006.

LEE,W.TK., LEUNG-HU, W., XU., Y., et al.Double-blind, controlled calcium supplementation and a bone mineral accretion in children accustomed to a low- calcium diet. *Clin Nutr*. V. 60 p.744-50, 1994

LEONARD,S. G., SWEENEY, T., BAHAR, B. et al., Effect of maternal fish oil and seaweed extract supplementation on colostrum and milk composition, humoral immune response, and performance of suckled piglets. *J. Animal Sci*, v. 88, p. 2988-2997, 2010.

MARTINS, S.A., ROCHA,F.D., MELLO,A, F., et al., Fostase alcalina óssea, 2006. Disponível em <http://www.fisioweb.com.br/portal/>. Acesso em 02/01/2013.

MARTINEZ,P.P., CARVALHO,B.M. Participação da excreção renal de cálcio, fósforo, sódio e potássio na homeostase em cães saudáveis e cães com doença renal crônica. *Pesq. Vet. Bras*. 30(10):868-876, outubro 2010.

MELO, T.V., MOURA, A.M.A. Utilização da farinha de algas calcáreas na alimentação animal. *Arch. Zootec.*, v.58, p.99-107, 2009.

MELLO, T.V., MENDONÇA,P.P., MOURA, A.M.A., et al., Solubilidad in vitro de algunas fuentes de cálcio utilizadas em alimentacion animal. *Arch. Zootec.*,v. 55, p. 297-300, 2006.

MELO, T.V., FERREIRA, R.A., OLIVEIRA, V.C. et al. Calidad del huevo de codornices utilizando harina de algas marinas y fosfato monoamónico. *Arch. Zootec.*, v.57, p. 313-319,2008a.

MELO, T.V., FERREIRA, R.A., CARNEIRO, J.B.A. et al., Rendimiento de codornices japonesas utilizando harina de algas marinas y fosfato monoamónico. *Arch. Zootec.*, v.57, p. 381-384, 2008 b.

NUNES, I.J. Nutrição animal básica. 2. ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ Editora, 1998. 388 p.

PELICIA, K., GARCIA,E. A., SCHERER, M. R. et al., Efeito da combinação de fontes de cálcio sobre o desempenho e qualidade de ovos de poedeiras comerciais. In: 43ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2006. João Pessoa. *Anais...* Paraiba 2006. p 1-4.(Resumo Expandido).

RISTELI,L, RISTELI, J. Biochemical markers of bone metabolism. *Annal of Med* , v. 25, p.385–9, 1993.

SHARP, R.C., KERL,E.M., MANN,A.F. A comparison of total calcium, corrected calcium, and ionized calcium concentrations as indicators of calcium homeostasis among hypoalbuminemic dogs requiring intensive care. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. v.19(6), p. 571–578, 2009.

SHEIKH,M.S., RAMIREZ, A., EMMETT,M., et al., Role of vitamin D-dependent and vitamin D independent mechanisms in absorption of food calcium. *J. Clin. Invest.* .v.81, p.126–13, 1988.

SUKI,W.N., ROUSE,D., Renal transport of calcium, magnesium and phosphate. In: Brenner, B.M. (Ed.), *The Kidney*. WB Saunders, Philadelphia, p. 472–515, 1996

PERALI, C., ARANOVICH, M., SANTOS, M.W. et al., Efeito de diferentes níveis de adição do Suminal® sobre a produção e peso de ovos de codornas alimentadas com concentrados. In: 40ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2003. Santa Maria. *Anais...* Rio Grande do Sul .(Resumo Expandido).

POPE, H.R., OWENS, C.M., CAVITT, L.C. et al., Efficacy of marigro in supporting growth, carcass yield and meat quality of broilers. 91st Annual Meeting Abstracts. *The Southern Poultry Science Society. Poscal 80* (Suppl. 1). p. 25, 2002.

SANTOS, J.S.N., DRAIBE,A.S., KAMIMURA,A.M., Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. *Rev. Nutr., Campinas*, v.17(3), p.339-349, 2004

STOCKHAM, S. L, SCOTT, D.V.M. Enzimas. In: *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. 2. ed. cap.12, p.655-658 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

TEIXEIRA,O.A., LOPES,C.D., GOMES,P.C., et al., Níveis de substituição do fosfato bicálcico pelo monobicálcico em dietas para suínos nas fases de crescimento e terminação. *R. Bras. Zootec.*, v.34, n.1, p.142-150, 2005.

UCRÓS, N.S, FERREIRA, W.M., TORRES, R.C.S. et al., Lithothamnium calcareum no tratamento de osteotomia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) . *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.3, p.615-622, 2012.

ZANINI, S.F., CARVALHO, M.A.G., COLNAGO, G., et al., Uso de farinha de algas como fonte de cálcio na ração de frangos de corte. In: 37ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Viçosa. *Anais...* Minas Gerais 2000.

ZANINI, S.F.; CARVALHO, M.A.G.; COLNAGO, G. et al. Composição da carcaça de frangos de corte submetidos a dieta com farinha de algas. *Rev. Centro Univ.Vila Velha (ES)*, v.3 n.1 (janeiro/julho), p. 45- 56., 2002.

CAPÍTULO III - DINÂMICA SÉRICA DE FOSFATASE ALCALINA, FÓSFORO, CÁLCIO TOTAL, CÁLCIO AJUSTADO, CÁLCIO IÔNICO E ALBUMINA EM CÃES SUPLEMENTADOS COM FARINHA DE ALGAS MARINHAS (*LITHOTHAMNIUM CALCAREUM*.)

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a dinâmica da fosfatase alcalina, fósforo, albumina, cálcio total, cálcio ajustado à albumina e cálcio iônico séricos em cães da raça Fox Paulistinha, na idade adulta, suplementados com diferentes níveis de *Lithothamnium calcareum*. O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições, foram utilizados cães da raça Fox Paulistinha, totalizando-se 16 animais em um período experimental de 20 dias, quando foram coletados sangue dos animais no tempo 0 (inicial), 5; 10; 15 e 20 dias. Para tanto, foram analisados o cálcio total, o cálcio ionizado e o cálcio ajustado à albumina, albumina, fósforo e fosfatase alcalina a fim de se conhecer suas dinâmicas séricas em cães suplementados com *Lithothamnium calcareum* para cães. Os animais foram alojados em baias individuais recebendo água *ad libitum* e animais ração que atendia todas as necessidades dos mesmos. Foram realizadas análises de regressão quadráticas e cúbicas para estabelecer a relação entre as variáveis estudadas, de acordo com a suplementação de farinha de algas. Os resultados mostraram correlação positiva para níveis de cálcio total, ajustado à albumina, iônico e albumina. Foram obtidas equações de regressão significativas ($P < 0,05$) para os níveis séricos de fósforo, cálcio total, iônico e ajustado e em relação à suplementação de *Lithothamnium calcareum* para cães.

Palavras chaves: *Lithothamnium calcareum*, cães e sangue.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the dynamics of alkaline phosphatase, phosphorus, albumin, calcium, total calcium, albumin-adjusted calcium and serum ionized calcium in dogs of the breed *Fox Paulistinha* in adulthood, supplemented with different levels of *Lithothamnium calcareum*. The experimental design was completely randomized with four treatments and

four replications and dogs *Fox Paulistinha* were used, totaling 16 animals on a 20 days trial period, where the animals' blood were collected at time 0 (baseline), 5, 10, 15 and 20 days. Therefore, we analyzed the total calcium, ionized calcium and albumin adjusted calcium, albumin, phosphorus and alkaline phosphatase in order to know their serum dynamics in dogs supplemented with *Lithothamnium calcareum* for dogs. The animals were housed in individual stalls and they were given water *ad libitum* and animal feed that met their needs. Quadratic and cubic regression analyses were made to establish the relationship among variables studied, according to the algae flour supplementation. Results showed a positive correlation of levels of total calcium, albumin adjusted, and ionic albumin. We obtained meaningful regression equations ($P < 0.05$) for the levels of serum phosphorus, total and ionic calcium and adjusted in relation to supplementation of *Lithothamnium calcareum* for dogs.

Key-words: *Lithothamnium calcareum*, dog and bloods

3.1 INTRODUÇÃO

As pesquisas em nutrição de cães vêm avançando nos últimos anos, em busca de alimentos mais funcionais e que proporcione uma maior qualidade de vida aos animais. O *Lithothamnium calcareum*, um alga calcária, é geralmente utilizada na alimentação animal e na agricultura. Comumente vermelha, em razão da presença de phyco-eritrina, quando morta é de coloração cinza azulada, pertence ao grupo das algas vermelhas ou rodofíceas, da família das Coralineacea, tendo aspecto calcário, pois absorve o carbonato de cálcio e o magnésio; seu esqueleto se constitui de 95 a 99% de minerais, majoritariamente de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio, como também de outros minerais e em quantidades não negligenciáveis, (Assoumani, 1997; Melo e Moura, 2009). São vegetais que crescem naturalmente no meio marinho e se desenvolvem em grandes profundidades desde que exista a presença de luz (Dias, 2001; Melo e Moura, 2009). As algas calcárias são compostas, basicamente, por carbonato de cálcio e magnésio contendo ainda mais de 20 oligoelementos, presentes em quantidades variáveis, tais como Fe, Mn, B, Ni, Cu, Zn, Mo, Se e Sr (Zanini et al., 2000).

A fosfatase alcalina, uma enzima que pertence à família das fosfatase, catalisa a hidrólise de ésteres de fosfato, tendo vida média no sangue de 24 a 48 horas. Sua concentração sérica tem sido amplamente utilizada como marcador da remodelagem óssea; em humanos é um marcador útil (Teixeira et al., 2005) e sua mensuração no sangue está amplamente relacionada ao remodelamento ósseo.

Já o fósforo e o cálcio estão diretamente envolvidos no metabolismo do organismo animal, nas funções essenciais. O fósforo é importante para a manutenção da pressão osmótica e equilíbrio ácido-básico, é um dos mais importantes minerais para a formação e a mineralização do osso na matriz orgânica (Campos et al., 2012). O cálcio é o cátion mais abundante no corpo animal, fazendo parte da lista de elementos essenciais, tendo a sua função básica na formação de ossos e dentes e desempenha várias outras funções nos diferentes processos fisiológicos (Nunes, 1998). A concentração total de cálcio no sangue é

composta por três frações: cálcio ionizado, que é o cálcio livre e representa a forma biologicamente ativa; cálcio complexado, que é normalmente ligado a fosfato, lactato, sulfato, bicarbonato, citrato e o cálcio ligado às proteínas, que está ligado, principalmente, à albumina. (Kogika et al., 2006). O cálcio no fluido celular encontra-se 50% ionizado, sendo 40% unido às proteínas, e 10% unido a fosfatos, citratos, ácidos orgânicos e sulfatos. Do cálcio unido à proteína, 80% estão unidos à albumina e 20%, à globulina (Cruz, 2009). A albumina no soro humano (HSA) é a proteína mais abundante no plasma, o que representa o principal determinante da pressão osmótica plasmática e o principal modulador de distribuição de fluido entre os compartimentos corporais. (Santos et al., 2004). O objetivo desse trabalho foi analisar a dinâmica sérica da fosfatase alcalina, fósforo, cálcio total, cálcio iônico, cálcio ajustado à albumina e albumina em cães suplementados com diferentes quantidades de *Lithothamnium calcareum* por um período de vinte dias.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro de Tecnologia Animal, no distrito de Parajú, no município de Domingos Martins-ES. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, a ração utilizada foi uma ração experimental que supria todas as necessidades nutricionais dos animais (Tabela 1), a dieta dos animais foi suplementada com *Lithothamnium calcareum*. O produto foi administrado na forma de cápsulas, e ao grupo que não recebia o *Lithothamnium calcareum* foram administradas cápsulas vazias.

O experimento consistiu em um delineamento inteiramente casualizado (4X4), com quatro níveis de suplementação de *Lithothamnium calcareum*, 0; 0,5; 1,0 e 1,5 g/dia (tratamento) e com quatro repetições (cães), totalizando 16 cães da raça Fox Paulistinha, Terrier Brasileiro, com peso médio de $8,5 \pm 1,5$ kg e com idades de 9 meses a 5 anos. Todos os animais foram vermifugados, vacinados e chipados previamente. Os animais foram alojados em baias individuais com dimensão de 1,30 x 1,35 m na parte coberta e solário de 2,70 x 2,50 m e baias com 2,00 x 2,30 m na parte coberta e solário de 2,50 x 2,30 m. Esses foram designados às baias por meio de sorteio, na frente de cada baia havia uma etiqueta com o chip de cada animal e o tratamento a que o mesmo pertencia.

O experimento teve duração de 20 dias e, no primeiro dia, os animais foram pesados e coletados 10 ml de sangue de sua jugular. O sangue foi colocado em tubos secos e estéreis, levados à centrífuga a 3.000 r.p.m por 15 minutos para a separação do plasma, o soro sendo armazenado em eppendorfes de 0,5 ml a -20°C até análise, esse procedimento foi repetido a cada cinco dias, totalizando cinco coletas de sangue. As coletas de sangue foram realizadas na parte da manhã, quando todos os animais estavam em jejum e a 24 horas da administração do *Lithothamnium calcareum*. As análises de fósforo e fosfatase alcalina foram realizadas no Biolabor em Vila Velha com as seguintes metodologias:

- Metodologia da análise do fósforo sérico :UV de Ponto Final. O Fósforo inorgânico reage em meio ácido com o molibdato formando fosfomolibdato cuja intensidade de cor desenvolvida é proporcional à concentração de Fósforo presente na amostra.
- Metodologia da análise da fosfatase alcalina sérica: Cinética IFCC. A fosfatase alcalina (ALP) hidrolisa o p-nitrofenilfosfato (p-NFF), que é incolor, produzindo fosfato e p-nitrofenol, em pH 9,0. A velocidade de aparição do ânion p-

nitrofenolato (amarelo), a 405 nm, é proporcional à atividade enzimática da amostra.

As análises de cálcio, albumina, cálcio ajustado e cálcio ionizado sérico foram realizadas no laboratório de patologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

- Metodologia da análise do cálcio total sérico: método IR (Arsenazo III) para determinação quantitativa de cálcio total. O cálcio reage com Arsenazo III vermelho para produzir um complexo cálcio- Arsenazo III, o qual tem cor azul escura no pH alcalino do reagente. A absorbância do complexo azul cálcio - Arsenazo pode ser medida entre 600-660 nm e é proporcional à concentração de cálcio.
- Metodologia da análise da albumina sérica: método IR (Verde de Bromocresol Modificado) para determinação da albumina. A Albumina liga-se ao Verde de Bromocresol, para formar um complexo colorido. A absorbância deste complexo é quantificada a 600nm, e é diretamente proporcional à concentração de albumina da amostra.
- O Cálcio Ajustado à albumina foi determinado pela seguinte fórmula: $[iCa^{2+}] = [tCa^{2+}] - [Albumina] + 3,5$ (Sharp et al., 2009)
- O Cálcio Ionizado foi determinado pela seguinte fórmula: $[iCa^{2+}] = [tCa^{2+}] - [Albumina] + 3,5 * 0,5$ (Feldman, 1995; Portale, 1996 citado por Lustoza, 2005).

Lustoza et al., (2005) avaliaram a concentração sérica de cálcio ionizado, pelo método eletrodo íon-seletivo, em 40 cães saudáveis, para comparar os valores obtidos por meio do cálcio ionizado estimado em que se considerou a metade do valor do cálcio total mensurado pelo método colorimétrico e corrigido pela albumina. Não foi observada diferença do cálcio ionizado entre os dois métodos e observou-se baixa correlação entre os métodos ($r = 0,328$). Com isso conclui-se que o método de determinação utilizando a fórmula é preciso para determinação do cálcio ionizado.

Composição básica da ração: farinha de peixe, farinha de vísceras, concentrado proteico de soja, soja micronizada, milho moído, quirera de arroz, gordura animal, palatabilizante, vitaminas (A, D, E, B1, B2, B6, B12, cloreto de colina, biotina, ácido fólico, ácido pantotênico, niacina), minerais (iodato de cálcio, sulfato de cobre, sulfato de ferro, cloreto de sódio(sal comum), óxido de zinco, cloreto de potássio, selênio) e antioxidantes.

Tabela 1. Composição nutricional da dieta experimental.

| | | |
|----------------------------|---------|---------|
| Matéria Seca (MS) | % | 90,10 |
| Proteína (PB) | % | 31,79 |
| Energia Metabolizável (EM) | Kcal/Kg | 5075,27 |
| Extrato Etéreo (EE) | % | 14,22 |
| Fibra (FB) | % | 1,53 |
| Cinzas (Cin) | % | 9,26 |

| | | |
|-------------|---|------|
| Cálcio (Ca) | % | 2,2 |
| Fósforo (P) | % | 0,80 |

As médias obtidas foram submetidas à análise de regressão polinomial, utilizando-se o sistema de análises estatísticas SISVAR desenvolvido por Ferreira (2000), para se obter distribuição normal foram feitas mudanças de bases. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O peso inicial dos animais foi utilizado como covariável nas análises de variância das variáveis estudadas, o animal de nove meses foi retirado, para posterior análise dos resultados. Para ser obter distribuição normal no tratamento foram realizadas mudanças de bases.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ao analisar os níveis sérios de fosfatase alcalina, cálcio total, cálcio iônico, cálcio ajustado à albumina e fósforo em função do tempo de coleta e a inclusão *Lithothamnium calcareum* e da inclusão de *Lithothamnium calcareum* e o tempo de coleta foram geradas equações de regressão cúbicas e quadráticas.

Sampaio (1998) relata que, com um R^2 alto, o modelo fará melhores estimativas e será adequado para os dados obtidos. Entretanto um R^2 baixo não permite estimativas confiáveis, quer pela alta variabilidade da resposta medida, quer pelo fato de o modelo testado não ser adequado à dispersão dos dados observados.

Tabela 2. Regressão geral para análise de cálcio total da coleta dentro suplementação de *Lithothamnium calcareum*.

| Equação Geral | R^2 | Pr>(t) |
|-------------------------|--------|--------|
| $Y=2,2x^2-1,66x+10,3^*$ | 88,85% | 0,04* |

* Significativo para $p < 0,05$

Tabela 3. Regressão geral para análise de cálcio total da suplementação de *Lithothamnium calcareum* dentro da coleta.

| Equação Geral | R^2 | Pr>(t) |
|--------------------------------------|--------|---------|
| $Y=-0,001 x^3+0,03x^2-0,23x+10,31^*$ | 93,43* | 0,0001* |

* Significativo para $p < 0,05$

Tabela 4. Desdobramento da tabela 3 e da tabela 4.

| | Coleta | Pr>Fc | Equação | R^2 (%) |
|---------------|--------|-------|----------------------|-----------|
| Lithothamnium | 0 | 0,36 | $Y=0,82x^2-0,92x+10$ | 77,73 |
| Lithothamnium | 5 | 0,20 | $Y=0,72x^2-0,86x+10$ | 33,68 |
| Lithothamnium | 10 | 0,26 | $Y=1,25x^2-1,68x+10$ | 94,62 |
| Lithothamnium | 15 | 0,13 | $Y=0,92x^2-0,83x+11$ | 82,12 |

| | | | | |
|---------------|---------------|---------|------------------------------------|--------------------|
| Lithothamnium | 20 | 0,001* | $Y=1,79x^2-4,01x+10$ | 96,23* |
| | Suplementação | Pr>Fc | Equação | R ² (%) |
| Coleta | 0 | 0,90 | $Y=-0,0002x^3+0,007x^2-0,56x+10,3$ | 99,75 |
| Coleta | 0,5 | 0,22 | $Y=-0,001x^3+0,03x^2-0,23x+9$ | 97,68 |
| Coleta | 1 | 0,0001* | $Y=-0,001x^3+0,04x^2-0,27x+10^*$ | 88,9* |
| Coleta | 1,5 | 0,0001* | $Y=-0,002x^3+0,06x^2-0,38x+10^*$ | 96,38* |

* Significativo para $p<0,05$

Tabela 5. Regressão geral para análise cálcio ajustado à albumina da coleta dentro suplementação de *Lithothamnium calcareum*.

| Equação Geral | R ² | Pr>(t) |
|---------------------------|----------------|--------|
| $Y=0,89x^2-1,39x+10,10^*$ | 98,25% | 0,04* |

* Significativo para $p<0,05$

Tabela 6. Regressão geral para análise de cálcio ajustado à albumina da suplementação de *Lithothamnium calcareum* dentro da coleta.

| Equação Geral | R2 | Pr>(t) |
|----------------------------------|-------|---------|
| $Y=-0,001x^3+0,03x^2-0,23x+10^*$ | 95,86 | 0,0001* |

* Significativo para $p<0,05$

Tabela 7. Desdobramento da tabela 6 e da tabela 7.

| | | | | |
|---------------|---------------|---------|-----------------------------------|--------------------|
| | Coleta | Pr>Fc | Equação | R ² (%) |
| Lithothamnium | 0 | 0,32 | $Y=0,67x^2-0,66x+10$ | 99,02 |
| Lithothamnium | 5 | 0,38 | $Y=0,73x^2-0,9x+10$ | 79,26 |
| Lithothamnium | 10 | 0,29 | $Y=1,0x^2-1,37x+10$ | 99,89 |
| Lithothamnium | 15 | 0,40 | $Y=0,53x^2-0,45x+10$ | 99,81 |
| Lithothamnium | 20 | 0,001* | $Y=1,52x^2-3,56x+10$ | 89,14* |
| | Suplementação | Pr>Fc | Equação | R ² (%) |
| Coleta | 0 | 0,90 | $Y=-0,0002x^3+0,009x^2-0,05x+10$ | 91,79 |
| Coleta | 0,5 | 0,06 | $Y=-0,001x^3+0,03x^2-0,29x+10^*$ | 94,73 |
| Coleta | 1 | 0,0001* | $Y=-0,001x^3+0,049x^2-0,30x+10^*$ | 94,03* |
| Coleta | 1,5 | 0,0001* | $Y=-0,002x^3+0,05x^2-0,34x+11^*$ | 97,36* |

* Significativo para $p<0,05$

Tabela 8. Regressão geral para análise de albumina sérica total da coleta dentro suplementação de *Lithothamnium calcareum*.

| Equação Geral | R ² | Pr>(t) |
|---------------------|----------------|--------|
| $Y=0,21x^2-0,27x+3$ | 16,95% | 0,30 |

Não significativo p >0,05

Tabela 9. Regressão geral para análise de albumina sérica total da suplementação de *Lithothamnium calcareum* dentro da coleta.

| Equação Geral | R ² | Pr>(t) |
|------------------------------------|----------------|--------|
| $Y=-0,00009x^3+0,021x^2-0,0035x+3$ | 64,33 | 0,30 |

Não significativo p >0,05

Tabela 10. Regressão geral para análise de cálcio ionizado da coleta dentro suplementação de *Lithothamnium calcareum*.

| Equação Geral | R ² | Pr>(t) |
|--------------------------|----------------|--------|
| $Y=0,89x^2-1,39x+8,95^*$ | 98,25% | 0,04* |

*Significativo para p <0,05

Tabela 11. Regressão geral para análise cálcio ionizado da suplementação de *Lithothamnium calcareum* dentro da coleta.

| Equação Geral | R ² | Pr>(t) |
|------------------------------------|----------------|---------|
| $Y=-0,001x^3+0,03x^2-0,23x+9,04^*$ | 95,86 | 0,0001* |

*Significativo para p <0,05

Tabela 12. Desdobramento da tabela 10 e da tabela 11.

| | Coleta | Pr>Fc | Equação | R ² (%) |
|---------------|---------------|---------|-------------------------------------|--------------------|
| Lithothamnium | 0 | 0,32 | $Y=0,67x^2-0,66x+8,92$ | 99,02 |
| Lithothamnium | 5 | 0,38 | $Y=0,73x^2-0,9x+8,75$ | 79,26 |
| Lithothamnium | 10 | 0,29 | $Y=1,0x^2-1,37x+8,9$ | 99,89 |
| Lithothamnium | 15 | 0,40 | $Y=0,53x^2-0,45x+9,01$ | 99,81 |
| Lithothamnium | 20 | 0,0001* | $Y=1,52x^2-3,56x+9,1^*$ | 89,14* |
| | Suplementação | Pr>Fc | Equação | R ² (%) |
| Coleta | 0 | 0,90 | $Y=-0,0002x^3+0,007x^2-0,05x+8,9$ | 91,79 |
| Coleta | 0,5 | 0,008* | $Y=-0,001x^3+0,03x^2-0,23x+8,7^*$ | 94,73* |
| Coleta | 1 | 0,0001* | $Y=-0,001x^3+0,049x^2-0,30x+9,26^*$ | 94,03* |
| Coleta | 1,5 | 0,0001* | $Y=-0,002x^3+0,05x^2-0,34x+9,46^*$ | 97,36* |

*Significativo para p <0,05

Tabela 13- Regressão geral para análise de fosfatase alcalina da coleta dentro suplementação de *Lithothamnium calcareum*.

| Equação Geral | R ² | Pr>(t) |
|-----------------------|----------------|--------|
| $Y=-7,97x^2+7,07x+66$ | 60,80% | 0,70 |

Não significativo p >0,05

Tabela 14. Regressão geral para análise fosfatase alcalina da suplementação de *Lithothamnium calcareum* dentro da coleta.

| Equação Geral | R ² | Pr>(t) |
|--------------------------------|----------------|--------|
| $Y=0,004x^3-0,1200x^2+0,9x+50$ | 63,82 | 0,68 |

Não significativo p >0,05

Tabela 15- Regressão geral para análise de fósforo total da coleta dentro suplementação de *Lithothamnium calcareum*.

| Equação Geral | R ² | Pr>(t) |
|--------------------------|----------------|--------|
| $Y=-0,455x^2+0,73x+3,76$ | 88,76% | 0,40 |

Não significativo p >0,05

Tabela 16. Regressão geral para análise fósforo total da suplementação de *Lithothamnium calcareum* dentro da coleta.

| Equação Geral | R ² | Pr>(t) |
|------------------------------------|----------------|---------|
| $Y=-0,007x^3+0,02x^2-0,17x+3,92^*$ | 97,21 | 0,0005* |

*Significativo para p <0,05

Tabela 17. Desdobramento da tabela 15 e da tabela 16.

| | Coleta | Pr>Fc | Equação | R ² (%) |
|---------------|---------------|--------|-------------------------------------|--------------------|
| Lithothamnium | 0 | 0,70 | $Y=-0,53x^2+0,65x+3,89$ | 85,44 |
| Lithothamnium | 5 | 0,32 | $Y=-0,62x^2+0,68x+3,6$ | 49,13 |
| Lithothamnium | 10 | 0,91 | $Y=-0,22x^2+0,51x+3,59$ | 98,49 |
| Lithothamnium | 15 | 0,36 | $Y=-0,5x^2+1,13x+3,84$ | 74,2 |
| Lithothamnium | 20 | 0,86 | $Y=-0,38x^2+0,70x+3,87$ | 80,03 |
| | Suplementação | Pr>Fc | Equação | R ² (%) |
| Coleta | 0 | 0,70 | $Y=-0,00008x^3+0,005x^2-0,007x+3,9$ | 93,32 |
| Coleta | 0,5 | 0,02* | $Y=-0,001x^3+0,03x^2-0,27x+4,01^*$ | 95,15* |
| Coleta | 1 | 0,50 | $Y=-0,0002x^3+0,01x^2-0,08x+4,11$ | 81,64 |
| Coleta | 1,5 | 0,004* | $Y=-0,001x^3+0,04x^2-0,28x+3,63^*$ | 99,89* |

*Significativo para p <0,05

Tabela 18. Média dos desdobramentos nas análises de sangue, fosfatase alcalina(fosf.alc), cálcio (Ca), cálcio corrigido à albumina (Ca. Alb), cálcio ionizado (Ca.I), albumina (Alb) e fósforo (P).

| Suplementação | Fosf. Alc U/L | Ca (mg/dl) | Ca. Alb (mg/dl) | Ca.I (mg/dl) | Alb (mg/dl) | P (mg/dl) |
|---------------|---------------|------------|-----------------|--------------|-------------|-----------|
| 0 | 56,45* | 10,3* | 10,69* | 8,94* | 3,15* | 3,78 |
| 0,5 | 53,14* | 9,6 | 10,27 | 8,52 | 2,84* | 3,96 |
| 1 | 57,97* | 9,8 | 10,16 | 8,41* | 3,20* | 4,10* |
| 1,5 | 46,69* | 10,3* | 10,64* | 8,90* | 3,10* | 3,84* |
| Coleta | | | | | | |
| 0 | 51,03 | 10,76 | 11,5 | 9,01 | 3,01 | 3,91* |
| 5 | 50,38 | 10,46 | 10,8 | 8,71 | 3,08 | 3,59* |
| 10 | 55,87 | 10,55 | 11 | 8,80 | 3,05 | 3,78* |
| 15 | 51,04 | 10,89 | 11,8 | 9,14 | 3,16 | 4,25* |
| 20 | 59,49 | 9,53 | 9,2 | 7,78 | 3,053 | 4,06* |

* onde a covariável peso foi significativa

Tabela 19. Média dos parâmetros sanguíneos das análises de sangue, fosfatase alcalina (Fosf. Alc), cálcio (Ca), cálcio corrigido à albumina (Ca. Alb), cálcio ionizado (Ca. I), albumina (Alb) e fósforo (P).

| Fosf. Alc (U/L) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | Ca. (mg/dl) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------------|---------|----------|---------|---------|---------|
| 0 | 60,62Aa | 45,15Aa | 61,97Aa | 42,92Aa | 71,57Aa | 0 | 10,32Aa | 10,2Aa | 10,31Aa | 10,43Aa | 10,45Aa |
| 0,5 | 55,32Aa | 44,85Aa | 59,22Aa | 57,92Aa | 48,4Aa | 0,5 | 9,81Aa | 9,4Aa | 9,64Aa | 10,01Aa | 9,20Aab |
| 1 | 47,97Aa | 67,7Aa | 52,97Aa | 53,7Aa | 67,5Aa | 1 | 10,34Aa | 10,33Aa | 9,95Aa | 10,64Aa | 9,08Ab |
| 1,5 | 40,21Aa | 43,85Aa | 49,32Aa | 49,6Aa | 50,5Aa | 1,5 | 10,65Aa | 10,24ABa | 10,53Aa | 11,14Aa | 8,63Bb |
| P (mg/dl) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | Ca. I. (mg/dl) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| 0 | 3,92Aa | 3,72Aa | 3,6Aa | 3,77Aa | 3,9Aa | 0 | 8,94Aa | 8,8Aa | 8,95Aa | 9,01Aa | 9,00Aa |
| 0,5 | 4,00ABa | 3,52Ba | 3,77ABa | 4,45Aa | 4,05ABa | 0,5 | 8,73Aa | 8,33Aa | 8,50Aa | 8,93Aa | 8,10Aab |
| 1 | 4,10Aa | 3,87Aa | 3,9Aa | 4,27Aa | 4,27Aa | 1 | 8,97Aa | 8,72Aa | 8,59Aa | 9,08Aa | 6,71Ab |
| 1,5 | 3,63Aa | 3,15Aa | 3,85Aa | 4,47Aa | 4,03Aa | 1,5 | 9,43Aa | 8,99Aa | 9,15Aa | 9,53Aa | 7,33Bb |
| Ca. Alb (mg/dl) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | Alb. (mg/dl) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| 0 | 10,69Aa | 10,55Aa | 10,7Aa | 10,76Aa | 10,75Aa | 0 | 3,13Aa | 3,15Aa | 3,10Aa | 3,17Aa | 3,2Aa |
| 0,5 | 10,48Aa | 10,08Aa | 10,25Aa | 10,68Aa | 9,85Aab | 0,5 | 2,83Aa | 2,81Aa | 2,88Aa | 2,82Aa | 2,84Aa |
| 1 | 10,72Aa | 10,47Aa | 10,34Aa | 10,83Aa | 8,46Bb | 1 | 3,12Aa | 3,34Aa | 3,10Aa | 3,13Aa | 3,12Aa |
| 1,5 | 11,18Aa | 10,74Aa | 10,90A | 11,28Aa | 9,08Aab | 1,5 | 2,97Ba | 3,00ABa | 3,13ABa | 3,35Aa | 3,04ABa |

Letras maiúscula linha e letras minúsculas coluna, teste Tukey $p > 0,05$.

A covariável peso não foi afetada pelo tempo de coleta, ela só foi significativa na suplementação de *Lithothamnium calcareum*.

Ao analisar os resultados séricos de cálcio total, cálcio ajustado, albumina, fósforo, fosfatase alcalina e cálcio iônico, foram encontradas equações de regressões quadráticas e cúbicas significativas a ($P < 0,05$), para as variáveis estudadas, cada variável foi estudada separadamente. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado tendo subparcela, onde o *Lithothamnium calcareum* representou a parcela e tempos de coleta, a subparcela.

De acordo com resultados das análises estatísticas constatou-se que houve interação entre parcela e subparcela para análise de cálcio total. Foram feitos desdobramentos da suplementação de *Lithothamnium calcareum* nas diferentes coletas e dos diferentes tempos de coleta dentro da suplementação de *Lithothamnium calcareum*.

Nas análises estatísticas da coleta dentro da suplementação de *Lithothamnium calcareum*, para as análises séricas de cálcio total, cálcio iônico e cálcio ajustado à albumina, verificou-se efeito quadrático ($p < 0,05$) para o tempo de 20 dias de coleta de sangue e apresentaram um R^2 alto o que demonstra que os dados encontrados estão dentro da curva de predição. Todos os tipos de análise sanguínea de cálcio se comportaram da mesma forma, isto provavelmente ocorreu porque todas as análises foram realizadas a partir do cálcio total e da albumina e esta não se encaixou em nenhum modelo estatístico ($p > 0,05$). Já nas análises da suplementação de *Lithothamnium calcareum* dentro da coleta, do cálcio sérico total apenas o nível de suplementação de 1,5g foi explicado por um efeito cúbico; no cálcio ajustado à albumina foi observado efeito cúbico nos níveis de suplementação 1 e 1,5 g de *Lithothamnium calcareum* e para o cálcio iônico se observou efeito cúbico nos níveis 0,5, 1 e 1,5g de suplementação de *Lithothamnium calcareum*.

A concentração de cálcio sérico varia de 9.2–11.3 mg/dL (Sharp et al., 2009) mas quando foi administrado 1,5g de *Lithothamnium calcareum* até o vigésimo dia de experimento esse valor caiu para 8,63 mg/dL abaixo que o esperado para um animal saudável, e essa diminuição apresentou significância pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Esse resultado corrobora o encontrado por Del Claro et al. (2006) que trabalhando com ovelhas descreveu que o cálcio tem duas vias de excreção: fezes e urina, e a inclusão ou suplementação de cálcio na dieta pode ter alterado a absorção desse mineral.

Observado os modelos de regressão das três análises para cálcio, constatamos que apenas o cálcio iônico gerou equações significativas para os três níveis de suplementação. Sharp et al., (2009), trabalhando com cães relataram que o valor ajustado à albumina pode subestimar o cálcio iônico, diferentemente do que aconteceu nos dados analisados pois a suplementação de 0,5g de *Lithothamnium calcareum* não se encaixou em nenhum modelo estatístico ($p > 0,05$) na análise de cálcio ajustado à albumina.

Este comportamento cúbico para as análises de cálcio também foi observado por Del Claro et al., (2006) ao trabalharem com dietas aniônicas para ovelhas. Nos cães vários fatores podem comprometer a absorção de cálcio como: idade, raça, tamanho, doença, administração de corticoides, gestação e lactação, obesidade, relação com a vitamina D e respostas imunes (Emkey e Emkey, 2012).

Diferente do encontrado neste trabalho, Euler (2009), encontrou uma regressão linear quando incluiu *Lithothamnium calcareum* nas dietas de coelhos, e foram utilizados níveis crescentes de suplementação 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%. O autor observou que a concentração de cálcio sérico diminuía quando a inclusão do suplemento aumentava.

Fazendo análise de correlação, encontraram-se correlações positivas significativas $P < 0,001$ para cálcio total, cálcio ajustado à albumina, cálcio iônico e albumina sérica.

Em estudo com ratos, Assoumani (1997) relatou que a farinha de algas marinhas calcária apresentou vantagens em relação ao calcário no crescimento do osso fêmur e na biodisponibilidade de cálcio, sugerindo que, provavelmente, a concentração de magnésio e a porosidade da alga seriam os responsáveis por estas diferenças.

O fato de melhorar a biodisponibilidade pode explicar as correlações existentes entre as diferentes análises do cálcio com a albumina, devido ao fato de a albumina se ligar ao cálcio e o tornar indisponível para as funções vitais.

Ucrós et al., (2012) avaliaram os efeitos da suplementação com *Lithothamnium calcareum* observou-se que, embora tenha ocorrido a consolidação clínica e a radiográfica aos 60 dias em todos os casos, histologicamente o grupo-controle foi melhor, mostrando que o organismo sadio não necessita de estímulo para o processo de reparação óssea.

Já Costa Neto et al., (2010) trabalhando com cães, constataram a influência da farinha de algas marinhas (*Lithothamnium calcareum*) como suplemento mineral na cicatrização de falha óssea cortical reconstituída com auto enxerto cortical concluiu-se que a suplementação à base de algas marinhas *Lithothamnium calcareum* contribuiu para um melhor desempenho cicatricial, uma vez que tanto o grau de radiopacidade como o número de osteoclastos foram maiores nos animais tratados com o *Lithothamnium calcareum*.

Nenhum modelo estatístico foi encontrado para a análise de fósforo na coleta dentro da suplementação de *Lithothamnium calcareum*, mas já nas análises do *Lithothamnium calcareum* na coleta foram explicadas por equações de regressão cúbicas. Diferente do que aconteceu no cálcio sérico, apenas as suplementações de 0,5 e 1,5g se encaixaram em modelos matemáticos.

De acordo com o teste de média, Tukey ($p < 0,05$), apenas o nível 0,5g de suplementação teve diferenças significativas no decorrer do tempo. Fato não observado no teste de média com nível de suplementação de 0,5g *Lithothamnium calcareum* para as análises de cálcio realizadas. Apesar de o *Lithothamnium calcareum* apresentar valores irrisórios de fósforo, os níveis séricos de fósforo indicam que o nível sérico de fósforo foi afetado com a suplementação de *Lithothamnium calcareum*. De acordo com as equações de regressão o cálcio iônico e o fósforo tiveram o mesmo comportamento. Martinez e Carvalho (2010) relatam que, para um bom funcionamento do corpo, o cálcio e fósforo devem estar balanceados.

Como os níveis de cálcio e fósforo sérico se encaixaram em regressões cúbicas, era esperado que a fosfatase alcalina também se encaixasse em um modelo estatístico, mas isso não ocorreu, devido ao fato dessa análise ser um indicativo de marcador ósseo e ser encontrada nos ossos e no fígado. No osso, ela está ligada aos osteoblastos. No experimento de Costa Neto et al., (2010) o número de osteoblastos teve um aumento na cicatrização de fraturas de cães e, o fato deste número ter aumentado sugere que os níveis séricos de fosfatase alcalina também tiveram um aumento. Nesse experimento utilizou-se uma quantidade de *Lithothamnium calcareum* de 5 gramas, quantidade essa superior a utilizada no atual trabalho, assim como o tempo de administração também foi superior a este (Martins et al., 2006; Teixeira et al., 2005).

Euler (2009) interpretando as equações de regressão lineares obtidas em seu experimento inferiu que a suplementação do *Lithothamnium calcareum* nas dietas para coelhos em crescimento implicou em incrementar os níveis de fosfatase alcalina o que se relacionou estreitamente com a indução à mobilização do fósforo bem como do cálcio. Isto demonstra que deve ter havido uma importante contribuição dos elementos minerais (Ca e P) presentes no *Lithothamnium sp.* para o metabolismo dos coelhos. Diferentemente do que ocorreu no atual trabalho e isto pode ter ocorrido porque os cães apresentam uma via de regulação de fosfatase alcalina diferente dos outros animais (Stockham e Scott, 2011).

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que a suplementação de *Lithothamnium calcareum* não melhorou os níveis séricos dos animais até a suplementação de 1,5 grama. A fosfatase alcalina e a albumina não se alteraram com a suplementação de *Lithothamnium calcareum* até 1,5 grama/dia.

Mais pesquisas devem ser realizadas para o melhor conhecimento da ação do *Lithothamnium calcareum* no organismo dos cães e realizarem-se ensaios com o uso do *Lithothamnium calcareum* em animais que apresentem alguma deficiência em cálcio.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOUMANI, M.B. Aquamin, a natural calcium supplement derived from seaweed. *Agro-food-Industry Hi Tech*. September/October 1997.

CAMPOS, F.P., SILVA, O.C.F., FERREIRA, S.A., et al., Available phosphorus in diets with or without ractopamine for late finishing Gilts. *R. Bras. Zootec.*, v.41, n.3, p.630-635, 2012

COSTA NETO, J.M., TEIXEIRA, R.G, SÁ, MARCELO JORGE, C.L., et al., Farinha de algas marinhas ("*Lithothamnium calcareum*") como suplemento mineral na cicatrização óssea de autoenxerto cortical em cães. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.11, n.1, p.217-230, 2010.

CRUZ, S.C.S. Digestibilidade do cálcio de alimentos avaliadas em frangos de corte e em suínos com diferentes métodos. 2009. 70 f. Tese. (Doutorado em nutrição animal). Universidade Federal de Viçosa.

DIAS, G.T.M. Granulados Bioclásticos – Algas Calcárias. *Braz. Journal. Geoph.*, v.18, p.301-318, 2001.

DEL CLARO, R.G., ZANETTI,A.M., CORREA., et al., Balanço cátion-aniônico da dieta no metabolismo de cálcio em ovinos. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.36, n.1, p.222-228, 2006.

EMKEY,D.R., EMKEY,R.G, Calcium Metabolism and Correcting Calcium Deficiencies. *Endocrinol Metab Clin N Am.*, v.41, p. 527–556, 2012

EULER,C.C.A. Utilização digestiva, metodologias de avaliação “in vitro” de dietas e caracterização da microbiota cecal em coelhos suplementados com *Lithothamnium sp.* 2009. 82f. Tese (Doutorado em nutrição animal). Univerdidade Federal de Minas Gerais.

FANALI,G., MASI,A., TREZZA,V., et al., Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* v.33, p. 209–290, 2012.

KOGIKA,M. M., LUSTOZA,D.M., NOTOMI,K.M., et al., Serum ionized calcium in dogs with chronic renal failure and metabolic acidosis. *Vet Clin Pathol.* v. 35, p. 441–445, 2006. LUSTOZA,,D.M., KOGIKA,,M.M., LAZARETTI., et al.,Avaliação dos valores séricos de cálcio ionizado pelo método eletrodo íon seletivo em cães hígdos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.2, p.177-180, 2005.

MARTINS, S.A., ROCHA,F.D., MELLO,A, F., et al., Fostase alcalina óssea, 2006. Disponível em <http://www.fisioweb.com.br/portal/>. Acesso em 02/01/2013.

MARTINEZ,P.P., CARVALHO,B.M. Participação da excreção renal de cálcio, fósforo, sódio e potássio na homeostase em cães saudios e cães com doença renal crônica. *Pesq. Vet. Bras.* 30(10):868-876, outubro 2010.

MELO, T.V., MOURA, A.M.A. Utilização da farinha de algas calcáreas na alimentação animal. *Arch. Zootec.*, v.58, p.99-107, 2009.

NUNES, I.J. Nutrição animal básica. 2. ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ Editora, 1998. 388 p.

RISTELLI,L, RISTELI, J. Biochemical markers of bone metabolism. *Annal of Med* , v. 25, p.385–9, 1993.

SHARP, R.C., KERL,E.M., MANN,A.F. A comparison of total calcium, corrected calcium, and ionized calcium concentrations as indicators of calcium homeostasis among hypoalbuminemic dogs requiring intensive care.*Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.* v.19(6), p. 571–578, 2009.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentaçãoanimal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SANTOS, J.S.N., DRAIBE,A.S., KAMIMURA,A.M., Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. *Rev. Nutr., Campinas*, v.17(3), p.339-349, 2004

STOCKHAM, S. L, SCOTT, D.V.M. Enzimas. In: Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária. 2. ed. cap.12, p.655-658 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

TEIXEIRA,O.A., LOPES,C.D., GOMES,P.C., et al., Níveis de substituição do fosfato bicálcico pelo monobicálcico em dietas para suínos nas fases de crescimento e terminação. *R. Bras. Zootec.*, v.34, n.1, p.142-150, 2005.

UCRÓS, N.S, FERREIRA, W.M., TORRES, R.C.S. et al., Lithothamnium calcareum no tratamento de osteotomia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) . *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.3, p.615-622, 2012.

ZANINI, S.F., CARVALHO, M.A.G., COLNAGO, G., et al., Uso de farinha de algas como fonte de cálcio na ração de frangos de corte. In: 37^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Viçosa. *Anais...* Minas Gerais 2000.

CAPÍTULO IV- EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LITHOTHAMNIUM CALCAREUM NA DIGESTIBILIDADE DE PROTEÍNA, EXTRATO ETÉREO, MATÉRIA SECA E ENERGIA BRUTA PARA CÃES

RESUMO

Este experimento teve a finalidade de avaliar o efeito da suplementação do *Lithothamnium calcareum* na digestibilidade da proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EE), matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e energia bruta (EB). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (quatro níveis 0; 0,5; 1 e 1,5 grama/dia de suplementação de *Lithothamnium calcareum*) e quatro repetições totalizando-se 16 cães da raça Fox Paulistinha. Todos os animais receberam a mesma dieta e tinham acesso livre à água. Foram alojados em baias individuais. Os animais ficaram 10 dias se adaptando à dieta e à suplementação, e cinco dias de coleta total de fezes, totalizando 15 dias de experimentação para digestibilidade. Concluiu-se que a suplementação com até 1,5g de *Lithothamnium calcareum* não altera a digestibilidade da PB, EE, MS e EB.

Palavras chave: digestibilidade, *Lithothamnium calcareum*, cães.

ABSTRACT

This experiment aimed to evaluate the effect of supplementation of *Lithothamnium calcareum* in the digestibility of crude protein (CP), ether extract (EE), dry matter (DM), mineral matter (MM) and gross energy (GE). The experimental design was completely randomized with four treatments (levels 0, 0.5, 1 and 1.5 grams / day of supplementation of *Lithothamnium calcareum*) and four repetitions, totaling up 16 dogs of the breed *Fox Paulistinha*. All animals received the same diet and had free access to water. They were housed in individual stalls. The animals stayed for 10 days by adapting to diet and supplementation, and five days of total fecal collection, totaling 15 days experimentation to digestibility. It was found that supplementation with up to 1.5 g of *Lithothamnium calcareum* does not alter the digestibility of CB, EE, DM and GE. Key-words: *Lithothamnium calcareum*, dog, digestibility

4.1 INTRODUÇÃO

A relação entre o homem e o cão vem se fortalecendo nos últimos anos, e essa convivência é muito importante para ambos. Os animais viraram membros das famílias, e com o aumento da expectativa de vida de seus donos, a expectativa de vida dos animais de estimação vem aumentando e com isso tem se desenvolvido pesquisas visando proporcionar uma melhor qualidade de vida aos cães.

Antes, os cães eram alimentados com restos de comida e, hoje recebem rações balanceadas que suprem todas as suas necessidades nutricionais. A ciência da nutrição de cães vem desenvolvendo-se e inúmeras dietas com níveis adequados de nutrientes para as várias raças e fases do ciclo de vida do cão e, cada vez melhores, são lançadas no mercado mundial. Estabeleceu-se, com isto, elevada competitividade, o que tem levado à segmentação de produtos que apresentam padrões comerciais e nutricionais distintos. Com isso, as empresas, de um lado, têm desenvolvido produtos específicos, com o intuito de atrair a atenção do consumidor para um alimento diferenciado e de elevado valor nutricional, mas de alto custo. Estes apresentam formulação mais sofisticada, com o emprego de ingredientes selecionados de melhor processamento. Entretanto, também se produzem alimentos econômicos, de baixo valor agregado e que competem no mercado apenas por preço, pois são formulados com ingredientes de menor custo. Desta forma, o mercado *pet* absorve, hoje, ampla gama de ingredientes e subprodutos, empregados na produção de dietas variadas, com densidades nutricionais e digestibilidade distintas. Uma dieta balanceada deve conter ingredientes cuja digestibilidade seja elevada, o que resulta em maior aporte de nutrientes para atender à demanda dos tecidos do animal. Dessa maneira, a digestibilidade constitui parâmetro importante na avaliação de dietas para cães (Malafaia et al., 2002; Carciofi, 2008).

O *Lithothamnium calcareum*, uma alga calcária, geralmente é vermelha em razão da presença de phyco-eritrina, enquanto a alga morta é de coloração cinza azulada pertence ao grupo das algas vermelhas ou rodofíceas, da família das Corallineacea, com aspecto calcário, pois absorve o carbonato de cálcio e o magnésio. O seu esqueleto se constitui de 95 a 99% de minerais, majoritariamente de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio, como também de outros minerais e em quantidades não negligenciáveis, sendo usado principalmente na agricultura e na alimentação animal, mas está igualmente presente em certos complementos alimentares humanos (Assoumani, 1997; Melo e Moura, 2009).

As algas calcárias são compostas, basicamente, por carbonato de cálcio e magnésio contendo ainda mais de 20 oligoelementos, presentes em quantidades variáveis, tais como Fe, Mn, B, Ni, Cu, Zn, Mo, Se e Sr (Zanini, 2000).

O objetivo deste trabalho foi verificar se a suplementação de *Lithothamnium calcareum*, nos níveis de 0; 0,5; 1,0 e 1,5 g/dia altera a digestibilidade da proteína, extrato etéreo, energia, matéria mineral e matéria seca total.

4.2 MATERIAIS E METÓDOS

O experimento foi realizado no Centro de Tecnologia Animal no distrito de Parajú, no município de Domingos Martins- ES. Os animais foram alimentados com uma ração (Tabela 2) que atendia todas as necessidades nutricionais dos mesmos, de maneira *ad libitum*. Os animais foram suplementados nos níveis de 0; 0,5; 1,0 e 1,5 g/dia de *Lithothamnium calcareum*. O produto foi administrado em forma de cápsulas. No grupo que não recebia o *Lithothamnium calcareum* foram oferecidas cápsulas vazias; o experimento consistiu em quatro tratamentos com quatro animais em cada grupo, totalizando 16 cães da raça Fox Paulistinha, Terrier Brasileiro, com peso $8,5 \pm 1,5$ kg e com idades de 9 meses a 5 anos. Todos os animais foram vermifugados, vacinados e chipados. Os animais foram alojados em baias individuais com dimensões de 1,30 x 1,35 m e baias com 2,00 x 2,30 m na parte coberta e solário de 2,50 x 2,30 m. Os animais foram distribuídos por tratamento nas baias por meio de sorteio, sendo que a frente de cada baia continha uma etiqueta com a identificação do chip de cada animal e do tratamento a que o mesmo pertencia.

Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, ficando cada tratamento com peso médio de 8,5 kg. O experimento teve duração de 15 dias e no 10º dia começou a coleta de fezes que foi de 5 dias; nos dias de coleta, os animais não tinham acesso ao solário. As fezes foram coletadas diariamente e congeladas em sacos plásticos, de acordo com o protocolo de coleta total de fezes. Todos os dias as rações eram pesadas antes de serem fornecidas e assim como as sobras. As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Veterinária da UFMG, seguindo as normas do Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2000). As fezes coletadas de cada animal foram pesadas, homogeneizadas, compondo uma única amostra, e secas em estufa, a 65°C por 72 horas, para posterior análise laboratorial. Na ração e nas fezes foram determinados os valores de extrato etéreo em hidrólise ácida (EE), matéria seca total (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM) e energia (EN), e foi verificada a relação cálcio e fósforo da ração. As determinações dos valores de EB foram feitas em bomba calorimétrica automática Parr 1271. Com os dados obtidos, os coeficientes de digestibilidade aparente da EB, MS, PB, MM e EE em hidrólise ácida foram calculados com a seguinte fórmula (Nunes, 1998). Calculou-se a quantidade de fósforo e cálcio ingerida e excretada. Foram feitas análises de regressão para o estudo dos dados.

Coeficiente de digestão = $\frac{\text{Quantidade ingerida} - \text{Quantidade excretada nas fezes}}{\text{Quantidade ingerida}} \times 100$

Quantidade ingerida

Tabela 1. Análise bromatológica do *Lithothamnium calcareum* na matéria natural

| Na | La | Sc | Cr | Fe |
|----------|----------|-----------|----------|-----------|
| 5,64mg/g | 2,63ug/g | 0,58 ug/g | 6,5 ug/g | 2,49 ug/g |

| | | | | |
|-----------|------------|----------|----------|----------|
| Co | Ce | Urânio | Sm | Th |
| 0,22 ug/g | 9,118 ug/g | 186 ug/g | 0,45ug/g | 1,38ug/g |

Análise realizada no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) da Universidade Federal de Minas Gerais.

Tabela 2. Composição da ração

| Ingrediente | % |
|------------------------------|---------|
| Farinha de peixe 55 | 3 |
| Farinha de vísceras 60 | 10 |
| Farelo de soja tostado 44 | 1,9039 |
| Concentrado proteico de soja | 20 |
| Soja Micronizada soiji | 10,5835 |
| Milho integral moído m | 10,1182 |
| Arroz quebrado – quirera | 15 |
| Calcário calcítico | 0,1682 |
| Fosfato Bicálcio 18.5 | 1,4348 |
| Linhaça Grão 36485 | 1 |
| Ovo desidratado | 1 |
| Sal Comum | 0,3 |
| L- Carnitina | 0,01 |
| Malto Dextrose | 0,5 |
| Cloreto de Colina 70% | 0,1 |
| Banox E | 0,06 |
| Deodorase | 0,1 |
| Gordura de aves NT | 5 |
| Açucar | 0,3 |
| Beterraba em Pó | 0,4 |
| Espinafre em Pó | 0,1 |
| Saffmannn | 0,1 |

| | | |
|-----------------------------|--------|----------|
| Óleo de Soja | | 6,2814 |
| Aminogut | | 1 |
| Vitamina e Acetato 50% | | 0,01 |
| Vitamina C 35 PROT | | 0,01 |
| Mivatex 710 – Emulsificante | | 0,1 |
| Rovimix SPD CÃES PREMIUM | | 0,4 |
| 8L - Hidrolizado proteico | | 6 |
| Sulfato de Condroitina | | 0,01 |
| Hexametafosfato de sódio | | 0,01 |
| Glúten de Trigo | | 5 |
| Zinco (Zn) | mg/kg | 142,6328 |
| Iodo (I) | mg/kg | 1,50038 |
| Selênio (Se) | mg/kg | 0,33933 |
| Vitamina A (VitA) | KUI/kg | 10,0025 |
| Vitamina D (VitD) | KUI/kg | 1,00025 |
| Vitamina E (VitE) | UI/kg | 110,515 |
| Vitamina C (VitC) | UI/kg | 60,35625 |
| Tiamina (TiB1) | mg/Kg | 2,0005 |
| Riboflavina (Ri-B2) | mg/Kg | 4,001 |
| Ácido Pantotênico (AcPan) | mg/Kg | 15,00375 |
| Niacina (Niac) | mg/kg | 25,00625 |
| Piridoxina - B6 (pirB6) | mg/kg | 4,001 |
| Ácido Fólico (AcFol) | mg/Kg | 0,4001 |
| Vitamina B12 (VtB12) | MCG/kg | 0,03201 |
| Colina (Coli) | mg/Kg | 1200,825 |
| Vitamina K (VitK) | UI/kg | 1,00025 |
| Biotina (Biot) | % | 0,0006 |
| BHT (BHT) | mg/kg | 60,1 |

| | | |
|------------------------------|-------|----------|
| BHA (BHA) | mg/kg | 6,01 |
| Arginina (Arg) | % | 2,37525 |
| Histidina (Hist) | % | 0,69653 |
| IsoLeucina (IsoLe) | % | 1,29074 |
| Leucina (Leuc) | % | 2,29304 |
| Lisina (Lys) | % | 1,81591 |
| Metionina-cistina (metci) | % | 1,15832 |
| Fenilalanina-Tironin (fe/ti) | % | 2,4564 |
| Treonina (Treon) | % | 1,29694 |
| Triptofano (Tript) | % | 0,40359 |
| Valina (Valin) | % | 1,44797 |
| Metionina (Met) | % | 0,55237 |
| Glicina+Serina (glser) | % | 3,26991 |
| Fenilalanina (Fenil) | % | 1,46664 |
| Cistina (Cist) | % | 0,40262 |
| Tirosina (Tiros) | % | 0,88971 |
| Taurina (Tau) | mg | 55,76143 |
| Saponina (sapon) | mg/kg | 16,016 |
| Sapogenina (sapog) | mg/kg | 7,007 |

4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Para as análises estatísticas o cão de nove meses foi retirado e as análises foram realizadas utilizando-se o peso como covariável. Todas as variáveis estudadas tiveram distribuição normal, comprovada pelo teste Kolmogorov-Smirnov.

Os coeficientes de digestibilidade aparente da EB, EE, MS, MM e PB são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Tabela que representa os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDMS), proteína bruta (CDPB), energia bruta (CDEB), extrato etéreo em hidrólise ácida (CDEE) e coeficiente de digestibilidade de matéria mineral (CDMM).

| Parâmetro | Suplementação 0 | Suplementação 0,5g | Suplementação 1g | Suplementação 1,5g | Media | CV |
|-----------|-----------------|--------------------|------------------|--------------------|---------|---------|
| CDMS | 81,99% | 83,51% | 82,69% | 81 % | 82,56 % | 2,54% |
| CDPB | 87,33% | 88,79% | 87,14% | 86,83% | 87,57 % | 2,21% |
| CDEB | 87,75% | 87,33% | 84,55% | 85,12% | 86,26 % | 4,57% |
| CDEE | 93,92% | 94,62% | 94,06% | 93,95% | 94,15 % | 1,06% |
| CDMM | 37,71% | 43,56% | 38,94% | 34,87% | 39,03 % | 20,31 % |

CV. Coeficiente de variação

Tabela 4. Tabela da correlação entre as variáveis estudadas (Pearson)

| | CDMS | CDPB | CDEE | CDEB | CDMM |
|------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| CDMS | 1.000 | 0,84988 <0.0001 | 0,71783 0.0026 | 0.76185 0.0010 | 0,97361 <0.0001 |
| CDPB | 0.84988 <0.0001 | 1.000 | 0.84364 <0.0001 | 0,82669 0.0001 | 0.89029 <0.0001 |
| CDEE | 0,71783 0.0026 | 0.84364 <0.0001 | 1.000 | 0.75204 0.0012 | 0.74659 0.0014 |
| CDEB | 0.76185 0.0010 | 0.82669 0.0001 | 0.75204 0.0012 | 1.000 | 0.74846 0.0013 |
| CDMM | 0.97361 | 0.89029 | 0.74659 | 0.74846 | 1.000 |

| | | | | | |
|--|---------|---------|--------|---------|--|
| | <0.0001 | <0.0001 | 0.0014 | <0.0001 | |
|--|---------|---------|--------|---------|--|

Tabela 5. Resultados das análises de regressão para o coeficiente de digestibilidade da CDMS, CDEB, CDPB, CDEE, e CDMM.

| Análise | Equação | R ² | PR>F |
|---------|------------------------------|----------------|------|
| CDMS | $Y = -2,33 x^2 + 3,27x + 82$ | 0,83 | 0.26 |
| CDEB | $Y = 0,98x^2 - 3,6x + 88$ | 0,78 | 0.76 |
| CDPB | $Y = -1,75 x^2 + 2x + 87$ | 0.55 | 0.54 |
| CDEE | $Y = -0,81 x^2 + 1.13x + 94$ | 0.54 | 0.47 |
| CDMM | $Y = -9,9 x^2 + 12,24x - 38$ | 0.84 | 0.29 |

Nenhuma das análises se encaixou em modelos matemáticos ($p > 0.05$).

Nas análises de cálcio e fósforo da ração concluiu-se que essa tinha 0,7 % de fósforo e 2,2% de cálcio e segundo a Abinpet (2012) as recomendações mínimas de cálcio e fósforo são 0,6 e 0,5% respectivamente.

As análises estatísticas não demonstraram ($p > 0,05$) modelos matemáticos a que se encaixassem as variáveis estudadas.

Este resultado corrobora com o Pelicia et al., (2006) que avaliando o calcário calcítico e o *Lithothamnium* para desempenho de aves de postura concluíram que ele poderia ser incluído em até 45% para substituição do calcário calcítico sem prejudicar o desempenho e a postura das aves; apesar de neste presente trabalho não ter sido feita a substituição, também constatamos que a suplementação de até 1,5g de *Lithothamnium calcareum* não alterou a digestibilidade da matéria seca, extrato etéreo, proteína bruta, energia bruta e matéria mineral.

Euler et al., (2010) também não encontraram diferenças significativas quando incluíram diferentes níveis de *Lithothamnium calcareum* (0,25%; 0,50%; 0,75% e 1,00%) para coelhos, pois os mesmos não interferiram nas variáveis estudadas que foram: consumo, coeficiente de digestibilidade da matéria seca, proteína e energia, ganho de peso, rendimento de carcaça e peso de vísceras comestíveis. Apesar de não terem encontrado diferenças observaram que o nível de inclusão de 1% afetou negativamente a largura e o comprimento das vilosidades ileais.

Trabalhos de substituição do calcário por *Lithothamnium calcareum*, como o de Zanini et al., (2002) ao trabalharem com aves demonstram que o *Lithothamnium calcareum* não afeta a digestibilidade da ração e nem a carcaça dos animais.

Já Pope et al., (2002) trabalhando com aves observaram uma melhor conversão alimentar em animais e, com isso, obtiveram melhor rendimento e ganho de peito em aves que foram suplementadas com o *Lithothamnium sp.* Este efeito de melhoria na conversão alimentar também foi observado em suínos por Fialho et al., (1992), quando avaliaram diferentes

fontes de cálcio para suínos, embora o ganho de peso não tenha sido o foco do atual trabalho.

Os estudos de suínos, aves e coelhos não corroboram tanto para a interpretação dos dados estudados, pois cada espécie possui metabolismo distinto apesar de serem considerados animais não ruminantes. Outra diferença marcante é o fato de os cães não serem animais de produção e terem um tempo de vida médio de 12 anos, enquanto os animais de produção apresentam um ciclo de vida curto. Sabe-se que, para estes animais, o impacto de cálcio em curto prazo pode não trazer tanto prejuízo quando comparado a um animal de ciclo de vida curta; entretanto para os cães o impacto de uma suplementação errada de cálcio pode causar problemas para a vida inteira do animal.

De acordo com Dobenecker et al., (2009) quando trabalhando com duas raças de cães observaram que excesso de cálcio na dieta afetou negativamente a digestibilidade da energia aparente e matéria orgânica nas duas raças utilizadas(beagles e mestiços) enquanto a digestibilidade da proteína e do extrato etéreo só foi prejudicial para os animais mestiços. Conclui-se, então, que a suplementação de até 1,5 g de *Lithothamnium calcareum* não afeta a digestibilidade da ração, visto que o cálcio afeta a digestibilidade da energia e matéria orgânica.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluiu-se que a suplementação com o *Lithothamnium calcareum* não alterou a digestibilidade da proteína, matéria seca, matéria mineral, extrato etéreo e energia bruta. Pode-se concluir que até a suplementação de até 1,5g de *Lithothamnium calcareum* não é prejudicial aos cães.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. ABINPET. 2012

ASSOUMANI, M.B. Aquamin, a natural calcium supplement derived from seaweed. *Agro-food-Industry Hi Tech*. September/October 1997.

CAMPOS, F.P., SILVA, O.C.F., FERREIRA, S.A., et al., Available phosphorus in diets with or without ractopamine for late finishing Gilts. *R. Bras. Zootec.*, v.41, n.3, p.630-635, 2012

CARLOS, A.C., SAKOMURA, N.K., PINHEIRO, S.R.F et al., Uso da alga *Lithothamnium calcareum* como fonte alternativa de cálcio nas rações de frangos de corte. *Ciênc. Agrotec.*, v. 35, n. 4, p. 833-839, jul./ago., 2011.

CARCIOFI, A.C., Fontes de proteína e carboidratos para cães e gatos. *R. Bras. Zootec.*, v.37, suplemento especial p.28-41, 2008

DOBENECKER, B., Factors that modify the effect of excess calcium on skeletal development in puppies. *British Journal of Nutrition*, v.106, p.142– 145, 2011.

DOBENECKER, B., FRANK, V., KIENZLE, E. High calcium intake differentially inhibits nutrient and energy digestibility in two different breeds of growing dogs. *Journal of Animal Physiology and Animal nutrition*, v.94, p.109–114. 2009

EULER, A.C.C. FERREIRA, W.M., TEIXEIRA, E.A. et al., Desempenho, digestibilidade e morfometria da vilosidade ileal de coelhos alimentados com níveis de “*Lithothamnium*”. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim*, v.11, n.1, p.91-103, 2010.

EULER, C.C.A. Utilização digestiva, metodologias de avaliação “in vitro” de dietas e caracterização da microbiota cecal em coelhos suplementados com *Lithothamnium sp.* 2009. 82f. Tese (Doutorado em nutrição animal). Universidade Federal de Minas Gerais.

KOGIKA, M. M., LUSTOZA, D.M., NOTOMI, K.M., et al., Serum ionized calcium in dogs with chronic renal failure and metabolic acidosis. *Vet Clin Pathol*. v. 35, p. 441–445, 2006.

MALAFAIA, R.F.I.M., RIBEIRA, D.M., SILVA, R.M., et al., CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE DE MINERAIS EM DIETAS PARA CÃES CONTENDO POLPA DE CITROS E FOLHA DE ALFAFA. *Ciência Rural*, v.32, n.5, p.863-867, 2002.

MELO, T.V., MOURA, A.M.A. Utilização da farinha de algas calcáreas na alimentação animal. *Arch. Zootec.*, v.58, p.99-107, 2009.

MELLO, T.V., MENDONÇA, P.P., MOURA, A.M.A., et al., Solubilidad in vitro de algunas fuentes de cálcio utilizadas em alimentacion animal. *Arch. Zootec.*, v. 55, p. 297-300, 2006.

NUNES, I.J. Nutrição animal básica. 2. ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ Editora, 1998. 388 p.

PELICIA, K., GARCIA, E. A., SCHERER, M. R. et al., Efeito da combinação de fontes de cálcio sobre o desempenho e qualidade de ovos de poedeiras comerciais. In: 43ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2006. João Pessoa. *Anais...* Paraíba 2006. p 1-4. (Resumo Expandido).

POPE, H.R., OWENS, C.M., CAVITT, L.C. et al., Efficacy of marigro in supporting growth, carcass yield and meat quality of broilers. 91st Annual Meeting Abstracts. *The Southern Poultry Science Society. Poscal 80* (Suppl. 1). p. 25, 2002.

ZANINI, S.F., CARVALHO, M.A.G., COLNAGO, G., et al., Uso de farinha de algas como fonte de cálcio na ração de frangos de corte. In: 37ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Viçosa. *Anais...* Minas Gerais 2000.

ZANINI, S.F.; CARVALHO, M.A.G.; COLNAGO, G. et al. Composição da carcaça de frangos de corte submetidos a dieta com farinha de algas. *Rev. Centro Univ. Vila Velha* (ES), v.3 n.1 (janeiro/julho), p. 45- 56., 2002.

CAPÍTULO V-ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA DE CÃES SUPLEMENTADOS COM *LITHOTHAMNIUM CALCAREUM*

RESUMO

O experimento teve o intuito de analisar a diversidade genética bacteriana de cães suplementados com *Lithothamnium calcareum* de (0; 0,5; 1,0 e 1,5 g/dia) utilizando métodos moleculares baseados na extração de DNA total de fezes de cães, seguida de PCR-DGGE. Foram coletadas amostras de conteúdo fecal de 16 cães (4 tratamentos x 4 repetições). Os resultados demonstraram a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) foi adequada para as análises do DNA da microbiota fecal de cães. O perfil de diversidade genética não se ajustou a equações de regressões pré- definidas, os índices utilizados foram: Riqueza (UTOs), Becker Parker e Shannon H.

Palavras chave: cães, PCR-DGGE, *Lithothamnium calcareum*.

ABSTRACT

The experiment aimed to analyze the bacterial genetic diversity of dogs supplemented with *Lithothamnium calcareum* (0, 0.5, 1.0 and 1.5 g / day) by using molecular methods based on total DNA extraction from dogs feces, followed by PCR-DGGE. Samples were collected from fecal content of 16 dogs (4 treatments x 4 repetitions). The results demonstrated that the technique of gel electrophoresis with denaturing gradient (DGGE) was suitable for the analysis of DNA from fecal microbiota of dogs. The profile of genetic diversity did not fit in regression equations pre-defined; indexes were used; Riqueza (UTOs), Becker Parker and Shannon H.

Key-words: dogs, PCR-DGGE, *Lithothamnium calcareum*

5.1 INTRODUÇÃO

A Microbiota intestinal apresenta um papel importante na saúde de todos os mamíferos, pois reúne várias espécies de microorganismos (bactérias, fungos, arqueobactérias, vírus e protozoários). Nos ruminantes e herbívoros de grande porte, por exemplo, os microorganismos são cruciais para a obtenção de energia, a partir de substratos fibrosos, que é realizada através de fermentação anaeróbica. Sem ele, estes animais não seriam capazes de atender as suas necessidades energéticas. Na maioria dos não ruminantes onívoros e carnívoros, a quantidade de energia derivada da fermentação microbiana é baixa devida às baixas concentrações de fibra na dieta e das variações em anatomia e fisiologia gastrointestinal; a outra função dos microorganismos é funcionar como uma barreira de defesa (Lubbs et al., 2008; Suchodolski, 2010). Em análises da microbiota fecal de cães pode-se observar que a maioria dos filos presentes pertencem à família das Firmicutes que compreendem as *Eubactérias*, *Clostridium* e *Lactobacillus* (Hooda et al., 2012).

O *Lithothamnium calcareum*, é uma alga calcária, geralmente vermelha em razão da presença de phyco-eritrina, enquanto a alga morta é de coloração cinza azulada. Ele pertence ao grupo das algas vermelhas ou rodofíceas, da família das Corallineacea, tendo aspecto calcário, pois absorve o carbonato de cálcio e o magnésio. O seu esqueleto se constitui de 95 a 99% de minerais, majoritariamente de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio, como também de outros minerais e em quantidades não negligenciáveis, sendo usado principalmente na agricultura e na alimentação animal, mas está igualmente presente em certos complementos alimentares humanos (Assoumani, 1997 ; Melo e Moura, 2009).

Técnicas moleculares permitem a identificação das espécies microbianas intestinais utilizando sequências de DNA isolado. Reação em cadeia da polimerase quantitativa (QPCR), por exemplo, permite a quantificação das populações microbianas, enquanto a desnaturação em gel de gradiente eletroforese (DGGE) e o sequenciamento do rDNA 16S permitem a medição da diversidade microbiana no intestino e identificação das espécies de cada microorganismo, respectivamente (Lubbs et al., 2008).

A técnica de DGGE baseia-se na separação de produtos de PCR por meio de eletroforese em poliacrilamida com gradiente de agente desnaturante, normalmente uréia e formamida. Os fragmentos, que possuem o mesmo tamanho, são discriminados com relação à sua resistência às concentrações crescentes dos agentes desnaturantes e, então, o gel é corado com um corante específico. A análise por DGGE de diferentes comunidades microbianas demonstrou a presença de um máximo de 10 faixas distintas no padrão de separação, que foram derivadas a partir de muitas espécies diferentes que constituem estas populações gerando, assim, um perfil de DGGE das populações (Muyzer et al., 1993).

A avaliação da diversidade microbiana pela técnica de DGGE permite identificar a variabilidade, inter e intra-específica, presente na comunidade amostrada. (Santos, 2008). Como o conceito de espécie microbiana está atrelado à parcela de microrganismos cultiváveis, a quantificação da diversidade requer que os elementos individuais sejam agrupados em classes, visto que a diversidade é função do número total de diferentes classes, este que é denominado Riqueza (NÜBEL et al., 1999, citado por Santos, 2008).

As bandas resultantes do *fingerprint* em DGGE são referidas como Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). Essas UTOs correspondem às classes, que juntas compõem a Riqueza. A diversidade da comunidade microbiana é medida pelo cálculo dos índices de diversidade, como o Índice de Shannon-Weaver, mais utilizado, comumente, em estudos de Ecologia. Nubel et al., (1996) descreveu que o Berger-Parker é um índice que expressa a dominância de um organismo sobre os demais.

O objetivo deste trabalho foi observar se a suplementação de *Lithothamnium calcareum* pode alterar a diversidade de bactérias em fezes de cães.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro de Tecnologia Animal, no distrito de Parajú, no município de Domingos Martins-ES, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualidade, utilizando 16 cães da raça Fox Paulistinha de ambos os sexos, o peso médio dos animais foi de $8,5 \pm 1,5$ kg, a idade variava de 9 meses a 5 anos, sendo que para a análise estatística o animal de 9 meses foi excluído fazendo o delineamento com parcela perdida no quarto tratamento. O peso inicial foi utilizado como covariável, com quatro níveis de suplementação de *Lithothamnium calcareum*, 0; 0,5; 1,0 e 1,5 g/dia (tratamento) e com quatro repetições (cães). Todos os animais foram vermifugados, vacinados e chipados previamente. Os animais foram alojados em baias individuais com dimensão de 1,30 x 1,35 m na parte coberta e solário de 2,70 x 2,50 m e baias com 2,00 x 2,30 m na parte coberta e solário de 2,50 x 2,30 m. Os animais foram designados às baias por meio de sorteio, identificando-os na frente de cada baia por uma etiqueta com a referência ao chip de cada animal e ao tratamento a que o mesmo pertencia.

O experimento teve duração de 15 dias e, nos primeiros 10 dias ficaram em período de adaptação e, mais 5 dias de coleta de fezes. O protocolo utilizado foi o de coleta total de fezes, protocolo este utilizado para digestibilidade, onde as fezes foram congeladas, homogeneizadas e tirada uma alíquota de 20 gramas para realização das análises da microbiota. A análise de diversidade bacteriana foi realizada no Laboratório de Microbiologia Industrial –BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa.

O DNA foi extraído das amostras de fezes utilizando o Kit Qiamp DNA mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA) seguindo as instruções para extração de fluidos biológicos, com adaptações (Oliveira et al., 2013) Foram pesados 50 mg de fezes em eppendorf de 2 ml, adicionado 300µl de EDTA 50mM e 5 µl de lisozima 50mg/ml. A solução foi homogeneizada em vortex. Os tubos foram incubados a 37°C por 1 h e invertidos a cada 10 min, e posteriormente o tubo foi centrifugado a 12000g por 5 minutos e o sobrenadante foi removido. O *pellet* foi ressuspenso em 180 µl do tampão ATL e a solução foi homogeneizada em vortex. As amostras foram tratadas com proteinase K (20 µl de proteinase K (20 mg/ml) a 56°C por 1,5h. Em seguida. 20 µl de RNase (20mg/ml) e 200 µl do tampão AL foram adicionados e misturados por 15s em vortex e incubados ,

misturando dando pulsos no vortex por 15s. Incubou a 70°C por 10 minutos. Para remover o DNA presente em solução, uma série de centrifugações foram feitas para remover as partículas insolúveis, consistindo em breve centrifugação a 2000rpm, seguido por 2 centrifugações a 1000g por 2 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado 200 µl de etanol 100%, e misturado dando pulsos no vortex por 15s. As etapas finais do protocolo consistiram na purificação do DNA em colunas QIAamp Mini Spin seguindo as instruções do kit. Foram utilizados os primers universais F984/GC (5`CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAAGA 9ACCTT - 3`) e R1378 (5` - CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3`) (Oliveira et al., 2013) para amplificação dos fragmentos de 16S rDNA do domínio Bacteria, sob as seguintes condições: 95° C por 3 minutos para desnaturação do DNA, 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 57° C por 30 segundos para o anelamento dos primers, 72° C por 30 min e uma extensão final de 72° C por 60 segundos. A PCR foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Cada reação com volume final de 25µL continha tampão da enzima (1X), 1 µL de DNA, 12,05 µL de água, 200µM de dNTP, 200µM de cada primer 2,25mM de MgCl₂, 2% de formamida, 50µg de Soro albumina bovina e 1U de GoTaq DNA polimerase (PROMEGA, Madison, WI, EUA). Os amplicons resultantes da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 1% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM) e visualizado utilizando GelRed

A Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) foi realizada utilizando-se o equipamento “DCode™ Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad – Califórnia USA).

Foram aplicados 20µL dos produtos de PCR, em gel de poliacrilamida (acrilamida:N,N'-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE 1X, para fragmentos de tamanhos variando de 200 pb a 400 pb. O gradiente desnaturante variou linearmente de 40% a 60%. O gradiente foi formado a partir da mistura de duas soluções estoque de poliacrilamida a 8%, uma com 100% dos agentes desnaturantes, que corresponde a uréia 7 M e formamida desionizada 40% (v/v), e outra sem esses agentes. Além das soluções-estoque para a formação do gradiente, foram utilizados 0,03% (p/v) de persulfato de amônio [polimerizador], 0,17% (v/v) de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletileno diamino) [catalisador] e 50µL de corante (azul de bromofenol 0,5%, xileno cianol 0,5% e TAE 1X) para visualização do gradiente. O tempo de polimerização do gel, antes da aplicação das amostras, foi de 3 horas (Oliveira et al., 2013).

A eletroforese foi realizada em temperatura de 60°C e voltagem constante de 50V durante 16 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de SYBR® Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel foi visualizada no sistema de digitalização de imagem L-PIX CHEMI Molecular Imaging (Loccus Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil).

A comparação estatística dos perfis de bandas dos géis obtidos após a DGGE foi realizada utilizando o programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de Bactéria foi estimada com base em uma matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1) e ausência como zero (0). Os índices de diversidade de Shannon-Weaver (H), e de Berger- Parker (d) foram calculados no programa Past (REFERENCIA). O índice de diversidade (H) é calculado como: $H = \frac{C}{N} (N \times \log N - \sum n_i \times \log n_i)$, em que C=2,3; N= soma da massa de todas as bandas de DNA; n_i= massa da ith da banda de DNA. A riqueza representa o número de bandas, que se refere às UTOS. E. A diversidade Shannon-Weaver

é o índice de diversidade geral que aumenta com o número de espécies e é maior quando a massa é distribuída mais uniformemente entre as espécies (Euler,2009). O valor do índice de Becker- Parker é obtido pela expressão $d = N_{\text{máx}} / N$, sendo d o grau de dominância, $N_{\text{máx}}$, o número de indivíduos da espécie mais abundante e, N o número total de indivíduos amostrados na área.(Sofia e Suzuki, 2004).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para as análises estatísticas foram feitos teste de média e análise de regressão, utilizando o delineamento inteiramente casualizado com o peso inicial do animal como covariável, e que, de acordo com as análises, não foi significativo a $p > 0,05$.

Para as amostras de fezes, o protocolo testado foi eficiente (Fig. 1). Entretanto, as primeiras tentativas para os números 1,2,3,7,13 de amplificação foram negativas. Após quantificação do DNA, foram necessárias diluições sucessivas das amostras e na diluição 1:10 quase todas as amostras foram amplificadas menos a amostra 13 que foi diluída em 1:50 para ser amplificada, como demonstrado nas figuras a seguir. Provavelmente, a grande quantidade de impurezas que é obtida junto com o DNA tenha dificultado a purificação das amostras (Rodrigues, 2009).

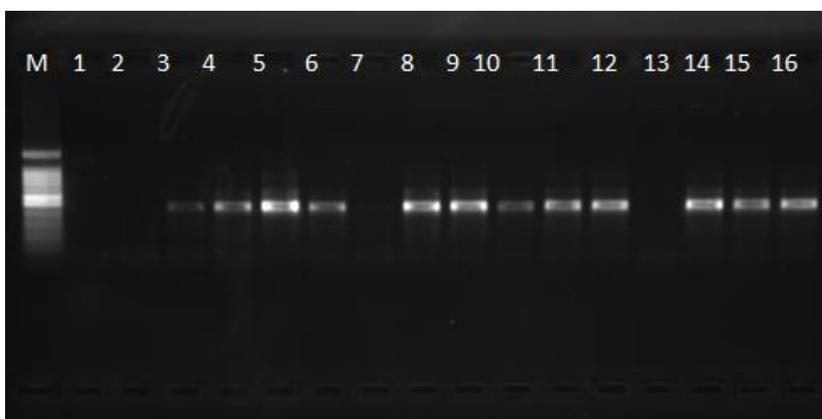


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação por PCR dos fragmentos dos rDNA 16S de bactérias de fezes de cães. M – marcado 100bp DNA ladder (PROMEGA). 1 a 16 – amostras de fezes.

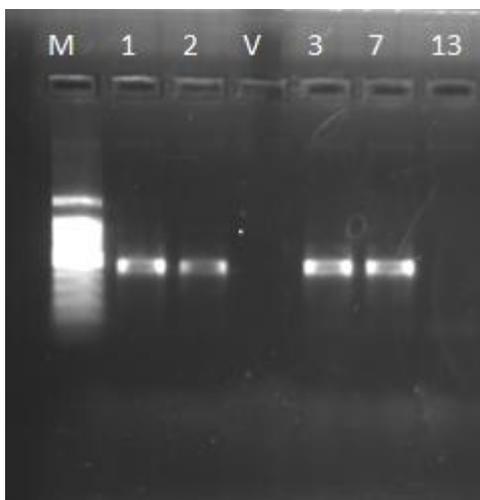


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação por PCR dos fragmentos dos rDNA 16S de bactérias de fezes de cães. M – marcado 100bp DNA ladder (PROMEGA). Amostras de fezes que tiveram de ser repetidas.

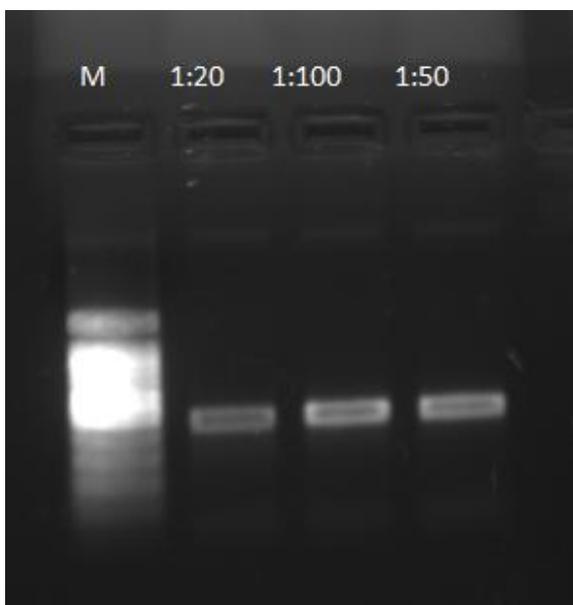


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação por PCR dos fragmentos dos rDNA 16S de bactérias das fezes do cão número 13. M – marcado 100bp DNA ladder (PROMEGA). A diluição 1:50 foi a escolhida para ser aplicada no DGGE.

Foram testadas três condições de reações de PCR até alcançar a reação satisfatória para as análises de DGGE, não havendo, aparentemente, amplificação de bandas inespecíficas ou formação de produtos quiméricos. Cada número corresponde a um animal e ao seu tratamento, como representado na Tabela 1.

Tabela 1. Cada tratamento com suas diferentes inclusões de de *Lithothamnium calcareum*, e as posições dos animais no gel de agarose e no DGGE

| Tratamento | Identificação dos animais no gel de agarose |
|------------|---|
| 1 (0g) | 9,13,10 e 2 |
| 2(0,5g) | 3,8,12 e 4 |
| 3 (1g) | 11,5,16 e 14 |
| 4 (1,5) | 1,7,15 e 6 |

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostrou a existência de um variado perfil de diversidade genética nas 16 amostras de DNA (Figura 4).

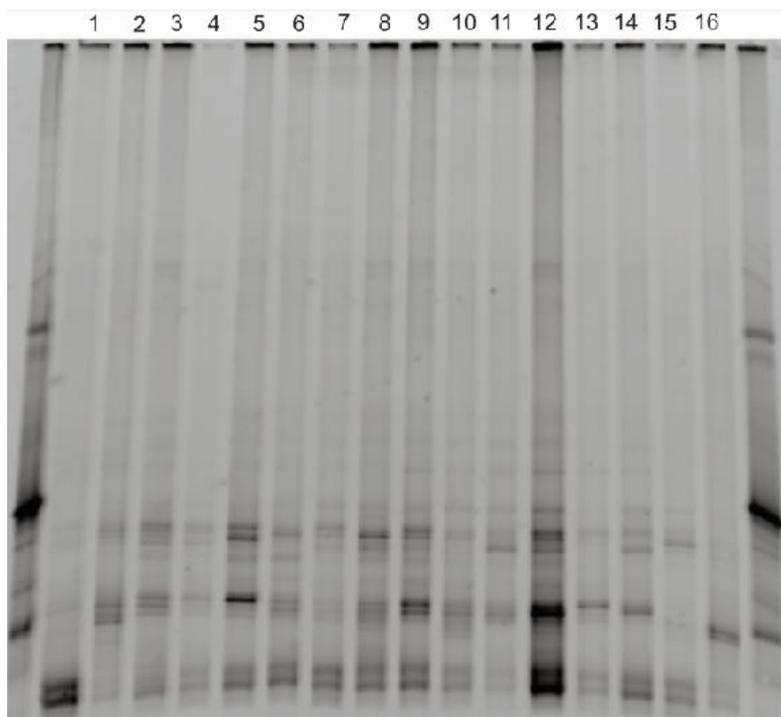


Figura 4. Perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias totais presentes nas fezes de cães, obtido após amplificação por PCR utilizando primers universais para a Eubacteria. M: marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S de organismos de referência.

Tabela 2. Valores da Taxa_S (riqueza), expressos como o número de UTOs no gel de DGGE, valores dos índice de diversidade genética (Shann_H ou H') e valores de Berger_Parker, da comunidade de Eubacteria em fezes de cão. Os dados foram obtidos pela análise do perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de Eubacteria, com o auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths).

| Suplementação | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 |
|---------------|------|-------|-------|-------|
| Taxa_S | 10 | 10,25 | 10,25 | 10,33 |
| Shannon_H | 2,28 | 2,26 | 2,29 | 2,32 |
| Berger_Parker | 0,1 | 0,11 | 0,1 | 0,09 |

Não houve diferenças significativas para $p > 0,05$, no teste de Tukey

A riqueza representa o número de bandas a que se refere as UTOs. (Euler, 2009) O índice de Berger-Parker (d), é que expressa a importância proporcional da espécie mais abundante de uma determinada amostra (Magurran 1988, citado por Sofia e Suzuki, 2004). A diversidade Shannon-Weaver é o índice de diversidade geral que aumenta com o número de espécies e é maior quando a massa é distribuída mais uniformemente entre as espécies.

A composição da microbiota intestinal depende da fisiologia do intestino de cada animal e da dieta ofertada aos animais (Schwab e Gänzle, 2011).

Nos resultados das análises de riqueza e de Shannon- Weaver, apesar do tratamento 4 ter apresentado o maior índice de UTOs (Unidade Taxonomica Operacional) e o maior índice de diversidade geral, respectivamente, as análises variância pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos e a análise de regressão não indicou efeitos significativos ($p > 0,05$), não se ajustando assim, a nenhum modelo de equação pré-definido. Na análise de Berger-Parker podemos observar que o tratamento dois foi o que apresentou maior índices de bandas, mas não houve diferenças significativas entre os tratamentos e nem equação de regressão que se adequasse a esse modelo. Os valores representados nessa análise, permite-se concluir que, entre os tratamentos, não há nenhuma banda mais dominante que a outra devido aos baixos valores encontrados.

Apesar de não ter havido diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos, quantidade da população bacteriana pode ter diminuído ou aumentado, mas isto não pôde ser identificado por DGGE e para se conhecer ao certo se houve diferença deve-se fazer PCR em tempo real ou empregar-se alguma outra técnica. Essa diferença não foi observada quando se utilizou o *primers* para Eubactéria; às vezes, utilizando *primers* específicos para grupos microbianos, como Gram Positivos e Negativos, Lactobacilus ou outros pudesse identificar efeito do seu tratamento. Suchodolski (2010), avaliando as microbiota de cães e gatos descreveu que a mudança na dieta dos animais afeta de forma endógena a composição do microbioma da flora intestinal desses animais. Manninen et al., (2006) trabalhando com beagles fistulados e cinco tipos de bactérias *Lactobacillus fermentum*

LAB8, *Lactobacillus salivarius* LAB9, *Weissella confusa* LAB10, *Lactobacillus rhamnosus* LAB11, e *Lactobacillus mucosae* LAB12, suplementou-os com essas bactérias, e foram observadas mudanças na microbiota do quimo desses animais: a LAB12 que era dominante antes da mudança da dieta, após a mudança a dominância passou para LAB 8 e, mesmo depois de cessada a suplementação, 4 dos 5 cães, não recuperam a microbiota inicial.

Utilizando dois tipos de prebiótico (frutanos) em cães, Vanhoutte et al., (2005) demonstraram através de análises de DGGE- PCR, que a microbiota fecal dos cães foi alterada antes e após a administração do prebiótico, mas o autor sugere que são necessários mais estudos sobre a microbiota estável das fezes de cães para um resultado mais conclusivo sobre essas modificações.

Para humanos foi relatado que o teor de proteína e gordura na dieta afeta a microbiota intestinal (Hill MJ,1981 citado por Hang, 2012), isso corrobora pelo fato de não ter havido diferenças na microbiota intestinal, pois os teores de proteína e de gordura não foram alterados com a suplementação com *Lithothamnium calcareum* .

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) apesar de ser adequada para as análises do DNA de cães, não apresentou diferenças significativas na diversidade bacteriana usando *primer* de Eubactéria. Mais estudos devem ser feitos nessa área para se conhecer melhor a microbiota dos animais, já que se sabe que antibióticos e prebióticos alteram essa microbiota.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOUMANI, M.B. Aquamin, a natural calcium supplement derived from seaweed. *Agro-food-Industry Hi Tech*. September/October 1997.

EULER,C.C.A. Utilização digestiva, metodologias de avaliação “in vitro” de dietas e caracterização da microbiota cecal em coelhos suplementados com *Lithothamnium sp.* 2009. 82f. Tese (Doutorado em nutrição animal). Univerdidade Federal de Minas Gerais.

HANG, I., RINTTILA, T., ZENTEK, T., et al., Effect of high contents of dietary animal-derived protein or carbohydrates on canine faecal microbiota, *BMC Veterinary Research*, v.8:90, p.2-9, 2012.

LUBBS, D. C., VESTER, B. M., FASTINGER, N. D., et al., Fastinger, and K. S. Swanson. Dietary protein concentration affects intestinal microbiota of adult cats: A study using DGGE and qPCR to evaluate differences in microbial populations in the feline gastrointestinal tract. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* v.93, p.113–121, 2008.

MANNINEN, K.J.T., RINKINEN, L.M., BEASLEY, S.S., Alteration of the Canine Small-Intestinal Lactic Acid Bacterium Microbiota by Feeding of Potential Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology* v. 72, n. 10, p. 6539–6543, 2006

MUYZER, G., DEWAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of Polymerase Chain Reaction amplified genes-coding for 16S ribosomal RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 59, p. 695–700, 1993.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KÜHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.422-430. 1999.

OLIVEIRA, V.N.M., SANTOS, A.M.T, VALE, M.M.H., et al., Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from Southeastern Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, v.10, 2013.

RODRIGUES, P.S.C., Perfil da Comunidade microbiana e Distribuição de Nutrientes ao Longo do Estuário do Rio Cachoeira(Ilhéus, BA)..2009, 51f.(Dissertação em Ecologia). Universidade Estadual de Santa Cruz.

SANTOS, T.M.A. Diversidade genética de bactérias endofíticas associadas a frutos de café (*Coffea arabica*). 2008.127f. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SCHWAB, C., GANZLE, M., Comparative analysis of fecal microbiota and intestinal microbial metabolic activity in captive polar bears. *Can. J. Microbiol.* v. 57, p. 177–185, 2011

SOFIA H. S., SUZUKI, K. M., SUZUKI. Comunidades de Machos de Abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em Fragmentos Florestais no Sul do Brasil *Neotropical Entomology*, v.33(6), p.693-702, 2004.

SUCHODOLSKI, J. S., COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM: Microbes and gastrointestinal health of. *J. Anim. Sci.*, v.89, p. 1520-1530, 2010.

VANHOUTTE, T., HUYS, G., BRANDT, E., et al., Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation, *FEMS Microbiology Letters*, v.249, P. 65-71, 2005.