

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE CÁLCIO E VITAMINA K NA
DIETA DE POEDEIRAS NA FASE DE RECRIA E OS
EFEITOS SOBRE A FASE POSTURA

Autor: Cleverson de Souza
Orientador: Prof.^a Dr.^a Tatiana Carlesso dos Santos

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro-2014

INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE CÁLCIO E VITAMINA K NA
DIETA DE POEDEIRAS NA FASE DE RECRIA E OS
EFEITOS SOBRE A FASE POSTURA

Autor: Cleverson de Souza
Orientador: Prof.^a Dr.^a Tatiana Carlesso dos Santos

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

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro-2014

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

S729i

Souza, Cleverson de, 1990-

Influência dos níveis de cálcio e vitamina K na dieta de poedeiras na fase de recria e os efeitos sobre a fase postura / Cleverson de Souza. -- Maringá, 2014.
68 f. : il. (algumas color.).

Dissertação (mestrado em Zootecnia)--Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Zootecnia, 2014.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiana Carlesso dos Santos.

1. Galinhas poedeiras - Nutrição - Suplementos minerais e vitamínicos. 2. Aves domésticas - Nutrição. 3. Nutrição animal. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

CDD 23. ed. -636.508527
NBR/CIP - 12899 AACR/2



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

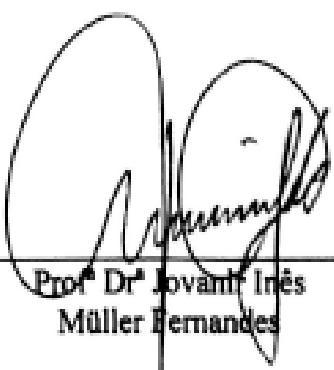
**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE CÁLCIO E VITAMINA K
NA DIETA DE POEDEIRAS NA FASE DE RECRIA
E SEUS EFEITOS NA FASE DE POSTURA**

Autor: Cleverson de Souza
Orientadora: Profª Drª Tatiana Carlesso dos Santos

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 28 de fevereiro de 2014.


Profª Drª Alice Eiko Murakami


Profª Drª Jovani Inês
Müller Fernandes


Profª Drª Tatiana Carlesso
dos Santos
(Orientadora)

“Todo homem é livre para subir tanto quanto puder ou quiser, porém, ele só sobe na medida em que utilizar sua mente. O trabalho braçal em si não vai além do momento. O homem que só realiza trabalho braçal consome o valor material equivalente ao da própria contribuição ao processo de produção e não gera mais nenhum valor, nem para si próprio nem para os outros. Mas o que produz uma ideia em qualquer campo no domínio da razão – o homem que descobre novos conhecimentos – será para sempre um benfeitor da humanidade”

Ayn Rand

(A Revolta de Atlas)

A Deus....

Aos meus pais,

Pedro de Souza e Lidia de Souza,

pelo amor, incentivo, paciência, carinho,

e por acreditarem em mim, sempre.

Meu eterno obrigado.

Ao meu irmão,

Cleison de Souza

pelo amor, carinho,

amizade e apoio.

À minha namorada,

Flavia Galvan Tedesco,

pelo amor, incentivo, ajuda,

amizade e apoio incondicional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a razão da minha existência, me confortando nos momentos difíceis e por todas as bênçãos a mim concedidas.

Aos meus pais, Pedro e Lidia, pelo exemplo de superação, esforço e honestidade que me transmitiram ao longo da minha jornada, por me propiciarem sempre o que me faria bem, me dando amor e compreensão, e me amparando nos momentos difíceis, meu muito obrigado.

Ao meu irmão, Cleison, pelo apoio, confiança e amizade.

A minha namorada, Flavia, que me apoiou em minhas decisões, e sempre esteve ao meu lado nos momentos difíceis, me apoiando, com amor e carinho, obrigado.

Aos meus amigos Fabiana e seu esposo Fábio, que me ampararam nos momentos de mudança, me aconselharam e me ajudaram incondicionalmente quando precisei, obrigado.

Aos meus amigos, Yuri De Gennaro Jaruche, Leonardo Zanetti, por momentos de conversa, companheirismo e ajuda mútua, meu obrigado.

À Universidade Estadual de Maringá, pela possibilidade de realização do curso de Mestrado em Zootecnia.

À professora Tatiana Carlesso dos Santos, pela orientação, apoio e conhecimentos transmitidos.

À professora Alice Eiko Murakami, que possibilitou a execução do trabalho, se mostrando sempre acessível para sanar dúvidas, transmitindo o seu conhecimento e auxiliando sempre que necessário.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, pelo conhecimento e profissionalismo transmitidos.

Aos colegas do grupo de pesquisa: Janaína Furlanetto de Mello, Denner Casale Ferreira, Rodrigo Palhano, Rodrigo Andrade, Carlos Eduardo Lino Pinto, Bruna Bronharo, Izabele Naemi Kaneco e Leonardo Malavazi, pela ajuda na execução do trabalho! Sem vocês, não teria conseguido.

Aos alunos do grupo de pesquisa da professora Alice, em especial, a Guilherme Nascimento, Mayra Dias Vargas, Cristiano da Cruz, meu muito obrigado pelo aprendizado a mim repassado.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, pelo auxílio durante a execução do trabalho, em especial, ao Sr. Mauro e ao Sr. Valentim.

Aos funcionários do LANA, Sr. Augusto e Sra. Creusa, que me auxiliaram nas análises laboratoriais.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

Enfim, agradeço a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

A TODOS, MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

BIOGRAFIA

CLEVERSON DE SOUZA, filho de Pedro de Souza e Lidia de Souza, nasceu em Enéas Marques, Paraná, no dia 21 de março de 1990.

Em janeiro de 2012, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV).

Em março de 2012, matriculou-se no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de nutrição de não-ruminantes.

No mês de fevereiro de 2014, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
I- INTRODUÇÃO	1
1.1 Estrutura e crescimento do tecido ósseo	3
1.2 Cálcio na alimentação de galinhas poedeiras	6
1.3 Vitamina K	10
1.4 Referências	13
II- OBJETIVOS GERAIS	17
2.1 Objetivos específicos:	17
III- Efeito dos níveis dietéticos de cálcio e vitamina k na qualidade óssea e perfil sérico de frangas na fase de recria (13-18) semanas	18
Resumo	18
Abstract	19
Material e métodos	21
Resultados e discussão	26
Conclusões	33
Referências	33
IV- Níveis dietéticos de cálcio e vitamina k na fase de recria, sobre o desempenho, o perfil sérico e a qualidade óssea de poedeiras em postura até 32 semanas	36
Resumo	36

Abstract.....	37
Introdução	38
Material e métodos	39
Resultados e discussão.....	45
Conclusão	51
Referências	51
V- CONSIDERAÇÕES FINAIS	53

LISTA DE TABELAS

	Página
III-Efeito dos níveis dietéticos de cálcio e vitamina k na qualidade óssea e perfil sérico de poedeiras na fase de recria (13-18) semanas.	
Tabela 1: Composição percentual e calculada da ração experimental.	22
Tabela 2: Análise dos níveis séricos de albumina (A), proteínas totais (PT), Ca total (CT), Ca iônico (CI), fosfatase alcalina (FA) e fósforo total (P) em frangas com 18 semanas de idade alimentadas com níveis de cálcio e vitamina K.	27
Tabela 3: Desdobramento da interação para cálcio total (mg/dL).	27
Tabela 4: Análise da qualidade óssea da tíbia as 18 semanas em frangas alimentadas com níveis de cálcio e vitamina K na fase de recria.	30
Tabela 5: Desdobramento das variáveis IS, CaT (%) e OM (%) em frangas com 18 semanas.	31
IV- Níveis dietéticos de cálcio e vitamina k na fase de recria, sobre o desempenho, o perfil sérico e a qualidade óssea de poedeiras em postura até 32 semanas.	
Tabela 6: Composição percentual e calculada da ração experimental durante a recria (13 a 18 sem) e de postura (20 a 32 sem).	40
Tabela 7: Desempenho produtivo de poedeiras entre 20 e 32 semanas de idade, suplementadas com cálcio e vitamina K na fase de recria.	46
Tabela 8: Análise das variáveis sanguíneas de poedeiras com 32 semanas, coletadas as 08h00, após a postura.	47
Tabela 9: Análise das variáveis de soro sanguíneo de poedeiras com 32 semanas, coletado as 16h00.	48
Tabela 10: Análise das variáveis ósseas de aves com 32 semanas de idade, suplementadas com cálcio e vitamina K durante a fase recria.	49

Tabela 11: Desdobramento da interação entre cálcio e vitamina K para porcentagem de osso medular da tíbia de poedeiras com 32 semanas.	50
--	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
III-Efeito dos níveis dietéticos de cálcio e vitamina k na qualidade óssea e perfil sérico de poedeiras na fase de recria (13-18) semanas.	
Figura 1: A) Fotografia de corte histológico da tíbia de frangas com 18 semanas em que a área de osso medular (osso) é distinta da área de medula óssea (med). HE, Barra 200 µm. B) Imagem binária da fotografia a esquerda obtida no programa Image J para cálculo da percentagem de área (área em preto = osso medular).	25
Figura 2: Comportamento da variável CT, em relação aos níveis de vitamina K dentro do nível de cálcio de 1,4%.....	28
Figura 3: Efeito dos níveis de vitamina K dentro do nível 1,4% de cálcio, para as variáveis IS, CaT e OM, de frangas com 18 semanas de idade.....	31
IV- Níveis dietéticos de cálcio e vitamina k na fase de recria, sobre o desempenho, o perfil sérico e a qualidade óssea de poedeiras em postura até 32 semanas.	
Figura 4: A) Fotografia de corte histológico da tíbia de poedeiras com 32 semanas em que a área de osso medular (osso) é distinta da área de medula óssea (med). HE, Barra 100 µm. B) Imagem binária da fotografia a esquerda obtida no programa Image J para cálculo da percentagem de área. Área (área em preto = osso medular).....	43

RESUMO

A suplementação dietética de cálcio (Ca) e de vitamina K foi estudada em poedeiras na fase de recria. O efeito dessa suplementação foi avaliado no perfil sérico e na qualidade óssea das aves com 18 semanas e, posteriormente, o efeito residual foi avaliado no perfil sérico, na qualidade óssea e no desempenho produtivo nas aves com 32 semanas de idade, no período de postura. Desta forma, dois experimentos foram realizados utilizando-se dois níveis de Ca (0,8 e 1,4%) e cinco níveis de vitamina K (0, 2, 8, 16, 32 mg/Kg), na dieta de aves poedeiras da linhagem Hy-Line. No Experimento I, foram utilizadas 120 aves, com idade de 13 semanas, distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x5), dois níveis de Ca e cinco níveis de vitamina K, totalizando dez tratamentos, quatro repetições e 3 aves por unidade experimental. As aves foram alojadas em gaiolas galvanizadas, com alimento e água à vontade e as dietas experimentais foram fornecidas de treze a dezoito semanas (recria). No Experimento I, foi observada interação entre os níveis de Ca e de vitamina K para o Ca total no sangue, o índice de Seedor, o Ca nos ossos e no osso medular. No nível 1,4% de Ca, as variáveis Ca total no sangue, Índice de Seedor, Ca nos ossos e o osso medular apresentaram comportamento quadrático, ($P < 0,05$), em relação aos níveis de vitamina K. No nível 0,8% Ca, não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) para a suplementação de vitamina K. Já para 1,4% de Ca, os maiores valores para Ca total no sangue, índice de Seedor, Ca nos ossos e osso medular foram obtidos com a suplementação de 17,86; 14,58; 14,48 e 16,80 mg/Kg de vitamina K, respectivamente. No Experimento II, foram utilizadas 80 aves com 20 semanas, as quais foram alimentadas durante a fase de recria (13-18 semanas) com dois níveis de Ca (0,8 e 1,4%) e cinco níveis de vitamina K (0, 2, 8, 16, 32 mg/Kg), totalizando dez tratamentos, quatro repetições e duas aves por unidade experimental. As aves receberam ração

comercial para o período. Durante 3 ciclos de 28 dias, foram coletados dados de produção de ovos e consumo de ração. Nas 32 semanas, o perfil sérico foi analisado às 08h00 e às 16h00, as aves foram abatidas e os ossos colhidos para análises. Nas variáveis sanguíneas e de produção, não foram observados efeitos dos tratamentos da fase de recria ($P > 0,05$). Foi observado efeito dos tratamentos sobre a % de osso medular ($P < 0,05$), quando as aves foram alimentadas com dieta contendo 1,4% de Ca. Para outras variáveis de qualidade óssea, não foram observados efeitos significativos. A suplementação com vitamina K de uma ração com 1,4% de Ca na fase de recria permitiu um incremento na área de osso medular que se mantém durante a fase de produção analisada.

Palavras-chave: poedeiras, cálcio, sangue, osso medular,

ABSTRACT

Dietary supplementation of calcium (Ca) and vitamin K was studied in laying hens in the laying period. The effect of supplementation was evaluated in serum profile and bone quality of the birds at 18 weeks and later, the residual effect was evaluated in serum profile, bone quality and productive performance in birds at 32 weeks of age, during laying period. Thus, two experiments were conducted using two levels of Ca (0.8 and 1.4 %) and five levels of vitamin K (0, 2, 8, 16, 32 mg / kg) in the diet of Hy - Line laying hens. In Experiment I, 120 birds at 13 weeks of age were used and distributed in a completely randomized design, in a factorial arrangement (2x5), two levels of Ca and five levels of vitamin K, totaling ten treatments, four replicates and 3 birds per experimental unit. The birds were housed in galvanized cages with food and water at will and the experimental diets were provided from thirteen to eighteen weeks (laying period). In Experiment I, interaction between the levels of Ca and vitamin K to the total Ca in the blood, Seedor index, Ca in the bone and in the bone marrow was observed. At the level of 1.4 % of Ca, the total Ca variables in the blood, Seedor index, Ca in the bone and in the bone marrow showed a quadratic response ($P < 0.05$), compared to the levels of vitamin K. At the level of 0.8% of Ca, no differences ($P > 0.05$) were found for vitamin K supplementation. As for the level of 1.4 % of Ca, the highest values of total Ca in the blood, Seedor index, Ca in the bone and in the bone marrow were obtained with the supplementation of 17.86; 14.58; 14.48 and 16.80 mg / kg of vitamin K, respectively. In Experiment II, 80 birds at 20 weeks of age were used and fed during the laying period (13-18 weeks) with two levels of Ca (0.8 and 1.4 %) and five levels of vitamin K (0 were used, 2, 8, 16, 32 mg / kg), totaling ten treatments, four replicates and two birds per experimental unit. The birds received commercial feed for the period. For 3 cycles of 28 days, data on egg production and feed intake were collected. At 32

weeks, the serum profile was analyzed at 08h00 and at 16h00, the birds were slaughtered and the bones collected for analysis. In the blood and production variables effects of the treatment were not observed in the laying period ($P > 0.05$). Effect of treatments on the % of medullar bone ($P < 0.05$) was observed when birds were fed diets containing 1.4 % of Ca, for other bone quality variables, no significant effects were observed. The supplementation of a diet with vitamin K with 1.4 % of Ca in the laying period allowed an increase in the area of medullary bone that keeps during the production phase that was analyzed.

Key words: laying, calcium, blood, bones

I- INTRODUÇÃO

O mercado de postura no Brasil tem apresentado um crescimento considerável. Somente no ano de 2012, cerca de 32 milhões de toneladas de ovos foram produzidos, sendo que somente 1 % foi exportado para África, Oriente Médio, Ásia, América, União Europeia e Europa, maiores importadores, somando 26,8 mil toneladas, representando um aumento de 61,2% em relação ao ano anterior (UBABEF, 2013). Esse aumento no consumo de ovos demanda por estudos que visem melhorar o desempenho produtivo das aves de postura comerciais.

A intensa pressão de seleção para características produtivas, como taxa de crescimento em frangos e produção de ovos em poedeiras, desencadeia uma demanda crescente por estudos sobre a integridade do sistema esquelético dessas aves (Thorp, 1994). Não obstante, é notável a sensibilidade que as galinhas poedeiras modernas apresentam às mudanças nos níveis nutricionais da dieta, possibilitando com isso melhorias na produção de ovos, redução da conversão alimentar, redução da percentagem de ovos defeituosos e diminuição dos problemas ósseos que as mesmas enfrentam (Costa et al., 2008).

Constantemente, as melhorias visadas são iguais em um ponto, que é a qualidade óssea. Os ossos apresentam papel essencial na criação das aves, e, dentre as funções mais óbvias, destacam-se a sustentação da massa corporal, proteção dos órgãos internos e locais de fixação para a musculatura, e outros menos óbvios. Porém, de igual importância, está o fornecimento do cálcio (Ca) para a formação da casca do ovo e para a manutenção da homeostase durante uma deficiência de curto ou longo prazo de Ca circulante (Korver et al., 2004; Bolukbasi et al., 2005).

A estrutura esquelética de uma galinha poedeira tem seu desenvolvimento completo durante o período de criação. Esse desenvolvimento é baseado no crescimento

longitudinal dos ossos longos do esqueleto apendicular, que se dá pela ossificação endocondral (Whitehead, 2004), sendo que os fatores nutricionais possuem amplo efeito sobre o desenvolvimento ósseo (Fleming et al., 2003).

No aspecto nutritivo, a dieta é importante para a geração e manutenção do sistema ósseo. Minerais como Ca e fósforo (P) e vitaminas, como D e K, são fatores importantes nesses processos. Dietas deficientes, principalmente em Ca, são o principal fator desencadeador de fraturas ósseas em aves de postura (Clark et al., 2008).

O Ca é um macro elemento essencial para garantir a qualidade óssea e produção de ovos com casca de qualidade e, semelhante a outros nutrientes, deve ser fornecido em níveis adequados e de forma equilibrada nas rações (Rodrigues et al., 2013). Além do fornecimento de níveis incorretos de Ca na dieta, o antagonismo com outros nutrientes da dieta, como fósforo e energia, podem interferir na disponibilidade e absorção do mesmo.

No tocante ao nível energético, a energia adicional fornecida sob forma de gordura pode aumentar o Ca renal e a excreção de fósforo, diminuindo a absorção de Ca e fósforo e induzindo a deficiência de ambos, consequentemente, prejudicando a densidade, a força e a massa do sistema ósseo (Jiang et al., 2013).

Indiscutivelmente, o Ca e a vitamina D são os principais nutrientes utilizados em prol da qualidade óssea, tanto para humanos quanto para animais. No entanto, nos últimos anos o interesse pela vitamina K tem aumentado. Embora ela seja mais conhecida por sua participação na coagulação do sangue essa vitamina apresenta um papel importante no metabolismo ósseo (Hamidi et al., 2013).

A vitamina K atua como um cofator pós-traducional para γ -carboxilação de proteínas dependentes de vitamina K, incluindo a osteocalcina, que é a proteína relacionada à formação óssea. A biossíntese da osteocalcina é regulada por hormônios e por fatores de crescimento. No entanto, a vitamina K tem influência sobre o grau de carboxilação da osteocalcina (Gundberg et al., 2012).

Durante o início da fase de postura, ocorre um balanço negativo de Ca, sendo que a suplementação de vitamina K pode contribuir para o aumento da osteocalcina carboxilada, que se liga ao Ca a partir da matriz óssea. Este mecanismo pode propiciar uma melhor utilização do Ca das dietas, sendo que o Ca em excesso pode desencadear uma redução na biodisponibilidade de outros minerais como fósforo, magnésio, entre outros, além de tornar a dieta menos palatável (Fernandes et al., 2009).

O Ca é de suma importância para os ossos. No entanto, para que o mesmo seja fixado, é necessário que ocorra o processo de carboxilação dos resíduos de ácido glutâmico, durante um processo de pós-tradução. Esse processo transforma as proteínas zimogênicas dependentes de vitamina K em proteínas fixadoras de cálcio (Macari et al., 2002).

Estudos em poedeiras demonstraram que a suplementação da dieta com vitamina K propiciou um aumento significativo do volume de osso esponjoso nos tarso e metatarsos proximais. Esse fato foi associado ao tratamento com vitamina K ter prolongado o período de formação estrutural do osso, ou inibido a perda de ossos esponjosos durante o início da postura em aves jovens (Fleming et al., 1998).

A combinação de vitamina K3 e calcário, em forma de partículas e fluoreto suplementar, propiciou um aumento na densidade óssea da tíbia, úmero e quilha de poedeiras com setenta semanas de idade. Essa melhora na densidade da tíbia e do úmero está associada a uma maior espessura do osso cortical entre 25 e 70 semanas. O tratamento resultou também em um maior acúmulo de osso medular durante o período de postura. Este osso medular extra propiciou um efeito protetor sobre o osso cortical, diminuindo, assim, a reabsorção das superfícies do osso cortical exposto à ação dos osteoclastos, propiciando uma melhor qualidade óssea e resistência final da postura (Fleming et al., 2003).

1.1 Estrutura e crescimento do tecido ósseo

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo, que apresenta muitas funções no organismo animal: auxilia na manutenção da homeostase, confere ao corpo certa rigidez e ao mesmo tempo permite flexibilidade, tolerando o crescimento, fornecendo a possibilidade da locomoção, proteção dos órgãos, armazenamento de certa quantidade de energia, minerais e elementos-chave do sistema imune (Lawrence e Fowler, 2002).

Segundo Pizauro Junior et al. (2002), o tecido ósseo é constituído de aproximadamente 70% de minerais, 22% de proteína e 8% de água. Sua constituição é diretamente influenciada por fatores físicos, nutricionais e fisiológicos. O mesmo é composto de uma fase extracelular, que é formada, mantida e remodelada por três tipos de células: osteoblastos, osteócito e osteoclastos. Esses elementos são responsáveis pela síntese da matriz óssea e mineralização, determinantes para os fatores químicos, geométricos e de resistência óssea (Rath et al., 2000).

Os osteoblastos são as células que formam o tecido ósseo e tem sua origem nas células tronco mesenquimais. Eles têm por função a síntese e secreção da matriz orgânica contendo colágeno tipo I, além da síntese de várias proteínas, como a fosfatase alcalina e a osteocalcina. Eles também produzem vários fatores regulatórios, tais como prostaglandinas, citosinas e fatores de crescimento, que estimulam a formação e a reabsorção óssea (Liu et al., 2004).

O osteócito, por sua vez, é um osteoblasto maduro aprisionado dentro da matriz óssea. O mesmo atua na manutenção da matriz, pois apresenta a capacidade de sintetizar e de reabsorver a matriz óssea em uma extensão limitada. Cada osteócito ocupa um espaço dentro da matriz, da qual partem pequenos canais que estabelecem contato com as células adjacentes (Bilezikian et al., 2002).

Outra célula importante é o osteoclasto, que durante o crescimento do esqueleto, reabsorve a cartilagem calcificada e modelam o osso em crescimento. Já no osso adulto, essas células são responsáveis pela reabsorção e remodelação óssea. Quando necessário, os osteoblastos atuam na homeostase do Ca via aumento da reabsorção óssea. Durante a remodelação óssea normal, a formação óssea osteoblástica ocorre de maneira precisa e quantitativa em relação à reabsorção óssea osteoclástica, sendo que a formação do osso e a reabsorção ocorrem de maneira equivalente (Bilezikian et al., 2002).

O tecido ósseo é dinâmico e, constantemente, sofre remodelação, independentemente de seu crescimento e modelagem estarem concluídos. A remodelação óssea é um processo de acoplamento, onde existe a remoção localizada (reabsorção) e substituição por osso recém-formado. Esse processo é complexo e exige a interação entre células de fenótipos diferentes, reguladas por uma série de fatores bioquímicos e mecânicos (Hill, 1998).

Os fatores de crescimento bem como hormônios sistêmicos são fatores envolvidos com as células osteoblásticas e células endoteliais, apresentam efeitos sobre as funções endoteliais e funções osteoblásticas. Esses fatores agem através da ativação de receptores específicos, que por sua vez atuam estimulando a expressão de outras proteínas depois da ativação das vias de sinalização intracelular, fornecendo, assim, evidências da comunicação entre células endoteliais e osteoblásticas (Bai et al., 2013).

O crescimento do tecido ósseo pode sofrer a influência de fatores internos e externos, como alimentação e genética, afetando diretamente o crescimento e desenvolvimento normal do tecido (Cook, 2000). O processo de crescimento de ossos se baseia no crescimento da placa epifisial, onde os condrócitos em repouso com

capacidade fibroblástica na camada germinativa se diferenciam em condrócitos proliferativos. Estas células multiplicam-se para formar colunas de células achatadas estreitamente embaladas no interior da matriz extracelular, secretadas pelos condrócitos, que contém um elevado teor de colágeno tipo II (Whitehead, 2004).

Durante a maturidade esquelética, dois tipos de estruturas ósseas são encontrados, uma delas é compacta e rígida conhecida como osso cortical, que se localiza ao redor das cavidades medulares. O osso cortical é o osso estrutural, constituindo um reservatório mais estável de Ca, sendo o osso com maior densidade apresentando uma porosidade entre 5 e 10 %. Encontra-se na camada externa aos ossos esponjosos, nos eixos dos ossos longos, no final das articulações e nas vértebras (Whitehead e Fleming, 2000). A outra forma são os ossos esponjosos ou trabecular, constituído de uma rede de lâminas ósseas entrelaçadas que deixam pequenos espaços ocupados pela medula óssea, e são encontrados na maioria dos ossos planos e nas extremidades dos ossos longos (Lawrence e Fowler, 2002).

As aves e os répteis se diferem das outras classes de vertebrados pela sua capacidade de produzir ovos com casca calcificada. Em aves e crocodilianos, o desenvolvimento maciço das cavidades endosteal dos ossos longos fornece um reservatório de Ca para a formação da casca do ovo (Dacke e Arkle, 1993). Nesses animais, ocorre uma mudança nos osteoblastos para a produção do osso cortical lamelar e a produção de um tecido ósseo chamado osso medular. Este tipo de osso tem por função servir de fonte lábil de Ca para formação da casca do ovo.

O osso medular é encontrado em espículas dentro da cavidade medular, especialmente nos ossos longos. Nas aves, especialmente em galinhas poedeiras, o esqueleto tem seu desenvolvimento completo durante o período de criação, e esse desenvolvimento é baseado no crescimento longitudinal dos ossos longos do esqueleto apendicular, que se dá pela ossificação endocondral (Whitehead, 2004).

Embora o osso medular não apresente regularidade na formação das fibras e está alocado em espículas, o mesmo apresenta função estrutural mantendo a conectividade trabecular e aumentando a resistência a fraturas (Fleming et al., 1998). O osso trabecular por sua vez, consiste em um emaranhado de fibras de colágeno irregulares. Conforme o osso vai crescendo, por proliferação dos condrócitos no topo do disco de crescimento, seguido por hipertrofia e mineralização da parte posterior, a rede trabecular é largamente reabsorvida, para formar a cavidade medular (Whitehead, 2004).

O tecido medular ósseo encontrado nos ossos longos em aves fêmeas apresenta uma resposta rápida ao nível de estrogênio circulante, sugerindo que os osteoblastos nesses ossos são altamente sensíveis a esse hormônio (Hiyama et al., 2009). Nas fêmeas, a formação do osso medular é estimulada pela ação sinérgica dos androgênios e estrogênios, que é acompanhada pela maturação dos folículos ovarianos. Já nos machos, a formação desse tecido ósseo pode ser estimulado via administração destes hormônios (Miller, 1978; Dacke e Arkle, 1993).

Esse tipo ósseo possui grande número de osteoclastos em sua superfície. Através da atividade osteoclástica nesse osso, tem-se o fornecimento de cerca de 40 % do Ca da casca. Seu metabolismo pode ser de 10 a 15 vezes mais rápido que o osso cortical e seu volume total não muda durante o ciclo, apenas o grau de calcificação (Dacke et al., 1993).

Em dietas de fêmeas poedeiras, que contenham níveis normais de Ca, ocorre um aumento da atividade osteoclástica no osso medular, suprimindo a necessidade deste mineral para formação da casca do ovo. No entanto, quando ocorre a falta do Ca na ração, o organismo responde através da retirada de Ca do osso cortical (Zallone e Mueller, 1969).

Almeida Paz et al. (2009), em poedeiras no período de 15 a 40 semanas, encontraram comportamento análogo entre as características de qualidade óssea, independente do tratamento utilizado, níveis adequados (3,8%) e baixos (1,8%) de Ca, ressaltando que as aves mobilizam constantemente minerais do sistema ósseo para formação da casca dos ovos e esse processo se torna mais intenso quando a dieta fornecida apresenta deficiência de Ca.

O intenso metabolismo de reabsorção óssea, principalmente no início de postura, é responsável por mortalidade significativa neste período e a má formação óssea na recria parece ser um fator que está intimamente ligado a essas perdas (Rath et al., 2000; Whitehead et al., 2004).

1.2 Cálcio na alimentação de galinhas poedeiras

Dentre os elementos que constituem a biosfera, o Ca é o quinto em abundância, ficando atrás do ferro, silício, oxigênio e alumínio. Oposto ao silício e alumínio que são elementos insolúveis, os sais de Ca exibem uma solubilidade intermediária, que confere a capacidade de estar presente nas soluções onde a vida evoluiu, além do

desenvolvimento de órgãos sólidos e rígidos que ajudaram nesta evolução (Bilezikian et al., 2002).

O Ca é o mineral mais abundante no organismo, sendo que 99% se encontra no esqueleto, fornecendo uma estrutura forte para o apoio dos músculos, proteção dos órgãos e tecidos mais delicados, incluindo a medula óssea. No entanto, ainda permite movimentos e o crescimento (Suttle, 2010; Datta e Schwartz, 2013). O Ca pode atuar como cofator de reações enzimáticas, participar do metabolismo do glicogênio, da síntese de proteínas e ácidos graxos, da formação de ATP, contribuir na regulação das contrações musculares e desempenhar papel crucial na formação das estruturas ósseas (Falguera et al., 2010).

No plasma sanguíneo, a concentração de Ca é mantida dentro de uma estreita faixa de variação, entre 5-10%. Não obstante, os grandes movimentos de Ca através do intestino, osso, rim e outros tecidos, são necessários para manutenção da homeostase. Para isso, o organismo utiliza alguns hormônios, entre eles 1,25- dihidroxivitamina D, calcitonina e o hormônio paratireóideo (PTH) (Kaneko et al., 1997; Mundy e Guise, 1999).

O PTH encontra-se pré-formado nas glândulas da paratireóide. Essas glândulas são capazes de responder rapidamente a ínfimas alterações na concentração de Ca, através do rápido aumento da taxa de secreção hormonal e da redução da taxa de síntese hormonal, tendo como *feedback* de controle o aumento dos níveis de íons de Ca circulante (Kaneko et al., 1997; Bar, 2008; Suttle, 2010). Além da ação catabólica sobre o tecido ósseo, o PTH pode promover tanto a formação quanto a reabsorção óssea. Evidências sugerem que o efeito anabólico do PTH não depende exclusivamente de sua ação sobre os osteoblastos e precursores, mas, necessitam da participação de fatores de crescimento, envolvendo o aumento dos precursores dos osteoblastos, a proliferação e a ação antiapoptótica de osteoblastos (De-Paula, 2009).

Em aves e mamíferos, os ossos atuam como um reservatório de minerais, em especial Ca e fósforo, que podem ser utilizados quando as fontes alimentares são inadequadas às necessidades do organismo. Em especial nas aves, as reservas ósseas são importantes durante o período de postura e formação da casca do ovo, sendo o Ca o mineral constituinte mais importante na determinação da qualidade da casca do ovo (Taylor e Moore, 1954; Taylor, 1970; Kadam et al., 2006).

A absorção de Ca ocorre ao longo do intestino delgado, principalmente no duodeno e jejuno (Coon et al., 2002; Macari et al., 2002). Em galinhas poedeiras, a absorção é

observada também na parte inferior do trato gastrointestinal e a secreção e ação do Ca é dependente da etapa de formação da casca do ovo (Hurwitz e Bar, 1965; Coon et al., 2002).

Na indústria de ovos comerciais, a casca do ovo fornece uma importante embalagem para o alimento. Para o embrião, fornece proteção contra danos mecânicos e contra contaminação externas e na formação da casca do ovo o Ca é de suma importância (Hunton, 2005).

Para galinhas, o Ca é um mineral crucial durante o período de postura e constitui aproximadamente 40% do peso da casca de ovo (Bolukbasi et al., 2005). É principalmente armazenado sob a forma de fosfato de Ca no esqueleto (Whitehead e Fleming, 2000) e na forma de Ca carbonato na casca de ovo (Bolukbasi et al., 2005; Bar, 2009).

A utilização do Ca pelo organismo depende principalmente da idade e da espécie. Nas aves em crescimento, esse mineral é utilizado na formação óssea, enquanto, nas aves em fase de produção, é utilizado na formação da casca do ovo, cujo peso médio é de 5 a 6 g, dos quais aproximadamente 2 g são apenas de Ca (Nunes et al., 2006).

Analisando níveis de energia e Ca na dieta de poedeiras com 19 semanas de idade, Jiang et al. (2013) observaram que dietas contendo alta e média energia acarretaram em maior deposição de gordura e efeitos negativos sobre a homeostase metabólica. Já níveis elevados de Ca na dieta, 2,62%; 3,7% e 4,4%, não influenciaram a deposição de gordura e foram benéficos para homeostase óssea. Quando a dieta apresentou-se deficitária em Ca, tanto a homeostase quanto a qualidade da casca do ovo foram comprometidas.

No tocante à fase de produção, melhores resultados são obtidos com a adição de 3,5% a 3,7% de Ca na dieta, melhorando, inclusive, a homeostase óssea (Safaa et al., 2008; Rodrigues et al., 2013; Jiang et al., 2013).

Durante a produção de ovos, mais precisamente quando ocorre a deposição da casca do ovo, a galinha poedeira apresenta o pico de consumo de Ca do organismo. Nesse período, é imprescindível que a ave tenha um aporte de Ca provindo da dieta e, para isso, é importante que haja disponibilidade do mineral. Essa disponibilidade também pode ser influenciada pelo tamanho da partícula da fonte de Ca (Witt e Kuleile, 2009).

Independentemente do tamanho da partícula, Saunders-Blades et al. (2009) não observaram variações na produção e na qualidade da casca dos ovos de galinhas. No

entanto, as aves que receberam tratamentos que continham partículas mistas foram capazes de manter a produção e a qualidade do ovo com menor aporte do Ca ósseo. Isso pode ajudar a galinha a reduzir a incidência de osteoporose, a chamada fadiga de gaiola, além de outros problemas ósseos.

Já Witt e Kuleile (2009) encontraram que o tamanho da partícula de calcário não apresentou efeito benéfico na produção de ovos e nem na qualidade dos ovos de poedeiras com idade maior que 54 semanas de postura, sugerindo que, independentemente do tamanho da partícula, o que importa são os valores de Ca dietético, que devem ser de 3,96 g/galinha/dia.

Com relação ao sistema de criação, aves criadas em gaiolas convencionais depositam menos Ca nos ossos que as aves alocadas em gaiolas enriquecidas. No entanto, o efeito dos níveis de Ca dietéticos são similares para ambas as formas de criação (Valkonen et al., 2010). Aves criadas em gaiolas enriquecidas apresentam também uma menor excreção de Ca e fósforo que as criadas convencionalmente. O mesmo pode ocorrer pelo fato de que ambientes comunitários influenciam positivamente na utilização do Ca e fósforo (Neijat et al., 2011).

Embora o Ca seja de suma importância para a produção de galinhas poedeiras e para a manutenção dos índices zootécnicos elevados, a utilização de níveis exacerbados deste mineral podem acarretar em problemas na produção, sendo que algumas desordens metabólicas podem estar associadas a altos níveis de Ca na dieta, como é o caso da alcalose metabólica em aves de postura (Guo et al., 2008).

Em estudos realizados em poedeiras de 39 a 50 e 60 a 76 semanas, não observaram efeitos dos níveis elevados de Ca sobre o consumo de ração (Costa et al., 2008; Cufadar et al., 2011). Cufadar et al. (2011) não observaram diferenças das concentrações de Ca sobre a força de quebra do ovo, porcentagem e espessura de casca e peso do ovo.

Como dito, o Ca apresenta grande importância para os ossos, mas para que o mesmo seja fixado, é necessário que ocorra o processo de carboxilação dos resíduos de ácido glutâmico, durante um processo de pós-tradução, e esse processo transforma as proteínas zimogênicas dependentes de vitamina K em proteínas fixadoras de Ca (Macari et al., 2002).

1.3 Vitamina K

A vitamina K tem um papel importante na saúde humana e animal, além de sua função mais aceita, que é a coagulação do sangue, a vitamina é essencial para a formação e mineralização óssea (Price et al., 1981). Alternativas foram testadas sobre alguns papéis que a vitamina K desempenha sobre a saúde do esqueleto, uma delas realizada com estudo *in vitro* indica que a K pode aumentar a mineralização óssea (Schoofs et al., 2004).

A vitamina K foi descoberta no ano de 1935 pelo bioquímico dinamarquês Henrik Dam, que estudou a deficiência alimentar em aves alimentadas com dietas livres de gordura e colesterol e apresentaram hemorragias intramusculares incontroláveis. Então, foi observada uma vitamina lipossolúvel diferente das já existentes A, D e E, que eram encontradas no fígado de suínos, sementes de cânhamo e em certos vegetais e cereais, e a ela deu o nome de Koagulations-Vitamin ou vitamina K (Dam, 1935; Gundberg, 2009).

A vitamina K é um micronutriente lipossolúvel, essencial na modificação química pós-traducional de um pequeno grupo de proteínas com propriedades de ligação ao Ca, conhecidas como proteínas dependentes de vitamina K ou Gla. As proteínas de coagulação dependentes da vitamina K são sintetizadas no fígado e compreendem fatores II, VII, IX e X, os quais tem função hemostática (Stenflo et al., 1974; Shearer, 1995; Klack e Carvalho, 2006). Gla é a definição usada para proteínas que desempenham papel importante em dois processos fisiológicos: coagulação sanguínea e metabolismo ósseo, sendo que a maior quantidade circulante está envolvida na coagulação sanguínea e são sintetizados pelos hepatócitos (Vermeer et al., 1995).

O fator que relaciona a vitamina K com o metabolismo ósseo é a osteocalcina. A mesma é produzida pelos osteoblastos durante o período de formação óssea e é a principal proteína não colagenosa na matriz extracelular do osso envolvida com a maturação óssea. Os processos de transcrição e tradução da osteocalcina são regulados pela vitamina D e sua capacidade de ligação com Ca. Porém, todo este processo é possível somente após a carboxilação de alguns resíduos específicos de ácido glutâmico e esse processo final é dependente da vitamina K (Shea et al., 2009).

A osteocalcina é sintetizada pelo osteoblasto na fase de formação do osso, durante o processo de mineralização, sendo essencial para a formação dos cristais de hidroxiapatita. Ela possui três resíduos de Gla nas posições 17, 21 e 24 e uma ponte de

dissulfeto, entre os resíduos 23 e 29, sua capacidade de ligação ao Ca e dependente da γ -carboxilação desses três resíduos, processo dependente da vitamina K (Lee et al., 2000; Hamidi et al., 2013).

Segundo Fleming et al. (2003), a vitamina K é um cofator que realiza a carboxilação residual do glutamyl durante a modificação pós tradução da osteocalcina, uma proteína associada especificamente com a formação do osso, e outras proteínas da matriz óssea. Atuando como cofator da gama carboxilase, ela converte o 3 ácido glutâmico e os resíduos de osteocalcina, para o ácido gama carboxiglutâmico (Gla), sendo essencial para a gama carboxilação dos resíduos de osteocalcina (Hauschka et al., 1975; Vermeer et al., 1995; Lee et al., 2000). Sem esta modificação, a osteocalcina não tem a integridade estrutural e nem a capacidade de se ligar à hidroxiapatita mineral. Essa reação de carboxilação é um processo intercelular pós traducional, de modo que uma vez secretada, a osteocalcina já não pode ser mais carboxilada (Iwamoto et al., 2009).

Durante o início da fase de postura, nas aves de produção, ocorre um balanço negativo de Ca, sendo que a suplementação de vitamina K pode contribuir para o aumento da osteocalcina carboxilada, que se liga ao Ca a partir da matriz óssea. Este mecanismo pode propiciar uma melhor utilização do Ca das dietas, que já apresentam um nível elevado de Ca, sendo que o Ca em excesso pode desencadear uma redução na biodisponibilidade de outros minerais como fósforo, magnésio, entre outros, além de tornar a dieta menos palatável (Fernandes et al., 2009).

Fleming et al. (1998) relataram que a suplementação da dieta com vitamina K propiciou um aumento significativo do volume de osso esponjoso nos tarso e metatarsos proximais, isso devido ao tratamento com vitamina K ter prolongado o período de formação estrutural do osso ou inibido a perda de ossos esponjosos durante o início da postura em aves jovens.

Embora a suplementação com vitamina K tenha apresentado evidências sobre a possível ligação com a formação óssea, Fleming et al. (2003) encontraram aumento do volume de ossos esponjosos em aves com 15 semanas de idade. Porém, a concentração de osteocalcina plasmática não sofreu influência da dieta suplementada com vitamina K, durante o período de criação, e durante a postura encontraram baixas concentrações de osteocalcina, o que indica alguma mudança no metabolismo da osteocalcina a nível molecular ou secretora.

Na postura comercial, é evidente a grande importância que o esqueleto exerce sobre o principal produto desta atividade, o ovo. A má formação ou problemas relacionados ao sistema esquelético acarretam problemas na casca do ovo, diminuição da produção, entre outros. Isto posto, é necessário que na fase de formação óssea, período de recria, as aves apresentem uma boa formação óssea, com relativo aumento do osso medular, que durante a postura servirá de fonte de Ca lábil para a casca do ovo.

1.4 Referências

- ALMEIDA PAZ, I.C.L.; MENDES, A.A.; BALOG, A.; et al. Efeito do cálcio na qualidade óssea e de ovos de poedeiras. *Arch. Zootec.* v.58, p.173–183, 2009.
- BAI, Y.; YIN, G.; HUANG, Z.; et al. Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering. *Int. Immunopharmacol.* v.16, p.214–23, 2013.
- BAR, A. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: mechanisms and regulation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* v.152, p.447–69, 2009.
- BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A.; et al. Calcium. Pages 1325–1337 in *Principles of Bone Biology*.
- BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A.; et al. Amylin and Calcitonin Gene-Related Peptide. Pages 641–654 in *Principles of Bone Biology*.
- BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A.; et al. Cells of Bone. Pages 109–126 in *Principles of Bone Biology*.
- BOLUKBASI, S.C.; CELEBI, S.; AND UTLU., N. The Effects of Calcium and Vitamin D3 in Diet on Plasma Calcium and Phosphorus, Eggshell Calcium and Phosphorus Levels of Laying Hens in Late Laying Production Period. *Int. J. Poult. Sci.* v.4, p.600–603, 2005.
- CLARK, W.D.; COX, W.R.; AND SILVERSIDES, F.G. Radiodensity in the central cavity of humeri in high-producing non-commercial laying hens. *Br. Poult. Sci.* v.48, p.647–50, 2007.
- CLARK, W.D.; COX, W.R.; AND SILVERSIDES, F.G. Bone fracture incidence in end-of-lay high-producing, noncommercial laying hens identified using radiographs. *Poult. Sci.* v.87, p.1964–70, 2008.
- COOK, M.E. Skeletal deformities and their causes: introduction. *Poult. Sci.* v.79, p.982–4, 2000.
- COON, C.; LESKE, K.; AND SEO, S. The availability of calcium and phosphorus in feedstuffs. Page 427 in *Poultry Feedstuffs: Supply, Composition, and Nutritive Value*. CABI.
- COSTA, C.H.R.; BARRETO, S.L. DE T.; MESQUITA FILHO, R.M. de; et al. Avaliação do desempenho e da qualidade dos ovos de codornas de corte de dois grupos genéticos. *Rev. Bras. Zootec.* v.37, p.1823–1828, 2008.
- CUFADAR, Y.; OLGUN, O.; AND YILDIZ, A Ö. The effect of dietary calcium concentration and particle size on performance, eggshell quality, bone mechanical properties and tibia mineral contents in moulted laying hens. *Br. Poult. Sci.* v.52, p.761–8, 2011.
- DACKE, C.G. *The Parathyroids, Calcitonin, and Vitamin D*. 2000.
- DACKE, C.; and Arkle, S. Medullary bone and avian calcium regulation. *J. Exp. Biol.* v.88, p.63–88, 1993.

- DAM, H. The antihemorrhagic vitamin of the chick. *Biochem. J.* v.84, p.5–12, 1935.
- DATTA, M.; AND SCHWARTZ, G.G. Calcium and vitamin D supplementation and loss of bone mineral density in women undergoing breast cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* v.88, p.613–24, 2013.
- DE-PAULA, F.J.A. A insuficiência óssea na doença renal crônica: papel do paratormônio. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* v.53, p.3–4, 2009.
- FALGUERA, V.; MENGUAL, A.; VICENTE, M.; et al. Effect of calcium pidolate on the rheological characteristics of jams and gelatins. *Food Res. Int.* v.43, p.882–885, 2010.
- FERNANDES, J.I.M.; MURAKAMI, A.E.; SCAPINELLO, C.; et al. Effect of vitamin K on bone integrity and eggshell quality of white hen at the final phase of the laying cycle. *Rev. Bras. Zootec.* v.38, p.488–492, 2009.
- FLEMING, R.H.; MCCORMACK, H. A; MCTEIR, L.; et al. Effects of dietary particulate limestone, vitamin K3 and fluoride and photostimulation on skeletal morphology and osteoporosis in laying hens. *Br. Poult. Sci.* v.44, p.683–9, 2003.
- GUNDBERG, C.M.; LIAN, J.B.; AND BOOTH, S.L. Vitamin K-dependent carboxylation of osteocalcin: friend or foe? *Adv. Nutr.* v.3, p.149–57, 2012.
- GUO, X.; HUANG, K.; CHEN, F.; et al. High dietary calcium causes metabolic alkalosis in egg-type pullets. *Poult. Sci.* v.87, p.1353–7, 2008.
- HAMIDI, M.S.; GAJIC-VELJANOSKI, O.; and Cheung, A.M. Vitamin k and bone health. *J. Clin. Densitom.* v.16, p.409–13, 2013.
- HAUSCHKA, P. V; LIAN, J.B.; AND GALLOP, P.M. Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* v.72, p.3925–9, 1975.
- HILL, P. Bone remodelling. *J. Orthod.* v.25, p.101–107, 1998.
- HIYAMA, S.; SUGIYAMA, T.; KUSUHARA, S.; et al. Evidence for the expression of estrogen receptors in osteogenic cells isolated from hen medullary bone. *Acta Histochem.* v.111, p.501–7, 2009.
- HUNTON, P. Research on eggshell structure and quality: an historical overview. *Rev. Bras. Ciência Avícola* v.7, p.67–71, 2005.
- HURWITZ, S.; AND BAR, A. Calcium Reserves in Bones of Laying Hens: Their Presence and Utilization. *Poult. Sci.* v.48, p.1391–1396, 1969.
- IWAMOTO, J.; SATO, Y.; TAKEDA, T.; et al. High-dose vitamin K supplementation reduces fracture incidence in postmenopausal women: a review of the literature. *Nutr. Res.* v.29, p.221–8, 2009.
- JIANG, S.; CUI, L.; SHI, C.; et al. Effects of dietary energy and calcium levels on performance, egg shell quality and bone metabolism in hens. *Vet. J.* v.198, p.252–8, 2013.
- KADAM, M.M.; MANDAL, A.B.; ELANGOVA, A. V.; ET AL. Response of Laying Japanese Quail to Dietary Calcium Levels at Two Levels of Energy. *J. Poult. Sci.* v.43, p.351–356, 2006.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L.; et al. Calcium-Regulating Hormones and Diseases of Abnormal Mineral (Calcium, Phosphorus, Magnesium) Metabolism. Pages 619–702 in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*.

KORVER, D.R.; SAUNDERS-BLADES, J.L.; AND NADEAU, K.L. Assessing bone mineral density in vivo: quantitative computed tomography. *Poult. Sci.* v.83, p.222–9, 2004.

LAWRENCE, T.L.J.; AND FOWLER, V.R. *Growth of Farm Animals*. 2nd ed. CABI.

LEE, A.J.; HODGES, S.; and Eastell, R. Measurement of osteocalcin. *Ann. Clin. Biochem.* v.37 (Pt 4), p.432–46, 2000.

LIU, H.K.; AND BACON, W.L. Effect of chronic progesterone injection on egg production in Japanese quail. *Poult. Sci.* v.83, p.2051–8, 2004.

MACARI, M.; FURLAM, R.L.; AND GONZALES, E. *Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte*. 2nd ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002.

MILLER, S.C. Rapid activation of the medullary bone osteoclast cell surface by parathyroid hormone. *J. Cell Biol.* v.76, p.615–8, 1978.

MUNDY, G.R.; AND GUISE, T. a. Hormonal control of calcium homeostasis. *Clin. Chem.* v.45, p.1347–52, 1999.

NEIJAT, M.; HOUSE, J.D.; GUENTER, W.; et al. Calcium and phosphorus dynamics in commercial laying hens housed in conventional or enriched cage systems. *Poult. Sci.* v.90, p.2383–96, 2011.

NUNES, R.V.; POZZA, P.C.; SCHERER, C.; et al. Efeito dos teores de cálcio para poedeiras semipesadas durante a fase de pré-postura e no início da postura. *Rev. Bras. Zootec.* v.35, p.2007–2012, 2006.

PIZAURO JUNIOR, J.; CIANCAGLINI, P.; AND MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. *Rev. Bras. Ciência Avícola* v.4, 2002.

PRICE, P.A. Role of vitamin-K-dependent proteins in bone metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* v.8, p.565–83, 1988.

RATH, N.C.; HUFF, G.R.; HUFF, W.E.; et al. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poult. Sci.* v.79, p.1024–32, 2000.

RODRIGUES, E.A.; OLIVEIRA, M.C. DE; CANCHERINI, L.C.; et al. Calcium in pre-laying and laying rations on the performance and quality of laying hens' eggshell. *Acta Sci. Anim. Sci.* v.35, p.153–157, 2013.

SAFAA, H.M.; SERRANO, M.P.; VALENCIA, D.G.; et al. Productive performance and egg quality of brown egg-laying hens in the late phase of production as influenced by level and source of calcium in the diet. *Poult. Sci.* v.87, p.2043–51, 2008.

SAUNDERS-BLADES, J.L.; MACISAAC, J.L.; KORVER, D.R.; et al. The effect of calcium source and particle size on the production performance and bone quality of laying hens. *Poult. Sci.* v.88, p.338–53, 2009.

SCHOOFS, M.W.C.J.; VAN DER KLIFT, M.; HOFMAN, A.; et al. ApoE gene polymorphisms, BMD, and fracture risk in elderly men and women: the Rotterdam study. *J. Bone Miner. Res.* v.19, p.1490–6, 2004.

SHEA, M.K.; GUNDBERG, C.M.; MEIGS, J.B.; et al. Gamma-carboxylation of osteocalcin and insulin resistance in older men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* v.90, p.1230–5, 2009.

SHEARER, M.J. Vitamin K. *Lancet* v.345, p.229–234, 1995.

STENFLO, J.; FERNLUND, P.; EGAN, W.; et al. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* v.71, p.2730–3, 1974.

SUTTLE, N.F. Mineral Nutrition of Livestock (Cabi). CABI Publishing.

TAYLOR, T. The role of the skeleton in egg-shell formation. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* v.10, p.83–91, 1970.

TAYLOR, T.G.; AND MOORE, J.H. Skeletal depletion in hens laying on a low-calcium diet. *Br. J. Nutr.* v.8, p.112–24, 1954.

THORP, B.H. Skeletal disorders in the fowl: a review. *Avian Pathol.* v.23, p.203–36, 1994.

UBABEF. Relatório Anual 2013. Disponível em :<
<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>>. Acessado em: 05 fev. 2014.

VALKONEN, E.; VENÄLÄINEN, E.; ROSSOW, L.; et al. Effects of calcium diet supplements on egg strength in conventional and furnished cages, and effects of 2 different nest floor materials. *Poult. Sci.* v.89, p.2307–16, 2010.

VERMEER, C.; JIE, K.S.; AND KNAPEN, M.H. Role of vitamin K in bone metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* v.15, p.1–22, 1995.

WHITEHEAD, C.C. Overview of bone biology in the egg-laying hen. *Poult. Sci.* v.83, p.193–9, 2004.

WHITEHEAD, C.C.; AND FLEMING, R.H. Osteoporosis in cage layers. *Poult. Sci.* v.79, p.1033–41, 2000.

WITT, F.; AND KULEILE, N. Effect of limestone particle size on egg production and eggshell quality of hens during late production. *South African J. ...* v.39, p.37–40, 2009.

ZALLONE, A Z.; AND MUELLER, W.J. Medullary bone of laying hens during calcium depletion and repletion. *Calcif. Tissue Res.* v.4, p.136–46, 1969.

II- OBJETIVOS GERAIS

Estudar o efeito da suplementação de vitamina K e de dois níveis de cálcio (Ca) na ração de frangas de postura comercial (13 a 18 semanas), no desenvolvimento ósseo e perfil sérico e a influência sobre a qualidade óssea, perfil sérico e desempenho produtivo na fase de postura (20-32 semanas).

2.1 Objetivos específicos:

Determinar a percentagem de Ca, fósforo e cinzas na tíbia em poedeiras alimentadas com níveis de Ca e vitamina K na fase de recria e produção.

Determinar a qualidade óssea em poedeiras com 18 e 32 semanas alimentadas com dietas contendo níveis de Ca e vitamina K;

Determinar os níveis séricos de Ca, fósforo, Ca iônico, fosfatase alcalina, proteínas totais e albumina na 18^a e na 32^a semana;

Analisar as variáveis produtivas (produção de ovos, consumo alimentar e conversão alimentar) do início da postura até a 32^o semanas em poedeiras que foram alimentadas com níveis de Ca e vitamina K na ração durante a fase de recria;

Inferir sobre o papel do Ca, da vitamina K e da interação entre ambos no desenvolvimento ósseo de poedeiras na fase de recria e posterior no período produtivo até 32 semanas.

III- Efeito dos níveis dietéticos de cálcio e vitamina k na qualidade óssea e perfil sérico de frangas na fase de recria (13-18) semanas.

Resumo - A suplementação dietética de cálcio (Ca) e de vitamina K foi estudada em poedeiras na fase de recria, (13-18 semanas). O efeito dessa suplementação foi avaliado sobre o perfil sérico e a qualidade óssea das aves. Foram utilizadas 120 frangas Hy-Line, com idade entre 13 e 18 semanas, distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x5), com dez tratamentos, quatro repetições e três aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram em dois níveis de Ca (0,8 e 1,4%) e cinco níveis de vitamina K (0, 2, 8, 16, 32 mg/Kg) na dieta. Não houve efeito dos tratamentos, ($P > 0,05$) nos níveis séricos de proteínas totais, albumina, fosfatase alcalina, fósforo e Ca iônico, no entanto, ocorreu interação ($P < 0,05$) entre Ca e vitamina K para o Ca total no sangue. No tocante à qualidade óssea, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para força de quebra, matéria seca, cinzas, fósforo, densidade óssea e relação Ca e fósforo no osso. As variáveis Ca sérico, %Ca na Tíbia, índice de Seedor e osso medular apresentaram efeito significativo ($P < 0,05$) da interação entre os níveis de Ca e vitamina K, com comportamento quadrático em relação aos níveis de vitamina K, quando o nível de Ca foi de 1,4% e maiores valores quando se forneceu 17,86; 14,48; 14,58 e 16,68 mg/Kg de vitamina K, respectivamente. Para os tratamentos com 0,8% Ca, a suplementação com vitamina K não apresentou efeito sobre as variáveis. A suplementação com vitamina K em uma dieta com 1,4% de Ca propiciou na 18^a semana melhoria nos níveis séricos de Ca e na qualidade óssea, refletida na área de osso medular da tíbia.

Palavras-Chave: tíbia, osso medular, fosfatase alcalina, postura

III-Effect of dietary levels of calcium and vitamin k on bone quality and serum profile of laying in the growing phase (13-18) weeks.

Abstract- Dietary supplementation of calcium (Ca) and vitamin K was studied in laying hens in the laying period (13-18 weeks), the effect of supplementation was evaluated on serum profile and bone quality of the birds. 120 Hy- Line layers, aged between 13 and 18 weeks were used and distributed in a completely randomized design, in a factorial arrangement (2x5), with ten treatments, four replicates and three birds per experimental unit. The treatments consisted of two levels of Ca (0.8 and 1.4%) and five levels of vitamin K (0, 2, 8, 16, 32 mg / kg) in the diet. There was no effect of treatments ($P > 0.05$) in serum level of total protein, albumin, alkaline phosphatase, phosphorus and ionic Ca, however, there was an interaction ($P < 0.05$) between Ca and vitamin K for total Ca in the blood. Regarding bone quality, no differences ($P > 0.05$) were observed for breaking strength, dry matter, ashes, phosphorus, bone density and Ca and phosphorus in bone. The variables serum Ca, Ca % in the tibia, Seedor index and bone marrow showed significant effect ($P < 0.05$) of the interaction between the levels of Ca and vitamin K, with a quadratic behavior in relation to the levels of vitamin K, when the Ca level was at 1.4% and higher values when 17.86 ; 14.48 ; 14.58 and 16.68 mg / kg of vitamin K were provided, respectively. For treatments with 0.8% of Ca, vitamin K supplementation had no effect on the variables .The supplementation with vitamin K in a diet with 1.4 % of Ca propitiated, at the 18th week, improvement in serum Ca and bone quality, reflected in the area of medullary bone of the tibia.

Key-Words: tibia, medullary bone, alkaline phosphatase, posture

Introdução

A melhoria na produtividade observada em galinhas poedeiras nos últimos anos, tornou as aves mais exigentes em ambiência, saúde e nutrição, sendo que, do ponto de vista nutricional, a exigência é baseada no aumento da produção e na qualidade dos ovos (Rodrigues et al., 2013). A descoberta de que as patologias ósseas relacionadas ao cálcio (Ca) afetam a produção e o bem estar das aves têm estimulado o interesse na biologia óssea das poedeiras, desencadeando uma crescente demanda por estudos do sistema esquelético dessas aves (Thorp, 1994; Whitehead, 2004).

Na nutrição de aves, os níveis ideais são atingidos quando se obtém o melhor desempenho produtivo, sendo estes ajustados para maximizar a produção de ovos ou carne (Fleming, 2008). Os recentes avanços nas áreas de nutrição, no melhoramento genético, em fatores de ambiência e de manejo, que elevaram a eficiência produtiva, levaram à necessidade de estudos periódicos relacionados a exigências nutricionais de Ca, devido ao papel crucial que o mesmo desempenha no desenvolvimento ósseo, durante a fase de crescimento da ave (Costa et al., 2008).

Atrelado aos estudos relacionados ao Ca, é importante a avaliação do comportamento de algumas vitaminas, relacionadas a proteínas Ca dependentes, como é o caso da vitamina K. Nas últimas décadas, o uso de suplementos nutricionais aumentou, sendo o Ca e a vitamina D os principais suplementos utilizados para saúde óssea. No entanto, tem ocorrido um aumento no interesse pela vitamina K, sendo que a mesma é mais conhecida por sua função na via de coagulação do sangue, mas também desempenha um papel no metabolismo ósseo (Hamidi et al., 2013).

A vitamina K apresenta-se como cofator enzimático de uma reação pós traducional, atuando na carboxilação da osteocalcina, aumentando indiretamente a atividade osteoblástica, sugerindo assim benefícios à formação óssea (Gundberg, 2009). Quando ocorre a deficiência de vitamina K, ocorre a elevação da produção de osteocalcina descarboxilada, que por sua vez é uma fraca ligante das hidroxapatitas de Ca, acarretando, assim, em deficiência da mineralização óssea (Price, 1988; Vermeer, 1990; Zhang et al., 2003). Além da elevação da osteocalcina descarboxilada, dietas deficientes em vitamina K, mas com níveis adequados de Ca, apresentam uma redução na concentração de osteocalcina carboxilada (Lavelle et al., 1994).

No período inicial de postura, a ave passa por um equilíbrio negativo de Ca, desta maneira, a suplementação com vitamina K pode contribuir para um aumento da osteocalcina carboxilada, que se ligará mais eficientemente ao Ca (Fernandes et al., 2009), diminuindo os efeitos nocivos deste período.

Nas aves, especialmente em galinhas poedeiras, o esqueleto tem seu desenvolvimento completo durante o período de recria (Whitehead, 2004) e a carboxilação da osteocalcina constitui-se em uma importante etapa da formação do tecido ósseo em poedeiras. Com base no exposto, objetivou-se avaliar o efeito da suplementação dietética de vitamina K em dois níveis de Ca na dieta de aves poedeiras, sobre os parâmetros ósseos, sanguíneos e de desempenho durante a fase de recria.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no setor de Bioclimatologia da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Foram utilizadas 120 poedeiras Hy-Line, na fase de recria (13 a 18 semanas), distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x5, totalizando 10 tratamentos, com 4 repetições e 3 aves por unidade experimental. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, sob o número de protocolo 116/2012.

Os tratamentos consistiam em dois níveis de Ca (0,8 e 1,4%), seguindo a recomendação de Rostagno et al. (2011) e o manual da linhagem Hy-Line W-36 de 2011, respectivamente, e cinco níveis de suplementação de vitamina K (0, 2, 8, 16, 32 mg/Kg) na dieta.

O período experimental foi de maio a junho de 2013. Ao início do período experimental, as aves foram uniformizadas por peso e passaram por um período de 7 dias de adaptação. O experimento foi desenvolvido na sala de Bioclimatologia com 9x5 m, feita de tijolos e com ar condicionado, não sofrendo a influência da luminosidade externa. As aves foram alocadas em gaiolas de arame galvanizado, com 60x40 cm cada, com 3 aves, bebedouro tipo *nipple* e comedouro tipo calha com ração e água *ad libitum*. Durante o período, as aves receberam 12h de luz artificial e permaneceram sob temperatura controlada (18°C a 23°C).

A ração basal experimental foi formulada de acordo com as exigências e a composição dos alimentos, segundo as recomendações de Rostagno et al. (2011). A

composição percentual e calculada da ração experimental encontra-se na Tab. 1, e, para fabricação da ração basal, foi utilizado premix sem vitamina K. Após a fabricação da ração basal, foram adicionados os níveis de vitamina k, tendo como fonte a menadiona (Vitamina K3) (Nucleopar, Mandaguari, PR) com 52% de vitamina K, nas proporções de 0% de inclusão; 2 mg/Kg; 8 mg/Kg; 16 mg/Kg; e 32 mg/Kg.

Tabela 1: Composição percentual e calculada da ração experimental.

Ingredientes (%)	0,8% Cálcio	1,4% Cálcio
Milho	74,05	73,51
Farelo de soja (45%)	15,64	16,44
Farelo de trigo	6,61	4,67
Óleo de soja	0,500	0,500
Calcário calcítico	1,25	2,91
Fosfato bicálcico	1,15	1,17
Sal comum	0,450	0,450
Premix Min.-Vit ¹	0,250	0,250
Inerte	0,100	0,100
Total	100	100
Valores calculados		
EM (kcal/kg)	2900	2900
Proteína bruta (%)	14	14
Cálcio (%)	0,80	1,400
Fósforo disponível (%)	0,310	0,310
Lisina digestível (%)	0,574	0,584
Metionina + Cistina digestível (%)	0,417	0,417
Treonina digestível (%)	0,469	0,473
Sódio	0,198	0,198
Potássio	0,550	0,553

¹ Suplemento mineral e vitamínico – Nucleopar Nutrição Animal Ltda (Conteúdo por kg de premix): Vit. A 3200 UI/g; Vit E 4800 UI/g; Vit D3 640 UI/g; Vit K3 0mg; Vit B1 400 mg; Vit B12 4000 µg; Vit B2 1200 mg; Vit B6 800 mg; Ác. Fólico 200 mg; Biotina 20 mg; Colina 140 g; Ác. Pantotênico 4000 mg; Metionina 320 g; Niacina 10 g; Ferro 20 g; Iodo 400 mg; Selênio 100 mg; Cobalto 80 mg; Antioxidante 4000 mg.

O consumo de ração foi controlado semanalmente da 13^o a 18^o semanas. O consumo médio foi obtido pela diferença entre a ração fornecida e a sobra ao final de cada semana, dividindo-se pelo número de aves de cada unidade experimental. O controle do peso das aves foi realizado utilizando-se balança digital. As aves foram pesadas individualmente e, na sua totalidade, ao início do experimento, e o controle semanal do peso foi feito pela pesagem de todas as aves em cada repetição até a 18^o semana.

Com 18 semanas de idade, uma ave por repetição (4 aves por tratamento, n = 40) foram sacrificadas por eletronarrose, seguida de deslocamento cervical, para obtenção

dos ossos (tíbia). Os ossos esquerdos foram utilizados na determinação da densitometria óssea, resistência e composição mineral, previamente medidos, com auxílio de um paquímetro digital, para posterior cálculo do índice de Seedor (Seedor et al., 1991). Isto, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Seedor} = \text{peso do osso (mg)} / \text{comprimento do osso (mm)}.$$

As tíbias esquerdas foram utilizadas para determinação da densitometria óssea radiográfica (densidade mineral óssea), que foi realizada na Clínica de Odontologia do Hospital Universitário de Maringá. Os ossos *in natura*, descongelados e dissecados, foram colocados sobre filme radiográfico (Kodak Intraoral E-Speed Film, size 2, tipo periapical), paralelos a um penetrômetro de alumínio com 10 degraus de tamanhos diferentes. Os ossos foram radiografados com aparelho de raios-x odontológico DabiAtlante®, modelo Spectro 70X eletrônico (DabiAtlante, Ribeirão Preto, Brasil), operando a 70 kVp, 8 mA, utilizando com tempo de exposição de 0,2 segundos, com o feixe de raios X incidindo perpendicularmente em relação ao filme, com uma distância foco-filme de 10 cm. Os filmes radiográficos foram revelados em processadora automática Revel Indústria e Comércio de 43 equipamentos Ltda., com tempo de trabalho de 150 segundos, operando com soluções da Kodak RP X-Omat. As radiografias foram digitalizadas no programa Image Tool® (versão 3.0, University of Texas Health Science Center at San Antonio, UTHSCSA, EUA, <ftp://maxrad6.uthscsa.edu/>) e gravadas em arquivos com extensão JPG.

As imagens digitais obtidas foram analisadas em cinco pontos, através do método de histograma no programa “Adobe Photoshop CS6”. As imagens em escala de tons de cinza foram avaliadas no histograma em 5 áreas centrais da diáfise da tíbia, com tamanho fixo (15 x 15 pixels) e calculada a média para cada osso.

Os dados obtidos no osso em valores de cinza foram convertidos em valores relativos à espessura da escala de alumínio. Para a conversão, foi realizada a setorização da curva densitométrica característica. Em cada radiografia, foi estabelecido este setor por meio da escolha de três degraus da escala (1 ao 3), cujos respectivos valores de escala de cinza limitavam a região de estudo previamente determinada no osso. As médias obtidas nos degraus da escala foram então utilizadas para obtenção de uma expressão matemática, que melhor se ajustou aos pontos encontrados. Com a equação obtida para cada osso, pode-se determinar o valor em milímetros de alumínio (mmAL) para densidade óssea, e quanto maior o valor obtido, maior a radioatividade, e, conseqüentemente, maior a densidade óssea.

Para a medida de força máxima da quebra do osso, a qual é denominada resistência óssea, foram utilizadas tíbias esquerdas das mesmas aves *in natura*. Os ossos foram posicionados anteroposteriormente, em um texturômetro (modelo TAXT2i), com uma base que apoia as regiões das epífises ósseas, e a aplicação da força de 5mm/s com carga de 200 kgf se deu na região central do osso (diáfise) e os valores foram expressos em quilograma de força (kgf).

Os mesmos ossos utilizados para densitometria óssea e que passaram pela análise de resistência, foram utilizados para análise de matéria seca. Os ossos foram pesados em balança analítica digital. Após este procedimento, os ossos foram secos por 72 horas em estufa de ventilação forçada à 105°C. Após o resfriamento, foram pesados novamente, e a diferença entre o peso correspondeu ao teor de matéria seca, expresso em porcentagem, conforme metodologia descrita por (Kim et al., 2004).

Os ossos utilizados para determinação da matéria seca foram utilizados para determinação do Ca e fósforo, os mesmos foram calcinados na mufla a 600° C durante 8 h. Após a queima, foram pesadas as cinzas e obteve-se a porcentagem de cinzas com base na matéria seca. A cinza resultante da queima dos ossos foi utilizada para o preparo das soluções minerais através do método descrito por (Silva e Queiroz, 2006). As determinações de fósforo foram realizadas pelo método colorimétrico, com utilização de solução mineral e as determinações de Ca foram analisadas por espectrofotometria.

Para realização da análise histológica do osso, utilizou-se a tíbia direita. Após a total remoção do tecido na hora do abate, as tíbias foram fixadas em formalina tamponada 10%. Após a fixação do tecido ósseo, o mesmo foi descalcificado em solução contendo ácido fórmico e citrato de sódio, com intuito de evitar a hidrólise e intumescimento do tecido ósseo. Após a descalcificação, os ossos foram seccionados verticalmente e a epífise proximal juntamente com parte da diáfise foram incluídos em parafina. Os blocos obtidos foram cortados em micrótomo rotativo (8 µm) e os cortes corados por método de Hematoxilina-Eosina. De cada osso, foram obtidas 2 imagens digitais (8 por tratamento), próximo ao osso cortical da diáfise, com câmera digital (Moticam 5MP), acoplada ao microscópio utilizando objetiva de 10x, com o programa Motic Image Plus versão 2.0. As imagens foram analisadas para determinar a porcentagem de osso medular por área no software ImageJ versão 1.47, seguindo os seguintes passos: ImageJ> Adjust>Treshold>Analyse>Set Measurements>Area

Fraction>Analyse>Measure. Os valores foram expressos em porcentagem da área analisada ($0,932 \text{ mm}^2/\text{imagem} = 7,456 \text{ mm}^2/\text{osso/ave}$).

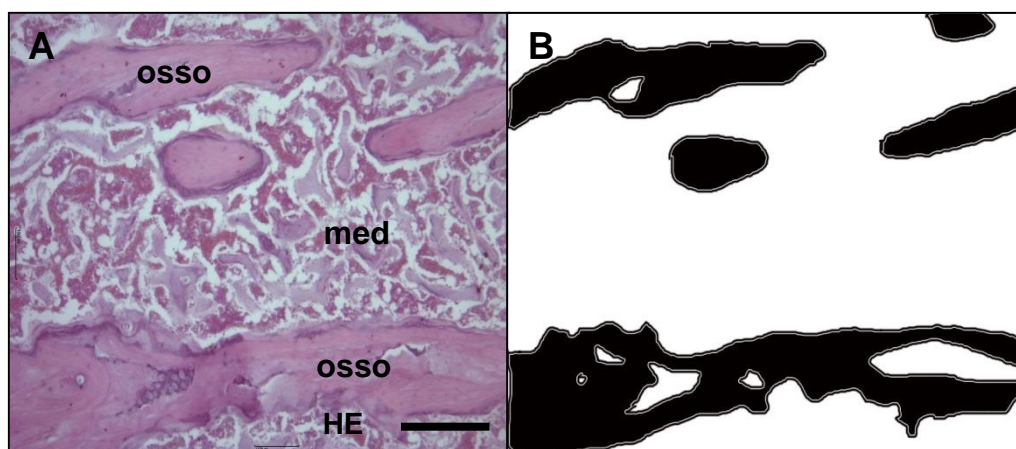


Figura 1: A) Fotografia de corte histológico da tíbia de frangas com 18 semanas em que a área de osso medular (osso) é distinta da área de medula óssea (med). HE, Barra 200 μm . B) Imagem binária da fotografia a esquerda obtida no programa Image J para cálculo da porcentagem de área (área em preto = osso medular).

Ao final do período experimental (18 semanas), de 1 ave por unidade experimental (4 aves por tratamento, $n = 40$) foram colhidos 5 ml de sangue na veia ulnar para obtenção do soro. A determinação dos níveis séricos de albumina (mg/dL), proteína total (mg/dL), Ca total (mg/dL), fosfatase alcalina (U/L) e fósforo (mg/dL) foi realizada através do método enzimático-calorimétrico (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte - Minas Gerais) e as leituras realizadas em espectrofotômetro modelo BIOPLUS 2000 (Bioplus Ltda), e o Ca iônico foi obtido através da fórmula (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte - Minas Gerais):

$$\text{Cálcio Iônico (mg/dL)} = (6 * C - (((0,19 * PT) + A) / 3)) / ((0,19 * PT) + A + 6); \text{ onde:}$$

C = Cálcio sérico (mg/dL);

PT = Proteína total sérica (mg/dL);

A = Albumina sérica (mg/dL).

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa estatístico SAS Institute Inc. (2011), com nível de 5% de significância, para se descrever a influência dos níveis de Ca e de vitamina K na dieta das poedeiras. Os dados foram analisados por análise de variância e, quando significativo, foi desdobrado a interação através dos modelos estatísticos descritos abaixo:

$$y_{ij} = \mu + C_i + K_j + CK_{ij} + e_{ijk};$$

$$y_{ij} = \mu + K_j + K_i/C_j + e_{ijk};$$

$$y_{ijk} = b_0 + b_1K_i + b_2K_i^2 + e_{ijk};$$

Onde:

y_{ijk} = valor observado das variáveis estudadas na unidade experimental k submetida ao nível i de Cálcio, $i = 1,2$ ($1 = 0,8\%$; $2 = 1,4\%$) e ao nível j de vitamina K, $j = 1,2,3,4,5$ ($1 = 0$; $2 = 2$; $3 = 8$; $4 = 16$; $5 = 32$ mg/Kg);

μ = constante geral;

y_{ij} = efeito do nível i de Cálcio (C), $i = 1,2$ e ao nível j de vitamina K (K), $j = 1,2,3,4,5$;

C_i = efeito do nível i de cálcio;

K_j = efeito do nível j de vitamina K;

CK_{ij} = interação entre o nível i de C com o nível j de K;

K_{ij}/C = efeito do nível i de K dentro o nível j de C;

b_0 = constante;

b_1 e b_2 = coeficiente linear e quadrático respectivamente, em função dos níveis de vitamina K;

e_{ijk} = erro experimental.

Resultados e discussão

As aves foram criadas durante o período experimental em ambiente distinto do usual, em gaiolas galvanizadas e ambiente controlado para temperatura e luminosidade. O consumo de ração e o peso médio das aves não foram afetados pelos tratamentos e apresentaram valores condizentes com a linhagem de aves utilizadas e com a idade estudada. O peso médio das aves com 18 semanas foi de $1220g \pm 36,4$ e o consumo médio de ração nessa idade foi de $63 \pm 4,7$ g.

A análise referente aos níveis séricos de albumina (A), proteínas totais (PT), Ca total (CT), Ca iônico (CI), fosfatase alcalina (FA) e fósforo total (P) estão na Tab. 2. Foram observados efeitos significativos da interação entre Ca e vitamina K ($P < 0,05$) somente para variável CT, sendo que as demais variáveis não obtiveram diferença estatística ($P > 0,05$).

Tabela 2: Análise dos níveis séricos de albumina (A), proteínas totais (PT), Ca total (CT), Ca iônico (CI), fosfatase alcalina (FA) e fósforo total (P) em frangas com 18 semanas de idade alimentadas com níveis de cálcio e vitamina K.

	A (mg/dL)	PT (mg/dL)	CT (mg/dL)	CI (mg/dL)	FA (U/L)	P (mg/dL)
Cálcio (%)						
0,8	2,15±0,17	4,21±0,46	9,28±0,54	6,11±0,37	249,59±36,21	5,43±0,56
1,4	2,20±0,24	4,38±0,29	9,56±0,78	6,25±0,62	249,31±50,50	5,25±0,42
Vitamina K (mg/kg)						
0	2,29±0,12	4,35±0,37	9,09±0,34	5,87±0,20	277,12±56,30	5,21±0,37
2	2,13±0,14	4,49±0,34	9,42±0,63	6,18±0,44	226,25±27,50	5,23±0,38
8	2,06±0,13	4,30±0,26	9,57±0,52	6,35±0,26	236,04±41,20	5,70±0,76
16	2,11±0,24	4,33±0,39	9,81±1,14	6,50±0,89	260,44±46,97	5,46±0,34
32	2,3±0,26	4,01±0,46	9,22±0,36	5,99±0,20	247,39±28,52	5,10±0,39
CV%	9,37	8,28	6,96	8,32	17,45	9,51
ANOVA						
Cálcio	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Vitamina K	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cálcio vs Vitamina K	NS	NS	0,049*	NS	NS	NS

NS – efeito não significativo; * valor do P.

Com o desdobramento da interação (Tab. 3) observa-se que o cálcio total teve comportamento quadrático ($P < 0,05$), em relação aos níveis de vitamina K para o nível 1,4% de Ca. Já para o nível 0,8% de Ca a variável não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre os níveis de vitamina K.

Na Fig. 2 está demonstrado o comportamento da variável CT no sangue, sendo que o nível mais elevado desta variável ocorreu com a suplementação de 1,4% de Ca e o nível de 17,86 mg/Kg de vitamina K na dieta.

Tabela 3: Desdobramento da interação para cálcio total (mg/dL).

Cálcio	Vitamina K (mg/Kg)					Efeito	R ²
	0	2	8	16	32		
0,8	9,19	9,89	9,35	8,90	9,05	NS	-
1,4	8,98	8,94	9,79	10,71	9,37	Q	0,6685

NS=Não significativo; Q= efeito quadrático.

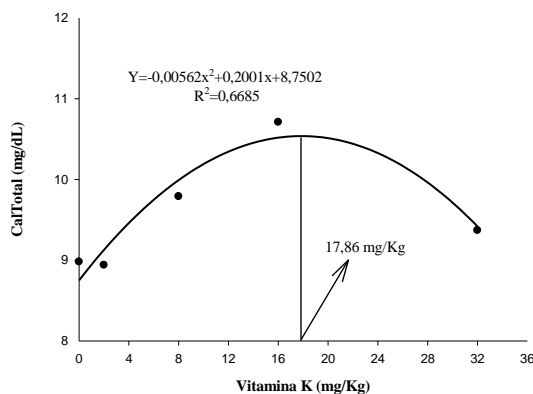


Figura 2: Comportamento da variável CT, em relação aos níveis de vitamina K dentro do nível de cálcio de 1,4%.

O mecanismo de absorção de Ca é muito complexo, envolvendo uma gama enorme de fatores como: vitamina D, ATPase, fosfatase alcalina intestinal, fatores que aumentem ou diminuam a sua solubilidade, proteínas ligadoras de Ca no enterócito, proteínas ligadoras de Ca no plasma, entre outros (Grüdtner et al., 1997). A vitamina K é responsável pela carboxilação das proteínas ligadoras de Ca no organismo (Vermeer, 1990; Vermeer et al., 1995; Hamidi et al., 2013). Quando a quantidade de vitamina K foi aumentada na dieta, provavelmente a quantidade dessas proteínas também aumentou. Os resultados sugerem que, com níveis elevados de Ca na ração, esse aumento de proteínas ligadoras de Ca, tanto no sangue quanto no plasma, elevaram a absorção de Ca, e conseqüentemente os níveis séricos.

Concentrações séricas de Ca mais elevadas sugerem uma melhor absorção do mesmo da dieta, e essa elevação pode aumentar a taxa de formação do osso e da casca do ovo (Gu et al., 2013). O organismo animal possui diferentes mecanismos para a homeostase do Ca sérico. A elevação de Ca sanguíneo resulta em secreção e liberação calcitonina, hormônio que tem a capacidade de reduzir as concentrações de Ca no soro sanguíneo, através de sua ligação com os receptores dos osteoclastos (Silverman, 2003), resultando, assim, na diminuição da reabsorção óssea, através da inibição da atividade dos osteoclastos (Chambers and Moore, 1983).

Os dados referentes à qualidade óssea das aves com 18 semanas de idade, alimentadas com vitamina K e Ca durante a fase de recria, são apresentados na Tab. 4. Foram observados efeitos da interação entre o Ca e a vitamina K para as variáveis índice de Seedor (IS), % Ca na Tíbia(CaT) e % osso medular (OM) ($P < 0,05$). Já para as outras variáveis, força de quebra do osso (F), matéria seca (MS), cinzas (C), cálcio no

osso (CaO) fósforo no osso (PO), relação Ca e fósforo (Ca:P) e densitometria óssea (DO), não se observou efeito da dieta ($P > 0,05$).

Os dados obtidos no trabalho corroboram com os encontrados por Almeida Paz et al. (2006; 2009) que, trabalhando com níveis de Ca dietético, não encontraram diferenças significativas nas variáveis índice de Seedor e % Ca na tíbia. Neste trabalho, também não foi encontrado efeito isolado dos níveis de Ca, dando ênfase à importância da suplementação dietética de vitamina K.

As variáveis IS, CaT e OM apresentaram comportamento quadrático em relação aos níveis de vitamina K, Tab. 5, dentro do nível de 1,4% de Ca na ração, enquanto que, para o nível de 0,8 de Ca, não foi observado efeito da suplementação. O comportamento das variáveis IS, CaT e OM, está representado na Fig. 3. Nota-se que os valores de vitamina K, onde as variáveis atingiram o ápice, estão próximos, onde os maiores valores de cada variável foram encontrados quando se forneceu os níveis de 14,58; 14,48 e 17,85 mg/Kg de vitamina K na ração, respectivamente.

Tabela 4: Análise da qualidade óssea da tíbia as 18 semanas em frangas alimentadas com níveis de cálcio e vitamina K na fase de recria.

	IS	F (Kgf)	MS (%)	C (%)	CaO (%)	PO (%)	Ca:P	DO (mmAL)	OM (%)
Cálcio (%)									
0,8	65,76±3,65	20,29±1,91	75,99±2,58	34,70±1,47	16,61±1,16	6,37±0,33	2,61±0,18	1,86±0,13	11,86±1,70
1,4	65,91±3,40	21,20±2,67	76,41±2,26	34,86±1,95	16,52±1,96	6,53±0,56	2,53±0,28	1,88±0,13	12,46±1,99
Vitamina K (mg/kg)									
0	65,86±2,50	20,69±2,89	74,82±2,25	34,34±1,99	15,36±1,52	6,35±0,57	2,42±0,19	1,88±0,08	11,13±0,90
2	65,96±2,50	20,78±1,75	76,73±1,84	34,91±0,93	17,23±0,93	6,55±0,20	2,63±0,15	1,83±0,10	13,06±2,31
8	65,75±5,33	21,55±2,55	76,44±1,79	35,05±1,29	18,40±1,22	6,72±0,72	2,75±0,33	1,91±0,12	11,68±2,05
16	67,63±3,23	20,30±2,53	75,87±2,99	34,97±2,55	15,99±0,79	6,33±0,35	2,52±0,14	1,92±0,14	13,23±1,86
32	63,96±2,90	20,39±2,24	77,13±2,83	34,62±1,70	15,84±1,35	6,30±0,22	2,53±0,23	1,80±0,18	11,66±1,26
CV	4,37	11,30	3,08	5,02	6,58	7,52	9,72	7,64	11,79
ANOVA									
Cálcio	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Vitamina K	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cálcio vs Vitamina K	0,0028*	NS	NS	NS	0,032*	NS	NS	NS	0,0072*

NS= não significativo; *Valor do p.

Tabela 5: Desdobramento das variáveis IS, CaT (%) e OM (%) em frangas com 18 semanas.

Cálcio	Vitamina K (mg/Kg)					Efeito	R ²
	0	2	8	16	32		
IS							
0,8	67,27	67,07	61,61	67,94	64,89	NS	-
1,4	64,44	64,85	69,90	67,31	63,03	Q	0,77
OM (%)							
0,8	11,32	14,02	9,76	11,87	11,09	NS	-
1,4	10,74	11,07	14,19	15,95	11,30	Q	0,95
CaT (%)							
0,8	16,11	17,33	17,47	15,72	16,40	NS	-
1,4	14,60	17,13	19,32	16,26	15,27	Q	0,64

NS= não significativo; Q= efeito quadrático.

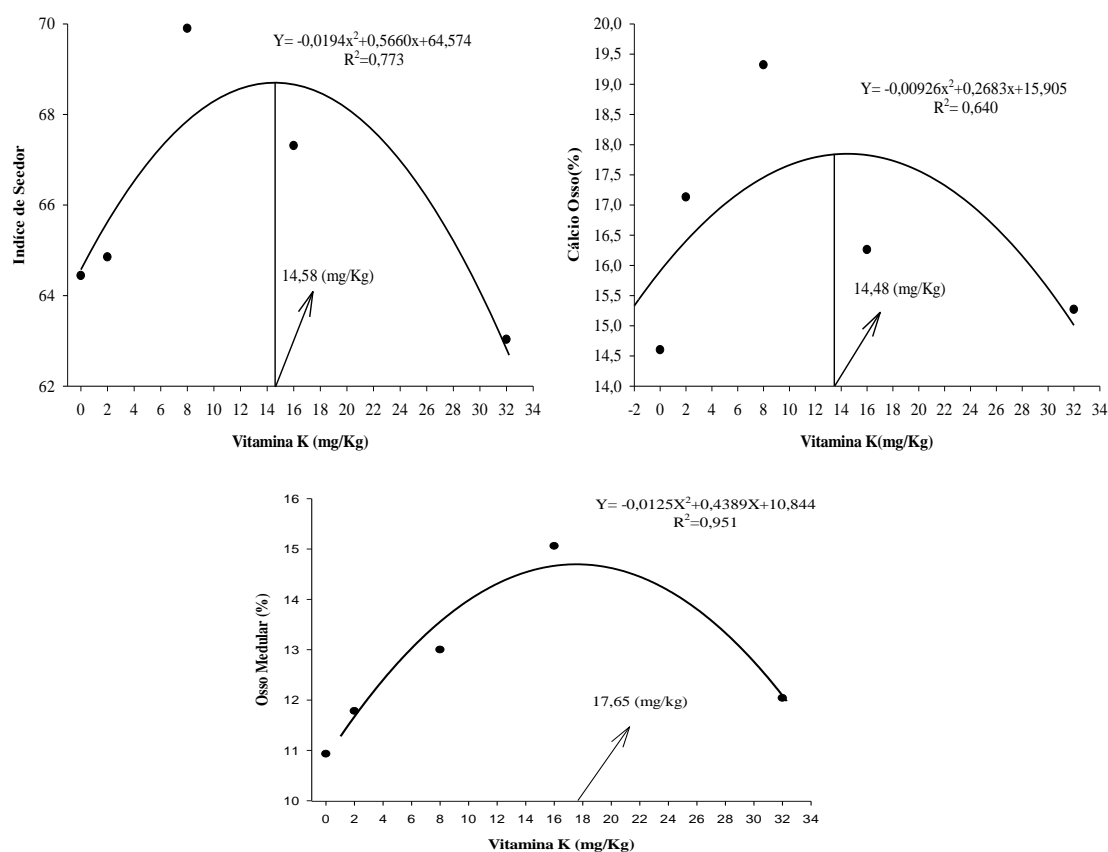


Figura 3: Efeito dos níveis de vitamina K dentro do nível 1,4% de cálcio, para as variáveis IS, CaT e OM, de frangas com 18 semanas de idade.

Os resultados observados assemelham-se aos encontrados por (Fleming et al., 1998, 2003) , que ao trabalharem com vitamina K e calcário, observaram que a

combinação do tratamento resultou em um maior acúmulo de osso medular durante o início de postura, sendo que a possível causa para isso é que o tratamento com vitamina K tenha prorrogado a formação estrutural do osso, ou inibido a perda de osso medular durante o início da postura.

Trabalhando com aves mais velhas, 67 semanas de idade, Fernandes et al. (2009) observaram melhora na mineralização óssea, com a inclusão de vitamina K na dieta das aves e salientaram que, no início do período de postura, ocorre um saldo negativo de cálcio e que a suplementação extra com vitamina K poderia elevar os níveis de osteocalcina carboxilada, que ligam o Ca a matriz óssea. Desta forma, ocorreria uma melhora na utilização do Ca dietético.

No entanto, resultados não significativos à inclusão de vitamina K são relatados por Rennie et al. (1997), que não observaram efeitos da inclusão de vitamina K na melhora de osso medular. Porém, vale salientar que os autores trabalharam com aves mais velhas, 68 semanas de idade, e analisaram adição de vitamina K, não incluindo nessa análise, variações de cálcio na dieta.

Os resultados analisados sugerem que poedeiras da linhagem Hy-line com 18 semanas em fase de recria provavelmente possuem uma exigência maior de Ca na dieta do que tem sido aplicado comercialmente. Quando o Ca foi aumentado e, conjuntamente a vitamina K, adicionada em quantidades superiores às recomendadas rotineiramente (2mg/kg), houve resposta de aumento de osso medular por área, o que reflete melhoria de qualidade óssea, e aumento nos níveis circulantes de Ca total. Apesar de não ter sido analisada a osteocalcina carboxilada no soro das aves estudadas, teoriza-se que esta tenha aumentado em função dos efeitos observados, tanto no osso ‘.

A osteocalcina é sintetizada pelo osteoblasto na fase de formação do osso, durante o processo de mineralização, sendo essencial para a formação dos cristais de hidroxiapatita. Ela possui três resíduos de Gla nas posições 17, 21 e 24 e uma ponte de dissulfeto entre os resíduos 23 e 29 e sua capacidade de ligação ao Ca e dependente da γ -carboxilação desses três resíduos, processo dependente da vitamina K (Lee et al., 2000; Hamidi et al., 2013).

Com a possível elevação dos níveis de osteocalcina carboxilada, decorrente do aumento dos níveis de vitamina K na dieta, provavelmente ocorreu um aumento na fixação de Ca no osso e esse feito deve ter sido mais efetivo quando concomitantemente foram aumentados os níveis de Ca da dieta. Os resultados sugerem efeitos positivos

para qualidade óssea quando se consideram níveis superiores de Ca e de vitamina K na fase de recria, pois ambos apresentam efeito sinérgico sobre a qualidade óssea.

Conclusões

As dietas contendo Ca 1,4% e níveis maiores do que os atualmente recomendados de vitamina K apresentaram aumento significativa no nível de Ca total sanguíneo, no índice de Seedor e na % de Ca e de osso medular da tíbia, em frangas na fase de recria, o que pode auxiliar na manutenção do sistema ósseo das aves em postura.

Referências

- ALMEIDA PAZ, I.C.L.; MENDES, A.A.; BALOG, A.; et al. Efeito do cálcio na qualidade óssea e de ovos de poedeiras. *Arch. Zootec.* v.58,p.173–183, 2009.
- ALMEIDA PAZ, I.; MENDES, A.; QUINTERIO, R.; et al. Use of radiograph optical densitometry to monitor bone quality in broiler breeders. *Rev. Bras. Ciência Avícola* v.8, p.33–38, 2006.
- CHAMBERS, T.J.; AND MOORE, A. The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v.57, p.819–24, 1983.
- COSTA, C.H.R.; BARRETO, S.L. DE T.; MESQUITA FILHO, R.M. DE; et al. Avaliação do desempenho e da qualidade dos ovos de codornas de corte de dois grupos genéticos. *Rev. Bras. Zootec.* v.37, p.1823–1828, 2008.
- FERNANDES, J.I.M.; MURAKAMI, A.E.; SCAPINELLO, C.; et al. Effect of vitamin K on bone integrity and eggshell quality of white hen at the final phase of the laying cycle. *Rev. Bras. Zootec.* v.38, p.488–492, 2009.
- FLEMING, R.H. Nutritional factors affecting poultry bone health. *Proc. Nutr. Soc.* v.67, p.177–83, 2008.
- FLEMING, R.H.; MCCORMACK, H. A; MCTEIR, L.; et al. Effects of dietary particulate limestone, vitamin K3 and fluoride and photostimulation on skeletal morphology and osteoporosis in laying hens. *Br. Poult. Sci.* v.44, p.683–9, 2003.
- FLEMING, R.H.; MCCORMACK, H.A.; AND WHITEHEAD, C.C. Bone structure and strength at different ages in laying hens and effects of dietary particulate limestone, vitamin K and ascorbic acid. *Br. Poult. Sci.* v.39, p.434–40, 1998.
- GRÜDTNER, V.; WEINGRILL, P.; AND FERNANDES, A. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. *Rev Bras Reum.* v.37, p.143–151, 1997.
- GU, H.; SHI, S.R.; CHANG, L.L.; et al. Safety evaluation of daidzein in laying hens: part II. Effects on calcium-related metabolism. *Food Chem. Toxicol.* v.55,p.689–92, 2013.

- GUNDBERG, C.M. Vitamin K and bone: past, present, and future. *J. Bone Miner. Res.* v.24, p.980–2, 2009.
- GUNDBERG, C.M.; LIAN, J.B.; AND BOOTH, S.L. Vitamin K-dependent carboxylation of osteocalcin: friend or foe? *Adv. Nutr.* v.3, p.149–57, 2012.
- HAMIDI, M.S.; GAJIC-VELJANOSKI, O.; AND CHEUNG, A.M. Vitamin k and bone health. *J. Clin. Densitom.* v.16, p.409–13, 2013.
- KIM, W.K.; FORD, B.C.; MITCHELL, A.D.; et al. Comparative assessment of bone among wild-type, restricted ovulator and out-of-production hens. *Br. Poult. Sci.* v.45, p.463–70, 2004.
- LAVELLE, P. A; LLOYD, Q.P.; GAY, C. V; et al. Vitamin K deficiency does not functionally impair skeletal metabolism of laying hens and their progeny. *J. Nutr.* v.124, p.371–7, 1994.
- LEE, A.J.; HODGES, S.; AND EASTELL, R. Measurement of osteocalcin. *Ann. Clin. Biochem.* v.37 (Pt 4), p.432–46, 2000.
- PRICE, P.A. Role of vitamin-K-dependent proteins in bone metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* v.8, p.565–83, 1988.
- RENNIE, J.S.; FLEMING, R.H.; MCCORMACK, H. A; et al. Studies on effects of nutritional factors on bone structure and osteoporosis in laying hens. *Br. Poult. Sci.* v.38, p.417–24, 1997.
- RODRIGUES, E.A.; Oliveira, M.C. De; Cancherini, L.C.; et al. Calcium in pre-laying and laying rations on the performance and quality of laying hens' eggshell. *Acta Sci. Anim. Sci.* v.35, p.153–157, 2013.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; DE OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R. **Tabelas brasileiras para suínos e aves: composição de alimentos e exigências nutricionais** (HS Rostagno, Ed.). 3º ed. UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- SAS Institute Inc. SAS/STAT Software for PC. n.Release 9.3. SAS Institute, 2011.
- SEEDOR, J.G.; QUARTUCCIO, H.A.; AND THOMPSON, D.D. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J. Bone Miner. Res.* v.6, p.339–46, 1991.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise dos Alimentos: Métodos químicos e biológicos**, 3ªedição, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- SILVERMAN, S.L. Calcitonin. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* v.32, p.273–284, 2003.
- THORP, B.H. Skeletal disorders in the fowl: a review. *Avian Pathol.* v.23, p.203–36, 1994.
- VERMEER, C. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem. J.* v.266, p.625–36, 1990.
- VERMEER, C.; JIE, K.S.; AND KNAPEN, M.H. Role of vitamin K in bone metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* v.15, p.1–22, 1995.
- WHITEHEAD, C.C. Overview of bone biology in the egg-laying hen. *Poult. Sci.* v.83, p.193–9, 2004.

ZHANG, C.; LI, D.; WANG, F.; et al. Effects of dietary vitamin k levels on bone quality in broilers. *Arch. Anim. Nutr.* v.57, p.197–206, 2003.

IV- Níveis dietéticos de cálcio e vitamina k na fase de recria, sobre o desempenho, o perfil sérico e a qualidade óssea de poedeiras em postura até 32 semanas.

Resumo - O efeito da suplementação de níveis de cálcio (Ca) e de vitamina K na dieta de poedeiras na fase de recria (13-18 semanas) foi estudado sobre o desempenho produtivo, o perfil sérico e a qualidade óssea de poedeiras, na fase de postura (20-32 semanas). Foram utilizadas 80 aves Hy-Line, com idade entre 20 e 32 semanas, distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com dez tratamentos, quatro repetições e duas aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram em dois níveis de Ca (0,8 e 1,4%) e cinco níveis de vitamina K (0, 2, 8, 16, 32 mg/Kg) na dieta, fornecidos durante a recria. Durante a fase de postura, que compreendeu o período experimental, as aves receberam dieta comercial para a fase de postura. Não houve efeito dos tratamentos ($P > 0,05$) fornecidos na recria para as variáveis de produção e qualidade de ovos (produção de ovos, consumo de ração, conversão alimentar, peso do ovo, porcentagem de albúmen e casca e espessura de casca). O soro analisado as 08h00 e 16h00 não apresentou efeito dos tratamentos para os níveis séricos de proteínas totais, albumina, fosfatase alcalina, fósforo, cálcio e cálcio iônico. A tíbia das aves as 32 semanas foi avaliada e não houve efeito dos tratamentos para resistência óssea, matéria seca, cinzas, fósforo, densidade óssea, relação Ca e fósforo, índice de Seedor % e Ca na tíbia. A porcentagem de osso medular na tíbia teve efeito da interação ($P < 0,05$) dos tratamentos na recria. Nas rações com 1,4% de Ca, a inclusão de vitamina K na dieta aumentou a quantidade de osso medular na tíbia de forma quadrática, sendo maior com 6,08 mg/kg de vitamina K. A suplementação com vitamina K, em uma dieta com Ca 1,4% na recria, resulta em poedeiras com maior proporção de osso medular na tíbia durante a fase produção.

Palavras-Chave: tíbia, fosfatase alcalina, osso medular, aves de postura

IV - Dietary levels of calcium and vitamin k in the growing phase on performance, serum profile and bone quality in laying hens until 32 weeks.

Abstract - The effect of calcium (Ca) and vitamin K supplementation in the diet of laying hens in the laying period (13-18 weeks) was studied on productive performance, serum profile and bone quality of laying hens in the laying phase (20 -32 weeks). Eighty Hy- Line birds, aged between 20 and 32 weeks, distributed in a completely randomized design, in a factorial arrangement with ten treatments and four replicates of two birds per experimental unit were used. The treatments consisted of two levels of Ca (0.8 and 1.4 %) and five levels of vitamin K (0, 2, 8, 16, 32 mg / kg) in the diet provided during the laying period. During the laying phase, which comprised the experimental period, the birds received a commercial diet. There were no treatment effects ($P > 0.05$) provided in the laying period for the variables of production and egg quality (egg production, feed intake, feed conversion, egg weight, albumen and bark percentage and bark thickness). The serum analyzed at 08h00 and at 16h00 showed no treatment effect on serum levels of total proteins, albumin, alkaline phosphatase, phosphorus, calcium and ionized calcium. The tibia of the birds was assessed at 32 weeks and there was no treatment effect on bone strength, dry matter, ash, phosphorus, bone density, calcium and phosphorus ratio, Seedor index and % of Ca in the tibia. The percentage of medullary bone in the tibia had a significant interaction ($P < 0.05$) between treatments for the laying period. In the diets with 1.4 % of Ca, the inclusion of vitamin K in the diet increased the amount of medullary bone in the tibia quadratically, being higher with 6.08 mg / kg of vitamin K. Vitamin K supplementation in a diet with 1.4% Ca during laying period results in layers with a higher proportion of medullary bone in the tibia during the production phase.

Key words: tibia, alkaline phosphatase, medullary bone, laying hens

Introdução

O sistema esquelético dos vertebrados apresenta duas funções importantes: suporte estrutural e reserva metabólica de minerais. O sistema esquelético das aves, por sua vez, foi adaptado para o voo, sendo compacto e leve, porém muito forte (Miller e Bowman, 1981). As aves poedeiras apresentam diferentes tipos de ossos no esqueleto, sendo que o mais resistente é o osso cortical. Esse tipo de osso tem importante função estrutural e é o depósito mais estável de Ca no organismo. Dentre os tipos de ossos, ele é o que apresenta maior densidade, com cerca de 5 a 10% de porosidade e são encontrados nos eixos dos ossos longos, na camada externa ao osso esponjoso e nas vertebrae (Whitehead e Fleming, 2000).

Outro tipo de osso é o trabecular ou esponjoso, que é composto por um emaranhado de fibras desuniformes de colágeno (Whitehead, 2004). Já o osso medular é formado nas poedeiras, quando estas atingem a maturidade sexual, através da influência de estrógenos e andrógenos. Este osso é mantido à custa do osso cortical nas aves em produção, em períodos onde há baixa disponibilidade de Ca (Etches, 1987). Esta estrutura, única em aves e crocodilos, é uma fonte lábil de Ca para a formação da casca do ovo e é estabelecido nas superfícies de ossos estruturais e em espículas entre as cavidades medulares, em especial em ossos longos (Whitehead, 2004). Durante o período de postura de ovos, a maioria das aves utilizam essa forma óssea como fonte de Ca lábil para formação da casca do ovo (Fleming et al., 1998).

No início do período de postura, o organismo da ave intensifica o metabolismo de reabsorção óssea, o que desencadeia um aumento significativo na mortalidade dessas aves, e esse aumento na mortalidade pode ter como causa uma má formação óssea na recria (Rath et al., 2000; Whitehead et al., 2004). A formação da casca do ovo demanda uma alta quantidade de Ca durante a vida produtiva e essa demanda pode desencadear o enfraquecimento progressivo e fratura dos ossos, resultantes da osteoporose (Fleming et al., 2006; Jendral et al., 2008).

Além do Ca, a suplementação dietética de vitamina k está recebendo um enfoque maior sobre seu papel na qualidade óssea. A vitamina k age como cofator para carboxilação de resíduos específicos de ácido glutâmico para formação do ácido gama glutâmico (Gla), aminoácido presente nos fatores de coagulação (fatores II, VII, IX e X)

e que também se liga ao Ca, regulando a disposição desse elemento na matriz óssea (Klack e Carvalho, 2006).

A reposição de Ca no osso medular é mais eficiente que no osso cortical e, ao longo do tempo, ocorre fragilidade deste último, levando aos processos conhecidos como fadiga de gaiola ou osteoporose. Esses efeitos são observados em aves em segundo ciclo, porém a origem pode estar relacionada com o período de formação do osso na recria (Whitehead, 2004). Diante disso, objetivou-se avaliar o fornecimento de níveis dietéticos de Ca e vitamina K durante a fase de recria e seu efeito sobre a qualidade óssea, parâmetros sanguíneos e desempenho produtivo de aves, durante a postura no período da 20^a a 32^a semana de idade.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no setor de Avicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Foram utilizadas 80 poedeiras Hy-Line, com idade de 20 semanas, distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x5, totalizando 10 tratamentos, com 4 repetições e 2 aves por unidade experimental. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, sob o número de protocolo 116/2012.

Os tratamentos consistiam em dois níveis de Ca (0,8 e 1,4%), seguindo a recomendação de (Rostagno et al., 2011) e do manual da linhagem Hy-Line W-36 de 2011, respectivamente, e cinco níveis de suplementação de vitamina K (0, 2, 8, 16, 32 mg/Kg) na dieta Tab. 6. Estas rações foram fornecidas durante a fase de recria (13-18 semanas).

Na sequência, as aves foram transferidas para o galpão de postura, de acordo com o tratamento fornecido na recria, onde receberam todas a mesma ração. O experimento foi desenvolvido por um período de 12 semanas (20-32semanas), totalizando 3 ciclos de 28 dias. As aves foram alojadas em gaiolas de arame galvanizado, medindo 25 x 45 cm cada, com duas aves em cada gaiola, totalizando oito aves por tratamento. Foi utilizado um galpão convencional de postura, com cobertura de telhas de barro e telas nas laterais. O alimento e a água foram fornecidos *ad libitum* e o programa de iluminação adotado foi de 17 horas de luz (natural + artificial).

A ração experimental fornecida na fase de postura foi formulada de acordo com as exigências e a composição dos alimentos, segundo as recomendações de (Rostagno et al., 2011). A composição percentual e calculada da ração experimental encontra-se na Tab.6.

Tabela 6: Composição percentual e calculada da ração experimental durante a recria (13 a 18 sem) e de postura (20 a 32 sem).

Ingredientes (%)	Recria		Postura
	0,8% Cálcio	1,4% Cálcio	
Milho	74,05	73,51	61,20
Farelo de soja (45%)	15,64	16,44	23,44
Farelo de trigo	6,61	4,67	-
Óleo de soja	0,500	0,500	2,59
Calcário calcítico	1,25	2,91	10,46
Fosfato bicálcico	1,15	1,17	1,570
Sal comum	0,450	0,450	0,340
Premix Min.-Vit	0,250 ¹	0,250 ¹	0,250 ²
DL- Metionina	-	-	0,140
Antioxidante ³	-	-	0,010
Inerte	0,100	0,100	-
Total	100	100	100
Valores calculados			
EM (kcal/kg)	2900	2900	2880
Proteína bruta (%)	14	14	16
Cálcio (%)	0,80	1,400	4,400
Fósforo disponível (%)	0,310	0,310	0,380
Lisina digestível (%)	0,574	0,584	0,813
Metionina + Cistina digestível (%)	0,417	0,417	0,669
Treonina digestível (%)	0,469	0,473	0,626
Triptofano (%)	-	-	0,190
Sódio	0,198	0,198	-
Potássio	0,550	0,553	-

¹ Suplemento mineral e vitamínico – Nucleopar Nutrição Animal Ltda (Conteúdo por kg de premix): Vit. A 3200 UI/g; Vit E 4800 UI/g; Vit D3 640 UI/g; Vit K3 0mg; Vit B1 400 mg; Vit B12 4000 µg; Vit B2 1200 mg; Vit B6 800 mg; Ác. Fólico 200 mg; Biotina 20 mg; Colina 140 g; Ác. Pantotênico 4000 mg; Metionina 320 g; Niacina 10 g; Ferro 20 g; Iodo 400 mg; Selênio 100 mg; Cobalto 80 mg; Antioxidante 4000 mg.

²Suplemento mineral e vitamínico – Nucleopar Nutrição Animal Ltda (Conteúdo por kg de premix): Vit. A 2.550 UI/g; Vit E 2.083,33 mg; Vit D3 500 UI/g; Vit K3 650 mg; Vit B1 408,33 mg; Vit B12 2.500 µg; Vit B2 1.000 mg; Vit B6 412,5 mg; Ác. Fólico 66,67 mg; Biotina 8,33 mg; Colina 70.000 mg; Ác. Pantotênico 2.375 mg; Metionina 226.875 mg; Niacina 5.308,33 mg; Ferro 12.500 mg; Iodo 258,33 mg; Selênio 75 mg; Cobalto 83,33 mg; Antioxidante 1.250 mg.

³ BHT (Butil Hidroxi Tolueno).

O consumo de ração foi controlado a cada ciclo de 28 dias, e foi obtido pela diferença entre a ração fornecida e a sobra ao final de cada ciclo, dividindo-se pelo número de aves de cada unidade experimental.

Ao final do período experimental (32 semanas), foram coletados sangue em dois horários diferentes: às 08h00 horas da manhã (período de ovulação) e às 16h00 da tarde (período de deposição de casca de ovo).

Foram utilizadas 1 ave por unidade experimental, 4 aves por tratamento e 40 aves no total. Foram colhidos 5 ml de sangue, por meio da veia ulnar, e após procedeu-se com a obtenção do soro. O soro obtido foi colocado em tubos identificados e armazenados em freezer (-18) para posterior análises.

A determinação dos níveis séricos de albumina (mg/dL), proteína total (mg/dL), Ca total (mg/dL), fosfatase alcalina (U/L) e fósforo (mg/dL) foi realizada através do método enzimático-calorimétrico (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte - Minas Gerais) e as leituras realizadas em espectrofotômetro modelo BIOPLUS 2000 (Bioplus Ltda), e o Ca iônico foi obtido através da fórmula (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte - Minas Gerais):

$$\text{Cálcio Iônico (mg/dL)} = (6 * C - ((0,19 * PT) + A) / 3) / ((0,19 * PT) + A + 6); \text{ onde:}$$

C = Cálcio sérico (mg/dL);

PT = Proteína total sérica (mg/dL);

A = Albumina sérica (mg/dL).

Com 32 semanas de idade, uma ave por repetição (4 aves de cada tratamento, n=40) foram sacrificadas por eletronarcole, seguida de deslocamento cervical, para obtenção dos ossos (tíbia). Os ossos esquerdos foram utilizados na determinação da densitometria, resistência óssea e composição mineral. Os mesmos foram medidos, com auxílio de um paquímetro digital, para posterior cálculo do Índice de Seedor (Seedor et al., 1991). De acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Seedor} = \text{peso do osso (mg)} / \text{comprimento do osso (mm)}.$$

As tíbias esquerdas foram utilizadas para determinação da densitometria óssea radiográfica (densidade mineral óssea), que foi realizada na Clínica de Odontologia do Hospital Universitário de Maringá. Os ossos *in natura*, descongelados e dissecados, foram colocados sobre filme radiográfico (Kodak Intraoral E-Speed Film, size 2, tipo periapical), paralelos a um penetrômetro de alumínio com 10 degraus de tamanhos diferentes. Os ossos foram radiografados com aparelho de raios-x odontológico DabiAtlante®, modelo Spectro 70X eletrônico (DabiAtlante, Ribeirão Preto, Brasil), operando a 70 kVp, 8 mA, utilizando com tempo de exposição de 0,2 segundos, com o feixe de raios X incidindo perpendicularmente em relação ao filme, com uma distância foco-filme de 10 cm. Os filmes radiográficos foram revelados em processadora automática Revel Indústria e Comércio de 43 equipamentos Ltda., com tempo de trabalho de 150 segundos, operando com soluções da Kodak RP X-Omat. As radiografias foram digitalizadas no programa Image Tool® (versão 3.0, University of

Texas Health Science Center at San Antonio, UTHSCSA, EUA, <ftp://maxrad6.uthscsa.edu/>) e gravadas em arquivos com extensão JPG.

As imagens digitais obtidas foram analisadas em cinco pontos, através do método de histograma no programa “Adobe Photoshop CS6”. As imagens em escala de tons de cinza foram avaliadas no histograma em 5 áreas centrais da diáfise da tíbia, com tamanho fixo (15 x 15 pixels) e destas foram obtidos a média para cada osso.

Os dados obtidos no osso em valores de cinza foram convertidos em valores relativos à espessura da escala de alumínio. Para a conversão, foi realizada a setorização da curva densitométrica característica. Em cada radiografia, foi estabelecido este setor por meio da escolha de três degraus da escala (1 ao 3), cujos respectivos valores de escala de cinza limitavam a região de estudo previamente determinada no osso. As médias obtidas nos degraus da escala foram então utilizados para obtenção de uma expressão matemática, que melhor se ajustou aos pontos encontrados. Com a equação obtida para cada osso, pode-se determinar o valor em milímetros de alumínio (mmAL) para densidade óssea, e, quanto maior o valor obtido, maior a radioatividade, e, conseqüentemente, maior a densidade óssea.

Para a medida de força máxima da quebra do osso, a qual é denominada resistência óssea, foram utilizadas tíbias esquerdas das mesmas aves *in natura*. Os ossos foram posicionados anteroposteriormente, em um texturômetro (modelo TAXT2i), com uma base que apoia as regiões das epífises ósseas, e a aplicação da força de 5mm/s com carga de 200 kgf se deu na região central do osso (diáfise) e os valores foram expressos em quilograma de força (kgf).

Os mesmos ossos utilizados para densitometria óssea e que passaram pela análise de resistência, foram utilizados para inferência de matéria seca, pesando-se os ossos em balança analítica digital. Após este procedimento, os ossos foram secos por 72 horas em estufa de ventilação forçada à 105°C, após esfriarem foram pesados novamente. A diferença entre o peso correspondeu ao teor de matéria seca, expresso em porcentagem, conforme metodologia descrita por (Kim et al., 2004).

Os ossos utilizados para determinação da matéria seca foram utilizados para determinação do Ca e fósforo, os mesmos foram calcinados na mufla a 600° C durante 8 h. Após a queima, foram pesadas as cinzas e obteve-se a porcentagem de cinzas com base na matéria seca. A cinza resultante da queima dos ossos foi utilizada para confecção das soluções minerais através do método descrito por (Silva e Queiroz, 2006). As determinações de fósforo foram realizadas pelo método colorimétrico, com

utilização de solução mineral e as determinações de Ca foram analisadas por espectrofotometria.

Para realização da análise histológica do osso utilizou-se a tíbia direita. Após a total remoção do tecido na hora do abate, as tíbias foram fixadas em formalina tamponada 10%. Após a fixação do tecido ósseo, o mesmo foi descalcificado em solução contendo ácido fórmico e citrato de sódio, com intuito de evitar a hidrólise e intumescimento do tecido ósseo. Após a descalcificação, os ossos foram seccionados verticalmente e a epífise proximal juntamente com parte da diáfise foram incluídos em parafina. Os blocos obtidos foram cortados em micrótomo rotativo (8 μm) e os cortes corados por método de Hematoxilina-Eosina para observação do osso medular e mensuração.

De cada osso, foram obtidas 7 fotos, totalizando 28 fotos por tratamento. As fotos de todas as aves foram tiradas próximo ao osso cortical, da região do osso onde se tem mais espículas. As fotos foram obtidas com câmera digital (Moticam 5MP), acoplada ao microscópio utilizando objetiva de 10x, com o programa Motic Image Plus versão 2.0. As imagens foram analisadas para determinar a porcentagem de osso medular. Para isso, utilizou-se o programa ImageJ versão 1.47, seguindo os seguintes passos: ImageJ> Adjust>Treshold>Analyse>Set Measurements>Area Fraction>Analyse>Measure, os valores foram expressado em porcentagem da área analisada. A área analisada em cada foto correspondeu a 0,976 mm^2 , Fig. 4, totalizando uma área de 6,83 mm^2 por ave.

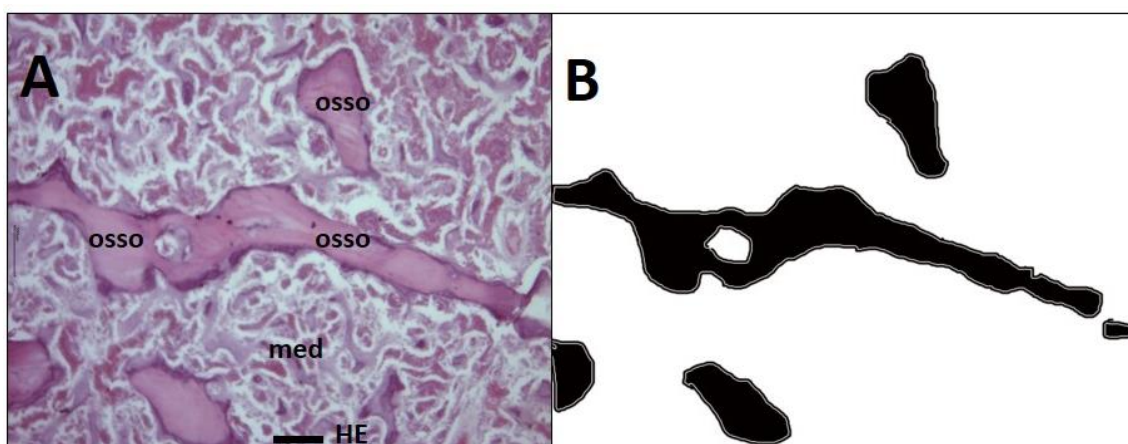


Figura 4: A) Fotografia de corte histológico da tíbia de poedeiras com 32 semanas em que a área de osso medular (osso) é distinta da área de medula óssea (med). HE, Barra 100 μm . B) Imagem binária da fotografia a esquerda obtida no programa Image J para cálculo da porcentagem de área. Área (área em preto = osso medular).

Durante o período experimental, foram coletados dados de consumo de ração (g/ave/dia) e conversão alimentar (kg de ração/dúzia de ovos e kg de ração/kg de ovos) foram controlados em intervalos de 28 dias. Para o cálculo da porcentagem de postura, os ovos foram coletados e anotados diariamente. Ao final de cada ciclo, de 28 dias, por três dias consecutivos, foram coletados todos os ovos íntegros, para obtenção do peso do ovo, peso da casca, espessura da casca e com esses dados foram aferidos os valores de porcentagem de casca e albúmen.

As cascas foram lavadas e secas à temperatura ambiente por 72 horas e, em seguida, pesadas em balança de precisão digital (0,001g). O percentual de casca foi obtido pela relação do peso das cascas secas com o peso dos respectivos ovos. Após a pesagem das cascas, efetuou-se a medição da espessura com auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo®) em três pontos na região equatorial de cada casca.

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa estatístico SAS Institute Inc. (2011), com nível de 5% de significância, para se descrever a influência dos níveis de Ca e vitamina K na dieta das poedeiras. Os dados foram analisados por análise de variância e quando significativo, foi desdobrado à interação através dos modelos estatísticos descritos abaixo:

$$y_{ij} = \mu + C_i + K_j + CK_{ij} + e_{ijk};$$

$$y_{ij} = \mu + K_j + K_i/C_j + e_{ijk};$$

$$y_{ijk} = b_0 + b_1K_i + b_2K_i^2 + e_{ijk};$$

Onde:

y_{ijk} = valor observado das variáveis estudadas na unidade experimental k submetida ao nível i de Cálcio, $i = 1,2$ ($1 = 0,8\%$; $2 = 1,4\%$) e ao nível j de vitamina K, $j = 1,2,3,4,5$ ($1 = 0$; $2 = 2$; $3 = 8$; $4 = 16$; $5 = 32$ mg/Kg);

μ = constante geral;

y_{ij} = efeito do nível i de Cálcio (C), $i = 1,2$ e ao nível j de vitamina K (K), $j = 1,2,3,4,5$;

C_i = efeito do nível i de cálcio;

K_j = efeito do nível j de vitamina K;

CK_{ij} = interação entre o nível i de C com o nível j de K;

K_{ij}/C = efeito do nível i de K dentro o nível j de C;

b_0 = constante;

b_1 e b_2 = coeficiente linear e quadrático respectivamente, em função dos níveis de vitamina K;

e_{ijk} = erro experimental.

Resultados e discussão

Poedeiras da linhagem Hy-line foram estudadas durante a fase inicial de postura, após terem sido alimentadas durante a fase de recria, entre 13 e 18 semanas, com níveis de Ca (0,8 e 1,4%) e níveis de vitamina K (0, 2, 8, 16, 32 mg/Kg). Foram analisadas variáveis de desempenho produtivo, perfil sérico em dois horários fisiológicos e qualidade de osso na 32^a semana. As variáveis de produção de ovos (Prod), consumo médio diário (consumo), conversão alimentar Kg/Kg (CA Kg/Kg), conversão alimentar por dúzia de ovo (CA Kg/duz), peso do ovo (Povo), porcentagem de albúmen (Albúmen), porcentagem de casca (Casca) e espessura da casca não apresentaram efeito ($P > 0,05$) da suplementação de vitamina K e de cálcio durante a recria, para aves em postura com 22-32 semanas de idade (Tab. 7).

Os dados produtivos aqui encontrados são contrários aos observados por Fernandes et al. (2009) em aves Hy-line com idade de 67 semanas, onde foram testados os níveis de 0, 2, 8 e 32 mg/Kg na dieta, e encontraram efeito da suplementação de vitamina K sobre a produção, peso do ovo e conversão alimentar das aves.

Tabela 7: Desempenho produtivo de poedeiras entre 20 e 32 semanas de idade, suplementadas com cálcio e vitamina K na fase de recria.

	Prod (%)	Consumo (g/dia)	CA (Kg/Kg)	CA (Kg/duz)	Povo (g)	Albúmen (%)	Casca (%)	Espessura casca (mm)
Cálcio (%)								
0,8	75,39±3,70	107,38±5,05	2,43±0,21	1,71±0,13	58,72±2,45	11,46±0,75	9,26±0,67	0,38±0,02
1,4	77,02±5,46	107,42±6,19	2,40±0,36	1,68±0,16	58,83±5,25	11,38±0,90	8,67±2,00	0,37±0,01
Vitamina K (mg/kg)								
0	77,45±3,41	104,56±4,43	2,28±0,14	1,62±0,11	59,30±2,29	11,50±0,65	9,39±0,74	0,38±0,02
2	75,42±4,19	104,52±5,91	2,51±0,46	1,66±0,08	56,48±7,85	11,96±0,54	9,09±0,39	0,37±0,01
8	78,86±4,78	105,76±7,18	2,25±0,25	1,61±0,17	59,81±1,80	11,66±0,45	9,21±0,61	0,38±0,01
16	74,36±5,80	111,45±2,24	2,56±0,19	1,80±0,13	58,75±2,41	10,79±0,92	9,17±0,74	0,38±0,02
32	74,92±4,45	110,72±3,01	2,49±0,25	1,77±0,12	59,55±2,68	11,18±1,03	7,96±3,09	0,36±0,01
CV	5,85	4,12	11,13	6,88	7,32	6,91	17,05	5,19
ANOVA								
Cálcio	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Vitamina K	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cálcio*Vitamina K	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS=não significativo.

A análise do perfil sérico de cálcio (CaT), fósforo (P), fosfatase alcalina (FA), cálcio iônico (CaI), proteínas totais (PT) e albumina (Alb) foi realizado às 8h00 e às 16h00, com o objetivo de avaliar essas variáveis em dois momentos fisiológicos da ave em postura, antes do início da formação da casca e durante o processo de formação da casca do ovo no útero. Os dados de perfil sérico das 8h00 das poedeiras estão descritos na Tab. 8. Não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) para as variáveis analisadas.

Tabela 8: Análise das variáveis sanguíneas de poedeiras com 32 semanas, coletadas às 08h00, após a postura.

	Alb (mg/dL)	PT (mg/dL)	CaT (mg/dL)	CaI (mg/dL)	FA (U/L)	P (mg/dL)
Cálcio (%)						
0,8	1,91±0,18	4,52±0,70	13,41±1,88	9,04±1,09	438,21±120,34	4,13±0,86
1,4	1,59±0,30	3,88±0,60	13,48±2,72	9,60±1,76	340,52±134,78	4,33±1,27
Vitamina K (mg/kg)						
0	1,98±0,26	4,83±0,57	15,30±2,50	10,21±1,59	275,88±81,29	4,95±1,13
2	1,66±0,44	3,86±0,85	14,56±1,64	10,29±0,80	416,32±117,58	4,90±0,60
8	1,79±0,17	4,51±0,70	12,37±2,53	8,48±1,80	409,93±63,88	3,90±1,00
16	1,63±0,31	3,75±0,53	11,81±1,37	8,40±0,97	509,92±125,5	3,75±0,82
32	1,70±0,24	4,07±0,59	13,20±2,04	9,22±1,28	334,78±177,25	3,65±1,28
CV%	13,96	13,27	16,62	15,07	25,70	25,38
ANOVA						
Cálcio	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Vitamina K	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cálcio vs Vitamina K	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS= Não significativo.

O mesmo foi observado por (Ghise et al., 2009), que avaliaram os parâmetros hematológicos de aves poedeiras durante as fases de formação do ovo e não encontraram diferenças para os níveis de Ca, alegando que, quando as dietas são correspondentes devido à absorção intestinal e reabsorção óssea, os níveis séricos de Ca não se alteram, já os níveis de fósforo se elevaram entre 10 e 12 horas após a ovoposição.

A segunda coleta de soro sanguíneo ocorreu às 16h00 e o perfil sérico observado nas poedeiras está descrito na Tab. 9. Não foi observado efeito dos tratamentos ($P > 0,05$) sobre as variáveis estudadas.

Tabela 9: Análise das variáveis de soro sanguíneo de poedeiras com 32 semanas, coletado as 16h00.

	Alb (mg/dL)	PT (mg/dL)	CaT (mg/dL)	CaI (mg/dL)	FA (U/L)	P (mg/dL)
Cálcio (%)						
0,8	1,89±0,26	4,81±0,44	15,68±1,43	10,57±0,92	267,22±45,01	4,13±0,52
1,4	1,94±0,21	4,83±0,59	15,58±2,42	10,43±1,62	281,38±77,44	3,86±0,60
Vitamina K (mg/kg)						
0	1,88±0,14	5,00±0,68	16,35±2,76	10,97±1,78	324,40±60,09	3,48±0,31
2	1,70±0,26	4,86±0,34	15,02±1,42	10,36±1,09	235,04±46,41	3,94±0,67
8	2,10±0,20	4,81±0,27	15,69±1,66	10,33±1,14	299,43±77,66	4,46±0,43
16	2,03±0,15	4,45±0,53	16,45±1,67	11,00±0,99	276,83±48,34	3,85±0,47
32	1,88±0,21	4,98±0,56	14,62±1,82	9,84±1,32	235,80±29,63	4,25±0,47
CV%	10,41	10,23	10,55	10,64	11,94	10,96
ANOVA						
Cálcio	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Vitamina K	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cálcio*Vitamina K	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS= não significativo.

Para a formação da casca do ovo, muitas variáveis estão relacionadas com o transporte de cálcio para o útero e a contribuição acumulada de todos esses mecanismos como a homeostase de Ca, a absorção intestinal, a atividade do útero e a reabsorção óssea são muito importantes (Bar, 2009). O transporte de Ca^{2+} pelo útero varia de acordo com o ciclo de formação da casca do ovo e seu pico se intensifica na segunda metade do ciclo, mais especificamente na parte da tarde, cerca de 11 a 12 horas após a ovulação e é finalizada entre 22 e 24 horas após a ovulação (Bar, 2009). O horário que foi coletado o sangue, 16h00, compreende o período em que o ovo está começando a deposição de casca no útero, aumentando, assim, a necessidade por Ca. O organismo animal faz uso de vários mecanismos para a homeostase do Ca sérico. Mesmo sob intensa mobilização de Ca para o útero, as aves conseguem manter os níveis séricos pela absorção intestinal de Ca da dieta e por mobilização do sistema esquelético.

Na análise de qualidade óssea da tíbia em poedeiras com 32 semanas, não foram observados efeitos do tratamento sobre as variáveis: índice de Seedor, resistência óssea, matéria seca, cinzas, %Ca no osso, fósforo no osso, relação Ca e fósforo e densidade óssea (Tab. 10). No entanto, foram observados efeitos da interação entre vitamina K e Ca, sobre a porcentagem de osso medular da tíbia ($P < 0,05$).

Tabela 10: Análise das variáveis ósseas de aves com 32 semanas de idade, suplementadas com cálcio e vitamina K durante a fase recria.

	Índice de Seedor	Resistência óssea (Kgf)	Mat seca (%)	Cinzas (%)	Cálcio (%)	Fósforo (%)	Ca:Fos	Densidade óssea (mmAL)	Osso Medular (%)
Cálcio (%)									
0,8	65,95±3,86	21,31±2,87	65,56±3,65	45,96±2,40	25,49±5,60	8,84±0,60	2,87±0,63	2,32±0,19	10,33±1,35
1,4	66,22±2,81	21,06±1,84	65,48±3,04	45,68±1,58	26,12±2,70	8,93±0,79	2,94±0,36	2,39±0,18	10,47±2,01
Vitamina K (mg/kg)									
0	66,71±4,54	20,36±2,00	64,28±4,78	45,73±2,19	24,30±3,32	8,98±0,58	2,71±0,38	2,31±0,16	10,06±1,26
2	67,40±2,78	23,08±2,89	67,34±3,17	45,23±1,66	25,80±3,47	9,01±0,79	2,88±0,47	2,37±0,22	10,46±1,63
8	64,50±3,99	20,51±1,65	64,62±2,44	47,51±2,07	27,08±3,22	9,30±0,82	2,92±0,38	2,29±0,18	9,45±0,93
16	66,18±1,33	21,96±2,05	65,83±2,37	45,61±1,77	28,14±1,57	8,56±0,46	3,29±0,24	2,36±0,18	9,73±1,26
32	65,65±3,23	20,01±2,18	65,54±3,19	45,04±1,79	23,71±7,34	8,57±0,61	2,73±0,79	2,43±0,16	12,34±2,02
CV	5,45	9,73	5,40	4,05	16,37	8,09	16,52	7,24	11,02
ANOVA									
Cálcio	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Vitamina K	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cálcio*Vitamina K	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,001*

NS= não significativo (P > 0,05). * Valor do P.

O desdobramento da interação para variável percentagem de osso medular na diáfise da tíbia está descrita na Tab.11. Observou-se que a maior quantidade de osso medular foi encontrado quando a ave recebeu 1,4% de Ca e 6,08 mg/kg de vitamina K na ração durante a fase de recria. Quando se forneceu um nível mais baixo de Ca, 0,8%, a vitamina K não apresentou efeito sobre o parâmetro analisado.

Tabela 11: Desdobramento da interação entre cálcio e vitamina K para percentagem de osso medular da tíbia de poedeiras com 32 semanas.

Ca	Vitamina K (mg/Kg)					Efeito	R ²
	0	2	8	16	32		
0,8	10,75	11,11	9,96	9,06	10,52	NS	
1,4*	9,54	9,80	9,07	10,23	13,71	Q	0,71

Equação da Regressão

$$\text{Osso Medular} = 9,648 - 0,0789\text{vitK} + 0,00648\text{vitK}^2$$

NS= Não significativo; Q= Efeito quadrático.

Trabalhando com a suplementação de vitamina K, Fleming et al. (1998) observaram aumento do volume de osso medular em aves com 25 semanas de idade. O mesmo grupo de pesquisadores observaram efeitos benéficos da inclusão de 10 mg/Kg vitamina K na dieta, em aves com idade de 15, 25 e 70 semanas. Fatores nutricionais apresentam efeitos amplos sobre as características ósseas. No entanto, essa influência no osso se dá em maior quantidade durante a fase de postura, fato esse comprovado com a elevação da densidade óssea em aves com 70 semanas de idade, ainda suplementadas com vitamina K (Fleming et al., 2003).

A vitamina K atua como cofator convertendo resíduos de ácido glutâmico para ácido carboxi gama glutâmico, que liga as proteínas Ca dependentes, auxiliando na regulação do Ca no corpo (Hamidi et al., 2013). Uma melhora na qualidade óssea foi relatada por Fernandes et al. (2009), que encontrou comportamento quadrático do teor de cinzas nos ossos em relação aos níveis de vitamina K na dieta.

Nota-se que o tratamento com vitamina K, em uma dieta contendo 1,4% de Ca durante a fase de recria, apresenta efeito residual favorecendo uma melhora na quantidade de osso medular, esse osso medular dará um aporte de Ca durante a formação da casca do ovo, evitando ou diminuindo as retiradas de Ca do osso cortical e, eventualmente, diminuindo a incidência de fraturas ósseas, ou até mesmo reduzindo os índices de osteoporose em aves mais velhas.

Conclusão

A utilização de uma dieta suplementada com o nível de 1,4% de Ca e níveis de vitamina K durante a recria aumentou a quantidade de osso medular na tíbia, em poedeiras com 32 semanas de idade.

Referências

- BAR, A. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: mechanisms and regulation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* v.152, p.447–69, 2009.
- ETCHES, R.J. Calcium logistics in the laying hen. *J. Nutr.* v.117, p.619–28, 1987.
- FERNANDES, J.I.M.; MURAKAMI, A.E.; SCAPINELLO, C.; et al. Effect of vitamin K on bone integrity and eggshell quality of white hen at the final phase of the laying cycle. *Rev. Bras. Zootec.* v.38, p.488–492, 2009.
- FLEMING, R.H.; MCCORMACK, H. A; MCTEIR, L.; et al. Effects of dietary particulate limestone, vitamin K3 and fluoride and photostimulation on skeletal morphology and osteoporosis in laying hens. *Br. Poult. Sci.* v.44, p.683–9, 2003.
- FLEMING, R.H.; MCCORMACK, H. A; MCTEIR, L.; et al. Relationships between genetic, environmental and nutritional factors influencing osteoporosis in laying hens. *Br. Poult. Sci.* v.47, p.742–55, 2006.
- FLEMING, R.H.; MCCORMACK, H.A.; AND WHITEHEAD, C.C. Bone structure and strength at different ages in laying hens and effects of dietary particulate limestone, vitamin K and ascorbic acid. *Br. Poult. Sci.* v.39, p.434–40, 1998.
- GHISE, A.; CARPINISAN, L.; RADA, O.; et al. Determination of haematological and biochemical parameters in hens at different stages of the egg formation biochimici la gaini in diferite stadii de formare. v.42, p.247–252, 2009.
- HAMIDI, M.S.; GAJIC-VELJANOSKI, O.; AND CHEUNG, A.M. Vitamin k and bone health. *J. Clin. Densitom.* v.16, p.409–13, 2013.
- JENDRAL, M.J.; KORVER, D.R.; CHURCH, J.S.; et al. Bone mineral density and breaking strength of White Leghorns housed in conventional, modified, and commercially available colony battery cages. *Poult. Sci.* v.87, p.828–37, 2008.
- KIM, W.K.; DONALSON, L.M.; HERRERA, P.; et al. Research note: Effects of different bone preparation methods (fresh, dry, and fat-free dry) on bone parameters and the correlations between bone breaking strength and the other bone parameters. *Poult. Sci.* v.83, p.1663–6, 2004.
- KLACK, K.; AND CARVALHO, J.F. de. Vitamina K: metabolismo, fontes e interação com o anticoagulante varfarina. *Rev. Bras. Reumatol.* v.46, p.398–406, 2006.
- MILLER, S.C.; AND BOWMAN, B.M. Medullary bone osteogenesis following estrogen administration to mature male Japanese quail. *Dev. Biol.* v.87, p.52–63, 1981.

RATH, N.C.; HUFF, G.R.; HUFF, W.E.; et al. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poult. Sci.* v.79, p.1024–32, 2000.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para suínos e aves: composição de alimentos e exigências nutricionais** (HS Rostagno, Ed.). 3º ed. UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

SEEDOR, J.G.; QUARTUCCIO, H.A.; AND THOMPSON, D.D. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J. Bone Miner. Res.* v.6, p.339–46, 1991.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise dos Alimentos: Métodos químicos e biológicos**, 3ª edição, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004.

WHITEHEAD, C.C. Overview of bone biology in the egg-laying hen. *Poult. Sci.* v.83, p.193–9, 2004.

WHITEHEAD, C.C.; AND FLEMING, R.H. Osteoporosis in cage layers. *Poult. Sci.* v.79, p.1033–41, 2000.

WHITEHEAD, C.C.; MCCORMACK, H.A.; MCTEIR, L.; et al. High vitamin D3 requirements in broilers for bone quality and prevention of tibial dyschondroplasia and interactions with dietary calcium, available phosphorus and vitamin A. *Br. Poult. Sci.* v.45, p.425–36, 2004.

V- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados obtidos nesse experimento, foi possível afirmar que a vitamina K associada a níveis elevados de Ca influenciou na absorção do Ca, melhorando a qualidade óssea e melhorando perfil sanguíneo em aves com 18 semanas de idade.

Foi observado que o tratamento durante a fase de recria aumentou a quantidade de osso medular, que se manteve até as 32 semanas de idade, apresentando efeito residual da utilização da vitamina K durante a fase de postura. No entanto, esse efeito só foi constatado quando o nível de Ca da dieta foi de 1,4%. Para as demais variáveis de qualidade óssea, não se observou melhorias da adição de vitamina K.

Os dados permitiram inferir que é necessário aumentar os níveis de vitamina K e Ca, atualmente utilizados 2mg/kg e 0,8%, respectivamente, nas dietas de frangas na fase de recria, para obtenção de melhoria óssea que se refletem nas fases de produção. Esse ganho em área de osso medular se manteve durante a primeira fase de postura, e, possivelmente, resultou em diminuição nos processos de perda de osso cortical para produção de casca de ovos. Espera-se que as mesmas aves na segunda fase de postura tenham tido redução em problemas ósseos e melhoria de bem estar por redução de problemas de fraturas.