



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

TESE DE DOUTORADO

**INTERAÇÕES DE
ADSORVENTE DE
MICOTOXINAS COM
MINERAIS EM DIETAS DE
FRANGOS DE CORTE**

ALINE FÉLIX SCHNEIDER

LAGES, SC, 2017

ALINE FÉLIX SCHNEIDER

**INTERAÇÕES DE ADSORVENTE DE MICOTOXINAS COM MINERAIS EM
DIETAS DE FRANGOS DE CORTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Dr. Clóvis Eliseu Gewehr

**LAGES
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Félix Schneider, Aline
INTERAÇÕES DE ADSORVENTE DE MICOTOXINAS COM
MINERAIS EM DIETAS DE FRANGOS DE CORTE / Aline
Félix Schneider. - Lages , 2017.
115 p.

Orientador: Clóvis Eliseu Gewehr
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages,
2017.

1. Aditivos anti-micotoxinas. 2. Bentonita . 3.
Cálcio. 4. Fósforo. I. Gewehr, Clóvis Eliseu. II.
Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação. III. Título.

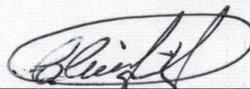
ALINE FÉLIX SCHNEIDER

INTERAÇÕES DE ADSORVENTE DE MICOTOXINAS COM MINERAIS EM
DIETAS DE FRANGOS DE CORTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração Produção Animal.

Banca Examinadora

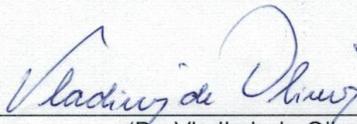
Orientador: _____



(Dr. Clóvis Eliseu Gewehr)

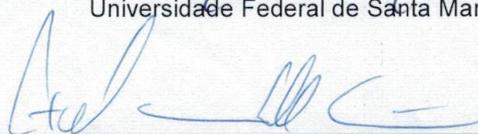
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membros: _____



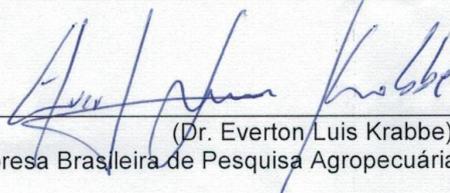
(Dr. Vladimir de Oliveira)

Universidade Federal de Santa Maria - UFSM



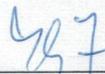
(Dr. Fabiano Dahlke)

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC



(Dr. Everton Luis Krabbe)

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA



(Dr. Thiago El Hadi Perez Fabregat)

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Lages, 23 de fevereiro de 2017.

Dedico, com todo meu amor, aos grandes mestres da minha vida: meus pais e meus avós!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por atender ao meu chamado diário e vir comigo todos os dias, para todos os lugares que vou, em tudo que faço.

À minha família e amigos, que próximos ou distantes fornecem seu apoio e suporte, com respostas de amor aos meus momentos de estresse e ausência. Agradeço em especial a minha mãe Zenaide Félix Schneider, meu pai Ivanei Cruz Schneider e irmã Priscilla Félix Schneider, pela paciência, compreensão, apoio irrestrito e boas energias emanadas através de pensamentos de fé e amor. Agradeço aos meus avós, pelos exemplos dados e deixados que me remonte a sempre buscar o bem, o trabalho e a verdade! Agradeço acima de tudo, por serem o mastro que me orienta, quando os ventos param de soprar sei para onde seguir!

Ao meu melhor amigo, parceiro que alegra meus dias e noivo Thiago Bedin, por continuar despertando a melhor parte de mim!

Aos colegas pós-graduandos que passaram pelo CAV nos últimos anos e deixaram sua contribuição nesse período; Jonathan Barbosa, Paula Horácio César, Cleverson de Souza, Franciele Sordi. Ao colega Felipe Ceolin pelo auxílio na compra de insumos. Em especial agradeço a três pós-graduandos: Ao Flavio Manabu Yuri, com quem pude partilhar diversos momentos, das responsabilidades do setor aos divertidos cafés, pela amizade e lealdade ao longo dos anos! À Jaqueline Kunhen Mayer, pelas inúmeras manhãs geladas de execução das análises, que iniciavam antes das 7 horas da manhã, pela amizade, pelas risadas, pelas cuias de chimarrão, pelo companheirismo! À Amanda D'Avila Verardi, pela atenção constante, interesse em ajudar e por nos transmitir uma tranquilidade ao longo desses quatro anos, que nos fez muito bem!

Aos bolsistas e estagiários do Setor de Avicultura do CAV que possibilitam a execução dos projetos de pesquisa, sacrificando seus sábados, domingos e feriados, estando presentes em clima de descontração e harmonia, o que faz o trabalho tornar-se extremamente prazeroso!

Em minha jornada acadêmica, vários professores foram importantes, alguns decisivos, outros inesquecíveis! E assim agradeço a todos os mestres que passaram por minha vida acadêmica, da pré-escola ao doutorado! Grandes exemplos, grandes ensinamentos e uma admiração imensurável pela escolha de ser professor!

Em especial, agradeço ao professor Clóvis Eliseu Gewehr pela oportunidade e amizade nos últimos seis anos; além das ricas discussões sobre avicultura, agradeço pelas inúmeras conversas sobre política e economia, sobre ética e formação! Agradeço por nos fornecer a base que nos possibilita um crescimento pessoal e profissional!

Ao professor Henrique Ribeiro Filho pelas análises realizadas no Laboratório de Bromatologia do CAV, e neste ao laboratorista Maurílio pelo auxílio fornecido.

Aos professores do Departamento de Solos do CAV / UDESC pela concessão de seus dias para análises laboratoriais: Letícia Sequinatto, Jackson Adriano Albuquerque, Ildegardis Bertol, Júlio César Pires Santos, Davi Miquelutii, Álvaro Luiz Mafra e Marcelo Alves Moreira.

À professora Mere Erika Saito e a pós-graduanda Julieta Volpato pelo auxílio nas análises séricas, bem como aos demais participantes do Laboratório de Patologia Clínica do CAV.

Ao professor Luiz Claudio Milleti, pelo auxílio com empréstimos de equipamentos e concessão de reagentes! Grande admiração!

Ao professor Célsio Pilati, pela amizade em todos esses anos! O curso de doutorado tornou-se um objetivo porque um dia me foi concedida a oportunidade de uma bolsa de iniciação científica, na 3ª fase da graduação, que foi o início do interesse pela pesquisa! Obrigada professor Célsio!

Aos professores que participaram da banca de Qualificação do Doutorado, Prof. Vladimir de Oliveira e Prof. Thiago El Hadi Fabregat, pela disponibilidade e auxílio com proveitosos questionamentos, que contribuíram para o crescimento do projeto.

As Irmãs Clarissas, pelas preces e orações!

À FAPESC pelo auxílio financeiro através da concessão de bolsa de pesquisa.

Ao Setor de Avicultura e a FIEPE CAV que através de seu trabalho possibilitaram a execução dos experimentos, compra de reagentes e realização de análises.

Considero-me com uma enorme dívida de gratidão com a Universidade do Estado de Santa Catarina, e assim agradeço a todos os catarinenses que através de seus impostos permitiram que eu pudesse ter acesso à graduação e a pós-graduação.

Agradeço aos colaboradores dos serviços gerais, mecânica, limpeza, segurança, secretaria e todos que contribuem diariamente, dando o seu melhor para que a universidade cresça e continue transformando a vida de milhares de pessoas! Espero um dia poder retribuir e retornar ao estado de Santa Catarina toda a formação a mim concedida.

A todos que contribuíram para que chegasse até aqui e concluísse essa etapa que ousou chamar de sonho, muito obrigada!

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar possíveis interações entre o adsorvente bentonita e os minerais cálcio e fósforo. Um ensaio foi conduzido com 240 frangos de corte, os quais foram submetidos a três dietas com 0,0, 0,25 e 0,50 % de bentonita. Não foram observadas diferenças no desempenho das aves, nos níveis séricos de cálcio, cloretos, ferro e magnésio, no entanto os níveis de fósforo foram reduzidos nas aves que ingeriram dieta com 0,50 % de bentonita. Em relação às tíbias, observou-se redução na matéria mineral (g e %) e no teor de cálcio com a inclusão de 0,50 % de bentonita e, redução nos níveis de fósforo com a inclusão de 0,25 e 0,50 % de bentonita. O segundo ensaio foi conduzido com o objetivo de determinar a digestibilidade verdadeira e o balanço dos minerais cálcio e fósforo em dietas sem e com a inclusão de bentonita. Foram utilizados 384 frangos de corte, submetidos a dietas com 0,0 e 0,50 % de bentonita e quatro níveis de minerais, atendendo em 90, 80, 70 e 60 % as exigências para cálcio e fósforo, dispostos em arranjo fatorial, totalizando oito tratamentos. Através do método de coleta total de excretas, observou-se que o coeficiente de digestibilidade da matéria mineral foi reduzido pela presença da bentonita. A ingestão, excreção e digestibilidade do cálcio não foram influenciadas. Já o cálcio absorvido, retido e endógeno foram reduzidos pela presença da bentonita. A regressão do cálcio ingerido sobre o digerido resultou nas seguintes equações $y = 0,69x + 0,27$ e $y = 0,68x + 0,24$ para dietas com inclusão 0,0 e 0,50 % de bentonita, respectivamente, sendo o valor do coeficiente angular a digestibilidade verdadeira, e o coeficiente linear as perdas endógenas. Através do método de coleta ileal observou-se que a bentonita reduziu a digestibilidade verdadeira do cálcio, e a regressão resultou nas seguintes equações: $y = 0,68x - 0,83$ e $y = 0,64x - 0,44$ para dietas sem e com bentonita, respectivamente. O contraste das equações obtidas nos métodos de coleta total vs ileal demonstrou que as perdas endógenas são maiores até o íleo. Em relação ao fósforo observou-se que a presença da bentonita reduziu o fósforo absorvido, retido e a digestibilidade aparente, e aumentou o fósforo excretado e o endógeno. A análise de regressão resultou nas seguintes equações $y = 0,67x - 0,44$ e $y = 0,66x - 0,51$ para dietas sem e com bentonita, respectivamente. Através do método de coleta ileal observou-se que a bentonita aumentou a excreção de fósforo endógeno e a regressão resultou nas seguintes equações: $y = 0,64x - 0,58$ e $y = 0,68x - 0,88$ para dietas sem e com bentonita, respectivamente. A comparação entre coleta total e ileal demonstrou que as perdas endógenas são maiores até o íleo. Conclui-se a presença de 0,5 % de bentonita na dieta de frangos de corte reduz os níveis séricos de fósforo, a deposição de cálcio e fósforo nas tíbias e altera a digestibilidade dos minerais cálcio e fósforo.

Palavras chave: Aditivos anti-micotoxinas. Bentonita. Cálcio. Fósforo.

ABSTRACT

This study aims to analyse the interactions between bentonite adsorbent and minerals calcium and phosphorus. An assay was carried out with 240 broilers, which were submitted to three diets with 0.0, 0.25 and 0.50 % of bentonite. No differences were observed on performance and serum levels of calcium, chloride, iron and magnesium, however phosphorus levels of broilers fed diet containing 0.5 % bentonite was reduced. With respect to tibia, it was observed reduction on mineral matter (g and %) and calcium levels with inclusion of 0.50 % bentonite, and reduction on phosphorus levels with inclusion of 0.25 and 0.50 % of bentonite on diet. The second assay was carried out to determine the true digestibility and balance of calcium and phosphorus minerals in diets without and with bentonite inclusion. 384 broilers were submitted to diets with 0.0 and 0.50 % of bentonite and four levels of minerals, meeting requirement on 90, 80, 70 and 60 % of calcium and phosphorus, in a factorial arrangement, totalizing eight treatments. Through excretion total collection method, it was observed the mineral matter digestibility coefficient was reduced by the presence of bentonite. The calcium intake, excreted and digestibility were not influenced by the presence of the adsorbent. Calcium absorbed, retained and endogenous were reduced by bentonite. The regression of ingested calcium on digested calcium resulted in the following equations: $y = 0.69x + 0.27$ and $y = 0.68x + 0.24$, for the diets with 0.0 and 0.50 % bentonite inclusion, respectively, been the slope of the regression line the true digestibility coefficient and regression line intercept the endogenous losses. Through the ileal collection method it was observed that bentonite reduced true digestibility of calcium, and the regression resulted in the following equations: $y = 0.68x - 0.83$ and $y = 0.64x - 0.44$ for diets without and with bentonite, respectively. The contrast between equations obtained with total and ileal collection methods showed endogenous losses are higher until ileo. With respect to phosphorus, it was observed the presence of bentonite decreased phosphorus absorbed, retained and aparent digestibility, and increased excreted and endogenous phosphorus. The regression analisys resulted in the following equations: $y = 0.67x - 0.44$ and $y = 0.66x - 0.51$ for diets without and with bentonite, respectively. Through the ileal collection method it was observed that bentonite increased endogenous phosphorus excretion, and regression resulted in the following equations: $y = 0.64x - 0.58$ e $y = 0.68x - 0.88$ for diets without and with bentonite, respectively. The contrast between total and ileal collection showed endogenous losses are higher until ileo. It was concluded the presence of 0.5 % of bentonite in broilers diet reduced phosphorus serum levels, deposition of calcium and phosphorus in tibia, and change the digestibility of calcium and phosphorus minerals.

Keywords: Anti-mycotoxins additives. Bentonite. Calcium. Phosphorus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da bentonita.	41
Gráfico 1 - Digestibilidade verdadeira e perdas endógenas de cálcio estimadas através dos métodos de coleta total das excretas e coleta ileal da digesta, de aves alimentadas com dieta sem a inclusão de bentonita.....	86
Gráfico 2 - Digestibilidade verdadeira e perdas endógenas de cálcio estimadas através dos métodos de coleta total das excretas e coleta ileal da digesta, de aves alimentadas com dieta com inclusão de 0,5 % de bentonita.....	86
Gráfico 3 - Digestibilidade verdadeira e perdas endógenas de fósforo estimadas através dos métodos de coleta total das excretas e coleta ileal da digesta, de aves alimentadas com dieta sem inclusão de bentonita.....	96
Gráfico 4 - Digestibilidade verdadeira e perdas endógenas de fósforo estimadas através dos métodos de coleta total das excretas e coleta ileal da digesta, de aves alimentadas com dieta com a inclusão de 0,5 % de bentonita.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional e calculada das dietas fornecidas as aves até os 13 dias de idade.....	52
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas e composição da bentonita utilizada.	53
Tabela 3 - Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio “Bentonita”, sem inclusão (0,0), com inclusão de 0,25 e 0,50 % de bentonita.....	54
Tabela 4 - Dietas experimentais utilizadas no ensaio “Digestibilidade” atendendo em 90, 80, 70 e 60% das exigências nutricionais para cálcio e fósforo determinadas por Rostagno et al. (2011), sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,5 % de bentonita.	57
Tabela 5 – Peso médio inicial, consumo de ração, peso médio final, ganho de peso médio diário e conversão alimentar de frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,25 ou 0,50 % de bentonita.	69
Tabela 6 - Níveis dos minerais séricos cálcio, cloretos, ferro, fósforo e magnésio de frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,25 ou 0,50 % de bentonita.....	70
Tabela 7 - Variáveis ósseas, teor de matéria mineral, cálcio, fósforo e relação cálcio / fósforo de tíbias de frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,25 ou 0,50 % de bentonita.	72
Tabela 8 - Peso médio inicial, consumo de ração, peso médio final, ganho de peso médio diário e conversão alimentar de frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, em diferentes níveis de cálcio e fósforo. ...	75
Tabela 9 - Coeficientes de digestibilidade da matéria seca (CDMS) e mineral (CDMM), balanço de cálcio, coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) e verdadeiro (CDV) de cálcio, para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, em diferentes níveis de cálcio e fósforo.	77
Tabela 10 - Regressão do cálcio ingerido (g/kg MS) sobre o cálcio total digerido (g/kg MS), para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, através do método de coleta total das excretas.....	81
Tabela 11 - Contrastes polinomiais ortogonais de coeficiente de digestibilidade da matéria mineral (CDMM), balanço de cálcio, coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e verdadeiro (CDV) de cálcio, para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita.....	82

Tabela 12 - Coeficiente de digestibilidade ileal aparente (CDIA), ileal verdadeiro (CDIV) e cálcio ileal endógeno (CaIE), para de frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, em diferentes níveis de cálcio e fósforo. 83

Tabela 13 - Regressão do cálcio ingerido (g/kg MS) sobre o cálcio digerido (g/kg MS), para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, através do método de coleta ileal da digesta. 84

Tabela 14 - Contrastes polinomiais ortogonais de coeficientes de digestibilidade ileal aparente (CDIA), ileal verdadeiro (CDIV) e cálcio ileal endógeno (CaIE), para de frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita. 85

Tabela 15 - Balanço de fósforo, coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) e verdadeiro (CDV) de fósforo, para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, em diferentes níveis de cálcio e fósforo. 88

Tabela 16 - Regressão do fósforo ingerido (g/kg MS) sobre o fósforo total digerido (g/kg MS), para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, através do método de coleta total das excretas. 91

Tabela 17 - Contrastes polinomiais ortogonais de balanço de fósforo, coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e verdadeiro (CDV) de fósforo, para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita. 92

Tabela 18 - Coeficiente de digestibilidade ileal aparente (CDIA), ileal verdadeiro (CDIV) e fósforo ileal endógeno (PIE), para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, em diferentes níveis de cálcio e fósforo. 94

Tabela 19 - Regressão do fósforo ingerido (g/kg MS) sobre o fósforo digerido (g/kg MS), para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, através do método de coleta ileal da digesta. 94

Tabela 20 - Contrastes polinomiais ortogonais de coeficientes de digestibilidade ileal aparente (CDIA), verdadeiro (CDIV) e fósforo ileal endógeno (PIE), para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita. 95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	FORMULAÇÃO DO PROBLEMA.....	32
1.2	JUSTIFICATIVA	32
1.3	OBJETIVOS.....	33
1.3.1	Objetivo geral	33
1.3.2	Objetivos específicos	33
1.4	HIPÓTESES	33
2	REVISÃO DE LITERATURA	35
2.1	MICOTOXINAS.....	35
2.2	ADSORVENTES DE MICOTOXINAS OU ADITIVOS ANTI-MICOTOXINAS.....	38
2.2.1	Definição	38
2.2.2	Mecanismos de adsorção	38
2.2.3	Adsorventes	39
2.2.3.1	<i>Bentonitas</i>	40
2.3	MINERAIS	42
2.3.1	Cálcio	44
2.3.2	Fósforo	45
2.4	INTERAÇÕES ENTRE MINERAIS E ADSORVENTES DE MICOTOXINAS	47
3	MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1	ENSAIO BENTONITA	52
3.1.1	Dietas experimentais	53
3.1.2	Variáveis zootécnicas	54
3.1.3	Análises de sangue	55
3.1.4	Análises de túbias	55
3.2	ENSAIO “DIGESTIBILIDADE”	56
3.2.1	Dietas experimentais	56
3.2.2	Variáveis zootécnicas	58
3.2.3	Coleta total de excretas	58
3.2.4	Coleta ileal da digesta	58
3.3	ANÁLISES LABORATORIAIS	59
3.3.1	Matéria Seca	59
3.3.2	Matéria mineral	60
3.3.3	Solução mineral para leitura de cálcio e fósforo	60

3.3.4	Leitura de cálcio	61
3.3.4.1	<i>Solução de estrôncio 5 %.....</i>	61
3.3.4.2	<i>Solução de ácido clorídrico 50 %.....</i>	61
3.3.4.3	<i>Solução padrão de cálcio</i>	61
3.3.4.4	<i>Curva.....</i>	61
3.3.4.5	<i>Leitura das amostras.....</i>	62
3.3.4.6	<i>Cálculo do teor de cálcio (%)......</i>	62
3.3.5	Leitura de fósforo	62
3.3.5.1	<i>Solução ácida de molibdato de amônio</i>	62
3.3.5.2	<i>Solução de vitamina C 2 %</i>	63
3.3.5.3	<i>Solução padrão de fósforo</i>	63
3.3.5.4	<i>Curva padrão.....</i>	63
3.3.5.5	<i>Leitura de amostras.....</i>	64
3.3.5.6	<i>Cálculo do teor de fósforo (%)......</i>	64
3.3.6	Cinza insolúvel em ácido.....	64
3.4	COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE E BALANÇO MINERAL	65
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
3.5.1	Ensaio Bentonita	67
3.5.2	Ensaio Digestibilidade	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1	ENSAIO BENTONITA	69
4.2	ENSAIO DIGESTIBILIDADE	75
4.2.1	Cálcio	76
4.2.1.1	<i>Coleta total.....</i>	76
4.2.1.2	<i>Coleta ileal.....</i>	83
4.2.1.3	<i>Comparação entre coleta total e coleta ileal</i>	85
4.2.2	Fósforo	86
4.2.2.1	<i>Coleta total.....</i>	87
4.2.2.2	<i>Coleta ileal.....</i>	93
4.2.2.3	<i>Comparação entre coleta total e coleta ileal</i>	95
5	CONCLUSÃO.....	101
	REFERÊNCIAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira destaca-se mundialmente pelos excelentes índices produtivos, sendo o Brasil atualmente o maior exportador e segundo maior produtor de carne de frango do mundo. No ano de 2015 foram produzidas 13,1 milhões de toneladas de carne de frango, sendo que destas aproximadamente 33 % foram destinadas a exportação (ABPA, 2016). O desenvolvimento acelerado da produção avícola nas últimas décadas definiu a atividade como produtora de uma das principais fontes de proteína para alimentação humana.

Para que as metas competitivas e produtivas sejam alcançadas, a avicultura deve estar alicerçada em alguns pilares como o melhoramento genético, a nutrição, a sanidade e o manejo dos lotes, os quais representam elos de uma cadeia produtiva que se mantidos coesos e em equilíbrio resultam em altos índices produtivos.

No entanto, a produção animal de forma global enfrenta diariamente o desafio do controle das micotoxinas, metabólitos tóxicos produzidos por fungos filamentosos, popularmente conhecidos como bolores ou mofos. As micotoxinas interferem negativamente no metabolismo das aves, resultando em diversas apresentações clínicas e subclínicas, que vão desde quadros inespecíficos com quedas no desempenho zootécnico e imunossupressão, até quadros patológicos específicos, podendo levar a mortalidade expressiva e grande impacto econômico. Além disso, é importante destacar que, as micotoxinas podem se depositar no tecido muscular das aves, e conseqüentemente entrar na cadeia alimentar humana através do consumo de carnes, apresentando-se como um risco a saúde pública.

Visando o controle das micotoxinas, os adsorventes ou aditivos anti-micotoxinas vem sendo incluídos nas dietas animais com o intuito de ligarem-se as micotoxinas em nível intestinal impedindo sua absorção. As bentonitas (montmorilonita), minerais argilosos da família das esmectitas, são amplamente utilizadas na avicultura em virtude de seu baixo custo e sua eficácia na adsorção a micotoxinas, principalmente a aflatoxina.

No entanto, com base na estrutura química, e nos mecanismos de adsorção dos aditivos anti-micotoxinas, verifica-se uma possibilidade de ligação a vitaminas, minerais entre outros nutrientes, diminuindo sua disponibilidade para as aves. Neste

âmbito, faz-se necessário estudar a adsorção dos minerais, principalmente cálcio e fósforo, já que em quantidade, são os mais limitantes para as aves.

Com base no exposto, o objeto do presente trabalho foi avaliar possíveis interações entre o adsorvente de micotoxinas bentonita e os minerais cálcio e fósforo, sobre a concentração sérica, a deposição óssea e a digestibilidade, em dietas de frangos de corte.

1.1 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA

A inclusão de adsorventes de micotoxinas nas dietas das aves é prática frequente, visto os danos causados à sanidade e ao desempenho zootécnico pela presença destes metabólitos tóxicos. Como a inclusão é profilática, em situações práticas os adsorventes podem estar presentes em dietas com alto nível de micotoxinas ou com nível próximo a zero, ficando disponíveis para adsorverem moléculas em nível intestinal.

Alguns trabalhos na literatura atentam para a possibilidade de adsorventes de micotoxinas sequestrarem nutrientes no lúmen intestinal, limitando sua absorção e aumentando sua excreção (Briggs; Fox, 1956; Ramos; Hernandez 1997; Walz et al., 1998; Grosicki; Kowalski; Bik, 2004; Zaia; Zaia, 2006; Prvulovic et al., 2008; Lehnen et al., 2011; Gowda, Swamy; Mahajan, 2013).

1.2 JUSTIFICATIVA

Em virtude da presença frequente das micotoxinas nas dietas das aves, os adsorventes, como as bentonitas, são componentes usualmente utilizados. Dentre eles destaca-se a bentonita, que possui baixo custo e vem sendo amplamente adotada na produção animal. Por sua estrutura química, a qual é capaz de adsorver as micotoxinas, indaga-se a possibilidade de adsorver minerais diminuindo o valor nutricional das dietas.

Carências minerais prejudicam diretamente o desempenho e a sanidade das aves. Faz-se necessário avaliar essas reações através de experimentação e determinar seu possível impacto sobre o metabolismo dos minerais cálcio e fósforo para frangos de corte.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar a concentração sérica de minerais, deposição óssea e digestibilidade dos minerais cálcio e fósforo de frangos de corte recebendo dieta com inclusão do adsorvente bentonita.

1.3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os níveis séricos de cálcio, cloretos, ferro, fósforo e magnésio de frangos de corte recebendo dietas com zero, 0,25 % e 0,50 % de bentonita;
- b) Avaliar as características morfométricas ósseas, teor de matéria mineral, cálcio e fósforo nas tíbias de frangos de corte recebendo dieta com zero, 0,25 % e 0,50 % de bentonita;
- c) Avaliar o balanço, digestibilidade verdadeira e perdas endógenas de cálcio e fósforo oriundos de frangos de corte recebendo dietas com zero e 0,50 % de bentonita;
- d) Determinar o comportamento das variáveis de balanço, digestibilidade e perdas endógenas de cálcio e fósforo;
- e) Comparar as digestibilidades verdadeiras e perdas endógenas totais e ileais.

1.4 HIPÓTESES

A inclusão de 0,25 % de bentonita na dieta de frangos de corte não é capaz de provocar a redução dos minerais séricos cálcio, cloretos, ferro, fósforo e magnésio.

A inclusão de 0,25 % de bentonita na dieta de frangos de corte não altera as características morfométricas ósseas e a deposição de minerais nas tíbias das aves.

A inclusão de 0,5 % de bentonita na dieta de frangos de corte provoca a redução dos minerais séricos cálcio e fósforo.

A inclusão de 0,5 % de bentonita na dieta de frangos de corte provoca a mobilização de minerais ósseos.

A inclusão de 0,5 % de bentonita na dieta de frangos de corte adsorve os minerais cálcio e fósforo em nível intestinal, diminuindo sua disponibilidade para absorção e provocando aumento na excreção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICOTOXINAS

Micotoxinas são metabólitos secundários de fungos filamentosos, causadores de micotoxicoses. O termo micotoxina deriva das palavras “*mykes*” (fungo) e “*toxicon*” (veneno) (Murugesan et al., 2015). Existem evidências da presença das micotoxinas relatadas desde o Antigo Testamento, registradas nos livros de Êxodo e Jó, quando uma afecção denominada “peste” dizimou animais e humanos, no antigo Egito. Na Idade Média, relata-se a ocorrência de surtos de gangrena na população que consumia cereais contaminados por esclerotos do fungo *Claviceps purpurea*, episódio denominado “Fogo de Santo Antônio” (Mallmann; Dilkin; Mallmann, 2014). Apesar dos relatos longínquos, somente no início da década de 60 as micotoxicoses ganharam maior visibilidade e importância, quando foram relacionadas à “Doença X dos perus”, episódio no qual ocorreu a morte de aproximadamente 100.000 aves a partir do consumo de rações com farelo de amendoim contaminado com micotoxinas, no Reino Unido (Blount, 1961). O período compreendido entre 1960 e 1975 foi denominado “corrida de ouro das micotoxinas” onde diversos pesquisadores aplicaram seus recursos e dedicaram-se ao estudo e compreensão desses agentes toxigênicos (Bennett; Klich, 2003). Em 2013, uma pesquisa reuniu 3.000 amostras de grãos e alimentos para animais em todo o mundo, e revelou que 81 % das amostras continham no mínimo um tipo de micotoxina (Murugesan et al., 2015). As micotoxinas podem causar diversos problemas agudos e crônicos aos animais, principalmente os monogástricos, que apresentam maior susceptibilidade, impactando negativamente sobre os custos de produção (Zain, 2011).

A contaminação mundial dos alimentos por micotoxinas é um problema preocupante à saúde animal e humana. A produção de micotoxinas é favorecida por fatores extrínsecos ambientais, como áreas quentes e úmidas (clima tropical e subtropical), substrato (principalmente alimentos ricos em carboidratos), desenvolvendo-se em condições restritas como atmosfera contendo 0,1 a 0,2 % de oxigênio, ou mais de 80 % de dióxido de carbono, além dos fatores intrínsecos a espécie fúngica em questão, os quais são difíceis de serem controlados (Iamanaka et al., 2010; Zain, 2011). A contaminação por micotoxinas pode ocorrer em qualquer fase da cadeia de produção (Bryden, 2012), crescimento, colheita, ou estocagem.

Nem todos os fungos são toxigênicos, sendo os gêneros mais comumente relacionados à produção de micotoxinas os *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Iamanaka et al., 2010). Destacam-se como as micotoxinas de maior impacto sanitário e econômico, as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e alcaloides do ergot, sendo responsáveis por milhões de dólares perdidos anualmente em todo o mundo, na saúde animal, humana e em produtos agrícolas (Zain, 2011). Dentre essas, a aflatoxina é considerada o mais perigoso dos metabólitos secundários dos fungos, de ocorrência mundial (Ramos; Hernandez, 1997), sendo empregada até como arma biológica em programas de bioterrorismo (Bennett; Klich, 2003).

Estudos realizados *in situ*, demonstraram que as aflatoxinas são absorvidas por difusão passiva, em nível intestinal a uma taxa muito elevada (Ramos; Hernandez, 1996). Os mesmos autores atentam para a necessidade de adsorventes com elevada afinidade pela micotoxina, capazes de formar complexos estáveis, sem rupturas e liberação destes metabólitos. As aflatoxinas induzem a hipoproteinemia (Maciel et al., 2007), sendo que a redução da síntese proteica afeta diretamente a resposta imune das aves (Santin et al., 2002). O maior problema causado pelas dietas contaminadas por micotoxinas não são os episódios de doenças agudas, e sim as baixas doses ingeridas por longo período que causam diversas desordens metabólicas, reduzindo consideravelmente os índices de produtividade (Bryden, 2012). Além dos problemas causados à saúde animal, a presença de fungos nos grãos altera significativamente seu valor nutricional, reduzindo o teor de energia dos mesmos (Silva et al., 2008). Os efeitos das micotoxinas podem ser potencialmente mais perigosos quando mais de uma micotoxina está presente na dieta, em virtude dos efeitos sinérgicos ou aditivos (Tasheva-Petkova; Christova-Bagdassarian; Ivanov; 2013).

O Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) determinou os limites máximos recomendados de várias micotoxinas para aves de produção. Tomando-se como exemplo a aflatoxina, para frangos de corte em fase inicial recomenda-se que as dietas contenham zero ppb, em fase de crescimento e terminação recomenda-se que tenham no máximo 2 e 5 ppb, respectivamente. O mesmo laboratório apresenta dados de análises micotoxicológicas, de 2004 a 2014, que demonstram que aproximadamente 50 % de todo o milho analisado estava contaminado, na concentração média de 19 ppb de

aflatoxina, 2.454 ppb de fumonisinas, 180 ppb de zearalenona e 367 ppb de deoxinivalenol (Mallmann, 2014), valores incompatíveis com as doses de segurança recomendadas.

Buscando regulamentar o controle das micotoxinas nos grãos, foi publicada a Resolução nº 7 de 18 de fevereiro de 2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, a qual determina os limites máximos tolerados (Imt) de micotoxinas em diferentes alimentos. Segundo esta resolução o limite máximo de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) no milho será de 20 µg/kg. Posteriormente, a RDC nº 59 de 26 de dezembro de 2013 prorroga os prazos para adequação para 1º de janeiro de 2017. Ao longo dos anos, observa-se o aumento da preocupação das entidades mundiais no controle de micotoxinas, haja vista que até o final de 2003 tem-se o relato de que aproximadamente 100 países (próximo a 85 % da população mundial) dispõem de regulamentos específicos ou diretrizes detalhadas para micotoxinas em alimentos (Van Egmond; Schothorst; Jonker, 2007).

A forma mais eficaz de prevenir os efeitos deletérios das micotoxinas é evitar a exposição das aves aos grãos contaminados (Santin et al., 2002), porém, frente as nossas reais condições de produção, esta solução apesar de ideal, pode ser considerada utópica. O controle desses agentes toxigênicos torna-se ainda mais difícil pela característica peculiar das micotoxinas em não apresentarem imunogenicidade (Bryden, 2012). É importante frisar que as micotoxinas podem manter-se presentes nos alimentos, mesmo após a destruição dos fungos que as originaram (Iamanaka et al., 2010). Sendo assim, para controle das micotoxinas nos grãos contaminados, dispõem-se atualmente de métodos químicos, com a utilização de compostos químicos, como ozônio e amônia; métodos biológicos, através da fermentação por microrganismos; e os métodos físicos, que consistem da utilização de adsorventes de micotoxinas na dieta, sendo o último, o mais comumente utilizado (Huwig et al., 2001).

Em virtude das desvantagens dos métodos químicos e biológicos de controle de micotoxinas nas dietas animais, os métodos físicos são as alternativas mais seguras e eficazes na prevenção da toxicidade das micotoxinas (Carão et al., 2014). Sendo assim, adsorventes também chamados de aditivos antimicotoxinas, tem sido comumente incluídos nas rações de aves e suínos (Southern et al., 1994), os quais sequestram as micotoxinas e reduzem a sua absorção intestinal, evitando seus efeitos tóxicos e o carreamento das toxinas para os produtos de origem animal

(Ramos; Hernandez, 1997), que poderiam perigosamente chegar à alimentação humana, através do consumo de carnes, ovos e leite (Maziero; Bersot, 2010).

2.2 ADSORVENTES DE MICOTOXINAS OU ADITIVOS ANTI-MICOTOXINAS

2.2.1 Definição

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA define como aditivo toda “substância, microrganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano”. Os aditivos são classificados como tecnológicos, sensoriais, nutricionais, zootécnicos e anticoccidianos. De acordo com a Instrução normativa nº 13, adsorventes são considerados aditivos tecnológicos e, podem ser definidos como substâncias capazes de fixar moléculas (Brasil, 2004). Sendo assim, adsorção pode ser entendida como um processo de acúmulo ou concentração seletiva de determinadas moléculas em uma superfície sólida.

2.2.2 Mecanismos de adsorção

Os processos de adsorção podem ser qualificados como físicos ou químicos, distinguindo-se pelo tipo de força envolvida. Adsorção física ocorre através de ligação do tipo Van Der Waals, de forma geral para qualquer espécie; enquanto a adsorção química ou quimissorção ocorre através de ligações específicas entre adsorvente e adsorvato (ligações covalentes e forças eletrostáticas), sendo um processo específico e seletivo (Teixeira; Coutinho; Gomes, 2001).

A adsorção é dependente principalmente da estrutura física do adsorvente que engloba a carga total, a distribuição da carga, o tamanho dos poros e, a área de superfície acessível. Além das características do adsorvente, devem ser consideradas as características das moléculas de adsorção, no caso as micotoxinas, como a polaridade, distribuição de carga (para compostos ionizados), solubilidade, tamanho e forma (Huwig et al., 2001). Como exemplo disso pode-se citar os

aluminossilicatos, que são eficazes na redução dos efeitos deletérios das aflatoxinas (Scheideler, 1993), todavia parecem não ter ação sobre as ocratoxinas (Santin et al., 2002). Sendo assim, a eficácia do processo de adsorção deve ser investigada diante das características físico químicas do adsorvente e adsorvato em questão (Huwig et al., 2001).

A exemplo dos processos de remoção de metais pesados, a ligação de aluminossilicatos depende de alguns fatores como pH e concentração da solução do meio, já que em pH extremamente ácido, ocorre o colapso da estrutura do aluminossilicato, e em soluções muito concentradas observa-se queda na eficiência do processo (Aguar; Novaes; Guarino, 2002).

Sabe-se que a adsorção de cobre pela bentonita aumenta linearmente de acordo com o pH do meio. Além disso, na medida em que se aumenta a concentração do elemento mineral na solução, os sítios de adsorção vão sendo preenchidos, reduzindo a capacidade de adsorção do material; ou seja, o aumento da força iônica da solução reduz o processo adsorptivo (Tito et al., 2008), o que corrobora com a afirmação dos autores supracitados. O pH influencia os processos adsorptivos pelo caráter anfótero dos argilominerais, ou seja, em função da variação do pH os sítios adsorptivos mudam sua carga, podendo haver uma adsorção ou dessorção (Duarte-Neto et al., 2014).

A eficácia dos adsorventes reside em sua capacidade de se ligar a micotoxina a nível intestinal, tornando-a indisponível para absorção (Southern et al., 1994), porém sabe-se que os aditivos antimicotoxinas podem ser altamente eficazes para determinada micotoxina e inespecíficos para outras (Bryden, 2012). É importante destacar que adsorventes como as argilas podem interagir com nutrientes, minerais e outros componentes da dieta (Wiles et al., 2004).

2.2.3 Adsorventes

Os adsorventes de micotoxinas mais utilizados e estudados são os aluminossilicatos (principalmente as zeólitas), aluminossilicatos cálcicos e sódicos hidratados (HSCAS) e aluminossilicatos contendo argilas. Os minerais de argilas são silicatos em camadas que podem ser representados pela fórmula química $[\text{Si}_2\text{O}^{2-}_5]_{xy}$. As zeólitas são compostas por tetraedros de SiO_4 e AlO_4 interligados com átomos centrais de oxigênio, representadas pela fórmula $[\text{AlSi}_3\text{O}_8^-]_{xyz}$. Já os HSCAS

apresentam íons de cálcio e prótons que são trocados naturalmente com os íons de sódio. São montmorilonitas pertencente aos filossilicatos, estruturalmente compostos por camadas de alumínio e silício interligados, sendo o arranjo da estrutura distribuído em razão de 1:1 ou 2:1 (Huwig et al., 2001). Diversos minerais têm capacidade de adsorção como as zeólitas, diatomitas e bentonitas (Bočarov-Stančić et al., 2011).

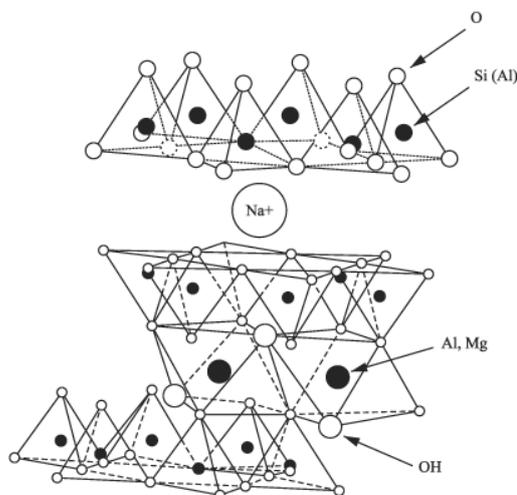
2.2.3.1 *Bentonitas*

Bentonita é a denominação genérica de argilominerais do grupo das esmectitas, independente da sua origem ou ocorrência. A denominação “bentonita” foi dada por Wilbur C. Knight em 1898 (Osalo; Merufinia; Saatlo, 2013). Os maiores produtores de bentonita mundiais são os Estados Unidos, que concentram aproximadamente 43 % de toda a produção (Teixeira-Neto; Teixeira-Neto, 2009). Dados do Departamento Nacional de Produção Mineral (2014) estimam as reservas nacionais de bentonita em 35,7 Mt, sendo que o estado do Paraná concentra as maiores jazidas (44,7 %), seguido pelos estados de São Paulo (24,2 %), Paraíba (20,8 %), Bahia (8,4 %) e Rio Grande do Sul (2,0 %). A extração de bentonitas pode ser destinada ao beneficiamento da mesma, ou a extração de petróleo/gás, graxas e lubrificantes, construção civil, cosméticos entre outras funções (Brasil, 2014).

As bentonitas são amplamente utilizadas na avicultura industrial como adsorventes de baixo custo. Bentonitas possuem estrutura química (Figura 1) cristalina composta por tetraedros de SiO_2 e octaedros de Al_2O_3 , que estão interligados formando placas de três camadas com uma carga negativa, enquanto as arestas das lamelas têm carga positiva (Bočarov-Stančić et al., 2011). A carga negativa é balanceada por cátions de compensação (alcalinos ou alcalino-terrosos), geralmente Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} , os quais podem se mover nos canais e podem ser trocados por outros cátions em solução (Aguiar; Novaes; Guarino, 2002).

A capacidade de troca catiônica (quantidade de cátions que um argilomineral pode adsorver e trocar) é uma característica inerente aos minerais como as argilas, resultante de substituição isomórfica dos átomos de silício de sua estrutura cristalina por átomos de alumínio trivalente. O desequilíbrio de cargas elétricas na estrutura da argila será compensado por cátions presentes no espaço interlamelar (Dal Bosco; Vignado; Carvalho, 2006).

Figura 1 - Estrutura química da bentonita.



Fonte: Costa Filho; Gomes; Lucas, 2005.

Em relação às micotoxicoses, o efeito profilático das bentonitas consiste em ligarem-se as micotoxinas irreversivelmente no intestino e impedir sua absorção através do epitélio (Indresh et al., 2013). Em dietas com 3 ppm de aflatoxina, a adição de 0,3 % de bentonita sódica reduz os efeitos negativos dessas micotoxinas sobre os frangos de corte (Lopes et al., 2006). Outros autores demonstram que a bentonita pode aumentar o consumo de ração e melhorar o desempenho de frangos de corte (Southern et al., 1994). Já Indresh et al. (2013) recomendaram a dose de 1 % de bentonita na dieta de frangos de corte para eliminar os efeitos adversos da aflatoxina sobre desempenho zootécnico, mortalidade, peso de órgãos, proteínas séricas e títulos de anticorpos contra Doença de Newcastle e Doença de Gumboro. Desheng et al. (2005) afirmam que a dose de 0,5 % reduz os efeitos adversos de 200µg/kg de aflatoxina B1, sobre o desempenho de frangos de corte.

A adição de 0,5 % de montmorilonita sódica em dietas de frangos de corte contaminadas com 3 ppm de aflatoxina é eficaz na prevenção dos efeitos tóxicos da aflatoxina, porém observa-se diminuição dos níveis séricos de fósforo (Franciscato et al., 2006). Em contrapartida, a inclusão dos níveis de 15, 30, 45 g/kg de bentonita na dieta de frangos de corte machos, avaliados aos 42 dias de idade, não alterou os níveis de globulina, ureia, creatinina, colesterol, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), fosfatase alcalina (ALP), creatina-quinase (CK), glutamiltransferase (GGT) e lactato-desidrogenase (LDH), sendo que somente a

partir da inclusão de 30 g/kg houve aumento das proteínas totais séricas e albumina, assim os autores concluem pela recomendação do uso de bentonita como aditivo alimentar para frangos de corte (Safaeikatouli; Jafariahangari; Baharlouei; 2010). Southern et al. (1994), verificaram aumento na concentração de zinco nas tíbias de frangos de corte ingerindo dieta com bentonita, e acreditam que o mineral em aumento, seja oriundo do próprio adsorvente. A inclusão de bentonita sódica ou cálcica não provocou alterações sobre os parâmetros bioquímicos séricos, características de carcaças e teor de cinzas das tíbias, sendo recomendada na dose de 1 % de inclusão (Khanedar; Vakili; Zakizadeh, 2012).

O uso profilático de bentonita sobre os efeitos deletérios da aflatoxicose foi validado também para perus, espécie extremamente sensível, na qual a micotoxicose pode causar mortalidade elevada. A bentonita natural, na dose de 0,5 % foi capaz de reduzir a mortalidade em 35 %, em relação às aves que ingeriram dieta contaminada por aflatoxina (2000 ppb) sem o adsorvente em sua composição (Santurio et al., 1998).

Ramos e Hernandez (1997) atentam para a necessidade de estudos dos possíveis efeitos em longo prazo dos adsorventes sobre os nutrientes essenciais, como vitaminas e minerais, os quais podem ser tornar indisponíveis para os animais, acarretando em queda no desempenho zootécnico. Lehnen et al. (2011) verificou que a digestibilidade de minerais pode ser alterada pela presença do adsorvente na dieta.

2.3 MINERAIS

Os macrominerais cálcio e fósforo são elementos mais abundantes no organismo, estando 99 % do cálcio e 80 % do fósforo no esqueleto na forma de hidroxiapatita, sendo os minerais mais limitantes para as aves (Runho et al., 2001; Proszkowiec-Weglarz; Angel, 2013), sendo necessários para o desempenho, crescimento e produção. Os alimentos de origem vegetal que compõem as dietas animais contêm quantidades insuficientes desses minerais para suprir as necessidades das aves, sendo obrigatoriamente incluídos nas dietas, na maioria das vezes na forma inorgânica (Adedokun; Adeola, 2013).

Entre os constituintes extracelulares sanguíneos como água, proteínas, glicose, enzimas, hormônios e eletrólitos, destacam-se o cálcio dissociado (Ca^{2+}) e o

fosfato (PO_4^{2-}) (Vieites et al., 2011). A homeostasia iônica é regulada pelas concentrações plasmáticas das formas ionizadas do cálcio e fósforo (Velasco et al., 2016). Alterações no equilíbrio acidobásico podem interferir na qualidade da mineralização óssea, já que dietas acidogênicas alteram a composição da matriz orgânica do osso e apresentam correlação negativa com a resistência à quebra (Araujo et al., 2001). Além disso, deficiências de cálcio e fósforo levam ao aparecimento de anormalidades esqueléticas, que são mais proeminentes em linhagens de crescimento rápido (Proszkowiec-Weglarz; Angel, 2013).

A compreensão dos mecanismos que envolvem o metabolismo do cálcio e do fósforo, bem como a estimativa acurada das reais exigências dos animais é de fundamental importância, levando-se em consideração o bem estar das aves e a mitigação da poluição ambiental. Formulações que tangenciam a real exigência da ave evitam deficiências nutricionais e minimizam a excreção de minerais para o meio ambiente. Para isso é fundamental que as formulações sejam feitas com base em valores digestíveis de cálcio e fósforo, e o primeiro passo é estimar as perdas endógenas dos minerais (Adedokun; Adeola, 2013). A digestibilidade aparente dos nutrientes não leva em consideração o que é perdido endogenamente pelo animal; uma vez que essas perdas sejam conhecidas, é possível formular dietas atingindo as exigências dos animais e reduzindo a utilização de fontes inorgânicas (Dilger; Adeola, 2006).

Fan et al. (2001) propõem uma metodologia para estimar as perdas endógenas e a digestibilidade verdadeira do fósforo simultaneamente, através de análise de regressão. Os autores determinam a importância da estimativa das perdas endógenas com base em três fatores principais: valores de digestibilidade aparente são variáveis dentro do mesmo ingrediente; valores de digestibilidade aparente provavelmente subestimam a verdadeira utilização digestiva do fósforo; valores de digestibilidade aparente medidos em um único ingrediente nem sempre são aditivos quando utilizados para a formulação de uma dieta, sendo, portanto, essencial determinar as perdas endógenas e digestibilidade verdadeira.

No aspecto metabólico, tanto as deficiências como as concentrações excessivas são prejudiciais, sendo que níveis elevados de cálcio e fósforo na dieta podem induzir a formação de fosfatos de cálcio, moléculas insolúveis a nível intestinal, o que, por conseguinte leva a redução na taxa de absorção de ambos minerais (Runho et al., 2001). Assim, as formulações devem considerar a relação

dos minerais e quaisquer outros fatores que possam interferir em sua digestibilidade e disponibilidade, de forma que as aves recebam as quantidades ideais, minimizando a excreção dos minerais (Vellasco et al., 2016).

2.3.1 Cálcio

O cálcio é um elemento mineral essencial que participa de funções vitais como a coagulação sanguínea, permeabilidade de membrana, excitabilidade neuromuscular, transmissão de impulsos nervosos, ativação de sistemas enzimáticos (Vieites et al., 2011), além da manutenção da atividade elétrica e da composição estrutural dos ossos (Schmidt et al., 2007). O cálcio é o maior componente das cinzas ósseas (Field, 2000), estando apenas 1 % fora dos ossos, localizando-se no fluido extracelular, plasma ou no interior das células (Proszkowiec-Weglarz; Angel, 2013).

O metabolismo do cálcio é regulado através da vitamina D₃, do paratormônio (PTH), calcitonina, e seus respectivos receptores. A vitamina D₃ pode ser sintetizada na pele através da exposição a raios UV ou através da suplementação dietética. Uma vez formada, é carregada por proteínas transportadoras e armazenada na gordura ou no fígado. Para se tornar ativa a vitamina passa por duas hidroxilações, sendo a primeira hepática e a segunda renal, chegando à forma ativa 1,25(OH)₂D₃. A ativação da vitamina D₃ ocorre quando as concentrações plasmáticas de cálcio estão abaixo dos níveis adequados, agindo em *feedback* sobre o paratormônio. O paratormônio, por sua vez, é liberado quando há necessidade de aumentar os níveis de cálcio, e age estimulando a conversão de vitamina D₃ para sua forma ativada, a qual atuará aumentando a absorção intestinal de cálcio via duas proteínas quinases (PKA e PKC) que induzem ao aumento da reabsorção de cálcio nos túbulos renais. Em situações de hipocalcemia ocorre reabsorção óssea através de ação conjunta da 1,25(OH)₂D₃ e do PTH (Adedokun; Adeola, 2013; Proszkowiec-Weglarz; Angel, 2013).

Em níveis elevados de cálcio as células da paratireoide, através de receptores específicos sensíveis ao cálcio que são ativados, irão estimular a liberação de cálcio intracelular e a ativação de proteases que clivam e inativam o PTH. A calcitonina por sua vez, hormônio produzido pela glândula tireoide, inibe a reabsorção óssea, o que leva a diminuição dos níveis séricos de cálcio. A absorção de cálcio se dá por

transporte ativo ou passivo. Transporte ativo ocorre principalmente no duodeno e envolve a entrada das moléculas de cálcio através membrana celular em canais aniônicos seletivos (TRPV5 e TRPV6), difusão pelo citoplasma e saída na membrana basolateral, sendo um processo dependente da vitamina D. Com a vitamina ativada, ocorre um aumento na expressão de genes de transportadores intestinais e a síntese da calbindina D_{28k} , seguido por aumento na absorção de cálcio. Transporte passivo é caracterizado por movimento iônico do lúmen intestinal para a circulação através de gradiente químico, no espaço intercelular ao longo do intestino delgado e predomina quando os níveis de cálcio são adequados (Adedokun; Adeola, 2013; Proszkowiec-Weglarz; Angel, 2013).

A biodisponibilidade do cálcio pode ser influenciada por fatores exógenos que afetam sua absorção e por fatores endógenos como idade, controle hormonal e momento fisiológico (Pereira et al., 2009). Além desses fatores, sabe-se que o sexo das aves influencia em sua exigência de cálcio e machos parecem exigir mais cálcio para deposição nas tíbias, observando maior incidência de raquitismo e discondroplasia tibial em relação às fêmeas. Além disso, os machos apresentam exigências maiores de cálcio para ganho de peso do que as fêmeas (Driver et al., 2005).

O cálcio é o mineral com maior exigência, incluído nas formulações na quantidade de 0,5 % em frangos de corte até 4,02 % em poedeiras (Rostagno et al., 2011), sendo a fonte mais comum o calcário, que é de baixo custo, tendo sua exigência expressa como cálcio total, diferentemente do fósforo onde se trabalha com valores disponíveis. Porém é fundamental lembrar que o elemento cálcio em excesso pode interferir negativamente na digestibilidade e absorção de outros minerais, formando quelatos insolúveis (Velasco et al., 2016).

2.3.2 Fósforo

O fósforo é o segundo mineral de maior exigência, encontrado 80 % no esqueleto das aves, na proporção 1:2 em relação ao cálcio na forma de hidroxiapatita. Além disso, também pode ser encontrado na forma inorgânica ou associado a proteínas, lipídeos, DNA e RNA (Adedokun; Adeola, 2013). É considerado um nutriente oneroso nas dietas para monogástricos, ficando atrás somente das fontes de energia e proteína (aminoácidos sulfurados e da lisina) no

custo de uma formulação (Pinheiro et al., 2015). O fósforo não existe como mineral na forma de fósforo livre nos sistemas biológicos, e sim como fosfato (PO_4) (Favus et al., 2006).

O fósforo participa de diversas funções fisiológicas, entre elas a composição da estrutura óssea, das membranas celulares e dos ácidos nucleicos. Interfere no controle do apetite das aves e na manutenção do equilíbrio osmótico e eletrolítico, sendo componente dos fosfolípídeos e das moléculas de ATP, sendo indispensável para o transporte de lipídeos, síntese de proteínas e utilização da energia (Runho et al., 2001). Como o fósforo participa do processo de mineralização óssea é importante que esteja disponível em quantidade compatível com as necessidades das aves, a fim de evitar os prejuízos econômicos em função das fraturas no processo de apanha (Gomes et al., 2004).

O metabolismo do fósforo é influenciado pelo paratormônio, vitamina D_3 (Adedokun; Adeola, 2013) e por fosfatoninas, principalmente o fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF-23) (Bobeck et al., 2012). Baixas concentrações de fósforo conduzem a ativação da vitamina D nos rins, que leva ao aumento na absorção de fósforo no intestino delgado e a reabsorção renal, além disso, ocorre reabsorção óssea para manter os níveis plasmáticos do mineral. Em nível molecular, deficiências de fósforo levam ao aumento de transportadores Na-P IIb, calbindina D_{28k} no intestino delgado e, transportadores Na-P II-A nos rins. Já o paratormônio age diminuindo a reabsorção e aumentando a secreção de fósforo pelos rins. A absorção de fósforo ocorre através da borda em escova da membrana celular, envolvendo vias sódio-dependentes e sódio-independentes. A vitamina D tem demonstrado aumentar a permeabilidade do fósforo no intestino das aves, sendo o duodeno o local de maior absorção. As fosfatoninas surgiram como importantes reguladoras da homeostase do fósforo, entre elas destaca-se o FGF23 que suprime a absorção de fósforo, inibindo o paratormônio, a ativação da vitamina D e os canais transportadores Na-P II-A nos rins; sendo assim, o papel principal das fosfatoninas é limitar a absorção de fosfato (Adedokun; Adeola, 2013; Proszkowiec-Weglarz; Angel, 2013).

As aves apresentam baixo aproveitamento do fósforo presente nos ingredientes vegetais que compõem as dietas, já que são incapazes de metabolizar o fósforo fítico, havendo necessidade de suplementação de uma fonte inorgânica de fósforo. Frente a esta situação as formulações contem alto conteúdo de fósforo total,

do qual grande parte é excretada pelas aves, e de acordo com o destino da cama do aviário, o mineral pode ser depositado no meio ambiente (Rostagno et al., 2007), podendo provocar a contaminação do solo e a diminuição da quantidade de oxigênio nas águas dos rios e lagos (Fukayama et al., 2008), através do processo de eutrofização, que consiste no enriquecimento excessivo da água, que resulta no crescimento em demasia de algas e plantas, podendo levar a mortalidade de peixes (Klein; Agne, 2012).

Levando-se em consideração a preocupação com a redução dos nutrientes potencialmente poluentes, o fósforo pode ser excretado em maior ou menor quantidade dependendo de alterações nas formulações (Tejedor et al., 2001) ou de adição de enzimas capazes de catalisar o fósforo fítico tornando o fósforo disponível (Adedokun; Adeola, 2013). Porém, o uso de fitases com o intuito de melhorar a biodisponibilidade do fosfato pode não melhorar a sua absorção, já que esta depende da regulação do fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF-23), sendo este um ponto crucial do metabolismo do fósforo a ser estudado (Bobeck et al., 2012). Recentemente foi desenvolvida uma vacina capaz de reduzir a excreção de fósforo pelas aves. Trata-se de uma vacina peptídica sintética que induz a produção de auto-anticorpos contra o FGF-23, um hormônio osteocítico que é liberado quando os níveis séricos de fosfato se elevam. O FGF-23 suprime co-transportadores de fosfato e sódio do tipo II, nos rins e intestinos, diminuindo tanto a absorção intestinal, quanto a reabsorção tubular de fosfato nos rins. Aves vacinadas tiveram quantidades excretadas de fósforo inferiores às não vacinadas, sendo este o primeiro relato sobre a utilização de uma vacina para redução da excreção de fósforo pelos animais (Ren et al., 2016).

Deficiências de fósforo na dieta de frangos de corte, no período de 10 a 29 dias de idade, podem levar a redução dos níveis séricos de hormônio de crescimento e hormônios da tireoide, principalmente T3, levando a redução no consumo de ração e conseqüentemente no desempenho das aves (Parmer et al., 1987).

2.4 INTERAÇÕES ENTRE MINERAIS E ADSORVENTES DE MICOTOXINAS

Haja vista à capacidade química dos adsorventes de se ligarem as micotoxinas, alguns autores atentam para a possibilidade de ligação com minerais,

já que nutrientes de alto peso molecular podem ser carregados por esses aditivos anti-micotoxinas, tornando-se indisponíveis para absorção (Southern et al., 1994). Gowda, Swamy e Mahajan, (2013) destacam que se as inclusões forem elevadas, as argilas podem se ligar a minerais e a antibióticos como a monensina.

Corroborando a afirmação acima, porém com inclusão de 0,3 % de bentonita em dietas de frangos de corte com baixa contaminação por aflatoxina (50 µg/kg) e contendo monensina em sua composição, constatou-se existir uma competição entre a micotoxina e a monensina por sítios de adsorção na estrutura do adsorvente, o que indica um processo não seletivo de adsorção (Magnoli et al., 2011). A inclusão de bentonita na dieta reduz os efeitos benéficos da monensina sobre o ganho de peso, e da salinomicina sobre o consumo de ração de aves expostas a *Eimeria acervulina* (Gray et al., 1998).

Estudos vêm demonstrando a interação das argilas na digestibilidade de nutrientes (Wiles et al., 2004). Eraslan et al. (2005) verificaram os efeitos de 1 ppm de aflatoxina e 0,25 e 0,5 % de bentonita administrada isoladamente e em combinação sobre os níveis séricos de sódio, potássio, cloreto, cálcio e fósforo, em frangos de corte com 15, 30 e 45 dias de idade. Os autores observaram que a aflatoxina causou diminuição nos níveis de cálcio e de fósforo, porém o mesmo resultado foi encontrado também nos grupos que receberam apenas o adsorvente, concluindo que o aditivo adicionado à ração pode ligar-se irreversivelmente a minerais e inibir a sua absorção em nível intestinal, e conseqüentemente sua concentração sérica. Além dos efeitos sobre os minerais séricos, os aluminossilicatos incluídos na dieta de frangos de corte podem apresentar efeitos sobre o depósito de minerais nos ossos (Desheng et al., 2005).

A digestibilidade de dietas com inclusão de bentonita sódica foi testada para suínos, verificando-se que a adição deste adsorvente nas dietas não altera o balanço da energia, do nitrogênio e a digestibilidade aparente do cálcio, magnésio, zinco, cobre e manganês, porém reduz a excreção fecal de fósforo (Lehnen et al., 2011). A adsorção da bentonita pelo fosfato foi avaliada através de análises laboratoriais, constatando-se que ocorre um processo de quimiossorção, no qual o ânion de fosfato monovalente, H_2PO_4^- , teve a maior afinidade para a superfície do adsorvente. Os autores investigaram a adsorção em pH 5 e 7 e verificaram que o processo perde sua eficiência em pHs mais elevados (Haghseresht; Wang; Do, 2009). Doses de bentonita de 1,5 e 3,0 % na dieta de frangos de corte não alteram o

pH das excretas, porém reduzem a umidade das mesmas (Safaeikatouli et al., 2010).

Em relação ao metabolismo do cálcio na presença de bentonita, relata-se redução na absorção no trato gastrointestinal e menor deposição do mineral para ratos, o que pode estar relacionado à competição por sítios de ligação na mucosa intestinal, e posterior transporte para o sangue, entre os minerais presentes no lúmen intestinal oriundos da dieta e aqueles ligados a bentonita. Afirma-se que as alterações causadas pela presença da bentonita em nível intestinal são variáveis de acordo com o elemento mineral estudado (Grosicki; Kowalski; Bik, 2004). A adsorção ocorre, pois os minerais, que geralmente são alcalinos e alcalinos terrosos, fixam-se eletrostaticamente sobre a superfície e entre as camadas argilomineral, buscando equilibrar cargas superficiais (Duarte-Neto et al., 2014).

Não somente os minerais podem ser adsorvidos, mas a literatura demonstra que determinados grupos de aminoácidos carregados positiva ou negativamente podem ser adsorvidos sobre minerais (Zaia; Zaia, 2006), sendo que a afinidade da bentonita pelos aminoácidos é afetado por alterações de pH (Benetoli et al., 2007). Estudos de difratometria de raios-x, demonstram a adsorção de aminoácidos sobre argilas com alta afinidade nas camadas internas das bentonitas, através do grupo amino e grupo sulfidril (Benetoli et al., 2007).

A literatura reporta diversos experimentos com doses elevadas de micotoxinas, buscando averiguar a eficácia de adsorventes sobre seus efeitos tóxicos. No entanto, no cotidiano da avicultura industrial, busca-se reduzir a produção de micotoxinas em todos os seguimentos (colheita, armazenagem, etc.), verificando-se maior ocorrência de níveis baixos de micotoxinas, porém em frequência elevada. Perante essas situações, a eficácia do adsorvente pode ser afetada pelos componentes normais da dieta, tais como coccidiostáticos, vitaminas, minerais, aminoácidos, que podem competir com as micotoxinas em nível intestinal pelos sítios de ligação do adsorvente (Magnoli et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar as interações entre adsorvente de micotoxinas e minerais, elegeu-se como material de estudo o adsorvente bentonita por ser amplamente utilizada na produção animal como agente anti-micotoxinas, e os macrominerais cálcio e fósforo, por serem os mais limitantes em quantidade para as aves.

Foram realizados dois ensaios para coleta de material (excretas, digestas, sangue e tíbias) e posteriores análises laboratoriais. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina - CETEA e aprovado sob o protocolo nº 6297240316.

Os ensaios foram conduzidos no Setor de Avicultura CAV/UDESC, sendo o primeiro denominado “Ensaio Bentonita”, e o segundo “Ensaio Digestibilidade”. Ambos os ensaios foram conduzidos com frangos de corte, machos, da linhagem Cobb 500, oriundos de incubatório comercial, vacinados contra Doença de Marek, Bronquite Infecciosa e Doença de Gumboro. As aves foram recebidas com um dia de idade e alojadas em pinteiro único, com ambiente aquecido na faixa de 30 a 32°C, sobre cama de maravalha de 8 cm de altura, recebendo água filtrada e clorada (5 ppm) e ração isonutritiva à vontade, no período de um a 13 dias de idade. Durante este período as aves receberam dieta pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 13 dias), de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2011) descritas na Tabela 1.

Aos 14 dias de idade realizou-se a pesagem de todas as aves para uniformizar os pesos médios das repetições. As aves foram pesadas individualmente e separadas por faixa de peso, descartando-se as mais leves e as mais pesadas. A distribuição foi realizada individualmente, seguindo-se a sequência das faixas crescentes de pesos, sendo a distribuição inteiramente casualizada, conforme recomendações de Sakomura e Rostagno (2007). Foram retiradas aves com quaisquer problemas aparentes.

A sala de metabolismo contou com 48 gaiolas metabólicas (0,5 X 0,5 m) de arame galvanizado, as quais eram dotadas de um comedouro tipo calha, dois bicos de bebedouros tipo *nipple* acoplados a um reservatório individual de água e uma bandeja coletora de excretas. O ambiente foi climatizado de acordo com a temperatura de conforto para a idade das aves, seguindo o manual da linhagem.

Tabela 1 - Composição nutricional e calculada das dietas fornecidas às aves até os 13 dias de idade.

Ingredientes (g/kg)	Pré-inicial (1 – 7 dias)	Inicial (8 – 13 dias)
Milho	529,85	555,77
Farelo de soja	395,48	365,62
Calcário calcítico	10,41	10,80
Fosfato bicálcico	19,00	15,50
Sal	4,78	4,55
Óleo vegetal	30,90	38,90
Metionina	1,96	1,68
Lisina	2,62	2,18
Premix ¹	5,00	5,00
Total	1000	1000
Composição calculada		
Energia metabolizável (Kcal/kg)	2960	3050
Proteína bruta (%)	22,4	21,2
Cálcio total (%)	0,92	0,84
Fósforo disponível (%)	0,47	0,40
Sódio (%)	0,22	0,21
Potássio (%)	0,88	0,83
Cloro (%)	0,60	0,30
Lisina digestível (%)	1,32	1,22
Metionina digestível (%)	0,52	0,47
Treonina digestível (%)	0,76	0,72

¹Composição do premix mineral e vitamínico (níveis por Kg do produto): Vitamina B12 3.000,00 mcg, Vitamina B6 622 mg, Acido Pantotênico 2.934,9 mg, Niacina 7.500 mg, Biotina 19 mg, Vitamina B2 1.125 mg, Manganês 16.800 mg, Zinco 13.000 mg, Ferro 12.600 mg, Iodo 250 mg, Cobre 2.100 mg, Selênio 75 mg, Vitamina A 2.640.000 UI/kg, Vitamina D3 638.000 UI/kg, Vitamina E 3.650 UI/kg, Vitamina K3 450 mg, Vitamina B1 502 mg, Ácido Fólico 189 mg, Colistina 2.500 mg, B.H.T. 0,80 g, Colina 86,67 g.

3.1 ENSAIO BENTONITA

O ensaio foi conduzido com o objetivo de avaliar a influência do adsorvente bentonita sobre o consumo de ração, ganho de peso, conversão alimentar concentração sérica de minerais, características morfométricas ósseas e deposição óssea dos minerais cálcio e fósforo.

Foram adquiridos 320 frangos de corte, criados sob as condições descritas anteriormente e transferidos para as gaiolas de metabolismo aos 14 dias de idade, seguindo a metodologia recomendada por Sakomoura e Rostagno (2007). Cada gaiola recebeu 12 aves, totalizando 288 frangos de corte.

3.1.1 Dietas experimentais

Para a composição das dietas experimentais foram adquiridos 350 kg milho oriundo de mesa densimétrica de empresa comercial. O milho recebido foi acondicionado em bandejas de alumínio e então levado a estufa à 200°C por 90 minutos. Este procedimento visou à eliminação ou redução das possíveis micotoxinas existentes, seguindo metodologia descrita por Hwang e Lee (2006). O procedimento foi realizado um dia antes da confecção das dietas.

Foram formuladas três dietas (tratamentos) seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2011) para desempenho superior: sem inclusão de bentonita (0,0), com inclusão de 0,25 e 0,50 % de bentonita. Cada tratamento contou com oito repetições, em um delineamento inteiramente casualizado.

As características da bentonita utilizada estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas e composição da bentonita utilizada.

Características gerais	
Estado físico	Sólido
Densidade (g/ml)	0,36
pH (dispersão aquosa contendo 2% de sólidos)	5 – 10
Umidade máxima	10 %
Recomendação de uso do fabricante	2 a 5 kg/tonelada
Composição química	
	(%)
SiO ₂	65,4
Al ₂ O ₃	17,5
Fe ₂ O ₃	5,10
K ₂ O	2,10
MgO	1,99
CaO	0,71
Na ₂ O	0,52
P.F.	6,71

Fonte: Sanex, 2016.

As aves foram submetidas às dietas experimentais no período de 14 a 22 dias de idade. A composição das dietas experimentais está descrita na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio “Bentonita”, sem inclusão (0,0), com inclusão de 0,25 e 0,50 % de bentonita.

Ingredientes (g/kg)	0,0 %	0,25 %	0,50 %
Milho	555,77	550,10	544,81
Farelo de soja	365,62	366,63	367,63
Calcário calcítico	10,80	10,80	10,76
Fosfato bicálcico	15,50	15,53	15,55
Sal	4,55	4,82	4,83
Óleo vegetal	38,90	40,77	42,60
Metionina	1,68	1,69	1,69
Lisina	2,18	2,16	2,13
Premix ¹	5,00	5,00	5,00
Bentonita	0,00	2,50	5,00
Total	1000	1000	1000
Composição calculada			
Energia metabolizável (Kcal/kg)	3050	3050	3050
Proteína bruta (%)	21,2	21,2	21,2
Cálcio total (%)	0,84	0,84	0,84
Fósforo disponível (%)	0,40	0,40	0,40
Sódio (%)	0,21	0,21	0,21
Potássio (%)	0,83	0,83	0,83
Cloro (%)	0,32	0,34	0,34
Lisina digestível (%)	1,22	1,21	1,22
Metionina digestível (%)	0,47	0,47	0,47
Treonina digestível (%)	0,72	0,72	0,72
Composição analisada			
Cálcio (%)	0,83	0,74	0,86
Fósforo (%)	0,68	0,64	0,65

¹Composição do premix mineral e vitamínico (níveis por Kg do produto): Vitamina B12 3.000 mcg, Vitamina B6 622 mg, Ácido Pantotênico 2.934,9 mg, Niacina 7.500 mg, Biotina 19 mg, Vitamina B2 1.125 mg, Manganês 16.800 mg, Zinco 13.000 mg, Ferro 12.600 mg, Iodo 250 mg, Cobre 2.100 mg, Selênio 75 mg, Vitamina A 2.640.000 UI/kg, Vitamina D3 638.000 UI/kg, Vitamina E 3.650 UI/kg, Vitamina K3 450 mg, Vitamina B1 502 mg, Ácido Fólico 189 mg, Colistina 2.500 mg, B.H.T. 0,80 g, Colina 86,67 g.

3.1.2 Variáveis zootécnicas

No período experimental, avaliou-se o peso vivo médio inicial e final, consumo de ração, ganho de peso médio diário e conversão alimentar. O peso vivo médio foi obtido através da pesagem coletiva das aves de cada gaiola ao início e ao final do período experimental. O valor obtido foi dividido pelo número de aves da gaiola, obtendo-se o peso médio vivo, em gramas. O consumo de ração foi aferido através do abastecimento diário dos comedouros com quantidade conhecida de ração. Ao final dos quatro dias de coleta, as sobras foram pesadas obtendo-se o consumo

geral da gaiola, o qual foi dividido pelo número de aves da unidade experimental, obtendo-se o consumo de ração/ave/dia, expresso em g/ave/dia. O ganho de peso médio diário foi obtido através da subtração entre peso final e inicial das aves, sendo este valor dividido pelos dias de experimento, expresso em gramas. A conversão alimentar foi obtida através da relação entre o consumo médio das aves (g) e o ganho de peso médio diário (g). Todos os valores foram corrigidos pela mortalidade, sendo o consumo e ganho de peso destas aves descontados da repetição.

3.1.3 Análises de sangue

No 21º dia de idade das aves, procedeu-se a coleta de sangue de cinco aves por repetição, totalizando 120 aves. A coleta de sangue foi realizada através de punção da veia jugular, com agulhas hipodérmicas 25 x 0,8 mm. Coletou-se 3 mL de sangue de cada ave, os quais foram imediatamente acondicionados em tubos identificados sem anticoagulante. As amostras foram deixadas em repouso por 40 minutos. Após, foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos. O soro coletado foi acondicionado em tubos plásticos de 2 mL e congelado para posterior análise.

As amostras foram analisadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Lauro Ribas Zimmer – HCV – CAV/UDESC, através do aparelho bioquímico Labmax Plenoo®. Foram adquiridos kits comerciais Labtest® de leitura para os minerais cálcio (mg/dL), fósforo (mg/dL), ferro ($\mu\text{g/dL}$), magnésio (mg/dL) e cloretos (mEq/L).

3.1.4 Análises de tíbias

No 22º dia de idade das aves, duas aves de cada repetição foram sacrificadas por deslocamento cervical, método aceito para aves de até 3 Kg, segundo as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (Brasil, 2013). Após, realizou-se a coleta das duas tíbias da ave, sendo realizada a incisão nas articulações tíbiotársica e femorotíbia. As tíbias coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos identificados, os quais foram imediatamente congelados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior análise.

As tíbias foram preparadas seguindo as recomendações de Kim et al. (2004), sendo primeiramente descongeladas em temperatura ambiente por 24 horas. Após foram manualmente descarnadas, sem cozimento. Nos ossos limpos, individualmente, foi realizada pesagem ao ar (g), em balança analítica de precisão (0,001g), pesagem em água (g), aferição de comprimento (mm) e largura (mm), seguindo a metodologia descrita por Zhang e Coon (1997). O volume ósseo foi calculado através de seu peso úmido (peso em água), assumindo-se que a densidade da água era 1 g/cm^3 (medições realizadas em sala com temperatura ambiente média de $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Comprimento e largura foram aferidos através de paquímetro digital Digimess® (0,001 mm). O Índice de Seedor foi calculado através da divisão do peso do osso por seu comprimento (Seedor et al.,1991). Após, as tíbias foram secas em estufa de ventilação forçada e processadas para aferição de matéria mineral (%) e posterior leitura de cálcio e fósforo (%), conforme descrito no item 3.3.

3.2 ENSAIO “DIGESTIBILIDADE”

O segundo ensaio foi conduzido com o objetivo de avaliar o balanço, perdas endógenas e digestibilidade verdadeira dos minerais cálcio e fósforo. Foram adquiridos 400 frangos de corte, criados sob as condições descritas anteriormente e transferidos para as gaiolas de metabolismo aos 14 dias de idade, utilizando-se o mesmo procedimento de distribuição das aves do ensaio anterior. Cada gaiola recebeu oito aves, totalizando 384 frangos de corte.

3.2.1 Dietas experimentais

As dietas experimentais (Tabela 4) foram calculadas em níveis decrescentes de cálcio e fósforo, buscando atender em 90, 80, 70 e 60 % das exigências nutricionais recomendadas por Rostagno et al. (2011) para ambos os minerais, os quais foram reduzidos simultaneamente, mantendo-se assim a relação Ca:P semelhante entre as dietas. O experimento foi delineado inteiramente ao acaso em arranjo fatorial, com quatro níveis de cálcio e fósforo e dois níveis de bentonita (0,0 e 0,5 %), totalizando oito dietas experimentais. As aves foram submetidas às dietas experimentais no período de 14 a 21 dias de idade.

Tabela 4 - Dietas experimentais utilizadas no ensaio “Digestibilidade” atendendo em 90, 80, 70 e 60% das exigências nutricionais para cálcio e fósforo determinadas por Rostagno et al. (2011), sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,5 % de bentonita.

Ingredientes (g/kg)	Bentonita 0,0 %				Bentonita 0,5 %			
	Nível em relação à exigência (%)				Nível em relação à exigência (%)			
	90	80	70	60	90	80	70	60
Milho	489,69	489,69	489,69	489,69	489,69	489,69	489,69	489,69
Farelo de soja	377,53	377,53	377,53	377,53	377,53	377,53	377,53	377,53
Amido	46,15	49,25	52,36	55,45	41,15	44,25	47,36	50,45
Calcário calcítico	9,75	8,80	7,89	6,95	9,75	8,80	7,89	6,95
Fosfato bicálcico	13,45	11,30	9,10	6,95	13,45	11,30	9,10	6,95
Sal	4,56	4,56	4,56	4,56	4,56	4,56	4,56	4,56
Óleo vegetal	40,2	40,2	40,2	40,2	40,2	40,2	40,2	40,2
Metionina	1,72	1,72	1,72	1,72	1,72	1,72	1,72	1,72
Lisina	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95
Premix ¹	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Bentonita	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	5,00	5,00	5,00
CIA ²	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Composição calculada								
Energia metabolizável (Kcal/kg)	3035	3046	3057	3068	3017	3028	3039	3050
Proteína bruta (g/kg)	212	212	212	212	212	212	212	212
Cálcio total (%)	0,76	0,67	0,59	0,50	0,76	0,67	0,59	0,50
Fósforo disponível (%)	0,36	0,32	0,28	0,24	0,36	0,32	0,28	0,24
Sódio (%)	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
Potássio (%)	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
Cloro (%)	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
Lisina digestível (%)	1,22	1,22	1,22	1,22	1,22	1,22	1,22	1,22
Metionina digestível (%)	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47
Treonina digestível (%)	0,72	0,72	0,72	0,73	0,72	0,72	0,72	0,72
Composição analisada								
Cálcio (%)	0,77	0,67	0,59	0,49	0,74	0,70	0,58	0,50
Fósforo (%)	0,59	0,56	0,50	0,40	0,59	0,55	0,52	0,42
Relação Ca:P	1,30	1,20	1,18	1,22	1,25	1,27	1,11	1,19

¹Composição do premix mineral e vitamínico (níveis por Kg do produto): Vitamina B12 3.000 mcg, Vitamina B6 622 mg, Ácido Pantotênico 2.934,9 mg, Niacina 7.500 mg, Biotina 19 mg, Vitamina B2 1.125 mg, Manganês 16.800 mg, Zinco 13.000 mg, Ferro 12.600 mg, Iodo 250 mg, Cobre 2.100 mg, Selênio 75 mg, Vitamina A 2.640.000 UI/kg, Vitamina D3 638.000 UI/kg, Vitamina E 3.650 UI/kg, Vitamina K3 450 mg, Vitamina B1 502 mg, Ácido Fólico 189 mg, Colistina 2.500 mg, B.H.T. 0,80 g, Colina 86,67 g.

²Cinza insolúvel em ácido.

As quantidades de milho, farelo de soja, sal, óleo vegetal, lisina, metionina, premix e marcador foram mantidas constantes em todas as rações, as quais tiveram alterações somente nos níveis de amido, calcário calcítico e fosfato bicálcico, buscando atender as porcentagens de minerais previamente determinadas. Nas dietas foi incluído 1 % de indicador, uma cinza insolúvel ácida (Celite ®), necessário para a realização dos cálculos no método de coleta ileal da digesta.

O ensaio foi assim delineado, pois o uso do modelo de regressão para estimativas de digestibilidades verdadeiras requer pelo menos três a quatro níveis de inclusão de ingredientes e, as dietas do ensaio devem ser formuladas abaixo da exigência em função da regressão (Mutucumarana; Ravindran, 2016).

3.2.2 Variáveis zootécnicas

No período experimental, avaliou-se o consumo de ração (g), ganho de peso médio diário (g) e a conversão alimentar (g/g). As variáveis foram aferidas utilizando os mesmos procedimentos descritos no item 3.1.2.

3.2.3 Coleta total de excretas

Foi utilizado o método de coleta total de excretas (Cortés et al., 2009). As excretas eram coletadas diariamente, às 8:00 h, acondicionadas em sacos plásticos, identificadas por repetição e congeladas em freezer a -18 °C, para posterior análise. O ensaio teve duração total de oito dias, sendo quatro dias de adaptação e quatro dias de coleta.

3.2.4 Coleta ileal da digesta

Para realização da coleta ileal da digesta, pesou-se todas as aves da gaiola coletivamente obtendo-se o peso médio da repetição. A partir deste foram escolhidas duas aves para abate que estivessem dentro do intervalo de ± 5 % em relação ao peso médio. As aves foram sacrificadas por deslocamento cervical, e então evisceradas para retirada do intestino. O íleo foi definido a partir do Divertículo de Meckel até 2 cm antes da junção ileocecal (Dilger; Adeola, 2006). A digesta ileal foi coletada a partir de infusão de água destilada no interior do intestino e

acondicionada em sacos plásticos identificados, os quais foram imediatamente congelados para posterior análise (Rutherford et al., 2004; Coca-Sinova et al., 2008).

3.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

Para realização das análises laboratoriais de matéria seca, matéria mineral, teor de cálcio e fósforo, as amostras de excretas e digestas coletadas foram descongeladas e homogeneizadas por repetição, para realização da pré-secagem ou da amostra seca ao ar (ASA). As excretas coletadas foram acondicionadas em bandejas de alumínio e secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas. Após, foram moídas em moinho Tecnal® modelo TE-631/3.

Todos os procedimentos foram realizados em duplicata, desde a secagem do material até as leituras, seguindo metodologias descritas por Silva e Queiroz (2002). As análises foram realizadas em Laboratórios do Departamento de Produção Animal e Alimentos e Departamento de Solos do CAV/UEDESC.

3.3.1 Matéria Seca

Para aferição da matéria seca, os cadinhos foram previamente lavados, enxaguados com cinco banhos de água destilada e secos em estufa. Para iniciar o processo, foi realizada primeiramente a calcinação dos cadinhos, mantendo-os em mufla a 550 °C, por 2 horas. Decorrido o período, a mufla foi desligada e após 2 horas, os cadinhos foram acondicionados em dessecador até o resfriamento completo (equilíbrio com a temperatura ambiente). Nos cadinhos previamente pesados em balança analítica de precisão (0,0001), foram acondicionadas alíquotas de aproximadamente 2 g. Os recipientes foram colocados em estufa previamente aquecida a 105 °C, por 24 horas.

Findo o tempo de secagem, os cadinhos foram retirados da estufa e acondicionados imediatamente em dessecador, até atingirem a temperatura ambiente, para então realizar-se a pesagem e o registro dos pesos.

A matéria seca foi calculada seguindo as fórmulas abaixo:

- a) Pré-secagem (%) = $[\text{excretas pré-secas (g)} / \text{excretas úmidas (g)}] \times 100$
- b) Secagem definitiva (%) = $[\text{excretas secas (g)} / \text{excretas pré-secas (g)}] \times 100$
- c) Matéria seca (%) = $(\text{pré-secagem} \times \text{secagem definitiva}) / 100$

3.3.2 Matéria mineral

Para cálculo da matéria mineral, amostras de ração, excretas e digestas previamente pré-secas foram acondicionadas em cadinhos calcinados e pesados, conforme procedimento descrito no item anterior. Após, foram colocadas em mufla a 550 °C. Para evitar perda de amostras, realizou-se uma pré-queima, seguida da queima. Para a pré-queima, a mufla permaneceu 15 minutos ligada e 45 minutos desligada, após seguia 30 minutos ligada e 30 desligada. Finda a pré-queima, o equipamento seguiu ligado por quatro horas consecutivas. Decorrido o tempo, a mufla foi desligada e deixada esfriar por duas horas, para redução da temperatura abaixo de 200°C. Os cadinhos foram retirados e acondicionados em dessecador até o resfriamento completo, e posteriormente pesados em balança analítica de precisão (0,0001g).

3.3.3 Solução mineral para leitura de cálcio e fósforo

Para realizar a leitura dos minerais primeiramente preparou-se uma solução aquosa a partir das amostras de ração, excretas e digestas, seguindo-se a metodologia de via seca, descrita por Silva e Queiroz (2002). Em todas as etapas, as vidrarias eram previamente lavadas com cinco banhos de água comum e cinco banhos de água destilada.

O preparo inicia com a digestão ácida das amostras, as quais devem ser incineradas em mufla, conforme procedimento descrito no item anterior. Posteriormente adicionou-se 5 mL de HCl (ácido clorídrico) 50 %. Os cadinhos foram levados para chapa quente (aproximadamente 100 °C), até evaporação completa do ácido. Após, a operação foi repetida com mais 5 mL de HCl 50 %, porém, desta vez sem deixar o ácido evaporar totalmente. Após a retirada dos cadinhos da chapa e resfriamento, as amostras foram redissolvidas em água destilada e filtradas em papel filtro quantitativo de faixa branca (filtração média - Unifil®), sendo recebidas em balões volumétricos de 100 mL. As amostras foram acondicionadas em tubos tipo falcon previamente lavados com água destilada e identificados para posterior análise dos minerais cálcio e fósforo.

3.3.4 Leitura de cálcio

Para leitura de cálcio foram preparadas soluções de Estrôncio a 5%, Ácido Clorídrico 50 % e Padrão de Cálcio. Posteriormente foi preparada a curva de calibração para então proceder-se a leitura das amostras, em espectrofotômetro de Absorção Atômica.

3.3.4.1 *Solução de Estrôncio 5 %*

Obtida pesando-se 48,7 g de estrôncio, e completando-se o balão com 1000 mL de água destilada. A solução foi homogeneizada estando pronta para o uso.

3.3.4.2 *Solução de ácido clorídrico 50 %*

Obteve-se através da diluição de 500 mL de HCl P.A. em 500 mL de água destilada. Após homogeneização a solução encontrava-se pronta para o uso.

3.3.4.3 *Solução padrão de cálcio*

O padrão de cálcio foi obtido através de solução padronizada comercial de 1000 ppm (solução de estoque). A solução de trabalho foi preparada adicionando-se 10 mL da solução padrão e 1 mL de HCl 50 % em um balão volumétrico de 100 mL, o qual teve seu volume completo com água destilada. Após homogeneização, obtinha-se uma solução a 100 ppm (solução de trabalho) pronta para uso.

3.3.4.4 *Curva*

A curva padrão foi preparada em sete balões volumétricos de 100 mL, adicionando-se alíquotas de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 10 mL da solução de trabalho de cálcio, em cada balão, correspondendo às concentrações de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 10 ppm de cálcio. Em cada balão foram adicionados 10 mL de Solução de Estrôncio a 5%, e 1 mL de HCL 50 %. Os balões foram completados água destilada, homogeneizados e, decorridos 5 minutos foram realizadas as leituras.

3.3.4.5 *Leitura das amostras*

Para leitura das amostras foram adicionados 2 mL da solução mineral previamente preparada em balões volumétricos de 100 mL. Nestes, foram adicionados Solução de Estrôncio 5 %, HCl 50 % e água destilada seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente no preparo da curva padrão. Decorridos cinco minutos, a leitura foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica PerlinElmer® (AAnalyst 200) a 422,7 nm de comprimento de onda. O equipamento foi programado para realizar as leituras em triplicata, obtendo-se o valor médio entre elas. Todas as amostras foram lidas em duplicata, sendo considerado o valor médio entre as duas leituras. Os valores foram expressos em ppm.

3.3.4.6 *Cálculo do teor de cálcio (%)*

A porcentagem de cálcio nas amostras foi calculada através da seguinte fórmula (Silva; Queiroz, 2004):

$$\text{Cálcio (\%)} = L \times (1/10.000) \times (\text{fator de diluição/peso da amostra})$$

Onde:

L: leitura média (ppm);

Fator de diluição: balões volumétricos (mL) utilizados no preparo da amostra e quantidade da solução mineral utilizada (mL);

Peso da amostra: peso da amostra seca (g).

3.3.5 Leitura de fósforo

Para leitura de fósforo primeiramente foram preparadas soluções de molibdato de amônio, vitamina C e Padrão de fósforo. Posteriormente foi preparada a curva de calibração para então proceder-se a leitura das amostras.

3.3.5.1 *Solução ácida de molibdato de amônio*

Em um béquer de 500 mL, pesou-se 1 g de carbonato de bismuto e, neste foram adicionados 200 mL de água destilada. Após, foram acrescentados 138 mL de

H₂SO₄ (ácido sulfúrico concentrado). A solução foi deixada em temperatura ambiente, até o resfriamento completo. Em um segundo béquer foram pesados 20 g de molibdato de amônio e adicionados 150 mL de água destilada, sendo a solução homogeneizada até dissolução completa do sal. Após, as duas soluções foram reunidas em balão volumétrico de 1000 mL, sendo o volume foi completo com água destilada e a solução homogeneizada por 20 vezes, estando pronta para o uso.

3.3.5.2 *Solução de vitamina C 2 %*

Foram pesados 2 g de ácido ascórbico (C₂H₄O₂Cl₃) e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Em virtude da foto sensibilidade da vitamina C, a pesagem, o preparo da solução e a leitura das amostras para fósforo foi realizada em sala com as luzes apagadas, obtendo-se somente a luminosidade da sala ao lado, visando manter a integridade da solução de Vitamina C. Após a pesagem da vitamina, anotava-se o horário e a partir desse momento, contava-se uma hora. Após esse período a solução era descartada e preparada nova solução.

3.3.5.3 *Solução padrão de fósforo*

Foram pesados 4,39 g de KH₂PO₄ (fosfato monobásico de potássio) em 1L de água destilada, homogeneizadas por 20 vezes, obtendo-se uma solução com 1000 ppm de fósforo (solução de estoque). Uma alíquota de 10 mL dessa solução, foi transferida para um balão volumétrico de 1 L, o qual foi completo com água destilada e homogeneizado da mesma forma, obtendo-se uma solução com 10 ppm de fósforo (solução de trabalho).

3.3.5.4 *Curva padrão*

A curva padrão foi preparada em seis balões volumétricos de 100 mL, adicionando-se alíquotas de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 mL da solução de 10 ppm de fósforo, em cada balão, correspondendo às concentrações de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 ppm de fósforo. Em cada balão foram adicionados 10 mL de solução ácida de molibdato de amônio. Os balões foram completos até 2/3 de sua capacidade com água destilada. Após, adicionou-se 4 mL de vitamina C em cada balão, finalizando com o

preenchimento de seus volumes com água destilada. Os balões foram homogeneizados e, decorridos 5 minutos foram realizadas as leituras de absorvâncias.

3.3.5.5 *Leitura de amostras*

Para leitura das amostras foram adicionados 0,4 mL da solução mineral previamente preparada em balões volumétricos de 100 mL. Nestes, foram adicionados molibdato de amônio, vitamina C e água destilada seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente no preparo da curva padrão. Decorridos cinco minutos, a leitura foi realizada em espectrofotômetro colorimétrico digital Kasuaki® a 725 nm de comprimento de onda, onde foram registradas as absorvâncias de cada amostra. Todas as amostras foram lidas em duplicata, sendo considerado o valor médio entre as duas leituras.

3.3.5.6 *Cálculo do teor de fósforo (%)*

A porcentagem de fósforo nas amostras foi calculada através da seguinte fórmula (Silva; Queiroz, 2004):

$$\text{Fósforo (\%)} = \left[\frac{\text{Curva}}{\text{Absorvância}} \times L \right] \times (1/10.000) \times (\text{fator de diluição/peso da amostra})$$

Onde:

Curva/ absorvância: ponto da curva preparada dividido por sua respectiva leitura de absorvância

L: leitura média da amostra (absorvância);

Fator de diluição: balões volumétricos (mL) utilizados no preparo da amostra e quantidade da solução mineral utilizada (mL);

Peso da amostra: peso da amostra seca (g).

3.3.6 **Cinza insolúvel em ácido**

Utilizou-se a metodologia descrita por Joslyn (1970). Pesou-se aproximadamente 1 g de amostra em cadinhos previamente lavados, secos em

estufa e resfriados em dessecador. As amostras foram levadas para mufla para queima através de programa descrito anteriormente (item 3.3.2).

Após a obtenção de cinzas, os cadinhos foram resfriados e nestes adicionou-se 25 mL de HCl 10 %. Os cadinhos com as amostras preparadas foram colocados em chapa quente e fervidos por 5 minutos. Após este procedimento, o material foi filtrado (papel filtro quantitativo de faixa branca - filtração média - Unifil®). Todo o resíduo presente nos cadinhos foi vertido no papel filtro utilizando-se água destilada aquecida (aproximadamente 95 °C).

Finda a filtração, o filtro com a amostra foi removido e retornado ao cadinho correspondente a amostra, e este por sua vez, foi conduzido à estufa a 105 °C por 18 horas para secagem da amostra. Decorrido este período, os cadinhos retornaram a mufla repetindo-se o mesmo procedimento de queima para obtenção de cinzas. Após, os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados, obtendo-se o valor de cinza insolúvel em ácido.

3.4 COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE E BALANÇO MINERAL

Os dados obtidos foram utilizados nas equações adaptadas por Jongbloed e Kemme (1990) e Rostagno e Featherston (1977) para cálculo dos coeficientes de digestibilidade aparente e verdadeira dos minerais cálcio e fósforo, para os diferentes métodos de coleta.

3.4.1 Método de coleta total de excretas

Através do método de coleta total das excretas foram aferidos:

- a) Coeficiente de digestibilidade da matéria seca (CDMS):

$$\text{CDMS (\%)} = [\text{MS ing (g)} - \text{MS exc (g)}] / [\text{MS ing (g)}] \times 100$$

Onde: ing = ingerido; exc = excretado

- b) Coeficiente de digestibilidade da matéria mineral (CDMM):

$$\text{CDMM (\%)} = [\text{MM ing (g)} - \text{MM exc (g)}] / [\text{MM ing (g)}] \times 100$$

- c) Cálcio ou fósforo ingerido diário por ave:

$$\text{Ca/P ing (g/ave/dia)} = \text{consumo (g/ MS/ ave)} \times \text{Ca/P dieta (\%)}$$

- d) Cálcio ou fósforo excretado diário por ave:

$$\text{Ca/P exc (g/ave/dia)} = \text{excreção (g/ MS/ ave)} \times \text{Ca/P excretas (\%)}$$

- e) Cálcio ou fósforo excretado por quilograma de matéria seca ingerida:

$$\text{Ca/P exc (g/kg MS ing)} = \text{excreção (g/ MS/ ave)} \times \text{Ca/P excretas (\%)}$$

- f) Cálcio ou fósforo excretado em porcentagem:

$$\text{Ca/ P exc (\%)} = [\text{Ca/P exc (g/ Kg/MS ing)}] / [\text{Ca/P ing (g) /kg/MS ing}] \times 100$$

- g) Cálcio ou fósforo absorvido:

$$\text{Ca/ P absorvido (mg)} = \text{Ca/P ing (mg/ave/dia)} - \text{Ca/P exc (mg/ave/dia)}$$

- h) Cálcio ou fósforo retido:

$$\text{Ca/ P retido (mg)} = \text{Ca/P absorvido (mg)} - \text{Ca/P endógeno (mg /ave / dia)}$$

- i) Cálcio ou fósforo retido em porcentagem:

$$\text{Ca/ P retido (\%)} = \text{Ca/P retido (mg/ave/dia)} / \text{Ca/P ing (mg/ave/dia)} \times 100$$

- j) Cálcio ou fósforo endógeno:

$$\text{Ca/ P endógeno (mg /ave / dia)} = \text{Ca/P endógeno (g/ Kg/ MS ing)} \times \text{consumo (kg MS/ ave/ dia)} \times 1000$$

Onde: Ca/P endógeno (g/ Kg/ MS ing) é obtido através do intercepto da respectiva equação de regressão

- k) Coeficiente de digestibilidade aparente Ca / P (CDA):

$$\text{(CDA) (\%)} = [\text{Ca/P ing (g)} - \text{Ca/P ex (g)}] / [\text{Ca/ P ingerido (g)}] \times 100$$

- l) Coeficiente de digestibilidade verdadeiro Ca / P (CDV):

$$\text{(CDV) (\%)} = \{ \text{Ca/ P ing (g/Kg/ MS ing)} - [\text{Ca/ P exc (g/Kg/MS ing)} - \text{Ca/ P endógeno (g)}] \} / [\text{Ca/ P ing (g)}] \times 100$$

3.4.2 Método de coleta ileal da digesta

Através do método de coleta ileal da digesta foram aferidos os coeficientes de digestibilidade aparente, verdadeiro e as perdas endógenas de cálcio e fósforo, seguindo a metodologia descrita por Fan et al. (2001) e Shen et al. (2002). As fórmulas encontram-se descritas abaixo.

- a) Fator de indigestibilidade (FI):

$$(FI) = \% \text{ CAI dieta} / \% \text{ CAI digesta}$$

Onde: CAI = Cinza insolúvel em ácido

- b) Coeficiente de digestibilidade ileal aparente do cálcio ou fósforo (CDIA):

$$\text{CDIA (\%)} = [\% \text{ Ca/P dieta} - (\% \text{ Ca/P digesta} \times \text{FI})] / (\% \text{ Ca/P dieta}) \times 100$$

- c) Coeficiente de digestibilidade ileal verdadeiro do cálcio ou fósforo (CDIV):

$$\text{CDIV (\%)} = \text{CDIA (\%)} + [\text{Ca/P endógeno} / \text{Ca/P dieta (g/kg/MS)}] \times 100$$

Onde: Ca/P endógeno (g/ Kg/ MS ing) é obtido através do intercepto da respectiva equação de regressão

- d) Cálcio ou fósforo ileal endógeno:

$$\text{Ca/ P ileal endógeno (mg/kg/MS)} = [\text{CDIV (\%)} - \text{CDIA (\%)}] \times \text{Ca/P dieta (g/kg/MS)}$$

Onde: CDIV é obtido através da inclinação da respectiva equação de regressão

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.5.1 Ensaio Bentonita

O experimento foi executado seguindo o delineamento inteiramente casualizado, com três níveis de bentonita e oito repetições. Os resultados foram analisados utilizando o PROC GLM (General Linear Model) do programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., 2002). Os dados foram inicialmente testados quanto à normalidade através do Teste de Shapiro-Wilk. Após, foram submetidos à análise de variância,

considerando-se o nível de significância de 5 %, e as médias testadas através de contrastes lineares.

3.5.2 Ensaio Digestibilidade

O experimento foi executado seguindo o delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 2, com quatro níveis dos minerais cálcio e fósforo e dois níveis de bentonita, com seis repetições por tratamento. Os dados foram inicialmente testados quanto à normalidade através do Teste de Shapiro-Wilk. As médias foram submetidas à análise de variância utilizando o PROC GLM (General Linear Model) do programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., 2002).

As perdas endógenas foram determinadas a partir da análise de regressão, através do procedimento REG para estimar inclinação e intercepto. A técnica infere no estabelecimento de relações lineares entre o mineral eliminado (na digesta ileal ou nas excretas) e o consumido na dieta (Fan et al., 2001). A variável dependente foi o mineral em estudo (cálcio ou fósforo) digerido, expresso em gramas por quilograma de matéria seca, e a variável independente o mineral (cálcio ou fósforo) dietético (g / kg de MS). Uma vez observada a relação linear entre os níveis crescentes de mineral consumido e digerido, a inclinação da curva de regressão representa a estimativa para digestibilidade verdadeira do mineral em estudo, e o intercepto representa a estimativa de perda endógena do mineral (g / kg MS) (Fan et al., 2001; González-Vega et al., 2013).

Os dados foram submetidos à análise de contrastes polinomiais ortogonais para avaliar possíveis efeitos lineares ou quadráticos dos níveis de cálcio e fósforo sobre as diferentes variáveis testadas.

A comparação entre coleta total e ileal para digestibilidade verdadeira e perdas endógenas foi realizada através dos contrastes das respectivas curvas de regressões lineares, contrastando-se os interceptos e as inclinações, seguindo os procedimentos das hipóteses 2 e 3 descritos por Zarnoch (2009).

O procedimento LSMEANS foi utilizado para calcular os valores médios e o nível de significância de 5 % foi considerado ao se determinar diferenças entre médias de tratamentos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados dos ensaios denominados “Bentonita” e “Digestibilidade” serão apresentados separadamente. Em ambos os ensaios as aves mantiveram-se saudáveis e todas as coletas de amostras para análises puderam ser realizadas.

4.1 ENSAIO BENTONITA

A inclusão de bentonita na dieta de frangos de corte não alterou ($P>0,05$) o consumo de ração, ganho de peso, peso vivo e conversão alimentar, independente da dose de inclusão (0,25 ou 0,50 %), como descrito na Tabela 5. Outros autores confirmam os resultados obtidos, alegando que os adsorventes não alteram o desempenho zootécnico das aves, onde a inclusão de 0,5 % de bentonita na dieta não afetou o consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar de frangos de corte criados até 42 dias de idade (Lopes et al., 2006), bem como a inclusão de 0,3 % não alterou nenhuma das variáveis de desempenho (Magnoli et al., 2011). Doses mais elevadas (0,75 e 1,0 %) mantiveram inalteradas as variáveis de peso vivo e consumo de ração de frangos de corte criados até cinco semanas de idade (Indresh et al., 2013).

Tabela 5 – Peso médio inicial, consumo de ração, peso médio final, ganho de peso médio diário e conversão alimentar de frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,25 ou 0,50 % de bentonita.

Variáveis	0,0 vs 0,25	<i>P</i>	0,0 vs 0,50	<i>P</i>	0,25 vs 0,50	<i>P</i>	CV (%)
Peso médio inicial(g)	368 vs 371	NS	368 vs 372	NS	372 vs 372	NS	2,07
Consumo (g/ave/dia)	78,2 vs 80,1	NS	78,2 vs 79,1	NS	80,1 vs 79,1	NS	6,85
Peso médio final (g)	780 vs 786	NS	780 vs 785	NS	786 vs 785	NS	2,89
Ganho de peso médio diário (g)	58,9 vs 59,2	NS	58,9 vs 59,0	NS	59,2 vs 59,0	NS	4,24
Conversão alimentar (g/g)	1,33 vs 1,35	NS	1,33 vs 1,34	NS	1,35 vs 1,34	NS	5,30

Dados avaliados através de contrastes lineares.

P: probabilidade; CV: coeficiente de variação.

NS: não significativo ($P>0,05$).

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Discordando dos autores supracitados, a inclusão de 1 % de bentonita na dieta de frangos de corte resultou em menor consumo de ração (Khanedar; Vakili; Zakizadeh, 2012). Os autores atribuem o resultado a natureza adsorviva das bentonitas e sua capacidade higroscópica, a qual pode implicar em maior resistência ao fluxo da digesta, afetando negativamente o consumo. Já para Pasha et al. (2008) a inclusão de 0,5 % de bentonita não alterou o consumo de ração e a conversão alimentar, porém o ganho de peso foi superior, possivelmente em virtude do maior tempo de retenção do alimento no intestino, submetendo os nutrientes a ação enzimática por maior tempo.

Os níveis dos minerais séricos cálcio, cloretos, ferro e magnésio (Tabela 6) não diferiram ($P>0,05$) entre as aves suplementadas ou não com bentonita na dieta. Resultados semelhantes foram encontrados por Franciscato et al. (2006), que verificaram que as doses isoladas de 0,3 e 0,5 % de bentonita, na dieta de frangos de corte, não são capazes de alterar os níveis de cálcio e magnésio.

No entanto, os níveis de fósforo das aves que receberam 0,5 % de bentonita na dieta foram inferiores ($P<0,05$) as aves que não receberam o adsorvente, o que pode ser ocasionado pela capacidade da bentonita em adsorver minerais em nível intestinal, diminuindo sua disponibilidade para absorção.

Tabela 6 - Níveis dos minerais séricos cálcio, cloretos, ferro, fósforo e magnésio de frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,25 ou 0,50 % de bentonita.

Variáveis	0,0 vs 0,25	<i>P</i>	0,0 vs 0,50	<i>P</i>	0,25 vs 0,50	<i>P</i>	CV (%)
Cálcio (mg/dL)	5,29 vs 5,10	NS	5,29 vs 5,04	NS	5,10 vs 5,04	NS	9,49
Cloretos (mEq/L)	100 vs 101	NS	101 vs 102	NS	101 vs 102	NS	1,32
Ferro (µg/dL)	109 vs 102	NS	109 vs 116	NS	102 vs 116	NS	18,2
Fósforo (mg/dL)	6,67 vs 6,37	NS	6,67 vs 6,28	*	6,37 vs 6,28	NS	5,30
Magnésio (mg/dL)	2,16 vs 2,17	NS	2,16 vs 2,19	NS	2,17 vs 2,19	NS	5,37

Dados avaliados através de contrastes lineares.

P: probabilidade; CV: coeficiente de variação.

NS: não significativo ($P>0,05$); *: $P<0,05$.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Os resultados obtidos corroboram parcialmente aqueles encontrados por Eraslan et al. (2005), os quais verificaram que as doses de 0,25 e 0,50 % de bentonita na dieta diminuem os níveis séricos de cálcio e fósforo de frangos de

corde, aos 15 dias de idade, sem alterar os níveis de sódio, potássio e cloro. Os autores sugerem que o adsorvente possa se ligar irreversivelmente ao cálcio e fósforo, inibindo sua absorção no trato gastrointestinal. No mesmo experimento, demonstraram que as aflatoxinas reduzem os níveis dos minerais séricos cálcio e fósforo e que, a inclusão de bentonita, nas doses de 0,25 ou 0,50 %, causou o mesmo efeito redutivo, só que em proporção menor. Dietas deficientes em fósforo para frangos de corte, que impliquem no aparecimento de hipofosfatemia, podem induzir a redução da liberação do hormônio do crescimento e da triiodotironina, além de reduzir a porcentagem de cinzas nas tíbias (Parmer et al., 1987). Os resultados do presente estudo indicam que a redução dos níveis de fósforo observada nas aves que receberam dieta com 0,5 % de bentonita não foi capaz de causar a condição patológica de hipofosfatemia, já que esta é considerada apenas com níveis sanguíneos inferiores a 5 mg/dL (Schmidt et al., 2007).

Apesar de não terem sido observadas significativas nos níveis de cálcio, pode-se ressaltar que, em relação ao tratamento sem inclusão de bentonita, os valores caem gradativamente nas dietas com 0,25 e 0,50 % do mineral. Baixo teor plasmático de cálcio aumenta a síntese de 1,25-dihidroxicolecalciferol [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$], desencadeando a secreção de PTH, que por sua vez aumenta a reabsorção renal de cálcio (Wideman, 1987). A redução nos valores sanguíneos de cálcio pode ser extremamente maléfica, já que o cálcio plasmático é utilizado nos processos de coagulação sanguínea, permeabilidade de membrana, excitabilidade neuromuscular, transmissão do impulso nervoso e ativação de sistemas enzimáticos (Vieites et al., 2011).

As análises sanguíneas podem ser ferramentas apropriadas para a monitoria das alterações sanitárias dos lotes, sendo válidas para identificar quadros subclínicos (Schmidt et al., 2007), quando as alterações ainda não foram vistas sobre variáveis de desempenho, mas já podem ser detectadas em nível metabólico, situação essa que se aplica ao uso de aditivos anti-micotoxinas na dieta de frangos de corte.

Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) nas variáveis de peso do osso ao ar, volume ósseo, comprimento, largura, Índice de Seedor e relação cálcio e fósforo de tíbias das aves suplementadas com bentonita na dieta (Tabela 7). No entanto, observou-se que a matéria mineral (%) e fósforo foram reduzidos ($P < 0,05$) com a inclusão de 0,50 % de bentonita. Os dados de matéria mineral

divergem dos obtidos por Khanedar; Vakili e Zakizadeh (2012), os quais não encontraram diferenças nas cinzas (45,8 %) das tíbias de aves suplementadas com até 1,5 % de bentonita na dieta. Deve-se figurar que a manutenção dos níveis plasmáticos dos minerais é soberana sobre a mineralização óssea, sendo assim, uma vez que as concentrações dos minerais no sangue sejam reduzidas, ocorrerá à mobilização óssea a fim de manter a homeostase, já que o osso é um depósito dinâmico de minerais (Araújo; Vieites; Souza, 2012). A porcentagem de cinzas nos ossos é empregada como medida correspondente à exigência de cálcio e fósforo (Vieira, 2008).

Tabela 7 - Variáveis ósseas, teor de matéria mineral, cálcio, fósforo e relação cálcio / fósforo de tíbias de frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,25 ou 0,50 % de bentonita.

Variáveis	0,0 vs 0,25	<i>P</i>	0,0 vs 0,50	<i>P</i>	0,25 vs 0,50	<i>P</i>	CV (%)
Peso do osso ao ar (g)	3,98 vs 3,98	NS	3,98 vs 4,15	NS	3,98 vs 4,15	NS	9,21
Volume ósseo	3,96 vs 4,24	NS	3,96 vs 4,13	NS	4,24 vs 4,13	NS	9,28
Comprimento (mm)	62,6 vs 63,6	NS	62,6 vs 62,5	NS	63,6 vs 62,5	NS	2,38
Largura (mm)	5,75 vs 5,94	NS	5,75 vs 5,97	NS	5,94 vs 5,97	NS	7,00
Índice de Seedor	0,06 vs 0,06	NS	0,06 vs 0,06	NS	0,06 vs 0,06	NS	8,15
Matéria mineral (%)	43,3 vs 43,2	NS	43,3 vs 41,5	**	43,2 vs 41,5	**	2,97
Matéria mineral (g)	0,31 vs 0,30	NS	0,31 vs 0,28	*	0,30 vs 0,28	NS	9,57
Cálcio (%)	14,8 vs 14,6	NS	14,8 vs 13,9	*	14,6 vs 13,9	NS	6,19
Fósforo (%)	5,46 vs 5,35	NS	5,46 vs 5,00	**	5,35 vs 5,00	*	6,55
Relação Ca/P	2,71 vs 2,73	NS	2,71 vs 2,78	NS	2,73 vs 2,78	NS	7,12

Dados avaliados através de contrastes lineares.

P: probabilidade; CV: coeficiente de variação.

NS: não significativo ($P > 0,05$); *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

A maioria dos trabalhos apresentam os resultados de cinzas ósseas expressos em porcentagem, porém, Li et al. (2015) apresentam uma discussão plausível em relação aos pesos relativos e absolutos de cinzas ósseas. Os autores afirmam que a expressão de peso das cinzas reflete a quantidade de mineral contida no osso, a qual é afetada tanto pelo tamanho ósseo quanto pela mineralização óssea, podendo expressar melhor as quantidades de cálcio e fósforo depositados nos ossos associadas a aves de maior peso e/ou tamanho ósseo. Já a expressão em porcentagem elimina as diferenças entre pesos ósseos observadas entre tratamentos, sendo menos precisa para determinar os impactos dietéticos na

mineralização óssea. Com base no exposto, avaliou-se também o peso das cinzas (g), constatando-se que a inclusão de 0,5 % de bentonita na dieta foi capaz de reduzir esta variável ($P < 0,05$), confirmando os dados obtidos em porcentagem, fornecendo assim maior coesão ao concluir-se que, as alterações no metabolismo mineral causadas pela presença da bentonita em nível intestinal induzem a mobilização de minerais ósseos.

O peso da matéria mineral dos ossos é um indicador de reservas minerais, sendo diretamente afetado pela dieta, contudo também é influenciado pela medula, cartilagem e perióstio (Field, 2000). Os principais íons que compõem a matriz mineral óssea na forma de cristais de hidroxiapatita são o fosfato e o cálcio (Araújo et al., 2011) e, portanto, a mobilização óssea desses minerais implicará diretamente sobre o teor de cinzas ósseas.

Presume-se que a menor absorção entérica do fósforo, causada pela adsorção da bentonita, induz a redução nos níveis plasmáticos do mineral e conseqüentemente a mobilização óssea, com o intuito de manter a fosfatemia. Baixas concentrações plasmáticas levam à síntese renal da forma ativa da Vitamina D que, por sua vez, tende a aumentar a absorção entérica e a reabsorção renal do mineral, ao mesmo tempo em que a reabsorção óssea é induzida com o objetivo de manter as concentrações plasmáticas de fósforo em níveis normais (ProszkowiecWeglarz; Angel, 2013). A redução no teor de fósforo afeta diretamente o teor de cinzas ósseas, já que embora o fósforo esteja presente em todos os tecidos, seu principal estoque encontra-se nos ossos, que albergam aproximadamente 85 % do fósforo total do organismo (Hamdi et al., 2015).

O teor de cálcio também sofreu redução ($P < 0,05$), porém somente na maior dose testada (0,5 %). Apesar da diferença no teor de cálcio e fósforo das tíbias das aves testemunhas e das que ingeriram 0,5 % de bentonita ser de aproximadamente 1 e 0,5 % respectivamente, esta já é capaz de alterar a mineralização óssea, reduzindo o teor de cinzas (Hamdi et al., 2015). Em virtude da alta exigência de cálcio é provável que seus mecanismos reguladores sejam mais efetivos que os demais minerais, buscando manter a homeostase, fato que se torna mais expressivo nas linhagens modernas de aves de corte de crescimento rápido e alta deposição muscular, que exigem do sistema locomotor grande capacidade de sustentação (Araujo et al., 2011). Além disso, nas primeiras fases de desenvolvimento as aves apresentam maior necessidade de cálcio para a mineralização da cartilagem

presente nos ossos (Driver et al., 2005). Um aporte mineral inadequado na fase de crescimento de frangos de corte provoca um desequilíbrio na homeostase mineral, que terá como consequência a calcificação anormal dos ossos (Muniz et al., 2007). Sendo assim, na fase de crescimento de frangos de corte as exigências nutricionais de cálcio devem ser consideradas não somente com base em variáveis de desempenho, mas também de mineralização óssea (Schoulten et al., 2003). Dietas com baixa concentração de cálcio ou fósforo podem reduzir a concentração de cinzas ósseas, porém a porcentagem de cálcio nas cinzas se mantém constante em aproximadamente 37% (Field, 2000).

Deve-se atentar ao fato de que a redução na matéria mineral óssea observada pode não estar relacionada somente a redução dos teores de cálcio e fósforo, mas também a outros minerais que podem estar envolvidos no processo de adsorção a nível intestinal pela bentonita, tendo sua absorção limitada e, sofrendo consequentemente a mobilização óssea, haja vista a manutenção da homeostase. A inclusão de 0,5 % de montmorilonita cálcica na dieta de frangos de corte não alterou os depósitos de cálcio, fósforo, cobre, ferro e zinco nos ossos, porém o conteúdo de manganês, chumbo e flúor foi diminuído (Desheng et al., 2005). Alguns autores justificam as diferenças encontradas nos trabalhos pela diversidade dos aluminossilicatos utilizados (Khanedar; Vakili; Zakizadeh, 2012).

Na avicultura industrial os problemas locomotores são frequentes e responsáveis por grandes perdas econômicas, além de atentarem contra o bem-estar das aves. São mais recorrentes em machos, principalmente ao final da fase de crescimento, sendo justificados pela alta deposição muscular, rápido desenvolvimento das aves, etc. Uma vez que transtornos esqueléticos são provocados por alterações no processo de crescimento e homeostase (Araújo; Vieites; Souza, 2012), trabalhos futuros poderiam investigar a possível correlação entre desordens esqueléticas e a presença de bentonita na dieta, já que no presente trabalho o adsorvente demonstrou contribuir para a piora da mineralização óssea.

O Índice de Seedor foi calculado já que é um indicador de densidade óssea, quanto maior o seu valor, mais denso é o osso (Ebrahimi; Shariatmadari; Karimi Torshizi, 2016). As alterações encontradas na concentração de minerais e a ausência de diferenças nas variáveis relacionadas à resistência à quebra são coerentes, já que a resistência à quebra está mais relacionada às concentrações de proteínas colagenosas e não colagenosas do que a concentração de minerais

propriamente (Araujo et al., 2011). Este resultado já foi confirmado por outros autores que verificaram que, maiores teores de cinzas ósseas e fósforo nas tíbias de frangos de corte em fase de crescimento não resultaram em maior resistência a quebra (Runho et al., 2001), sendo que a desmineralização óssea deve ser prologada para induzir à perda de resistência a quebra.

4.2 ENSAIO DIGESTIBILIDADE

A presença de bentonita na inclusão de 0,5 % não alterou ($P>0,05$) o consumo de ração, peso médio final, ganho de peso médio diário e conversão alimentar, sendo que estas variáveis também não foram influenciadas ($P>0,05$) pelos diferentes níveis de minerais na dieta (Tabela 8). Não foram observadas interações ($P>0,05$) entre a bentonita e os minerais. Os dados de peso médio inicial demonstram que as aves foram distribuídas uniformemente com variação insignificante entre os grupos, sendo a técnica recomendada por Sakomura e Rostagno (2007) eficaz para a aleatorização de aves.

Tabela 8 - Peso médio inicial, consumo de ração, peso médio final, ganho de peso médio diário e conversão alimentar de frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, em diferentes níveis de cálcio e fósforo.

Variáveis	Bentonita 0,0 %				Bentonita 0,5 %				CV (%)	<i>P</i>		
	Nível de Ca e P em relação à exigência (%)				Nível de Ca e P em relação à exigência (%)					Ca / P	Bent	Ca / P x Ben
	90	80	70	60	90	80	70	60				
Peso médio inicial(g)	361	356	358	356	354	354	356	357	1,75	NS	NS	NS
Consumo (g/ave/dia)	77,6	79,3	77,4	77,8	77,1	79,2	76,1	76,8	3,48	NS	NS	NS
Peso médio final (g)	750	757	737	754	737	742	739	739	2,54	NS	NS	NS
Ganho de peso médio diário (g)	48,7	50,1	47,4	49,7	47,8	48,5	47,9	47,7	4,46	NS	NS	NS
Conversão alimentar (g/g)	1,40	1,38	1,43	1,37	1,41	1,43	1,38	1,41	4,42	NS	NS	NS

P: probabilidade; CV: coeficiente de variação.

Ca: cálcio; P: fósforo; Bent: bentonita.

NS: não significativo ($P>0,05$).

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Os resultados encontrados confirmam os dados obtidos no ensaio anterior. As dietas diferiram apenas nos níveis dos minerais cálcio e fósforo e na presença ou

ausência da bentonita, e continham as mesmas quantidades dos principais ingredientes (milho, farelo de soja e óleo vegetal), eram isoproteicas (212 g/kg), com pequenas diferenças nos níveis energéticos (3.017 a 3.068 kcal/kg), os quais são fatores reguladores do consumo pelas aves (Leeson; Caston; Summers, 1996). Não havendo diferenças expressivas capazes de alterar o consumo de ração, tampouco as demais variáveis alteraram-se.

4.2.1 Cálcio

Os dados referentes à coleta total e ileal serão apresentados separadamente. Primeiramente serão apresentados os dados em arranjo fatorial, seguidos pelas regressões do cálcio ingerido sobre o cálcio digerido, e após, as análises de contrastes polinomiais ortogonais. Por fim, serão apresentados os dados de contrastes entre os métodos de coleta total e ileal, para digestibilidade verdadeira e perdas endógenas. Os cálculos foram apresentados com base nos dados analisados.

4.2.1.1 Coleta total

O coeficiente de digestibilidade da matéria seca (CDMS) não foi influenciado ($P>0,05$) pelos níveis de cálcio e fósforo na dieta, ou pela presença da bentonita (Tabela 9), sem interações entre os fatores ($P>0,05$). Os resultados podem ser justificados pela similaridade de composição das dietas, conforme descrito anteriormente.

Já o coeficiente de digestibilidade da matéria mineral (CDMM) foi reduzido tanto pelos níveis dos minerais ($P<0,05$) quanto pela presença da bentonita ($P<0,01$), sem interações ($P>0,05$) entre os fatores (Tabela 9). A diferença no CDMM em relação à redução dietética dos minerais era esperada em virtude da composição das rações. Porém, a diferença em relação à bentonita indica que uma maior quantidade de minerais da digesta é carregada no intestino, implicando em menor absorção. Observa-se que a diferença encontrada no CDMM, entre as dietas sem e com a presença da bentonita, é de 4,3 pontos percentuais. Isso ocorre em virtude da alta capacidade de adsorção desses aditivos, os quais se ligam não somente as

micotoxinas, mas também aos minerais (Eraslan et al., 2005), o que confirma a hipótese do presente estudo.

O consumo de cálcio (Tabela 9) não foi alterado pela bentonita ($P>0,05$), somente pelos diferentes níveis dos minerais na dieta, com interação entre os fatores ($P<0,001$). A excreção (em g/ave/dia ou g/kg matéria seca ingerida) não foi influenciada ($P>0,05$) pela presença do adsorvente, somente pelos níveis dos minerais na dieta ($P<0,001$), sem interação entre os fatores ($P>0,05$).

Tabela 9 - Coeficientes de digestibilidade da matéria seca (CDMS) e mineral (CDMM), balanço de cálcio, coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) e verdadeiro (CDV) de cálcio, para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, em diferentes níveis de cálcio e fósforo.

Variáveis	Bentonita 0,0 %				Bentonita 0,5 %				CV (%)	<i>P</i>		
	Nível de Ca e P em relação à exigência (%)				Nível de Ca e P em relação à exigência (%)					Ca	Bent	Ca x Bent
	90	80	70	60	90	80	70	60				
CDMS (%)	74,1	71,5	72,0	71,4	72,1	71,7	71,5	71,3	2,89	NS	NS	NS
CDMM (%)	37,5	30,4	30,0	34,4	32,9	26,8	27,4	28,1	15,9	*	**	NS
Ca ingerido (g/dia)	0,60	0,52	0,46	0,38	0,56	0,54	0,45	0,37	3,01	***	NS	***
Ca excretado (g/ave/dia)	0,17	0,15	0,12	0,10	0,15	0,17	0,13	0,11	23,0	***	NS	NS
Ca excretado (g/kg MS ing)	2,07	1,93	1,59	1,26	2,02	2,11	1,67	1,43	22,0	***	NS	NS
Ca excretado (%)	27,0	28,8	27,1	25,8	27,3	30,3	29,0	28,7	23,3	NS	NS	NS
Ca absorvido (mg/dia)	451	368	342	292	409	379	316	271	8,09	***	*	NS
Ca endógeno (mg/ave/dia)	21,9	20,2	21,2	21,2	18,6	18,6	18,5	17,8	2,59	*	***	NS
Ca retido (mg/ave/dia)	429	347	321	279	383	360	297	254	8,35	***	*	NS
Ca retido (%)	72,1	67,1	70,4	71,3	68,2	66,2	66,8	67,4	8,60	NS	NS	NS
CDA (%)	73,0	71,2	75,0	74,2	73,0	69,7	70,1	74,0	8,17	NS	NS	NS
CDV (%)	76,6	75,2	79,7	79,7	75,9	73,1	75,2	78,9	7,73	NS	NS	NS

P: probabilidade; CV: coeficiente de variação.

Ca: cálcio; P: fósforo; Bent: bentonita.

NS: não significativo ($P>0,05$); * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

As diferenças de consumo e excreção em relação aos minerais eram esperadas em virtude dos diferentes níveis dos minerais cálcio e fósforo dietéticos, necessários para aplicar a técnica de regressão para estimativa de digestibilidade verdadeira e perdas endógenas. É importante destacar que à alta variabilidade na

excreção de cálcio dificulta a rejeição da hipótese de nulidade. Apesar dos resultados estatísticos conduzirem as conclusões de uma pesquisa, há de se considerar sempre o significado biológico das variáveis em questão (Paes, 1998).

A adsorção dos minerais pela bentonita ao longo do trato gastrointestinal pode estar relacionada ao caráter anfótero dos argilo-minerais, já que os sítios ativos de ligação nas arestas mudam suas cargas em função do pH do meio, podendo haver maior adsorção ou dessorção (Duarte-Neto et al., 2014). Com base no exposto é importante frisar que a bentonita apresenta uma pequena quantidade de cálcio em sua composição, a qual pode ser variável dependendo da rocha de origem, sendo que variações no pH do meio podem provocar adsorção ou dessorção do elemento, contribuindo para a maior variação na excreção do mineral. Entretanto, esta é uma hipótese ainda a ser estudada.

O cálcio absorvido, endógeno e retido foram reduzidos ($P < 0,05$) pela presença da bentonita e pela redução dietética dos minerais, sem interações entre os fatores ($P > 0,05$). Os dados de retenção de cálcio refletem diretamente o efeito das perdas endógenas estimadas (González-Vega et al., 2013). Ponderando-se os resultados do fator principal verifica-se redução na absorção de cálcio de 5,23 % na presença do adsorvente. O cálcio retido e o endógeno também foram reduzidos ($P < 0,05$) pela presença da bentonita na dieta.

A absorção mineral depende da capacidade dos elementos de se ligar as proteínas transportadoras de membrana do enterócito, sendo que para isso o mineral precisa estar em sua forma solubilizada, disponível para a ligação. Reações químicas entre o metal presente na dieta e qualquer outro componente dietético estão diretamente relacionadas ao grau de absorção do mineral (Vieira, 2008). A menor absorção e retenção de cálcio indica que uma quantidade do mineral pode estar sendo adsorvida a estrutura da bentonita, estando indisponível para a absorção. Verifica-se que a apesar da absorção ser menor na presença da bentonita, os valores de excreção mantiveram-se inalterados.

As argilas do grupo das bentonitas apresentam alta capacidade de troca de cátions e possuem deficiências de cargas positivas em sua estrutura, em virtude de substituições isomórficas, o que gera um excesso de cargas negativas em sua estrutura, sendo essas cargas contrabalanceadas por cátions alcalinos ou alcalinos terrosos como sódio, potássio, cálcio e magnésio (Teixeira-Neto; Teixeira-Neto, 2009). Sendo assim, o cálcio é um elemento naturalmente potencial para adsorção

na estrutura da bentonita, o que conseqüentemente diminuirá sua disponibilidade para absorção.

As demais variáveis, tais como cálcio excretado (%), cálcio retido (%) não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos níveis de minerais ou pela presença do adsorvente. O crescente interesse nos estudos da digestibilidade do fósforo exige a determinação da digestibilidade do cálcio em virtude da relação associada no metabolismo dos dois minerais (Anwar, 2016), já que a concentração de um mineral afeta a disponibilidade do outro, podendo reduzir a absorção de ambos através da formação de complexos insolúveis (Al-Masri, 1995; Runho et al. 2001). Níveis elevados de cálcio em relação ao fósforo induzem a hipofosfatemia (Ansar et al., 2004). Em virtude disso, no presente trabalho as dietas foram formuladas reduzindo-se simultaneamente ambos minerais, na mesma proporção, permitindo que a relação Ca:P nas dietas fossem semelhantes. Outros autores que avaliaram a digestibilidade desses minerais adotaram a manutenção da relação Ca:P constante (Shastak et al., 2012; Mutucumarana et al., 2014).

Os valores de digestibilidade aparente (73,3 e 71,8 %) ou verdadeira (77,8 e 75,8) das dietas sem e com bentonita, respectivamente não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$), resultados justificados pela similaridade de consumo e excreção das aves. Os resultados de digestibilidade assemelham-se aos encontrados para suínos, onde doses de até 0,5 % de bentonita na dieta não alteraram a digestibilidade aparente do cálcio, magnésio, zinco, cobre e manganês (Lehnen et al., 2011).

Efeitos da bentonita sobre os minerais também tem sido investigados em outras espécies animais. Em ratos, observou-se que a presença da bentonita como aditivo alimentar pode reduzir a retenção de cálcio, sugerindo uma menor captação do mineral em nível gastrointestinal (Grosicki; Kowalski; Bik, 2004). Os mesmos autores atentam para a possibilidade da presença da bentonita na dieta tornar os minerais traços marginais ou insuficientes.

Khanedar, Vakili e Zakizadeh (2012) afirmam que a bentonita com cargas em equilíbrio não reage com ingredientes alimentares e atua como material inerte devido ao pH neutro ou ligeiramente alcalino. Porém, sabe-se que o processo de adsorção através da formação de sítios ativos ocorre em virtude das substituições isomórficas e das interações das arestas. As substituições isomórficas ocorrem pela troca de íons Si^{+4} por Al^{+3} ou Al^{+3} por Mg^{+2} (podendo ser também Fe^{+2} ou Fe^{+3}),

provocando um déficit de cargas positivas, o qual será compensado pela adsorção eletrostática de cátions. As interações nas arestas ocorrem através de protonação ou desprotonação, fazendo com os átomos possam ter a capacidade de ligação a compostos orgânicos ou inorgânicos (Duarte-Neto et al., 2014).

As funções críticas desempenhadas pelos minerais cálcio e fósforo são mantidas através de mecanismos fisiológicos de secreção, excreção e reabsorção (Ansar et al., 2004). Assim, uma vez que a bentonita adsorva o cálcio no intestino impedindo sua absorção, poderá ocorrer à liberação de paratormônio, o qual induz a mobilização de cálcio ósseo objetivando manter a calcemia. Ainda sob efeito hormonal, os rins reduzem a excreção de cálcio através do aumento da reabsorção tubular, o que pode justificar a ausência de diferenças estatísticas sobre a excreção do elemento mineral. Os rins funcionam como válvulas de segurança, operando em uma base minuto a minuto para excretar o cálcio e fósforo em excesso ou conservá-los no organismo das aves, quando são necessários para processos fisiológicos ou reabastecimento mineral ósseo, sendo a capacidade excretora de cálcio e fósforo modificada por hormônios e nutrição (Wideman, 1987).

A hipótese acima citada é sustentada pelos dados do ensaio anterior, que demonstrou que a adição de 0,5 % de bentonita na dieta não altera os níveis sanguíneos de cálcio, porém implica em menor deposição óssea do mineral. A extrapolação de dados entre ensaios é possível já que a relação Ca:P foi mantida semelhante entre eles, e esta é uma variável que desempenha grande influência sobre o conteúdo de minerais no organismo de animais em crescimento, principalmente nos ossos (Al-Masri, 1995).

O paratormônio estimula a síntese de hidroxilases nos rins, aumentando a produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Este metabólito alcança a mucosa intestinal e provoca o aumento na absorção de Ca^{2+} no intestino, estimula a reabsorção óssea, reduz a excreção renal de cálcio e induz a síntese de proteínas ligadoras de cálcio nos enterócitos (Pelicia et al., 2009). Após a paratireoidectomia, autores demonstraram que a excreção de cálcio aumentou para aproximadamente 25% do cálcio filtrado nos rins (Wideman, 1987), enfatizando o controle das paratireoides sobre a reabsorção do mineral.

Através da técnica de regressão a digestibilidade verdadeira foi determinada em 68,8 e 67,8 % para as dietas sem e com bentonita, respectivamente (Tabela 10).

As perdas endógenas (Tabela 10) foram determinadas em 272 e 242 mg/kg de matéria seca ingerida para as dietas sem e com bentonita, respectivamente.

Tabela 10 - Regressão do cálcio ingerido (g/kg MS) sobre o cálcio total digerido (g/kg MS), para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, através do método de coleta total das excretas.

Equação de regressão		Bentonita 0,0 %	Bentonita 0,5 %
		$y = 0,69 x + 0,27$	$y = 0,68 x + 0,24$
Inclinação	Erro padrão	0,06	0,08
	<i>P</i>	***	***
Intercepto	Erro padrão	0,41	0,55
	<i>P</i>	NS	NS
Digestibilidade verdadeira estimada (%)		68,8	67,8
PE de Ca (mg/kg de MS ingerida)		272	242
Coeficiente de determinação (R ²)		0,84	0,74
Coeficiente de variação (%)		7,01	8,53

Regressão do cálcio ingerido (g/kg MS) sobre o cálcio total digerido (g/kg MS) apresentou comportamento linear ($P < 0,001$).

P: probabilidade. NS: não significativo; *** $P < 0,001$.

PE: perdas endógenas.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

As perdas endógenas podem ser determinadas através de dietas isentas do mineral em estudo, técnica de diluição com a utilização de isótopos marcados com radioatividade e através da técnica de análise de regressão (Fan et al., 2001). As dietas isentas do mineral podem provocar alterações metabólicas que não expressem os valores endógenos reais, enquanto que a técnica de isótopos marcados é onerosa, laboriosa e insalubre. Sendo assim, a técnica de análise de regressão foi eleita como sendo a mais apropriada e, por isso escolhida na condução do experimento.

São escassas as informações em relação às perdas endógenas de cálcio para frangos de corte. Sabe-se que dietas isentas de cálcio tendem a estimar valores menores de perdas endógenas (Anwar et al., 2016), o que pode conduzir a interpretação de que, em situações onde haja menor disponibilidade do mineral as perdas endógenas tendem a ser reduzidas, o que é compatível com os resultados encontrados no presente ensaio. Como a bentonita reduziu a absorção de cálcio pelas aves, o cálcio endógeno pode estar sendo excretado em menor quantidade ou reabsorvido com maior eficiência, já que o organismo mobiliza seus eventos fisiológicos para preservar o mineral em circulação (Adedokun; Adeola, 2013).

O teor de cálcio ingerido, absorvido e retido aumentou linearmente ($P < 0,001$) com o aumento dos níveis de cálcio dietéticos (Tabela 11). Resultados semelhantes foram encontrados para suínos (González-Vega et al., 2013). O cálcio excretado expresso em g/ave/dia ou g/kg MS ingerida também apresentou aumento ($P < 0,01$) de acordo os crescentes níveis da dieta (Tabela 11). O CDMM apresentou comportamento quadrático ($P < 0,05$). Os resultados foram semelhantes para as dietas sem e com a inclusão de bentonita (Tabela 11), indicando que a presença do adsorvente na dieta não altera o padrão das variáveis.

Tabela 11 - Contrastes polinomiais ortogonais de coeficiente de digestibilidade da matéria mineral (CDMM), balanço de cálcio, coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e verdadeiro (CDV) de cálcio, para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita.

Variáveis	P			
	Bentonita 0,0 %		Bentonita 0,5 %	
	L	Q	L	Q
CDMM (%)	NS	*	NS	*
Ca ingerido (g/ave/dia)	***	NS	***	**
Ca absorvido (mg/ave/dia)	***	NS	***	NS
Ca retido (mg/ave/dia)	***	NS	***	NS
Ca retido (%)	NS	NS	NS	NS
Ca excretado (g/ave/dia)	***	NS	**	NS
Ca excretado (g/kg MS ingerida)	***	NS	**	NS
Ca excretado (%)	NS	NS	NS	NS
CDA (%)	NS	NS	NS	NS
Ca endógeno (mg/ave/dia)	NS	NS	*	NS
CDV (%)	NS	NS	NS	NS

P: probabilidade.

L: linear; Q: quadrático.

NS: não significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Já o cálcio endógeno (Tabela 11) aumentou linearmente de acordo com os níveis dos minerais, na dieta com inclusão de bentonita ($P < 0,05$), o que corrobora a explicação anterior, de que a maior disponibilidade de cálcio implica em maior excreção endógena. As demais variáveis não apresentaram significância ($P > 0,05$).

Hamdi et al. (2015) afirmam que o aumento do teor de cálcio na dieta diminui sua retenção. No presente trabalho, observou-se comportamento linear crescente dessa variável, o que pode ser justificado pelo fato de que as dietas continham

níveis abaixo da exigência e, por isso o aumento de cálcio na dieta conduziu a sua maior retenção.

4.2.1.2 Coleta ileal

Observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) somente na digestibilidade ileal verdadeira (Tabela 12), sendo esta inferior na presença da bentonita. Os valores de cálcio ileal endógeno e digestibilidade ileal aparente (Tabela 12) não foram alterados ($P > 0,05$), bem como não houveram interações entre as variáveis ($P > 0,05$).

Tabela 12 - Coeficiente de digestibilidade ileal aparente (CDIA), ileal verdadeiro (CDIV) e cálcio ileal endógeno (CaIE), para de frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, em diferentes níveis de cálcio e fósforo.

Variáveis	Bentonita 0,0 %				Bentonita 0,5 %				CV (%)	P		
	Nível de Ca e P em relação à exigência (%)				Nível de Ca e P em relação à exigência (%)					Ca	Bent	Ca x Bent
	90	80	70	60	90	80	70	60				
CDIA (%)	58,0	56,0	52,8	48,7	55,1	58,3	54,7	54,9	11,6	NS	NS	NS
CaIE (mg/kg MS ingerida)	1047	842	928	1102	995	933	825	685	31,4	NS	NS	NS
CDIV (%)	69,0	68,6	67,2	66,0	61,2	64,8	62,6	63,9	9,66	NS	*	NS

P: probabilidade; CV: coeficiente de variação.

Ca: cálcio; P: fósforo; Bent: bentonita.

NS: não significativo ($P > 0,05$); * $P < 0,05$.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Observando-se os valores relativos à presença da bentonita em relação à dieta sem adsorvente, verifica-se uma digestibilidade verdadeira menor em quase 5 pontos percentuais. Considerando-se que as perdas endógenas até o íleo foram semelhantes, verifica-se que a bentonita possa estar adsorvendo o cálcio no intestino delgado, provocando menor disponibilidade do mineral para absorção e, conseqüentemente gerando aumento de sua quantidade na digesta ileal, o que é refletido pelos dados de digestibilidade verdadeira. Há de se chamar atenção para a diferença de 5 pontos percentuais que aqui passa a ser mais pronunciada, já que nos seguimentos iniciais do intestino delgado ocorre a maior absorção do cálcio (Adedokun; Adeola, 2013).

Verifica-se que o metabolismo mineral é alterado na presença do adsorvente. Assim, quantidades consideráveis de elementos minerais que chegam ao lúmen

intestinal podem estar em competição por locais de ligação e transporte na mucosa, ocorrendo uma perturbação nos processos de absorção (Grosicki; Kowalski; Bik, 2004).

A análise de regressão estimou a digestibilidade verdadeira em 68,4 e 64,0 % para as dietas sem e com bentonita, respectivamente (Tabela 13), sendo valores muito próximos aos obtidos através do método de coleta total das excretas, através da técnica de regressão.

Tabela 13 - Regressão do cálcio ingerido (g/kg MS) sobre o cálcio digerido (g/kg MS), para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, através do método de coleta ileal da digesta.

Equação de regressão		Bentonita 0,0 %	Bentonita 0,5 %
		$y = 0,68x - 0,83$	$y = 0,64x - 0,44$
Inclinação	Erro padrão	0,08	0,12
	<i>P</i>	***	***
Intercepto	Erro padrão	0,52	0,72
	<i>P</i>	NS	NS
Digestibilidade verdadeira estimada (%)		68,4	64,0
PE de Ca (mg/kg de MS ingerida)		831	437
Coeficiente de determinação (R ²)		0,78	0,64
Coeficiente de variação (%)		11,5	13,6

Regressão do cálcio ingerido (g/kg MS) sobre o cálcio digerido (g/kg MS) apresentou comportamento linear ($P < 0,001$).

P: probabilidade. NS: não significativo; *** $P < 0,001$.

PE: perdas endógenas.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

As perdas endógenas (Tabela 13) foram estimadas em 831 e 437 mg de cálcio por quilograma de matéria seca ingerida, nas dietas sem e com inclusão de bentonita, respectivamente. As perdas endógenas ileais de cálcio foram determinadas em 88 ± 21 mg/kg de matéria seca ingerida com base em dietas isentas de cálcio e fósforo (Anwar et al., 2016).

Observa-se que os valores obtidos no presente trabalho são muito superiores aos encontrados por estes pesquisadores, porém metodologias diferentes devem ser atentamente consideradas ao se comparar resultados de ensaios. Anwar et al. (2016) afirmam que frações endógenas de cálcio podem ser reabsorvidas com maior eficiência em dietas isentas do mineral, levando a estimativas aquém dos valores reais.

Sabe-se que para fósforo, as perdas endógenas podem ter estimativas diferentes de acordo com a técnica utilizada, o que se acredita ser válido também para cálcio (González-Vega et al., 2013).

A digestibilidade aparente (Tabela 14) aumentou linearmente ($P < 0,05$) de acordo com os níveis de cálcio para dietas sem bentonita. Para as demais variáveis não houve significância ($P > 0,05$).

Tabela 14 - Contrastes polinomiais ortogonais de coeficientes de digestibilidade ileal aparente (CDIA), ileal verdadeiro (CDIV) e cálcio ileal endógeno (CaIE), para de frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita.

Variáveis	P			
	Bentonita 0,0 %		Bentonita 0,5 %	
	L	Q	L	Q
CDIA (%)	*	NS	NS	NS
CaIE (mg/kg de MS ingerida)	NS	NS	NS	NS
CDIV (%)	NS	NS	NS	NS

P: probabilidade.

L: linear; Q: quadrático.

NS: não significativo; * $P < 0,05$.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

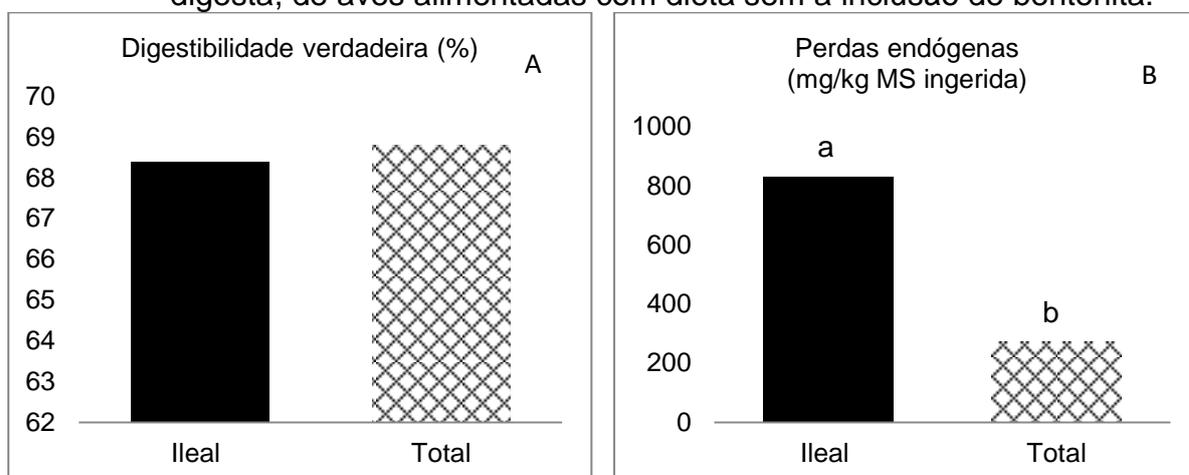
4.2.1.3 Comparação entre coleta total e coleta ileal

Os Gráficos 1 e 2 apresentam os contrastes das curvas regressão obtidas através dos métodos de coleta total e ileal e, portanto, comparam as digestibilidades verdadeiras e as perdas endógenas por meio dos valores de inclinação e intercepto, respectivamente.

Os resultados não diferem ($P > 0,05$) entre os valores de digestibilidade verdadeira (A), independente da inclusão da bentonita, o que reflete a pequena importância do intestino grosso das aves na absorção do cálcio exógeno, ratificando a informação de que a maior parte do cálcio é absorvido no intestino delgado pelas aves.

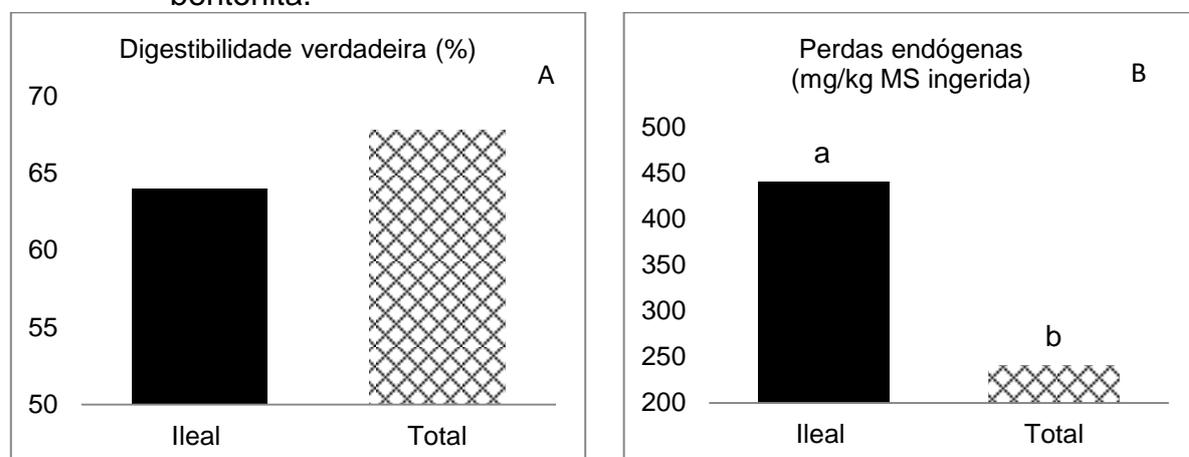
No entanto, verificou-se claramente que as perdas endógenas (B) são maiores ($P < 0,05$) no intestino delgado. Sendo assim, o intestino grosso parece desempenhar um importante papel na absorção do cálcio endógeno anteriormente excretado.

Gráfico 1 - Digestibilidade verdadeira e perdas endógenas de cálcio estimadas através dos métodos de coleta total das excretas e coleta ileal da digesta, de aves alimentadas com dieta sem a inclusão de bentonita.



Dados avaliados através de contrastes das equações $y = 0,68x - 0,83$ vs $y = 0,69x + 0,27$.
 Digestibilidade verdadeira $P > 0,05$. Perdas endógenas $P < 0,05$.
 Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Gráfico 2 - Digestibilidade verdadeira e perdas endógenas de cálcio estimadas através dos métodos de coleta total das excretas e coleta ileal da digesta, de aves alimentadas com dieta com inclusão de 0,5 % de bentonita.



Dados avaliados através de contrastes das equações $y = 0,64x - 0,44$ vs $y = 0,68x + 0,24$.
 Digestibilidade verdadeira $P > 0,05$. Perdas endógenas $P < 0,05$.
 Fonte: elaborado pela autora, 2016.

4.2.2 Fósforo

Os dados serão dispostos em apresentação semelhante ao descrito para cálcio, sendo primeiramente os dados de coleta total, seguidos pelos dados de coleta ileal e por fim o contraste entre os métodos, para digestibilidade verdadeira e perdas endógenas.

As diferentes fontes de fósforo na dieta interferem diretamente em sua disponibilidade, em virtude disso, as dietas foram formuladas para que contivessem as mesmas quantidades dos principais ingredientes, evitando que diferenças na digestibilidade pudessem estar relacionadas à maior ou menor disponibilidade de fósforo, já que se sabe, por exemplo, que o fósforo fítico presente no farelo de soja pode ser mais susceptível a hidrólise do que o encontrado no milho (Leytem et al., 2008). As alterações na relação Ca:P podem afetar a digestibilidade do fósforo e alterar o pH de seguimentos do tratamento gastrointestinal como a moela (Amerah et al., 2014) e por isso, no presente estudo, as dietas foram formuladas para que apresentassem a relação Ca:P semelhante. Além disso, alguns autores demonstraram que a digestibilidade pré-cecal do fósforo do farelo de soja pode ser diminuída com o aumento da relação Ca:P (Liu; Chen; Adeola, 2013). Os mesmos autores afirmam que a retenção não foi alterada quando a relação Ca:P variou entre 0,8 e 2,0.

4.2.2.1 *Coleta total*

Observou-se que a ingestão de fósforo (Tabela 15) foi afetada ($P < 0,05$) pelos níveis dos minerais na dieta, sem efeitos da bentonita ($P > 0,05$), resultado este esperado em virtude da composição das dietas.

A excreção de fósforo (em g/ave/dia ou g/kg de MS ingerida ou %) aumentou ($P < 0,05$) pela presença do adsorvente na dieta e à medida que os níveis de fósforo foram aumentados nas dietas (em g/ave/dia ou g/kg de MS ingerida), sem interações entre os fatores ($P > 0,05$). A excreção de fósforo é afetada principalmente pela absorção intestinal e reabsorção renal (Ren et al., 2016). Rodehutschord et al. (2012) sugerem que a excreção urinária de fósforo é muito baixa e que não é afetada pela ingestão quando as aves recebem dietas com níveis de fósforo abaixo da exigência. Já Wideman (1987) afirma que a excreção urinária de fósforo pelas aves é extremamente variável; dependendo do momento fisiológico (reabsorção ou secreção). Sendo assim, no presente trabalho presume-se que o principal controle sobre a excreção do fósforo foi entérico.

Sabe-se que o fósforo encontrado nas excretas pode originar-se de ingestão dietética não digerida, da segregação ou desprendimento do trato digestivo anterior ao íleo distal, da eliminação do ceco ou cólon, da excreção endógena e da excreção

urinária (Dilger; Adeola, 2006; Mutucumarana et al., 2014) e, além destes há uma parcela presa nas moléculas de bentonita que serão carregadas para o meio externo.

O fósforo presente nas excretas utilizadas como fertilizante na agricultura pode acarretar em efeitos maléficos ao meio ambiente, como acúmulo nos solos e eutrofização, pela presença excessiva do mineral (Delezie et al., 2015; Li et al., 2015). Em virtude disso, qualquer aditivo que tenha a capacidade de adsorver o fósforo deve ser cuidadosamente administrado, levando-se em consideração doses e sua real necessidade, já que além de diminuir a disponibilidade de um mineral oneroso nas formulações, pode também prejudicar o meio ambiente.

Tabela 15 - Balanço de fósforo, coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) e verdadeiro (CDV) de fósforo, para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, em diferentes níveis de cálcio e fósforo.

Variáveis	Bentonita 0,0 %				Bentonita 0,5 %				CV (%)	P		
	Nível de Ca e P em relação à exigência (%)				Nível de Ca e P em relação à exigência (%)					P	Bent	P x Bent
	90	80	70	60	90	80	70	60				
P ingerido (g/dia)	0,47	0,43	0,39	0,32	0,45	0,43	0,40	0,31	2,93	***	NS	**
P excretado (g/ave/dia)	0,18	0,19	0,15	0,13	0,21	0,20	0,16	0,15	14,1	***	*	NS
P excretado (g/kg MS ing)	2,30	2,48	1,98	1,63	2,70	2,56	2,11	2,03	13,2	***	**	NS
P excretado (%)	38,7	44,4	39,7	40,7	46,1	46,8	40,5	48,5	13,2	NS	*	NS
P absorvido (mg/dia)	290	240	234	187	240	229	240	161	9,70	***	**	NS
P endógeno (mg/ave/dia)	35,3	33,8	34,2	35,0	47,8	49,8	48,7	46,8	2,97	NS	***	**
P retido (mg/dia)	255	206	200	141	202	192	191	116	8,94	***	***	*
P retido (%)	53,9	47,8	51,5	44,4	45,5	44,3	47,4	36,9	9,64	***	***	NS
CDA (%)	61,3	55,6	60,3	59,3	53,9	53,2	59,5	51,5	10,0	NS	*	NS
CDV (%)	69,1	63,5	69,1	66,3	63,7	63,8	67,9	62,4	6,55	*	NS	NS

P: probabilidade; CV: coeficiente de variação.

Ca: cálcio; P: fósforo; Bent: bentonita.

NS: não significativo; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Concordando com a maior excreção, verifica-se que a absorção e retenção de fósforo (em mg/dia ou %) também foram reduzidas (P<0,05) tanto pela presença do adsorvente quanto pelos níveis de minerais na dieta (Tabela 15). Os transportadores de fosfato no intestino das aves são regulados pela Vitamina D e pela concentração de fósforo no lúmen intestinal. Partindo-se da premissa de que a bentonita adsorva o

fósforo e conseqüentemente diminua sua disponibilidade para a ligação aos transportadores intestinais, ocorre à ativação da vitamina D nos rins, com o intuito de aumentar a absorção de fósforo no intestino delgado e a reabsorção renal, através do aumento da expressão molecular dos transportadores Na-P IIb, calbindina D_{28k} no intestino delgado e, transportadores Na-P II-A nos rins. Uma vez que uma menor quantidade de fósforo esteja sendo absorvida, ocorrerá a inibição do FGF-23, já que este diminui a absorção intestinal e a reabsorção renal do fósforo (Bobeck et al., 2012; Ren et al., 2016).

É válido destacar que parte das vias de transporte do fosfato são sódio dependentes; sendo o sódio um metal alcalino e, portanto, um cátion, também pode estar sendo adsorvido pela bentonita, tendo sua concentração diminuída em nível intestinal, contribuindo para a menor absorção do fósforo. A exemplo da remoção de fósforo pela bentonita em soluções aquosas de tratamentos verificou-se que o ambiente entérico também é propício para tais fenômenos, implicando no carreamento do fósforo nas excretas.

Sabe-se que quanto maior for o tempo de contato da digesta no intestino maior a probabilidade de uma quantidade significativa de cálcio e fósforo ser absorvida no jejuno e íleo (Adedokun; Adeola, 2013). No entanto, relata-se que a presença da bentonita na digesta retém água e diminui a taxa de passagem no lúmen intestinal, e que pode afetar negativamente alguns processos absorptivos (Damiri et al., 2012), já que há maior oportunidade de contato da bentonita com os minerais em sua forma ionizada propícia para a adsorção.

Observou-se aumento ($P < 0,001$) no fósforo endógeno excretado (Tabela 15) pela presença da bentonita na dieta, com interação entre os fatores. Em comparação aos dados obtidos para cálcio, verifica-se que as frações endógenas de fósforo são maiores, sendo sua participação mais significativa ao se aferir a digestibilidade do mineral. Al-Masri (1995) verificou que quando a retenção de fósforo foi mais elevada, menores foram às excreções endógenas do mineral. A afirmação do autor corrobora os dados obtidos e permite a interpretação de que a adsorção de uma maior quantidade de fósforo pela bentonita, fez com o que o mineral fosse menos retido, já que o organismo excreta uma maior fração endógena.

As perdas endógenas (Tabela 15) não foram afetadas ($P > 0,05$) pelos níveis de minerais na dieta e, verificam-se pequenas variações nos valores do menor para o maior nível de mineral. Os resultados corroboram aqueles já descritos para suínos,

onde se verificou que as perdas endógenas parecem ser constantes, independente dos níveis de fósforo na dieta (Fan et al., 2001).

A digestibilidade aparente (Tabela 15) também foi reduzida ($P < 0,05$) pela presença da bentonita, porém em relação à digestibilidade verdadeira não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$), no entanto o valor da probabilidade ficou muito próximo da significância ($P = 0,058$), sem interações entre os fatores ($P > 0,05$). A digestibilidade deve ser corrigida pelas perdas endógenas, podendo-se assim determinar os coeficientes verdadeiros (Anwar et al., 2016), já que correções de utilização aparente de nutrientes pelas perdas endógenas resultam em estimativas mais acuradas (Dilger; Adeola, 2006).

Observa-se claramente que a presença da bentonita altera o balanço de fósforo no organismo da ave, sendo que os resultados encontrados confirmam a hipótese do presente estudo. Presume-se que a bentonita adsorva as moléculas de fosfato em nível intestinal implicando em menor retenção e maior taxa de excreção do mineral. A absorção, retenção e homeostase do fósforo são mediadas pelo FGF-23, calcitonina, paratormônio e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Bobeck et al., 2012; Ren et al., 2016). Com base nos resultados obtidos no primeiro ensaio, presume-se que, se uma menor quantidade do mineral estiver disponível para absorção seus níveis séricos tendem a ser reduzidos, o que já foi demonstrado por outros autores (Franciscato et al., 2006), por sua vez, ocorre à mobilização óssea para manter a fosfatemia (Eraslan et al., 2005).

A adsorção de fosfato pela bentonita já foi comprovada em soluções aquosas, na remoção de fósforo contaminante (Osalo; Merufinia; Saatlo, 2013; Pawar et al., 2016). Bentonitas modificadas mostraram-se eficazes na redução de fosfato, mesmo em baixas concentrações, em ecossistemas naturais de água (Zamparas et al., 2011). Sabe-se que a bentonita é um excelente adsorvente devido a sua afinidade por substâncias polares (Pasha et al., 2008), sendo assim o fosfato apresenta-se como molécula passível de adsorção, já que é utilizado pelos animais em formas tais como PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} e H_2PO_4^- . A adsorção a moléculas com cargas negativas pode ocorrer devido à substituição de íons na estrutura química da bentonita que faz com que o aditivo perca seu equilíbrio elétrico, gerando um excesso de cargas positivas (Xia et al., 2004).

Através da técnica de regressão a digestibilidade verdadeira do fósforo foi determinada em 67,0 e 66,3 % para as dietas sem e com bentonita, respectivamente

(Tabela 16). A utilização da técnica para estimar perdas endógenas de fósforo em frangos de corte foi confirmada por alguns autores (Dilger; Adeola; 2006; Mutucumarana et al., 2014).

Tabela 16 - Regressão do fósforo ingerido (g/kg MS) sobre o fósforo total digerido (g/kg MS), para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, através do método de coleta total das excretas.

		Bentonita 0,0 %	Bentonita 0,5 %
Equação de regressão		$y = 0,67 x - 0,44$	$y = 0,66 x - 0,51$
Inclinação	Erro padrão	0,07	0,09
	<i>P</i>	***	***
Intercepto	Erro padrão	0,38	0,52
	<i>P</i>	NS	NS
Digestibilidade verdadeira estimada (%)		67,0	66,3
PE de P (mg/kg de MS ingerida)		442	513
Coeficiente de determinação (R ²)		0,82	0,71
Coeficiente de variação (%)		7,43	9,31

Regressão do fósforo ingerido (g/kg MS) sobre o fósforo total digerido (g/kg MS) apresentou comportamento linear ($P < 0,001$).

P: probabilidade. NS: não significativo ($P > 0,05$); *** $P < 0,001$.

PE: perdas endógenas.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

As perdas endógenas de fósforo foram determinadas em 442 e 513 mg/kg de matéria seca através da técnica de regressão (Tabela 16). Perdas endógenas são consideradas respostas fisiológicas do animal em virtude das condições de consumo, sendo importante sua mensuração na avaliação de um elemento alimentar (Lopes et al., 1999). Os valores de perdas endógenas encontrados foram um pouco superiores aos relatados por outros autores. As perdas endógenas de fósforo foram estimadas em 235 mg de fósforo por kg de matéria seca ingerida por Dilger e Adeola (2006). Em virtude de tratar-se de uma técnica relativamente nova, acredita-se haver grande variabilidade entre e dentro dos laboratórios ao estimar perdas endógenas de fósforo em frangos de corte, o que é sugerido pela revisão de dados de ensaios anteriores (Dilger; Adeola, 2006).

Observa-se nas equações estabelecidas, que as perdas endógenas resultaram em valores negativos. Mutucumarana et al. (2014) afirmam que perdas endógenas negativas de fósforo são inerentes ao método de regressão, onde o primeiro e o último ponto da reta determinam a inclinação e o intercepto, podendo resultar em valores positivos ou negativos. Valores negativos de perdas endógenas obtidos através da técnica de regressão também foram encontrados por outros

autores para frangos de corte (Rodehutscord et al., 2012; Shastak et al., 2012; Liu; Chen; Adeola, 2013).

A exigência e utilização de fósforo em frangos de corte é altamente dependente dos critérios resposta avaliados (crescimento, mineralização óssea, entre outros), dos níveis e fonte de cálcio na dieta e presença de enzimas exógenas (Adeola; Walk, 2013). No presente trabalho, as variáveis analisadas, sejam hematológicas, de mineralização óssea ou digestibilidade, demonstraram que ocorre uma adsorção do fósforo pela bentonita, reduzindo sua biodisponibilidade. Sendo a manutenção dos níveis hematológicos fundamentais para a homeostase da ave, ocorre a mobilização óssea do mineral, como observado no Ensaio “Bentonita”.

A ingestão, absorção, retenção e excreção de fósforo (Tabela 17) aumentaram linearmente à medida que os níveis de cálcio e fósforo na dieta elevaram-se sendo que algumas variáveis apresentaram comportamento linear e quadrático ($P < 0,05$), principalmente na presença da bentonita. O comportamento linear da excreção de fósforo corrobora os dados obtidos por Rodehutscord et al. (2012).

Tabela 17 - Contrastes polinomiais ortogonais de balanço de fósforo, coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e verdadeiro (CDV) de fósforo, para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita.

Variáveis	<i>P</i>			
	Bentonita 0,0%		Bentonita 0,5 %	
	L	Q	L	Q
P ingerido (g/dia)	***	**	***	***
P absorvido (mg/dia)	***	NS	***	**
P retido (mg/ave/dia)	***	NS	***	***
P retido (%)	**	NS	*	*
P excretado (g/ave/dia)	***	NS	***	NS
P excretado (g/kg MS ingerida)	***	*	***	NS
P excretado (%)	NS	NS	NS	NS
CDA (%)	NS	NS	NS	NS
P endógeno (mg/ave/dia)	NS	**	NS	**
CDV (%)	NS	NS	NS	NS

P: probabilidade

L: linear; Q: quadrático.

NS: não significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

As perdas endógenas de fósforo (Tabela 17) apresentaram comportamento quadrático ($P < 0,01$) de acordo com o aumento dos níveis dos minerais na dieta. O mesmo comportamento foi encontrado por Fan et al. (2001) tanto na digesta ileal quanto nas fezes de suínos. Os dados de balanço de fósforo demonstram claramente que a bentonita interfere no metabolismo mineral colocando em discussão a afirmação de autores que asseguram que a bentonita é inerte e não tóxica (Miazzi et al., 2005). Há de se ponderar sempre as variáveis que estão sendo analisadas, já que afirmações generalistas incorrem em erros que podem se perpetuar através de citações mal formuladas. Em virtude disso, é fundamental citar sempre sobre quais variáveis o aditivo apresentou ou não efeito e concluir somente sobre elas, uma vez que o adsorvente ingerido terá contato com diversas moléculas, poderá interferir no metabolismo de diferentes esferas. A exemplo disso, pode-se citar trabalho realizado por Gilani et al. (2013) os quais demonstraram que a inclusão de bentonita na dieta de poedeiras marrons provocou redução na gravidade específica dos ovos e na coloração da gema, sugerindo que a bentonita pode carrear pigmentos carotenoides e não carotenoides.

4.2.2.2 *Coleta ileal*

Através da coleta ileal observou-se novamente que as perdas endógenas de fósforo (Tabela 18) foram aumentadas ($P < 0,05$) pela presença do adsorvente na dieta, sendo estimadas em 608 e 900 mg/kg de matéria seca ingerida para as aves recebendo dieta sem e com bentonita, respectivamente. Não foram observadas interações ($P > 0,05$) entre as variáveis. As perdas endógenas representam uma parcela das exigências diárias dos animais, já que as perdas metabólicas de fósforo são inevitáveis (Shen et al., 2002).

Diferenças entre a digestibilidade pré-cecal e a retenção do fósforo podem ocorrer como consequência da excreção urinária de fósforo, de sua absorção ou secreção no intestino grosso (Shastak et al., 2012). No ensaio anterior, verificou-se que a presença da bentonita reduziu a digestibilidade aparente do fósforo, o que não foi observado nos dados de coleta ileal. As diferenças podem estar relacionadas à absorção de fósforo que pode ocorrer após o íleo, sendo um tema ainda muito pouco elucidado nos frangos de corte (Rodehutscord et al., 2012). As variações de pH do trato gastrointestinal da ave podem implicar em maior ou menor adsorção do

mineral pela bentonita, já que o processo é dependente do pH do meio (Duarte-Neto et al., 2014), o que pode contribuir para as diferenças encontradas em relação a digestibilidade total e ileal.

Tabela 18 - Coeficiente de digestibilidade ileal aparente (CDIA), ileal verdadeiro (CDIV) e fósforo ileal endógeno (PIE), para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, em diferentes níveis de cálcio e fósforo.

Variáveis	Bentonita 0,0 %				Bentonita 0,5 %				CV (%)	P		
	Nível de Ca e P em relação à exigência (%)				Nível de Ca e P em relação à exigência (%)					P	Bent	P x Bent
	90	80	70	60	90	80	70	60				
CDIA (%)	55,0	55,1	49,1	51,7	54,0	51,9	47,6	50,8	14,0	NS	NS	NS
PIE (mg/kg MS ingerida)	611	588	743	491	1045	927	870	759	42,4	NS	*	NS
CDIV (%)	64,7	65,4	60,7	66,2	69,0	67,9	64,5	71,7	11,0	NS	NS	NS

P: probabilidade; CV: coeficiente de variação.

NS: não significativo; *P < 0,05.

Ca: cálcio; P: fósforo; Bent: bentonita.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Através da técnica de regressão a digestibilidade verdadeira ileal do fósforo (Tabela 19) foi determinada em 64,2 e 68,8 % para as dietas sem e com bentonita, respectivamente. As perdas endógenas (Tabela 19) foram estimadas em 578 e 887 mg/kg de matéria seca ingerida na ausência e na presença de bentonita, respectivamente.

Tabela 19 - Regressão do fósforo ingerido (g/kg MS) sobre o fósforo digerido (g/kg MS), para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita, através do método de coleta ileal da digesta.

Equação de regressão	Bentonita 0,0 %		Bentonita 0,5 %	
	y = 0,64 x - 0,58		y = 0,68 x - 0,88	
Inclinação	Erro padrão	0,09	0,20	
	P	***	**	
Intercepto	Erro padrão	0,45	1,08	
	P	NS	NS	
Digestibilidade verdadeira estimada (%)		64,2	68,8	
PE de P (mg/kg de MS ingerida)		578	887	
Coeficiente de determinação (R ²)		0,75	0,45	
Coeficiente de variação (%)		10,54	16,95	

Regressão do fósforo ingerido (g/kg MS) sobre o fósforo digerido (g/kg MS) apresentou comportamento linear (P < 0,001).

P: probabilidade. NS: não significativo (P>0,05); ***P < 0,001.

PE: perdas endógenas.

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Anwar et al. (2016) relatam perdas endógenas ileais de fósforo estimadas em 354 ± 39 mg/kg de matéria seca ingerida, sendo estas aferidas em dietas isentas do mineral. As diferenças entre os valores podem estar relacionadas às técnicas adotadas em cada ensaio. Rutherford et al. (2004) relatam perdas endógenas de 446 mg/kg de matéria seca ingerida, obtidas em ensaio com dietas contendo pequenas quantidades de fósforo.

As variáveis de coeficiente de digestibilidade aparente, perdas endógenas e coeficiente de digestibilidade ileal verdadeiro de fósforo (Tabela 20) não apresentaram significância ($P>0,05$) nas análises de contrastes ortogonais polinomiais.

Ao contrário dos animais de laboratório, onde o metabolismo do cálcio e fósforo já foi vastamente estudado e documentado, para as aves de interesse zootécnico ainda há grande necessidade de pesquisas básicas e aplicadas que nos possibilitem compreender o metabolismo desses minerais, principalmente em nível gastrointestinal (Adedokun; Adeola, 2013).

Tabela 21 - Contrastes polinomiais ortogonais de coeficientes de digestibilidade ileal aparente (CDIA), verdadeiro (CDIV) e fósforo ileal endógeno (PIE), para frangos de corte recebendo dieta sem inclusão de bentonita (0,0 %) e com inclusão de 0,50 % de bentonita.

Variáveis	<i>P</i>			
	Bentonita 0,0%		Bentonita 0,5 %	
	L	Q	L	Q
CDIA (%)	NS	NS	NS	NS
PIE (mg/ kg de MS ingerida)	NS	NS	NS	NS
CDIV (%)	NS	NS	NS	NS

P: probabilidade.

L: linear; Q: quadrático.

NS: não significativo ($P>0,05$).

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

4.2.2.3 Comparação entre coleta total e coleta ileal

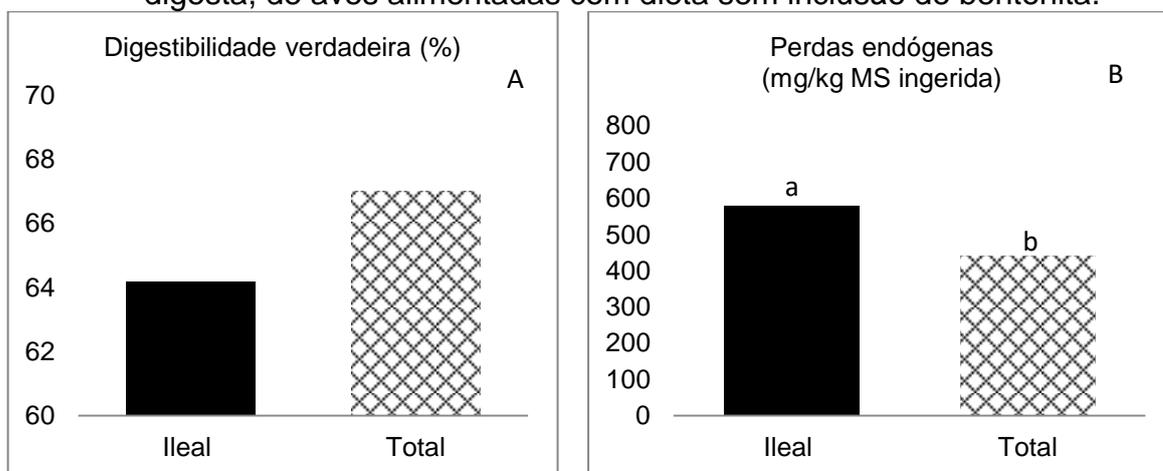
Os Gráficos 3 e 4 apresentam os contrastes das curvas regressão obtidas através dos métodos de coleta total e ileal e, portanto, comparam as digestibilidades verdadeiras e as perdas endógenas. Os dados não diferem ($P>0,05$) em relação aos valores de digestibilidade verdadeira (A), independente da inclusão da bentonita. Análogo ao descrito para cálcio, a ausência de diferenças entre os valores de digestibilidade indica que cecos e cólon parecem desempenhar

uma pequena função na absorção do fósforo exógeno, ratificando a informação de que a maior parte do fósforo é absorvido pelas aves no intestino delgado, havendo uma pequena absorção após o íleo (Shastak et al., 2012). Shen et al. (2002) relataram que para suínos, o intestino grosso não desempenha um papel importante na secreção de fósforo endógeno, tampouco na absorção do fósforo exógeno. No entanto, os rins parecem ter um papel importante na reabsorção de fósforo em aves e conseqüentemente na homeostase (Al-Masri, 1995).

Contudo, nas dietas sem bentonita (Gráfico 3) as perdas endógenas (B) foram maiores ($P < 0,05$) até o íleo, semelhantemente ao obtido para cálcio e, verifica-se, portanto, que o intestino grosso também parece atuar na absorção do fósforo endógeno anteriormente excretado.

Através dos contrastes das equações de regressão, pode-se sugerir que, para frangos de corte ingerindo dieta sem bentonita, aproximadamente 24 % do fósforo endógeno que foi eliminado até o íleo é reabsorvido, portanto o intestino grosso pode atuar na manutenção da homeostase do fósforo através da reciclagem do fósforo endógeno eliminado nas porções superiores do trato gastrointestinal. Maiores valores de perdas endógenas até o íleo também foram encontrados para suínos, onde se verificou que 64 % do fósforo endógeno excretado até o final do intestino delgado é reabsorvido no intestino grosso (Fan et al., 2001).

Gráfico 3 - Digestibilidade verdadeira e perdas endógenas de fósforo estimadas através dos métodos de coleta total das excretas e coleta ileal da digesta, de aves alimentadas com dieta sem inclusão de bentonita.

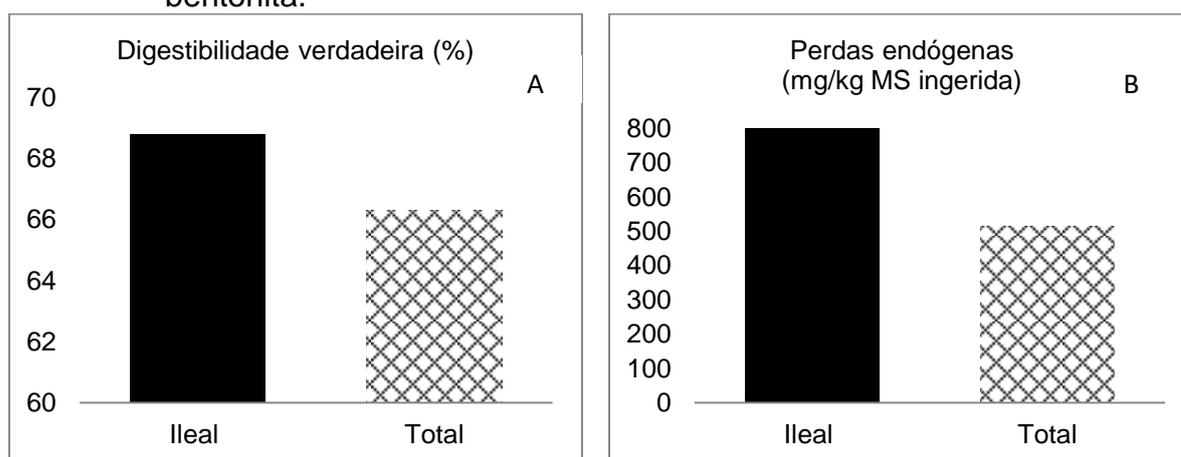


Dados avaliados através de contrastes das equações $y = 0,64x - 0,58$ vs $y = 0,67x - 0,44$
 Digestibilidade verdadeira $P > 0,05$. Perdas endógenas $P < 0,05$.
 Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Nas dietas com bentonita (Gráfico 4) não foram observadas diferenças ($P>0,05$) na excreção endógena de fósforo (B), porém há de se considerar que os valores de probabilidade ficaram muito próximos a significância ($P=0,058$), e a rejeição da hipótese de nulidade fica dificultada pela alta variabilidade dos dados de perdas endógenas.

Considerando-se que, segundo Rostagno et al. (2007), na atualidade o nível de significância não precisa necessariamente ser fixado em 5 %, podendo ser ponderados valores de 7 ou 10 % dependendo da variável em questão, a diferença poderia ser considerada. Através do contraste das equações verifica-se que a perdas endógenas totais foram aproximadamente 40 % menores que as ileais.

Gráfico 4 - Digestibilidade verdadeira e perdas endógenas de fósforo estimadas através dos métodos de coleta total das excretas e coleta ileal da digesta, de aves alimentadas com dieta com a inclusão de 0,5 % de bentonita.



Dados avaliados através de contrastes das equações $y = 0,68x - 0,88$ vs $y = 0,66x - 0,51$.
 Digestibilidade verdadeira $P>0,05$. Perdas endógenas $P>0,05$.

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Alguns autores vêm demonstrando os efeitos das interações entre moléculas em nível intestinal, como por exemplo cálcio, fósforo, vitamina D e fitase que apresentam diferentes resultados de acordo com a presença concomitante uns dos outros, porém, os pesquisadores são categóricos aos afirmar que as combinações existem mas não são fáceis de serem levadas em consideração nas formulações (Delezie, Maertens, Huyghebaert, 2012). A bentonita é mais um exemplo de ingrediente que interage com outras moléculas a nível intestinal e que seus efeitos sobre a digestibilidade devem ser estudados e considerados.

Apesar dos efeitos causados pela inclusão de bentonita na dieta das aves sobre o metabolismo dos minerais, sabe-se que os efeitos deletérios das micotoxinas são indubitavelmente piores, e por isso os adsorventes devem ser adicionados à dieta das aves. Porém, alguns cuidados devem ser tomados, o primeiro deles é conhecimento do nível de micotoxinas existentes, já que se sabe que o poder de adsorção desses aditivos é maior quanto menor for a presença das micotoxinas (Manafi, Narayanaswamy, Pirany, 2009). Sendo assim, na ausência de micotoxinas as bentonitas estão disponíveis quimicamente para ligar-se a quaisquer moléculas. Faz-se necessário adotar doses menores e adsorventes mais específicos, eficazes contra as micotoxinas e que causem menos efeitos deletérios para o metabolismo do cálcio e do fósforo.

A dose de bentonita a ser adotada não é consenso entre os profissionais da área de nutrição animal, já que deve ser escolhida de acordo com o nível de exposição que o animal sofrerá. A divergência de doses recomendadas entre autores pode estar relacionada às variáveis analisadas em cada experimento, já que alguns são mais generalistas e outros mais específicos. Uma alternativa é a utilização de bentonitas modificadas, as quais sofrem alterações em sua estrutura química e, tornam-se mais específicas para adsorção de determinadas moléculas. Bentonitas modificadas já demonstraram efeitos benéficos sobre a redução de agentes patogênicos entéricos, aumento da atividade de enzimas como proteases, amilases e lipases, além de melhorias na mucosa intestinal (Xia et al., 2004).

Outro fator a ser considerado em experimentos futuros é a investigação das interações da bentonita com outros elementos minerais, aminoácidos e vitaminas. Já em 1956, um experimento com aves New Hampshire demonstrou a deficiência de vitamina A em aves alimentadas com doses acima de 2 % de bentonita na dieta (Briggs; Fox, 1956). Em ratos verificou-se que outros minerais podem ser alterados como ferro, cálcio e cádmio, com menor retenção na presença de bentonita na dieta (Grosicki; Kowalski; Bik, 2004). Na dieta de cordeiros, verificou-se que a inclusão de 0,75 % de bentonita reduziu a deposição de manganês nos ossos e de ferro nos rins (Walz et al., 1998). Zaia e Zaia (2006) discutem a adsorção de diferentes grupos de aminoácidos por minerais como a montmorilonita.

No presente estudo, verificou-se que o CDMM foi 4,3 pontos percentuais menor no grupo de aves que recebeu o adsorvente na dieta, em relação ao controle, sendo este valor não atingido somente com as diferenças na menor digestibilidade

do cálcio e do fósforo, o que significa que outros minerais são adsorvidos pela bentonita e estão sendo carregados para as excretas.

Com base no exposto, pode-se verificar que diversos experimentos, muitas vezes delineados com objetivos distintos, relatam às interações indesejadas dos adsorventes de micotoxinas com diversos componentes orgânicos e inorgânicos. Os dados dos ensaios realizados tornam explícitas as alterações que a presença da bentonita causa no metabolismo do cálcio e fósforo, reascendendo a discussão sobre a necessidade de se encontrar adsorventes mais seletivos, bem como conhecer os reais efeitos destes aditivos não somente sobre as micotoxinas, mas sobre quaisquer moléculas que possam ter contato no trato gastrointestinal.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a inclusão de 0,25 % de bentonita, na dieta de frangos de corte, não altera a concentração dos minerais séricos cálcio, cloretos, ferro, fósforo e magnésio, tampouco as características morfométricas ósseas e a deposição de minerais nas tíbias.

A inclusão de 0,5 % de bentonita, na dieta de frangos de corte, reduz os níveis séricos de fósforo, o teor de matéria mineral e a concentração de cálcio e fósforo ósseos, sem afetar as características morfométricas ósseas.

A inclusão de 0,5% de bentonita, na dieta de frangos de corte, reduz o coeficiente de digestibilidade da matéria mineral, o cálcio absorvido, retido e endógeno e a digestibilidade ileal verdadeira do cálcio.

A inclusão de 0,5% de bentonita, na dieta de frangos de corte, reduz o fósforo absorvido, retido e a digestibilidade total aparente, e aumenta a excreção de fósforo exógeno e endógeno total e ileal.

O intestino grosso dos frangos de corte é responsável pela reabsorção do cálcio e fósforo endógenos.

REFERÊNCIAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. 2016. ABPA (Associação brasileira de proteína animal) - Estatística. 2014. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/estatisticas/frango/consumo_per_capita>. Acesso em: 22 jul. 2014.

ADEDOKUN, S. A.; ADEOLA, O. Calcium and phosphorus digestibility: Metabolic limits. **Poultry Science**, v. 22, p. 600–608, 2013.

ADEOLA, O.; WALK, C. L. Linking ileal digestible phosphorus and bone mineralization in broiler chickens fed diets supplemented with phytase and highly soluble calcium. **Poultry Science**, v. 92, p. 2109–2117, 2013.

AGUIAR, M. R. M. P. de; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, 2002.

AL-MASRI, M. R. Absorption and endogenous excretion of phosphorus in growing broiler chicks, as influenced by calcium and phosphorus ratios in feed. **British Journal of Nutrition**, v. 74, p. 407-415, 1995.

AMERAH, A. M. et al. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets. **Poultry Science**, v. 93, p.906–915, 2014.

ANSAR, M. et al. Effects of high dietary calcium and low phosphorus on urinary system of broiler chicks. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 24, n. 3, p. 113, 2004.

ANWAR, M. N. et al. Measurement of true ileal calcium digestibility in meat and bone meal for broiler chickens using the direct method. **Poultry Science**, v. 95, p. 70–76, 2016.

ARAÚJO, G.M. et al. Variação aniônica da dieta sobre características ósseas de frangos de corte: resistência à quebra, composição orgânica e mineral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 4, 2011.

ARAÚJO, G.M.; VIEITES, F.M.; SOUZA, C.S. Importância do desenvolvimento ósseo na avicultura. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. R, p. 79-89, 2012.

BENETOLI, L. O.de B. et al. Estudo da Interação de Aminoácidos com Argilas: Implicações para a Origem da Vida. **Sociedade Brasileira de Química**. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

BENNET, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical of Microbiology Review**, v. 16, p. 497–516, 2003.

BLOUNT, W.P. Turkey —xll Disease. **Turkey**, v. 9, p. 55-58, 1961.

BOBECK, E. A. et al. Maternally-derived antibody to fibroblast growth factor-23 reduced dietary phosphate requirements in growing chicks. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 420, p. 666–670, 2012.

BOČAROV-STANČIĆ, A. et al. In vitro efficacy of mycotoxins' adsorption by natural mineral adsorbents. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 27, n. 3, p. 1241-1251, 2011.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Brasília, 2011.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 59, de 26 de dezembro de 2013. **Prorrogação dos prazos estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução da Diretoria Colegiada RDC n.7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Brasília, 2013.

BRASIL. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA**. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Brasília, 2013.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Sumário Mineral / DNPM**, v. 34, 2014. 141 p.

BRASIL, MAPA. **Instrução Normativa nº 13**, de 30 de novembro de 2004. D.O.U., Brasília, 01 de dezembro de 2004. Disponível em:
<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal> >

BRIGGS, G. M.; FOX, M. R. S. Vitamin A deficiency in chicks produced by adding high levels of bentonite to synthetic diets. **Poultry Science**, v. 35, n. 3, p. 570-576, 1956.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implication for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p. 134–158, 2012.

CARÃO, Á. C. de P. et al. Métodos físicos e químicos de detoxificação de aflatoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola. **Ciência Rural**, v.44, n.4, p.699-705, 2014.

COCA-SINOVA, de A. et al. Apparent ileal digestibility of energy, nitrogen, and amino acids of soybean meals of different origin in broilers. **Poultry Science**, v. 87, p. 2613–2623, 2008.

CORTÉS, M. E. M. et al. Study of methodological variations in apparent nutrient metabolism determination in broiler chickens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.10, p.1921-1927, 2009.

COSTA FILHO, A. P.; GOMES, A. S.; LUCAS, E. F. Preparação e caracterização de organobentonita modificada com ionenos alifáticos. **Polímeros**, v. 15, n. 3, p. 212-217, 2005.

DAL BOSCO, S. M.; VIGNADO, C.; CARVALHO, W. A. Adsorção de mn(ii) e cd(ii) por argilas in natura e modificadas com pirrolidinaditiocarbamato de amônio. **Geochimica Brasiliensis**, v. 20, n. 3, p. 219-232, 2006.

DAMIRI H., et al. Effect of different sodium bentonite levels on performance, carcass traits and passage rate of broilers. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 32, n. 2, p. 197-200, 2012.

DELEZIE, E. et al. Impacts of calcium and phosphorus concentration, their ratio, and phytase supplementation level on growth performance, foot pad lesions, and hock burn of broiler chickens. **Journal Applied of Poultry Research**, v. 24, p.115–126, 2015.

DELEZIE, E.; MAERTENS, L.; HUYGHEBAERT, G. Consequences of phosphorus interactions with calcium, phytase, and cholecalciferol on zootechnical performance and mineral retention in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 91, p. 2523–253, 2012.

DESHENG, Q. et al. Adsorption of Aflatoxin B1 on Montmorillonite. **Poultry Science**, v. 84, p. 959–961, 2005.

DILGER, R. N.; ADEOLA, O. Estimation of true phosphorus digestibility and endogenous phosphorus loss in growing pigs fed conventional and low-phytate soybean meals. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 627–634, 2006.

DRIVER, J. P. et al. Calcium requirements of the modern broiler chicken as influenced by dietary protein and age. **Poultry Science**, v. 84, p. 1629–1639, 2005.

DUARTE-NETO, J. F. et al. Processos de adsorção de corantes em argilas esmectíticas: uma revisão. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 9, n. 1, p. 51–59, 2014.

EBRAHIMI, H.; SHARIATMADARI, F.; KARIMI TORSHIZI, M.A. Dietary supplementation and in ovo injection of 1α -OHD3 in a low-calcium and low-phosphorous diets for broilers. **Journal of Applied Animal Research**, v. 44, n. 1, p.113–117, 2016.

ERASLAN, G. et al. The effects of aflatoxin and sodium bentonite combined and alone on some blood electrolyte levels in broiler chickens. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v.29, p.601-605, 2005.

FAN, M. Z. et al. Novel methodology allows simultaneous measurement of true phosphorus digestibility and the gastrointestinal endogenous phosphorus outputs in studies with pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2388–2396, 2001.

FAVUS, M. J. et al. Regulation of Calcium, Magnesium, and Phosphate Metabolism. **American Society for Bone and Mineral Research**, p.76-117, 2006.

FIELD, R.A. Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures. **Meat Science**, v. 55, p. 255-264, 2000.

FRANCISCATO, C. et al . Concentrações séricas de minerais e funções hepática e renal de frangos intoxicados com aflatoxina e tratados com montmorilonita sódica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 11, 2006.

FUKAYAMA, E. H. et al. Efeito da suplementação de fitase sobre o desempenho e a digestibilidade dos nutrientes em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.4, p.629-635, 2008.

GILANI, A. et al. Impact of sodium bentonite addition to the diets containing cottonseed meal on productive traits of hy-line w-36 hens. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 23, n. 2, p. 411-415, 2013.

GOMES, P. C. et al . Exigência de fósforo disponível para frangos de corte machos e fêmeas de 22 a 42 e de 43 a 53 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, 2004.

GONZÁLEZ-VEGA, J. C. et al. Endogenous intestinal losses of calcium and true total tract digestibility of calcium in canola meal fed to growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 4807–4816, 2013.

GOWDA, N.K.S.; SWAMY, H.V.L.N.; MAHAJAN P. Recent advances for control, counteraction and amelioration of potential aflatoxins in animal feeds. In: RAZZAGHI-ABYANEH, Mehdi. Aflatoxins - recent advances and future prospects. InTech, Rijeka, Croatia 1, p. 59 – 62, 2013.

GRAY, S. J. et al. Interactive effects of sodium bentonite and coccidiosis with monensin or salinomycin in chicks. **Poultry Science**, v. 77, p. 600–604, 1998.

GROSICKI, A.; KOWALSKI, B.; BIK, D. Influence of bentonite on trace element kinetics in rats. II. Calcium. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 48, p. 337-340, 2004.

HAGHSERESHT, F.; WANG, S.; DO, D.D. A novel lanthanum-modified bentonite, Phoslock, for phosphate removal from wastewaters. **Applied Clay Science**, v. 46, n. 4, p. 369–375, 2009.

HAMDI, M. et al. Effect of different levels of calcium and phosphorus and their interaction on the performance of young broilers. **Poultry Science**, v. 94, p. 2144–2151, 2015.

HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, p. 179–188, 2001.

HWANG, J-H.; LEE, K-G. Reduction of aflatoxin B1 contamination on wheat by various cooking treatments. **Food Chemistry**, v.98, n.1, p.71-75, 2006.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos, **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 7, p.138-161, 2010.

INDRESH, G. et al. Effects of high grade bentonite on performance, organ weights and serum biochemistry during aflatoxicosis in broilers. **Veterinary world**, p. 313-317, 2013.

JONGBLOED, A.W.; KEMME, P.A. Apparent digestible phosphorus in the feeding of pigs in relation to availability, requirement and environment. Digestible phosphorus in feedstuffs from plant and animal origin. **Netherland Journal Agriculture Science**, v.38, p.56-75, 1990.

JOSLYN, M. A. **Methods in food analysis (physical, chemical and instrumental methods of analysis)**. Nova Iorque e Londres: Academic: Academic press, 1970.

KHANEDAR, F.; VAKILI, R.; ZAKIZADEH, S. Effects of two kinds of bentonite on the performance, blood biochemical parameters, carcass characteristics and tibia ash of broiler chicks. **Global Veterinaria**, v. 9, n.6, p. 720-725, 2012.

KIM, W. K. et al. 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. **Poultry Science**, v. 83, p. 1663–1666, 2004.

KLEIN, C.; AGNE, S. A. A. Fósforo: de nutriente à poluente! **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 8, n. 8, p. 1713-1721, 2012.

LAMIC - Laboratório de Análises Micotoxicológicas. **Mycotoxin: impacts and control strategies**. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM. Disponível em: <http://www.lamic.ufsm.br/papers/international.pdf>

LEESON, S.; CASTON, L.; SUMMERS, J. D. Broiler Response to Diet Energy. **Poultry Science**, v. 75, p. 529-535, 1996.

LEHNEN, C. R. et al. Digestibilidade das dietas e metabolismo de suínos alimentados com dietas contendo bentonita sódica em diferentes programas alimentares. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, 2011.

LEYTEM, A. B. et al. Interaction of calcium and phytate in broiler diets. 2.Effects on total and soluble phosphorus excretion. **Poultry Science**, v. 87, p. 459–467, 2008.

LI, W. et al. Impact of response criteria (tibia ash weight vs. percent) on phytase relative non phytate phosphorus equivalence. **Poultry Science**, v. 94, p 2228–2234, 2015.

LIU, J. N.; CHEN, D. W.; ADEOLA, O. Phosphorus digestibility response of broiler chickens to dietary calcium-to-phosphorus ratios. **Poultry Science**, v. 92, p. 1572–1578, 2013.

LOPES, J. M. et al. Adição de bentonita sódica como adsorvente de aflatoxinas em rações de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, 2006.

LOPES, J. B. et al. Avaliação das perdas endógenas e das exigências de fósforo, por meio da técnica da diluição isotópica, para suínos em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.4, p.773-778, 1999.

MACIEL, R. M. et al. Perfil eletroforético das proteínas séricas de frangos de corte alimentados com dietas contendo aflatoxinas e/ou argila clinoptilolita natural. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p.744-749, 2007.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; MALLMANN, A. O. Panorama das Micotoxinas. VI Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal, 2014.

MAGNOLI, A. P. et al. Effect of low levels of aflatoxin B1 on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. **Poultry Science**, v. 90, p. 48–58, 2011.

MANAFI, M.; NARAYANASWAMY, H. D.; PIRANY, N. In vitro binding ability of mycotoxin binder in commercial broiler feed. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 141-143, 2009.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n.1, p.89-99, 2010.

MIAZZO, R. et al. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. **Poultry Science**, v. 84, p.1–8, 2005.

MUNIZ, E. B. et al. Avaliação de fontes de cálcio para frangos de corte. **Revista Caatinga**, v. 20, n.1, p.05-14, 2007.

MURUGESAN, G. R. et al. Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. **Poultry Science**, v. 94, p. 1298–1315, 2015.

MUTUCUMARANA, R. K. et al. Measurement of true ileal digestibility of phosphorus in some feed ingredients for broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 5520–5529, 2014.

MUTUCUMARANA, R. K.; RAVINDRAN, V. Measurement of true ileal phosphorus digestibility in meat and bone meal for broiler chickens using the direct method. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 249–256, 2016.

OSALO, T. P.; MERUFINIA, E.; SAATLO, M. E. Phosphorus removal from aqueous solutions by bentonite: effect of Al_2O_3 addition. **Journal of Civil Engineering and Urbanism**, v. 3, n. 5, p. 317-322, 2013.

PAES, A. T. Itens essenciais em bioestatística. **Arquivo brasileiro de cardiologia**, v. 71, n. 4, 1998.

PARMER, T.G. et al. Thyroid function, growth hormone, and organ growth in broiler deficient in phosphorus. **Poultry Science**, v. 66, p. 1995-2004, 1987.

PASHA, T. N. et al. The effect of feed supplemented with different sodium bentonite treatments on broiler performance. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 32, n. 4, p. 245-248, 2008.

PAWAR, R. R. et al. Al-intercalated acid activated bentonite beads for the removal of aqueous phosphate. **Science of the Total Environment**, 2016.

PELICIA, K. et al. Calcium and available phosphorus levels for laying hens in second production cycle. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 11, n.1, p. 39 – 49, 2009.

PEREIRA, G. A. P. et al. Cálcio dietético – estratégias para otimizar o consumo. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 49, n. 2, p. 160-175, 2009.

PINHEIRO, S. R. F. et al. Fósforo disponível na ração de codornas de corte em fase de crescimento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 4, p. 818-826, 2015.

PROSZKOWIEC-WEGLARZ, M.; ANGEL, R. Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, p. 609–627, 2013.

PRVULOVIC, D. et al. The effects of dietary inclusion of hydrated aluminosilicate on performance and biochemical parameters of broiler chickens. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 32, n. 3, p. 183-189, 2008.

RAMOS, A.J.; HERNANDEZ, E. In situ absorption of aflatoxins in rats small intestine. **Myopathologia**, v. 134, p. 27-30, 1996.

RAMOS, A.J.; HERNANDEZ, E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. **Animal Feed Science Technology**, v. 65, p. 197-206, 1997.

REN, Z. et al. Antibody to fibroblast growth factor 23-peptide reduces excreta phosphorus of laying hens. **Poultry Science**, 2016. Doi: 10.3382/ps/pew189

ROSTAGNO, H. S.; FEATHERSTON, W. R. Estudos de métodos para determinação de disponibilidade de aminoácidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.6, n.1, p.64-75, 1977.

ROSTAGNO, H. S. et al. Avanços metodológicos na avaliação de alimentos e de exigências nutricionais para aves e suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p.295-304, 2007.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas Brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal Viçosa, 2011. 252 p.

RODEHUTSCORD, M. et al. A note on sampling digesta from the ileum of broilers in phosphorus digestibility studies. **Poultry Science**, v. 91, p. 965–971, 2012.

RUNHO, R. C. et al. Exigência de fósforo disponível para frangos de corte machos e fêmeas de 1 a 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, 2001.

RUTHERFURD, S. M. et al. Effect of microbial phytase on ileal digestibility of phytate phosphorus, total phosphorus, and amino acids in a low-phosphorus diet for broilers. **Poultry Science**, v. 83, n. 61–68, 2004.

SAFAEIKATOULI, M. et al. Effect of different levels of kaolin, bentonite and zeolite on broilers performance. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 1, p. 58-62, 2010.

SAFAEIKATOULI, M.; JAFARIAHANGARI, Y.; BAHARLOUEI, A. Effects of dietary inclusion of sodium bentonite on biochemical characteristics of blood serum in broiler chickens. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 12, n. 6, p. 877–880, 2010.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H. S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal: Funep, 2007. 283p.

SANTIN, E. et al. The effects of ochratoxin/aluminosilicate interaction on the tissues and humoral immune response of broilers. **Avian Pathology**, v. 31, p.73–79, 2002.

SANTURIO, J. M. et al . Desempenho de perus de corte alimentados com níveis crescentes de aflatoxinas, com ou sem adição de adsorvente. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 111-117, 1998.

SAS INSTITUTE. **SAS User's guide: statistics**. Software Version 9.0. Cary, NC, USA, 2002.

SCHEIDELER, S.E. Effects of various types of aluminosilicates and aflatoxin B1 on aflatoxin toxicity, chick performance, and mineral status. **Poultry Science**, v. 72, p. 282– 288, 1993.

SHASTAK , Y. et al. Comparison of retention and prececal digestibility measurements in evaluating mineral phosphorus sources in broilers. **Poultry Science**, v. 91, p. 2201–2209, 2012.

SHEN, Y. et al. Use of the regression analysis technique to determine the true phosphorus digestibility and the endogenous phosphorus output associated with corn in growing pigs. **The journal of nutrition**, v. 32, p. 1199–1206, 2002.

SCHMIDT, E. M. S. et al. Patologia clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 3. p. 9-20, 2007.

SCHOULTEN, N. A. et al. Níveis de cálcio em rações de frangos de corte na fase inicial suplementadas com fitase. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.5, p.1190-1197, 2003.

SEEDOR, J.G.; QUARRUCCIO, H. A.; THOMPSON, D. D. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 6, p. 339–346, 1991.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A. C. de. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**, Viçosa, 2002. 235p.

SILVA, C. S. et al. Valores nutricionais de milhos de diferentes qualidades para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p. 883-889, 2008.

SOUTHERN, L. L. et al. Effect of sodium bentonite or hydrated sodium calcium aluminosilicate on growth performance and tibia mineral concentrations in broiler chicks fed nutrient-deficient diets. **Poultry Science**, v. 73, p. 848-854, 1994.

TASHEVA-PETKOVA, Y. R.; CHRISTOVA-BAGDASSARIAN, V.; IVANOV, L. A. Aflatoxins - analysis and risk management. **Mintage Journal of Pharmaceutical & Medical Sciences**, v. 2, n.4, 2013.

TEIXEIRA, V. G; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de Divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.

TEIXEIRA-NETO, E.; TEIXEIRA-NETO, A. A. Modificação química de argilas: desafios científicos e tecnológicos para obtenção de novos produtos com maior valor agregado. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 809-817, 2009.

TEJEDOR, A. A. et al. Efeito da adição da enzima fitase sobre o desempenho e a digestibilidade ileal de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 802-808, 2001.

TITO, G. A. et al. Isotermas de adsorção de cobre por bentonita. **Revista Caatinga**, v.21, n.3, p.16-21, 2008.

VAN EGMOND, H. P.; SCHOTHORST, R. C.; JONKER, M. A. Regulations relating to mycotoxins in food perspectives in a global and european context. **Anal Bioanal Chem**, v. 389, p. 147–157, 2007. DOI 10.1007/s00216-007-1317-9.

- VELLASCO, C. R. et al . Níveis de cálcio e relação cálcio: fósforo em rações para poedeiras leves de 24 a 40 semanas de idade. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 206-216, 2016.
- VIEIRA, S. L. Chelated minerals for poultry. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 2, p. 73 – 79, 2008.
- VIEITES, F.M. et al. Cálcio, fósforo e proteína total no sangue de frangos de corte em função de níveis de balanço eletrolítico da ração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.887-894, 2011.
- WALZ, L. S. et al. Effects of fish meal and sodium bentonite on daily gain, wool growth, carcass characteristics, and ruminal and blood characteristics of lambs fed concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2025–2031, 1998.
- WIDEMAN Jr., R. F. Renal regulation of avian calcium and phosphorus metabolism. **The journal of nutrition**, maio, p. 808-815, 1987.
- WILES, M.C. et al. Toxicological evaluation and metal bioavailability in pregnant rats following exposure to clay minerals in the diet. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.67, p.863-874, 2004.
- XIA, M. S. et al. Effects of Copper-Bearing Montmorillonite on Growth Performance, Digestive Enzyme Activities, and Intestinal Microflora and Morphology of Male Broilers. **Poultry Science**, v. 83, p. 1868–1875, 2004.
- ZAIN, M. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129–144, 2011. doi:10.1016/j.jscs.2010.06.006
- ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. Adsorção de aminoácidos sobre minerais e a origem da vida. **Química Nova**, v. 29, n.4, 2006.
- ZAMPARAS, M. et al. Removal of phosphate from natural waters using modified bentonites. Proceedings of the 3rd International CEMEPE & SECOTOX. **Conference Skiathos**, p. 1011-1016, 2011.
- ZARNOCH, S. J. Testing hypotheses for differences between linear regression lines. **Mathematical Statistician**, NC 28804, 2009.

ZHANG, B.; COON, C. N. The relationship of various tibia bone measurements in hens. **Poultry Science**, v. 76, p. 1698–1701, 1997.