

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**CASCA DE OVO COMO FONTE DE CÁLCIO:
COMPOSIÇÃO MINERAL E BIODISPONIBILIDADE
EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Gressler Milbradt

Santa Maria, RS, Brasil

2014

CASCA DE OVO COMO FONTE DE CÁLCIO: COMPOSIÇÃO MINERAL E BIODISPONIBILIDADE EM RATOS

Bruna Gressler Milbradt

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Orientador: Prof^a Tatiana Emanuelli
Co-orientador: Prof^a Maria da Graça Kolisnski Callegaro

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gressler Milbradt, Bruna

CASCA DE OVO COMO FONTE DE CÁLCIO: COMPOSIÇÃO MINERAL E BIODISPONIBILIDADE EM RATOS / Bruna Gressler Milbradt.- 2014.

120 p.; 30cm

Orientadora: Tatiana Emanuelli

Coorientadora: Maria da Graça Kolisnski Callegaro

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2014

1. Casca de ovo 2. Minerais 3. Cálcio 4. Qualidade higiênico-sanitária 5. Biodisponibilidade I. Emanuelli, Tatiana II. Kolisnski Callegaro, Maria da Graça III. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Bruna Gressler Milbradt. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: brunamilbradt@gmail.com

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos
Alimentos

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CASCA DE OVO COMO FONTE DE CÁLCIO:
COMPOSIÇÃO MINERAL E BIODISPONIBILIDADE EM RATOS**

elaborada por
Bruna Gressler Milbradt

como requisito para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:



Profª Tatiana Emanuelli, Drª (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Profª Elizabeth Helbig, Drª (UFPEL)



Profª Leila Picolli da Silva, Drª (UFSM)

Santa Maria, 30 de maio de 2014.

*Dedico este trabalho ao meu amado,
carinhoso e compreensivo filho Raul.
Minha fonte de luz, energia e inspiração.*

AGRADECIMENTOS

Na Universidade, agradeço em especial:

* À Professora Maria da Graça, meu sincero agradecimento pelo apoio, confiança, carinho e amizade. Obrigada pelo seu incentivo durante essa caminhada que começou bem antes de estar matriculada no mestrado. Sou muito grata por poder conviver e aprender com você;

* À Professora Tatiana Emanuelli, agradeço sua orientação em todos os momentos, pelos ensinamentos, pela confiança, pelo apoio e incentivo. Tenho muita admiração pela pessoa que você é, e pelo seu trabalho como professora e pesquisadora;

* Às alunas de iniciação científica que participaram deste projeto: Jéssica, Juliana, Andressa, Laila e Rosana. Muito obrigada pelo empenho e dedicação, pelos momentos de convivência, e pela troca de experiências e saberes;

* À todos os colegas do Nidal e do mestrado, inclusive: Andréia, Luana, Vivian, Dani, Sabrina, Juliana, Jaque, Miguel, Cristine, Bruna K., Diego, Carine, Márcia, Rodrigo, Maria, Luis, Max e tantos outros pela troca de saberes, pela ajuda em diversos momentos e pela prazerosa convivência durante essa trajetória;

* Seu Finamor, que estava sempre disposto a ajudar nas leituras de minerais, e fazer esses dias de trabalho ao seu lado tão leves e prazerosos.

* Ao funcionário Carlos Rubini. Obrigada pela ajuda durante o trabalho que envolve a determinação de minerais. Obrigada por dividir suas experiências e conhecimentos comigo;

* Ao Professor Jean Minela, que assim como diversos professores que tive o prazer de conhecer, acreditam que a pesquisa deve ser um processo colaborativo. Obrigada por permitir e ajudar, com tamanha prontidão, nas análises granulométricas;

* Ao Professor Érico Flores e à aluna Aline Müller, do Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) pela parceria nas análises de minerais;

* À funcionária Liana Milani, pela realização das análises microbiológicas;

* À todos professores do PPGCTA pelos conhecimentos transmitidos;

* Aos amigos e funcionários do DTCA, pelo auxílio em análises, empréstimo de materiais e, sobretudo a agradável convivência;

* Às Professoras Luisa Hecktheuer, Leila Picolli, Elizabete Helbig por aceitarem participar desta banca;

* Além das pessoas da Universidade, também sou grata pela UFSM como instituição, por possibilitar minha pós-graduação em uma universidade pública e de tamanha excelência;

* À Capes, pela concessão da bolsa de mestrado;

Em um contexto diferente, mas igualmente importante:

** Aos meus pais pelo apoio incondicional; pelo incentivo e suporte para chegar até aqui: muito obrigada;*

** Ao meu querido filho Raul, que me faz sentir a pessoa mais especial do universo. Tenho muito orgulho de você. Obrigada pelo seu carinho, compreensão, pelos momentos de descontração, e pela torcida para a mãe terminar os temas;*

** Ao meu maninho Rafael, obrigada pelo amor, apoio, companheirismo. Você é um exemplo para mim;*

** Ao meu tio Silval por todo o apoio para fazer esse mestrado e todo incentivo durante essa trajetória;*

** À minha vó que me abrigou e me deu muito carinho em épocas em que eu precisei ficar escondidinha escrevendo, além de muitos outros momentos;*

** Ao Gabriel, obrigada pelo apoio e companheirismo durante essa caminhada,*

** E muitas outras pessoas da minha família, amigos e também da família do Gabriel (inclusive minas vós emprestadas: Dona Neuza e Dona Maria); meu muito obrigada por todo apoio e carinho.*

O sucesso nasce do querer, da determinação
e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e
vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

CASCA DE OVO COMO FONTE DE CÁLCIO: COMPOSIÇÃO MINERAL E BIODISPONIBILIDADE EM RATOS

AUTORA: BRUNA GRESSLER MILBRADT

ORIENTADORA: TATIANA EMANUELLI

CO-ORIENTADORA: MARIA DA GRAÇA KOLINSKI CALLEGARO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de maio de 2014.

A maior parte da população não ingere a recomendação diária de cálcio (Ca), mineral essencial para o desenvolvimento ósseo, contração muscular, coagulação sanguínea, permeabilidade celular e diversas outras funções. A casca de ovo de galinha é composta de cerca de 40% de Ca e poderia ser uma opção de baixo custo e fácil obtenção para atender as necessidades nutricionais da população. Este estudo teve como objetivos avaliar a influência do sistema de criação das poedeiras e coloração das cascas na composição de minerais essenciais e tóxicos de pó de casca de ovo, averiguar a segurança microbiológica de amostras submetidas a diferentes métodos de higienização e comparar cascas de ovo com diferentes tamanhos de partícula ao carbonato de cálcio purificado (CaCO_3) quanto a biodisponibilidade de minerais. As cascas foram lavadas, higienizadas, secas em estufa e trituradas em moinho e a composição mineral foi avaliada por espectroscopia de absorção atômica em 28 amostras previamente digeridas com ácido nítrico. O Ca se manteve em concentrações semelhantes nas diferentes amostras (cerca de 365 mg/g). As cascas de ovo de granja apresentaram maior concentração de magnésio (Mg) e menor concentração de estrôncio (Sr) que as cascas de ovo coloniais. Não foram encontradas quantidades significativas de ferro, cromo, manganês, molibdênio, níquel, selênio, alumínio, cádmio ou chumbo nas amostras analisadas. A avaliação microbiológica consistiu na contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva, determinação de coliformes totais e termotolerantes e pesquisa de *Salmonella* sp. em três amostras higienizadas por imersão em hipoclorito de sódio 1%, seguida de fervura em água e 3 amostras nas quais a etapa de imersão em hipoclorito foi suprimida. As amostras submetidas a ambos tratamentos não apresentaram contaminação microbiana. A biodisponibilidade de Ca foi avaliada em ratos Wistar machos em crescimento alimentados por 28 dias com dieta AIN-93 possuindo como fonte de Ca frações de casca de ovo com granulometrias grossa (CO G), média (CO M) ou fina (CO F) ou CaCO_3 purificado. A absorção de minerais, concentração mineral óssea e propriedades biomecânicas ósseas foram avaliadas. A absorção de Ca em ratos alimentados com dietas com casca de ovo foi de 56,2% do Ca ingerido, o que é considerado alto. No entanto, observou-se menor absorção de Ca nos grupos CO G e CO F, mas a absorção de Ca similar no grupo CO M em relação ao grupo CaCO_3 . Os ratos que receberam CO M e CO G tiveram maior absorção de fósforo e Mg comparados ao grupo CaCO_3 . Não foram observadas alterações na deposição mineral, peso ou propriedades biomecânicas dos ossos. Concluiu-se que a casca de ovo é rica em Ca, não apresenta contaminação por metais tóxicos, apresenta boa qualidade higiênico-sanitária se for processada corretamente e mostrou ser uma fonte de Ca com boa absorção intestinal e boa retenção em ossos de ratos em crescimento.

Palavras-chave

Casca de ovo, minerais, cálcio, qualidade higiênico-sanitária, biodisponibilidade, conteúdo mineral ósseo.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

EGGSHELL AS CALCIUM SOURCE: MINERAL COMPOSITION AND BIOAVAILABILITY IN RATS

AUTHOR: BRUNA GRESSLER MILBRADT

ADVISOR: TATIANA EMANUELLI

CO-ADVISOR: MARIA DA GRAÇA KOLINSKI CALLEGARO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de maio de 2014.

Most of the people do not reach the recommended intake for calcium (Ca), which is a mineral essential for bone development, muscle contraction, blood coagulation, cell permeability and several other functions. Hen eggshells are composed of around 40% Ca, and could be an easily obtainable low-cost option to meet the nutritional needs of the population. This study aimed to evaluate the influence of rearing laying hens systems and eggshells color in the composition of essential and toxic minerals of eggshell's powder, to determine the microbiological safety of samples subjected to distinct hygienization methods and compare the bioavailability of eggshell with different particle size to purified calcium carbonate (CaCO₃). The shells were washed, cleaned, oven-dried and milled. The mineral composition of 28 samples was evaluated by atomic absorption spectroscopy after previous digestion with nitric acid. Ca remained at similar concentrations in the different samples (approximately 365 mg/g). Eggshells from confined laying hens showed higher concentration of magnesium (Mg) and lower concentration of strontium than free-ranged laying hens egg shells. No significant amounts of iron, chromium, manganese, molybdenum, nickel, selenium, aluminum, cadmium or lead were found in the analyzed samples. Microbiological evaluation consisted of counting coagulase-positive *Staphylococcus*, total and thermotolerant coliforms, and detecting *Salmonella* sp. in three eggshell samples sanitized by immersion in 1% sodium hypochlorite followed by boiling in water, and three eggshell samples in which the step of immersion in hypochlorite was suppressed. The samples submitted to both treatments showed no microbial contamination. The bioavailability of Ca was evaluated in growing male Wistar rats fed during 28 days with AIN-93 diet, containing eggshell fractions of different granulometry (ES L, large particle size; ES M, intermediate particle size; and ES S, small particle size), or purified CaCO₃ as the Ca source. Mineral absorption, bone mineral concentration and bone biomechanical properties were evaluated. Ca absorption in rats fed with eggshell diets was 56.2%, which is considered high. However, we found a lower Ca absorption in groups ES L and ES S, but the absorption of Ca was similar in the ES M group when compared to CaCO₃. Rats that received ES M and ES L had greater absorption of phosphorus and magnesium (Mg) than CaCO₃ group. No changes in the mineral deposition, weight or bone biomechanical properties were observed. It was concluded that the eggshell is rich in Ca, shows no contamination by toxic metals, has good sanitary quality if properly processed and is a Ca source that has good intestinal absorption and good retention in bones of growing rats.

Keywords

Eggshell, minerals, calcium, sanitary quality, bioavailability, bone mineral content

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

- Figura 1: Relação entre a ingestão de Ca e o acúmulo ósseo do mineral em experimentos com ratos em crescimento. 28
- Figura 2: Relação teórica entre a ingestão de Ca, a quantidade total absorvida (linha sólida) e a eficiência da absorção (linha tracejada). 31
- Figura 3: Representação esquemática de corte transversal de casca de ovo de galinha com detalhe da microestrutura. 41
- Figura 4 : Processo de preparo do pó da casca de ovo para consumo humano. 43

MANUSCRITO 1

- Figura 1 - Etapas de preparo das amostras de pó de casca de ovo. 66

MANUSCRITO 2

- Figure 1 - Particle size of eggshells and CaCO_3 determined by a multi-wave length laser diffraction particle size analyzer. 89
- Figure 2 - Relative apparent absorption of Ca, P and Mg in rats fed with eggshell fractions containing different particle size as Ca source compared to CaCO_3 90

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1: Fatores relacionados à fonte de Ca e aos constituintes da matriz alimentar ou dieta que interferem na biodisponibilidade mineral.....	32
Tabela 2: Ingestão adequada para o Ca	34
Tabela 3: Porcentagem de cálcio presente em diferentes sais	37
Tabela 4: Influência dos minerais P, Mg, Na, F, Zn, Cu, Mn, Fe, K e Sr sobre o metabolismo do Ca.....	39
Tabela 5: Composição mineral da casca de ovo.	42

MANUSCRITO 1

Tabela 1 - Conteúdo de minerais em pós de cascas de ovo de granja e coloniais. .	67
Tabela 2 - Análises microbiológicas de cascas de ovo submetidas a diferentes processos de higienização.	68

MANUSCRITO 2

Table 1 - Ingredients and proximate composition of diets fed to growing rats.	91
Table 2 - Body weight gain, feed intake and feed efficiency ratio of rats fed with eggshell fractions containing different particle size as the Ca source compared to CaCO ₃	92
Table 3 – Ingestion and excretion of Ca, P and Mg in rats fed with eggshell fractions containing different particle size as Ca source compared to CaCO ₃	93
Table 4 - Weight, mineral content and biomechanical properties of tibias from rats fed with eggshell fractions containing different particle size as Ca source compared to CaCO ₃	94

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

AAS	Espectrometria de Absorção de Atômica/ Atomical Absorption Spectrometry
AIN	American Institute of Nutrition
ANOVA	Análise de variância de uma via
CO F	Casca de ovo com granulometria fina
CO G	Casca de ovo com granulometria grossa
CO M	Casca de ovo com granulometria média
ES L	Eggshell fractions with large particle size
ES M	Eggshell fractions with intermediate particle size
ES S	Eggshell fractions with small particle size
ICP-MS	Espectrômetro de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP-OES	Espectrômetro de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado
IDR	Ingestão Diária Recomendada
PTH	Hormônio paratireoideano

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Carta de submissão do manuscrito 1 à revista <i>Ciência Rural</i>	109
Anexo B - Norma para a publicação de artigos científicos submetidos à revista <i>Ciência Rural</i>	110
Anexo C - Norma para a publicação de artigos científicos submetidos à revista <i>Nutrition Research</i>	114

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 Cálcio	27
1.1.1 Distribuição e funções biológicas do Ca	27
1.1.2 Balanço metabólico e homeostase do Ca	29
1.1.3 Absorção de Ca	30
1.1.4 Biodisponibilidade de Ca	31
1.1.5 Modelos utilizados para estudar a biodisponibilidade do Ca	33
1.1.6 Recomendações da ingestão de Ca para humanos	34
1.1.7 Deficiências de Ca	35
1.1.8 Suplementação alimentar	36
1.2 Casca de ovo de galinha	40
1.2.1 Composição e estrutura da casca de ovo	40
1.2.2 Processamento da casca de ovo para o consumo humano	43
1.2.3 Aplicação da casca de ovo como fonte de Ca em humanos	45
1.2.4 Biodisponibilidade do Ca da casca de ovo em modelos animais e ex vivo	47
1.2.5 Biodisponibilidade do Ca da casca de ovo em humanos	49
2 OBJETIVOS	51
2.1 Objetivo geral	51
2.2 Objetivos específicos	51
3 MANUSCRITO 1	53
Introdução	55
Material e Métodos	57
Resultados e Discussão	58
Conclusão	61
Agradecimentos	61
Referências	62
4 MANUSCRITO 2	69
Introduction	72
Methods and materials	74
Results	79
Discussion	80
Acknowledgment	84
References	85
5 DISCUSSÃO	95
6 CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXOS	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cálcio

1.1.1 Distribuição e funções biológicas do Ca

O Ca é o mineral mais abundante no corpo humano, responsável por cerca de 1 a 2% do peso corporal. Cerca de 99% de todo o Ca do organismo encontra-se mineralizado nos ossos e dentes na forma de complexos cálcio-fosfato, principalmente a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Nestes tecidos, suas principais funções são fornecer resistência e força ao esqueleto e servir de reserva dinâmica para manter o balanço intra e extracelular de Ca. O restante encontra-se no sangue, no fluido extracelular, no músculo e em outros tecidos (SILVA; COZZOLINO, 2006; PEACOCK, 2010).

O osso é um tecido bastante dinâmico que está constantemente formando tecido novo por meio dos osteoblastos e reabsorvendo (liberando Ca do osso) através dos osteoclastos, processo conhecido como *turnover* (SILVA; COZZOLINO, 2006). A retenção de Ca no osso aumenta linearmente em função do aumento da ingestão de Ca até o limite que promove a resistência óssea ideal ou pico de massa óssea (Figura 1). Acima deste nível, o aumento na ingestão de Ca não produz maior retenção e é excretado (HEANEY, 2006a). Cerca de 60% a 80% da variação no pico de massa óssea é explicado por fatores genéticos, incluindo o polimorfismo de genes relacionados com o receptor de vitamina D, com a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1; *insulin-like growth factor-1*) e pela produção de colágeno (SCHULZE, 2013).

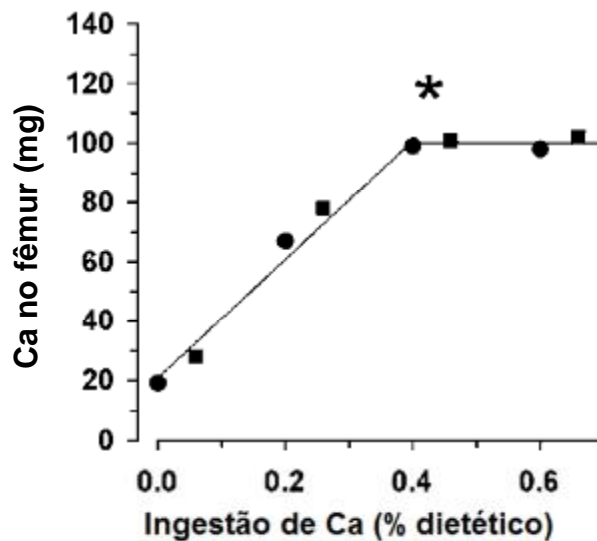


Figura 1- Relação entre a ingestão de Ca e o acúmulo ósseo do mineral em experimentos com ratos em crescimento. *O acúmulo ósseo de Ca é linearmente relacionado à sua ingestão, quando inferior ao limiar *; acima deste limiar dietético (linha horizontal), o acúmulo ósseo de Ca é limitado por outros fatores e não relacionado a mudanças na ingestão de Ca.

Fonte: Heaney (2006a), adaptado.

Na circulação sanguínea, o Ca encontra-se ligado à albumina (40%), sulfatos, fosfatos e citratos (10%) ou na forma ionizada (50%) em concentrações mantidas a 10 mg/dL por um sensível processo homeostático. O Ca intracelular encontra-se em organelas como no núcleo, retículo endoplasmático e vesículas (SCHULZE, 2013).

O Ca possui funções importantes em todo o organismo, não se restringindo apenas aos ossos. Funções como a contração muscular, condução do impulso nervoso e secreção de hormônios como a insulina são dependentes da sinalização intracelular de Ca (AWUMEY; BUKOSKI, 2006; SCHULZE, 2013). Além disso, várias metaloenzimas, como a α -amilase e fosfolipases, contêm Ca como parte essencial de seu sítio catalítico. Várias proteínas da coagulação sanguínea também necessitam de Ca para a sua atividade, tais como proteína quinase C e fatores de coagulação V e VIII (SILVA; COZZOLINO, 2006).

1.1.2 Balanço metabólico e homeostase do Ca

O balanço de Ca se refere ao estado de sua reserva corporal, primariamente no osso, que está amplamente relacionada com a ingestão dietética, absorção intestinal, excreção renal e remodelamento ósseo. O balanço ósseo muda durante as etapas da vida, dependendo das taxas de formação e reabsorção. Crianças possuem um balanço ósseo positivo (formação>reabsorção) que proporciona o crescimento saudável do esqueleto. Adultos jovens alcançaram o pico de massa óssea e estão em balanço ósseo neutro (formação=reabsorção). Idosos encontram-se tipicamente em balanço ósseo negativo (formação<reabsorção), o que leva à perda óssea relacionada com a senescência (SCHULZE, 2013).

A homeostase do Ca é regulada por processo de *feedback* negativo que controla o transporte de Ca no intestino, rins e ossos, e envolve os hormônios reguladores de Ca: hormônio paratireoideano (PTH), calcitriol (1,25 D) e calcitonina; seus receptores, assim como o Ca ionizado no soro e os receptores sensíveis ao Ca. A redução do Ca sérico inativa o receptor de Ca na célula paratireoideana e aumenta a secreção de PTH, que por sua vez restaura os níveis séricos de Ca pela ativação do receptor da tireoide no osso, aumentando sua reabsorção, e no rim, por aumentar a reabsorção tubular de Ca. Nos rins, o aumento da secreção de PTH acarreta em aumento da secreção de calcitriol (1,25-diidroxivitamina D₃) que atua no receptor de vitamina D no intestino, aumentando a absorção ativa de Ca e aumentando a reabsorção no osso (PEACOCK, 2010). Por outro lado, quando a concentração de Ca sérico é alta, a calcitonina, secretada na glândula tireoide, assegura que o Ca seja deslocado de volta para o osso, ou excretado pela urina (SILVA; COZZOLINO, 2006).

Os mecanismos de *feedback* ajudam a manter os níveis séricos de Ca em indivíduos saudáveis dentro de uma faixa relativamente estreita de variação fisiológica. Assim, as funções celulares do Ca são protegidas de flutuações na sua ingestão até deficiências mais extremas do mineral (SCHULZE, 2013). É também em função dos mecanismos de *feedback* que os níveis sanguíneos de Ca geralmente não refletem o estado nutricional em relação ao mineral (PEACOCK, 2010).

1.1.3 Absorção de Ca

A absorção intestinal de Ca se dá através de dois mecanismos: a absorção transcelular, que ocorre através das células intestinais, e a absorção paracelular, que ocorre entre as células intestinais. A absorção transcelular se dá por transporte ativo, é saturável, mediada por hormônios, dependente de vitamina D e ocorre principalmente no duodeno. A absorção paracelular é o transporte passivo do Ca através das junções celulares, é independente da regulação fisiológica e ocorre ao longo de todo intestino delgado, mas é predominante na porção inferior do jejuno e no íleo (BRONNER, 1987; BRONNER; PANSU, 1999).

O transporte ativo do Ca para o enterócito e sua saída da célula são dependentes de calcitriol. O movimento transcelular envolve as etapas de entrada através da borda apical pelo transportador TRPV6 (*transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 6*); difusão pelo citoplasma; e saída pela membrana basolateral da célula. A difusão intracelular do íon Ca é a etapa limitante. Na ausência da proteína ligante de Ca dependente de vitamina D, a calbindina, a velocidade de difusão do Ca nas células intestinais é apenas 1/70 da usual. Este mecanismo é responsável pela maior parte da absorção do Ca quando os níveis de ingestão são moderados ou baixos (BRONNER; PANSU, 1999; SILVA; COZZOLINO, 2006).

Já a difusão paracelular ocorre em favor do gradiente químico. A proporção do mineral que será absorvido pela via paracelular será determinada pela quantidade de Ca no lúmen intestinal, pela permeabilidade celular ao íon e pela velocidade do trânsito intestinal. O aumento na taxa de difusão também pode ocorrer porque a água, movendo-se em uma área de hiperosmolaridade, expande os tecidos e alarga as junções, levando consigo o Ca. Esse processo é responsável pela maior parte da absorção quando o Ca está presente em quantidade adequada ou alta (PANSU et al., 1993; BRONNER; PANSU, 1999; SILVA; COZZOLINO, 2006).

Diversos fatores fisiológicos irão afetar a absorção de Ca, tais como a idade e etapa de desenvolvimento do indivíduo. Crianças, gestantes e lactantes, em função das necessidades aumentadas de minerais, terão capacidade de absorção e utilização aumentada. Entretanto o mesmo não ocorre com os idosos, que poderão

ter deficiências, por exemplo, na secreção de ácido clorídrico, importante para manutenção do pH ácido para solubilização dos minerais (COZZOLINO, 1997).

A absorção de Ca também é relacionada à ingestão do nutriente. O organismo saudável tenta manter sua homeostase e geralmente absorve mais quando suas reservas estão diminuídas e menos em condições adequadas ou de excesso. Então, a eficiência da absorção ou o percentual de absorção em relação à quantidade ingerida decresce com o aumento da ingestão; no entanto o total de Ca absorvido continua aumentando (Figura 2; WEAVER; HEANEY, 2006)

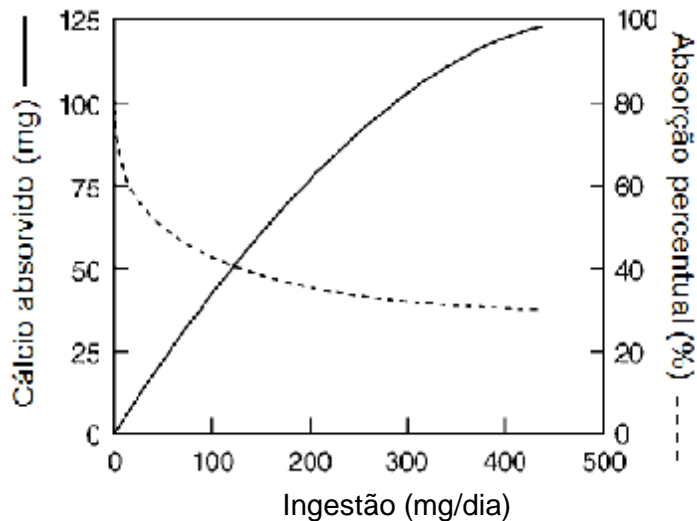


Figura 2- Relação teórica entre a ingestão de Ca, a quantidade total absorvida (linha sólida) e a eficiência da absorção (linha tracejada).

Fonte: Weaver e Heaney (2006), adaptado.

1.1.4 Biodisponibilidade de Ca

Os termos “biodisponibilidade” e “absorção” de um nutriente aparecem algumas vezes como termos intercambiáveis na literatura; no entanto, existe uma diferença importante entre eles. Enquanto a absorção envolve o transporte do nutriente do lúmen intestinal através da mucosa intestinal, a biodisponibilidade do nutriente é definida como a fração ingerida do nutriente que é utilizada para suas

funções fisiológicas normais ou estocagem. É importante acrescentar também que um dos principais determinantes da biodisponibilidade é a absorção (CASHMAN, 2003).

Existem fatores relacionados à fonte mineral que interferem na biodisponibilidade do Ca e de minerais em geral. Constituintes do alimento ou da dieta podem interferir na biodisponibilidade mineral por alterarem a absorção do mesmo. Além disso, muitos nutrientes e constituintes dos alimentos podem afetar a homeostase do Ca, e não ter apenas um efeito na digestibilidade e na absorção. (COZZOLINO, 1997; CÁMARA-MARTOS; AMARO-LÓPEZ, 2002; SILVA; COZZOLINO, 2006). Esses fatores podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1- Fatores relacionados à fonte de Ca e aos constituintes da matriz alimentar ou dieta que interferem na biodisponibilidade deste mineral

Fator	Influência sobre a biodisponibilidade
Especação	- Fórmula química na qual o elemento se encontra. Minerais podem estar presentes na forma livre ou combinada, necessitando ou não de digestão para serem absorvidos.
Ligação molecular	- Dependendo das ligações covalentes ou iônicas, por pontes de hidrogênio, grupos sulfidrílicos, podemos ter diferentes solubilidades em água, meio ácido ou meio básico.
Solubilidade	- Depende do grau de dispersão e solubilização da fonte mineral primeiramente no pH ácido do estômago; - Pode ser influenciada pela granulometria da fonte.
Interação com constituintes do alimento ou da dieta	- Presença de oxalatos no alimento: podem se ligar ao Ca diminuindo sua biodisponibilidade; - Nos cereais, sobretudo nos integrais, o fitato pode ligar o mineral reduzindo a absorção; - Fibras alimentares insolúveis geralmente reduzem a absorção enquanto as solúveis são geralmente associadas ao aumento da absorção; - Alta ingestão de sódio e proteínas aumentam a perda de Ca através da urina.

Dados compilados a partir dos estudos de Cozzolino (1997); Silva e Cozzolino (2006); Emanuelli et al. (2014).

1.1.5 Modelos utilizados para estudar a biodisponibilidade do Ca

O modelo ideal para estudar a biodisponibilidade do Ca são estudos conduzidos em humanos, os quais envolvem muitos gastos e tempo para serem conduzidos. Como alternativa, os modelos experimentais em animais, especialmente em ratos vem sendo extensivamente utilizados para avaliar a biodisponibilidade de fontes de Ca (CASHMAN, 2003).

O balanço intestinal estima a diferença entre a ingestão e a excreção fecal de Ca e trata-se de um método clássico que fornece bons resultados em modelos animais (PEREIRA et al., 2009). As principais limitações inerentes a esse método incluem erros na estimativa de ingestão, coleta incompleta das fezes e o fato de não ser capaz de medir a absorção real de Ca, pois não considera a excreção endógena de Ca nas fezes (CASHMAN, 2003).

A medida de absorção real de Ca pode ser conduzida com isótopos estáveis do Ca como ^{45}Ca e ^{47}Ca (COZZOLINO, 1997). No entanto, este método não pode ser utilizado para testar a biodisponibilidade de fontes naturais de Ca e avaliar o efeito algumas características intrínsecas da fonte, como o tamanho de partícula (ELBLE et al., 2011).

Mais recentemente, tem sido utilizada com frequência a avaliação *in vitro* da absorção de Ca em cultura de células, principalmente em células Caco-2. Essas células de carcinoma de cólon crescem e se diferenciam espontaneamente exibindo muitas das características de células normais do epitélio intestinal e são bons modelos para avaliar a absorção de Ca pelos mecanismos paracelular e transcelular (CASHMAN, 2003).

Além dos modelos utilizados para medir a absorção de Ca, métodos comuns que avaliam a mineralização e a microestrutura óssea também podem ser aplicados para prever a biodisponibilidade do Ca, já que o depósito mineral irá depender também da biodisponibilidade deste elemento (GARCIA-LOPEZ; MILLER, 1991). Em humanos, a densidade óssea pode ser avaliada através de absorciometria de duplo feixe de raios-X (DEXA) (CASHMAN, 2003). Em animais, a mineralização óssea pode ser avaliada por medidas destrutivas como a concentração mineral óssea e a resistência óssea (GARCIA-LOPEZ; MILLER, 1991; HUNT et al., 2008).

1.1.6 Recomendações da ingestão de Ca para humanos

Na tabela 2 constam as ingestões adequadas de Ca para humanos de ambos os gêneros durante o ciclo da vida, as quais são baseadas nas estimativas das necessidades recomendadas (GALLAGHER, 2010). A necessidade de cálcio varia conforme a faixa etária, sendo maior em períodos de rápido crescimento como a adolescência (1.300 mg/dia). Na idade adulta, a necessidade diária de cálcio fica em torno de 1.000 mg. Nos períodos em que a absorção intestinal do nutriente encontra-se diminuída ou a taxa de reabsorção óssea aumentada, como na pós-menopausa, a necessidade de Ca novamente se eleva (1.200 a 1.300 mg/dia; LOOKER, 2006).

Tabela 2- Ingestão adequada para o Ca em diferentes estágios de vida

Estágio de vida	Homem (mg/dia)	Mulheres (mg/dia)
Recém-nascidos		
0-6 meses	210	210
7-12 meses	270	270
Crianças		
1-3 anos	500	500
4-8 anos	800	800
9-13 anos	1.300	1.300
Adultos		
14-18 anos	1.300	1.300
19-30 anos	1.000	1.000
31-50 anos	1.000	1.000
51-70 anos	1.200	1.200
> 70 anos	1.200	1.200
Gravidez		
≤ 18 anos		1.300
19-30 anos		1.000
31-50 anos		1.000
Lactação		
≤ 18 anos		1.300
19-30 anos		1.000
31-50 anos		1.000

Fonte: Estados Unidos, 2005.

1.1.7 Deficiências de Ca

Em diversos países, uma grande parcela da população não consome quantidades adequadas de Ca (LOOKER, 2006). No Brasil, de acordo com dados do Inquérito Alimentar realizado entre 2008 e 2009, a prevalência da inadequação da ingestão de Ca também é bastante alta. Aproximadamente 90% dos adultos e 96% dos adolescentes não ingerem as recomendações de Ca de acordo com a faixa etária (VEIGA et al.; ARAUJO et al., 2013). Os possíveis fatores que explicam este baixo consumo de cálcio estão relacionados ao hábito alimentar, pela substituição de leite por bebidas com baixo teor de cálcio como o refrigerante, refeições realizadas fora de casa e a não realização de refeições como o café da manhã (PEREIRA et al., 2009).

A ingestão adequada de Ca está frequentemente associada ao consumo regular de leite e produtos lácteos, que são as principais fontes desse mineral (SCHULZE, 2013). No entanto, o consumo desses produtos pela população é limitado por fatores como o custo elevado e problemas como intolerância à lactose e alergia à proteínas do leite (FOX; THOMSON, 2007; PEREIRA et al., 2009; SCHULZE, 2013).

A deficiência de cálcio também é prevalente em indivíduos morbidamente obesos que se submetem à cirurgia bariátrica. A restrição na ingestão de Ca alimentar, o desvio do duodeno e do jejuno proximal que são os principais locais de absorção do mineral, e a alteração no metabolismo da vitamina D, que também prejudica a absorção de Ca, são os principais fatores desencadeadores da deficiência. Para a manutenção dos níveis séricos de Ca, ocorre constante mobilização do Ca ósseo, que em médio e longo prazo, podem gerar perdas ósseas e até mesmo a osteoporose nesses pacientes (COMINETTI; JÚNIOR; COZZOLINO, 2009).

O sistema de homeostase do Ca no fluido extracelular, especialmente quando envolve uma adaptação à ingestão cronicamente baixa de Ca, produz efeitos relacionados não apenas à saúde óssea. A adaptação, embora necessária para corrigir flutuações no nível desse mineral, pode exercer efeitos colaterais quando constantemente acionada (HEANEY, 2006b; SCHULZE, 2013).

De acordo com Heaney (2006b), a patogênese de todas as patologias relacionadas à baixa ingestão de Ca podem ser resumidas em três mecanismos básicos: (1) decréscimo na reserva de Ca, (2) decréscimo no Ca residual no conteúdo intestinal e (3) respostas não esqueléticas aos hormônios que regulam a adaptação à baixa ingestão de Ca (HEANEY, 2006b).

A osteoporose é a principal doença resultante do decréscimo na reserva de Ca do esqueleto. O mecanismo de homeostase reage à ingestão insuficiente de Ca mantendo os níveis circulantes de Ca, no entanto ocorre a depleção da reserva do mineral, ou seja, da massa óssea (HEANEY, 2006b). Além disso, considerando que o acúmulo ósseo de Ca durante o crescimento é dependente da quantidade de Ca na dieta, a deficiência de Ca durante a formação do esqueleto reduzirá o pico de massa óssea; um efeito que muitas vezes não tem consequências imediatas, mas que tem sido associado ao aumento do risco de fratura com o avanço da idade (HEANEY et al., 2000).

A incidência de câncer de cólon aumenta porque a deficiência de Ca ativa a regulação para a proliferação anormal das células epiteliais em presença do transportador de Ca TRPV5/6 (DAI et al., 2014). Doenças como hipertensão, pré-eclampsia, hiperparatireoidismo, síndrome de ovário policístico e obesidade estão relacionadas a respostas aos hormônios que regulam a adaptação à baixa ingestão de Ca. O hormônio PTH induz a produção de elevados níveis de vitamina D₃ que não só aumenta a eficiência da absorção do Ca no intestino, mas também eleva as concentrações de Ca iônico em diversos tecidos não relacionados à homeostase (HEANEY, 2006b).

1.1.8 Suplementação alimentar

Tem sido ressaltado pelos profissionais da área de nutrição que a melhor forma de conseguir uma boa saúde é através da alimentação diversificada. A ingestão de alimentos, como o leite e seus derivados, que são os que apresentam as maiores concentrações de Ca também fornecem outros nutrientes importantes para o organismo. No entanto, existem alguns grupos especiais da população nos quais a alimentação não será fonte suficiente de Ca, como em mulheres na

menopausa, mulheres grávidas e lactantes, intolerantes à lactose e vegetarianos. Nesses casos, deve-se considerar a suplementação de Ca (SILVA; COZZOLINO, 2006; PINHEIRO et al., 2009).

A suplementação de Ca concomitante com a vitamina D pode ser indicada para indivíduos com osteopenia ou osteoporose, mulheres na menopausa ou pós-menopausa, mulheres que amamentam muitas crianças e indivíduos que não ingerem produtos lácteos por algum motivo (STRAUB, 2007). Há diversos tipos de sais que podem ser utilizados; alguns deles, com o respectivo teor de Ca, são apresentados na tabela 3. Sais com menor concentração de Ca requerem volume maior da substância para atingir as dosagens. Considerava-se que a absorção dos sais de Ca seria proporcional a sua solubilidade, mas esta relação não foi confirmada. O Ca da maioria dos sais tem absorção semelhante e é comparável com a absorção do Ca do leite (WEAVER; HEANEY, 2006; PEREIRA et al., 2009).

Tabela 3- Porcentagem de cálcio presente em diferentes sais

Sais de cálcio	% de Ca
Carbonato de cálcio	40
Fosfato tricálcico	38
Citrato de cálcio	21
Citrato malato de cálcio	13
Lactato de cálcio	13
Gluconato de cálcio	9

Fonte: Weaver e Heaney (2006), adaptado.

É considerado que a quantidade de Ca ingerida por dia, incluindo o da alimentação e da suplementação, deve manter-se no nível da ingestão adequada deste mineral para cada indivíduo ou ficar abaixo da dose máxima tolerável, situada entre 2000 a 3000 mg/dia para adultos (STRAUB, 2007). Adicionalmente, quanto maior o fracionamento da suplementação durante o dia, melhor será a absorção do Ca (PEREIRA et al., 2009).

A seleção do suplemento de Ca mais adequado depende de vários fatores, inclusive das propriedades físicas e químicas, das interações com medicamentos usadas simultaneamente, da idade e da condição de saúde do paciente. Os sais mais usados, tanto no Brasil, como em outros países são o carbonato e o citrato de Ca. O carbonato de Ca é bem absorvido e tolerado na maioria dos indivíduos quando ingerido junto com a alimentação. O citrato de Ca, sal de maior solubilidade, é indicado para indivíduos com problemas de secreção ácida estomacal insuficiente (STRAUB, 2007; PEREIRA et al., 2009).

Além disso, diversos minerais interferem no metabolismo de Ca e/ou na sua retenção óssea. Desta forma, a suplementação do Ca em associação a quantidades adequadas de outros minerais está relacionada a efeitos mais expressivos à saúde óssea comparado a suplementação de Ca isoladamente (STRAUSE et al., 1994; GUILHERME; COZZOLINO, 2009). Na tabela 4 podemos observar a influência do P, Mg, Na, F, Zn, Mn, Cu, Fe, K e Sr sobre o metabolismo do Ca.

Tabela 4- Influência dos minerais P, Mg, Na, F, Zn, Cu, Mn, Fe, K e Sr sobre o metabolismo do Ca

Mineral	Influência sobre metabolismo do Ca
P	<ul style="list-style-type: none"> - A razão Ca/P da dieta deve ser adequada para garantir o máximo crescimento e deve ser considerada em casos de hipocalcemia e osteoporose; - Excesso produz queda temporária no Ca sérico ionizado, aumenta a secreção de PTH e potencializa a reabsorção óssea.
Mg	<ul style="list-style-type: none"> - Regula o tamanho dos cristais de hidroxiapatita, prevenindo a formação de cristais grandes (maior fragilidade óssea); - Deficiência provoca hipocalcemia por reduzir a secreção de PTH; - Suplementação com Mg aumenta a densidade mineral óssea e reduz o <i>turnover</i> ósseo em mulheres na menopausa.
Na	<ul style="list-style-type: none"> - Alta ingestão de NaCl aumenta a excreção urinária de Na e Ca, pois esses minerais compartilham o sistema de transporte nos túbulos renais; - Ingestão de Na tem papel importante na perda óssea já que a perda urinária de Ca é responsável por 50% da variabilidade na retenção de Ca.
F	<ul style="list-style-type: none"> - Associado ao aumento na atividade dos osteoblastos. - Substitui o grupo hidroxil no cristal de hidroxiapatita, formando fluorapatita menos solúvel, maior e mais resistente à ação dos osteoclastos; - Em excesso produz cristais de fluorapatita demasiadamente grandes tornando os ossos mais quebradiços e frágeis (fluorose);
Zn	<ul style="list-style-type: none"> - Co-fator da fosfatase alcalina (necessária para a mineralização óssea) e da colagenase (essencial para o desenvolvimento da estrutura colágena do osso); - Estimula a proliferação e a diferenciação das células osteoblásticas e inibe a formação de células osteoclásticas.
Cu	<ul style="list-style-type: none"> - Influencia na formação óssea, na mineralização do esqueleto e na integridade do tecido conjuntivo; - Cofator da lisil oxidase (essencial para as ligações cruzadas das fibras do colágeno e aumento da resistência mecânica da proteína); - Deficiência diminui a resistência óssea em animais.
Mn	<ul style="list-style-type: none"> - Essencial para a biossíntese de mucopolissacarídeos que integram a matriz óssea; - Cofator de várias enzimas do tecido ósseo;
Fe	<ul style="list-style-type: none"> - Cofator de enzimas envolvidas na síntese do colágeno da matriz óssea; - Cofator da enzima responsável pela conversão da vitamina D para sua forma ativa, afetando a absorção de Ca.
K	<ul style="list-style-type: none"> - Suplementação diminui a excreção urinária de Ca, reduz a reabsorção óssea e aumenta sua formação; - Ingestão deficiente aumenta a reabsorção óssea.
Sr	<ul style="list-style-type: none"> - Mineral não essencial utilizado no tratamento da osteoporose; - Associado ao aumento da formação, redução da reabsorção e melhora da microarquitetura óssea.

Dados compilados a partir de Silva e Cozzolino (2006); Guilherme e Cozzolino (2009); Boyd et al. (2011).

1.2 Casca de ovo de galinhas poedeiras

Anualmente, cerca de 6 milhões de toneladas de cascas de ovo são geradas nas residências e em empresas alimentícias de todo o mundo (OLIVEIRA; BENELLI; AMANTE, 2013). Basicamente, as cascas de ovo resultantes de processos industriais são descartadas diretamente no solo e a minoria é destinada à agricultura com a finalidade de corrigir o pH do solo (KING'ORI, 2011; OLIVEIRA; BENELLI; AMANTE, 2013).

Nos últimos anos, tem sido feito um grande esforço para ampliar o uso sustentável da casca de ovo e agregar valor ao material. As aplicações incluem produtos para a indústria cosmética, bases biocerâmicas, implantes ósseos e dentários, excipiente farmacêutico, adsorvente para remoção de poluentes do meio aquoso e do solo, catalisadores em transformações químicas e em processos orgânicos sintéticos, além do seu uso como fonte de Ca para humanos (MURAKAMI et al., 2007; OLIVEIRA; BENELLI; AMANTE, 2013; GURU; DASH, 2014).

A casca de ovo também pode ser utilizada como matéria prima para a preparação de diversos sais de Ca, por exemplo, citrato, gluconato, lactato, malato, mono e dicálcio fosfato além de sua purificação para obtenção de CaCO_3 purificado (DAENGPOROK et al., 2002; CORDEIRO; HINCKE, 2011; LIN et al., 2012). Um importante aspecto a ser considerado é que a casca de ovo é uma fonte renovável de CaCO_3 e seu aproveitamento pode reduzir o impacto ambiental gerado também pela extração de reservas naturais não-renováveis de CaCO_3 , como rocha calcária (OLIVEIRA; BENELLI; AMANTE, 2013).

1.2.1 Composição e estrutura da casca de ovo

A casca de ovo é composta de matriz orgânica (aproximadamente 2%) entrelaçada a cristais de carbonato de cálcio (CaCO_3 ; 95 à 98%) (MASUDA; HIRAMATSU, 2008; OLIVEIRA; BENELLI; AMANTE, 2013). A casca, juntamente com as membranas intimamente ligadas, representam cerca de 10% do peso do ovo (CORDEIRO; HINCKE, 2011). Sua principal função é proteger o embrião atuando

como barreira física para inibir a invasão de microrganismos além de participar de trocas gasosas com o ambiente (MURAKAMI et al., 2007).

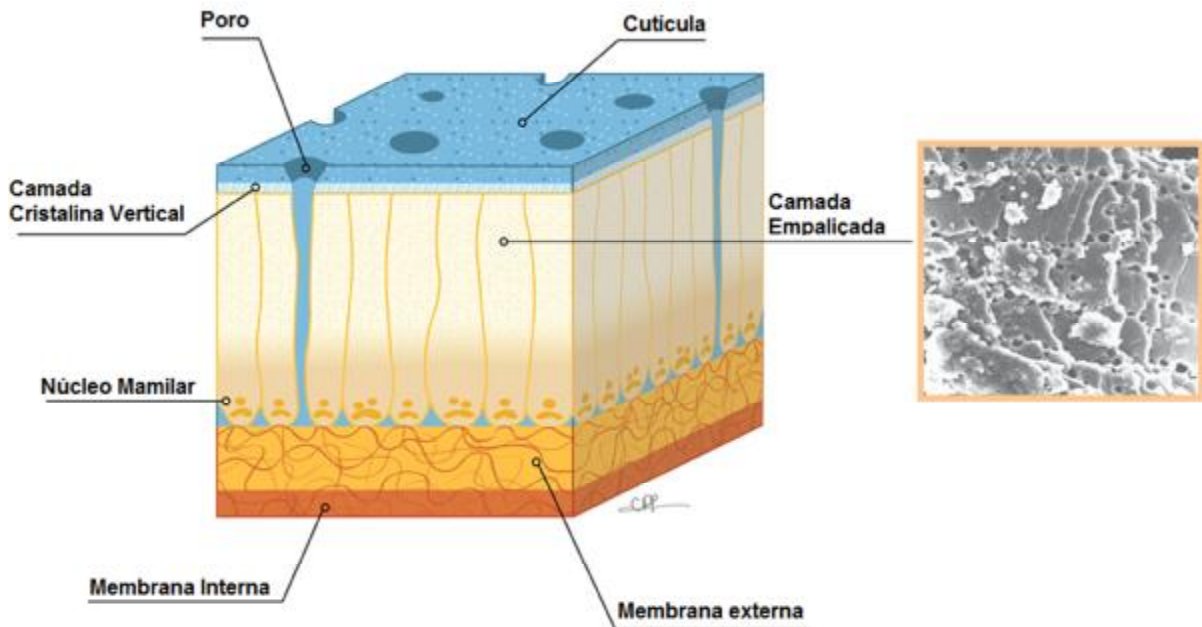


Figura 3- Representação esquemática de corte transversal de casca de ovo de galinha com detalhe da microestrutura.

Fonte: Adaptado de Hincke et al. (2012) e Masuda e Hiramatsu (2008).

Conforme ilustrado na Figura 3, a casca de ovo é constituída de diversas camadas, incluindo: cutícula, camada cristalina vertical, camada empalçada, núcleo mamilar, membrana externa e membrana interna. A cutícula é a camada mais externa da casca, porosa, de constituição proteica onde se localizam os pigmentos da casca. Abaixo, está localizada a matriz mineral da casca, formada de camadas CaCO_3 na forma de calcita, o polimorfo mais estável do CaCO_3 . Cada uma das camadas possui cristais com diferentes formas tamanhos e orientações, as quais são guiadas pela matriz orgânica formada de componentes residuais do rápido processo de mineralização da casca no oviduto (EUNICE; LI-CHAN; KIM, 2008).

A zona mais externa da matriz mineral é uma fina e densa camada de cristais de CaCO_3 dispostos verticalmente. A camada empalçada, também chamada zona esponjosa, é a maior camada mineralizada da casca, possui cristais colunares de até 200 μm de comprimento e também é encontrada matriz conectiva nesta região.

O núcleo mamilar é uma camada menos calcificada constituída de material floculento parcialmente embebido na membrana proteica interna; contém os cristais preferencialmente solubilizados usados no desenvolvimento do embrião. Intimamente ligadas à casca, estão as membranas proteicas externa e interna, constituídas principalmente de fibras de colágeno (EUNICE; LI-CHAN; KIM, 2008).

A matriz orgânica da casca de ovo é basicamente proteica, contendo principalmente proteoglicanas, glicoproteínas e mucopolissacarídeos ácidos associados. Essa matriz possui proteínas solúveis e insolúveis que são envolvidas no processo de mineralização e possuem capacidade de quelar o Ca durante a formação da casca (GURU; DASH, 2014).

Tabela 5- Composição mineral da casca de ovo.

Mineral	Concentração	Referência
Ca (mg/g)	303 - 415	1,2,3,6
Mg (mg/g)	3,5 - 5,5	1, 2,3,4,5
P (mg/g)	0,6 - 2,1	1,2,3,4,5
Sr (mg/g)	0,050 - 1,03	1,3,4,6
Zn (mg/g)	0,0008 - 0,006	1,3,4,5
Na (mg/g)	0,87 - 1,17	2,3,4,6
K (mg/g)	0,41 - 0,42	2,3,4,6
Fe (mg/g)	0,005 - 0,025	1,2,3,4
Cu (mg/g)	0,004 - 0,010	1,5
Cr (µg/g)	0,03 - 0,20	1
F (mg/g)	0,002 - 0,006	1,6
Se (µg/g)	0,014 - 0,034	1,3
Co (mg/g)	0,00052	3
Mn (mg/g)	0,0003	3,4
Pb (µg/g)	<0,5	1
Al (mg/g)	<0,005	1
Cd (µg/g)	<0,05	1,3
Hg (µg/g)	<0,2	1,3

1-Schaafsma et al. (2000); 2-Masuda e Hiramatsu (2008); 3-Vilar; Sabaa-Srur; Marques (2010); 4- Santos et al. (2012); 5- Küçükyılmaz et al. (2012); 6- Brun et al. (2013).

A composição mineral da casca de ovo pode apresentar variações de acordo com o sistema de criação além da dieta e idade das poedeiras (SCHAAFSMA et al., 2002; KÜÇÜKYILMAZ et al., 2012). Variações observadas entre diferentes estudos também podem ser atribuídas ao método de preparo das mesmas, o qual pode incluir ou não as membranas proteicas ligadas à casca. De qualquer forma, o Ca é o mineral mais abundante na casca de ovo, e outros minerais como magnésio (Mg), estrôncio (Sr), ferro (Fe) e selênio (Se), podem ser encontrados em menores e variáveis concentrações (ROVENSKÝ et al., 2003). A concentração destes e de outros minerais na casca de ovo pode ser visualizada na Tabela 5.

1.2.2 Processamento da casca de ovo para o consumo humano

A casca de ovo possui grande potencial para ser utilizada como fonte de Ca em humanos, seja na forma de suplementos alimentares ou sendo adicionadas aos alimentos durante seu preparo. Para esta aplicação as cascas de ovo precisam ser refinadas.

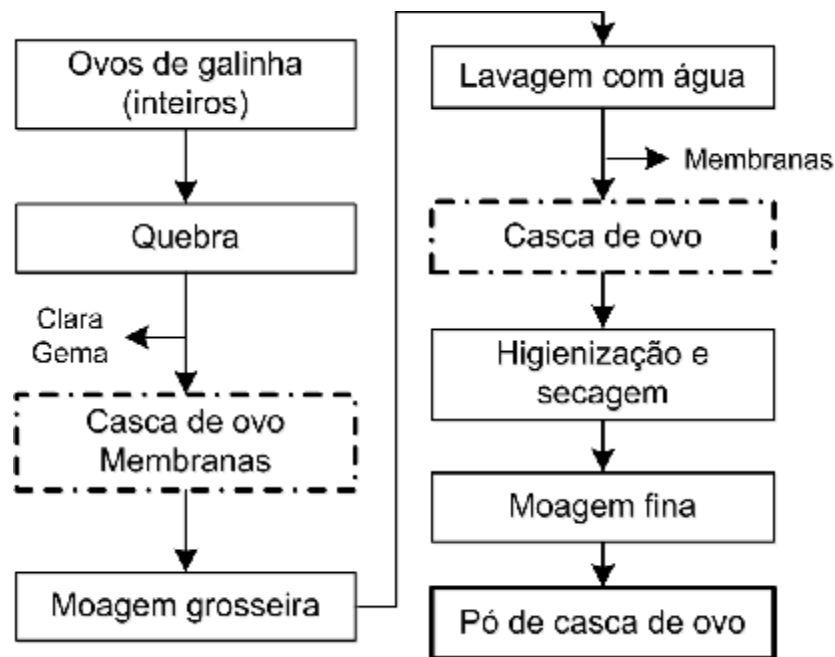


Figura 4- Processo de preparo simplificado do pó da casca de ovo para consumo humano.

Fonte: Masuda e Hiramatsu (2008), adaptado.

A Figura 4 mostra um exemplo de processo de manufatura para produção do pó da casca de ovo. Primeiramente, os ovos são lavados e quebrados para a separação da clara e gema. Em seguida, as cascas de ovo coletadas são grosseiramente moídas e lavadas com água para a separação das membranas. Posteriormente, as cascas de ovo são secas e higienizadas e moídas até obtenção de pó fino (MASUDA; HIRAMATSU, 2008). Segundo Oliveira, Benelli e Amante (2013), o rendimento do processo é de aproximadamente 95% em relação ao peso inicial das cascas.

O método de processamento deste produto foi patenteado primeiramente na Eslováquia e posteriormente em diversos países da Europa e Estados Unidos na década de 1990 (ROVENSKÝ et al., 2003). Nos anos subsequentes foram criados novos métodos para tornar mais fácil a separação das membranas proteicas ligadas à casca, utilizando inclusive luz pulsada (CORDEIRO; HINCKE, 2011). No Brasil, uma patente foi publicada em 2012 para a obtenção do pó de casca de ovo visando a alimentação animal ou humana (SRUR; VILAR; MARQUES, 2012).

A segurança microbiológica é um importante aspecto a ser considerado quando se visa o aproveitamento da casca de ovo por humanos, sobretudo por se tratar de um produto suscetível à contaminação por bactérias, principalmente do gênero *Salmonella* (NAVES et al., 2007a). Diferentes métodos de higienização das cascas já foram aplicados, incluindo calor seco, calor úmido e imersão em solução clorada com variações de tempo vs. temperatura (MICHÁLEK, 1991; NAVES et al., 2007a; SRUR; VILAR; MARQUES, 2012). Naves et al. (2007a) testou e otimizou o método utilizado pela Pastoral da Criança, verificando que a imersão por 5 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% seguida de fervura por 10 minutos são suficientes para obter adequação do produto para mesófilos aeróbios, coliformes totais e termotolerantes, bolores, leveduras, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Os autores também observaram que tanto a secagem em estufa (60°C) e ao sol podem ser adequadas. Na secagem em estufa, os níveis de contaminação foram irrelevantes e na secagem ao sol, a contaminação microbiana encontrada foi bastante baixa. Os autores sugerem que a secagem ao sol seja adotada para a redução de custos do processo, desde que haja proteção adequada das cascas durante esta etapa (NAVES, et al., 2007a).

A moagem da casca de ovo é uma etapa crucial do processo, pois o maior tamanho de partícula pode prejudicar características sensoriais de alimentos

fortificados com este produto (BRUN et al., 2013). De forma doméstica, as cascas podem ser moídas utilizando um rolo de massa, liquidificador, processador ou moedor de café, seguido por peneiragem para separar as partículas grosseiras (NAVES et al., 2007a; BRUN et al., 2013). No entanto, o tamanho de partícula que se consegue alcançar em escala doméstica é maior do que as granulometrias que se consegue atingir com moinho de laboratório e em escala industrial (BRUN et al., 2013).

1.2.3 Aplicação da casca de ovo como fonte de Ca para humanos

Produtos lácteos, conhecidos como a maior fonte dietética de Ca, foram introduzidos na alimentação humana apenas há 10.000 anos. Antes deste período, os homens consumiam elevada quantidade de Ca de outras fontes, possivelmente incluindo cascas de ovo (SCHAAFSMA; PAKAN, 1999). O primeiro uso clínico documentado da casca de ovo como fonte de Ca em humanos data da década de 1940, na Hungria. Crianças com raquitismo eram tratadas com uma dose diária de 6 g de casca de ovo triturada tendo sido observada regressão das deformidades esqueléticas típicas da doença, ganho de peso e melhora da condição física. O mesmo tratamento foi introduzido em mulheres grávidas reduzindo a frequência de recém-nascidos raquíticos (ROVENSKÝ et al., 2003). Em 1992, a casca de ovo de galinha foi registrada como droga medicinal na Eslováquia (Biomim H[®]/ ROVENSKÝ et al., 2003) e nos anos subsequentes diversas pesquisas foram publicadas com casca de ovo, investigando aspectos como composição, biodisponibilidade e fortificação de alimentos, entre outros.

No Brasil, o consumo da casca de ovo tem sido difundido pela Pastoral da Criança, a qual também atua em populações carentes de outros países. Esta organização não governamental utiliza a casca de ovo como fonte de Ca em multimisturas, um suplemento alimentar preparado com ingredientes de baixo custo e subprodutos alimentares, as quais são distribuídas para auxiliar no combate à desnutrição (HELBIG; BUCHWEITZ; GIGANTE, 2008; CALLEGARO et al., 2010).

Diversas pesquisas tem sido conduzidas visando o desenvolvimento de produtos fortificados com pó de casca de ovo, sendo que a principal característica

sensorial a ser contornada é a alteração de textura destes alimentos (DAENGPORK et al., 2002; SALEM et al., 2012; DUTRA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2013; BRUN et al., 2013). Para minimizar o possível efeito da cor, a maioria dos estudos utilizam somente cascas de ovo brancas na formulação (BORON et al., 2006; NAVES et al., 2007b; DUTRA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2013; BRUN et al., 2013).

O tamanho de partícula das cascas de ovo influencia diretamente na textura dos alimentos fortificados e em sua aceitação. Brun et al. (2013) verificou que alimentos como carne frita, pão, pizza e macarrão apresentaram pequenas alterações de textura quando enriquecidos com casca de ovo de tamanho de partícula médio de 450 μm e nível de 500 mg de Ca/porção comparados aos alimentos não fortificados. Entretanto, quando foi utilizada casca de ovo de 140 μm a alteração de textura não foi perceptível. Dutra et al. (2013) e Silveira et al. (2013) verificaram alteração de textura e redução da intenção de compra para macarrão e pães fortificados com casca de ovo de granulometria compreendida entre 106 e 212 μm em níveis de 128 e 325 mg de Ca/100g, respectivamente no macarrão e pão prontos para consumo. Já quando esses produtos foram fortificados, com o tamanho de partícula inferior a 106 μm , as diferenças de textura foram insignificantes em comparação aos alimentos não fortificados (DUTRA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2013). Salem et al. (2012), adicionou 10% ou 20% de pó da casca de ovo à farinha utilizada em formulação de bolo e não observou diferença na aceitabilidade em relação ao bolo não fortificado, porém o tamanho de partícula utilizado foi de 10 μm .

Outros pesquisadores formularam iogurte e salsicha adicionando os sais solúveis citrato e lactato de cálcio preparados a partir da casca de ovo (DAENGPORK et al., 2002; BORON et al., 2006) obtendo também resultados promissores.

Os níveis de fortificação testados são variáveis. Naves et al. (2007b) estudou a contribuição de alimentos de fácil preparo e baixo custo fortificados com casca de ovo para o aporte diário de Ca. Alimentos como arroz, bolo e biscoitos fortificados chegam a contribuir com 32% das recomendações de Ca para adultos em uma porção do alimento.

1.2.4 Biodisponibilidade do Ca da casca de ovo em modelos animais e *ex vivo*

A biodisponibilidade da casca de ovo como fonte de Ca foi avaliada em estudos em animais, sendo considerada comparável ou mesmo superior ao CaCO_3 purificado (SCHAAFSMA; BEELEN, 1999; HIRASAWA; OMI; EZAWA, 2001; NAVES, 2003; MAEHIRA; MIYAGI; EGUCHI, 2009; BRUN et al., 2013).

Schaafsma e Beelen (1999) estudaram a biodisponibilidade do Ca do pó de casca de ovo em comparação ao CaCO_3 purificado em suínos em crescimento. A absorção de Ca foi avaliada em duas dietas com diferentes fontes proteicas: caseína e isolado proteico de soja. Em ambos os casos, a absorção de Ca da casca de ovo foi maior, mas estatisticamente superior apenas na dieta de proteína de soja. Naves (2003) também avaliou a biodisponibilidade do Ca da casca de ovo em animais em crescimento, os quais foram alimentados com dietas à base de caseína ou de arroz e feijão. Este autor verificou que os ratos que receberam Ca da casca de ovo apresentaram teor de Ca no fêmur semelhante ao grupo que consumiu CaCO_3 purificado, mas neste estudo a natureza da ração não interferiu na biodisponibilidade do Ca.

Brun et al. (2013) estudaram a absorção de Ca em ratos adultos e também constataram que o Ca proveniente da casca de ovo foi tão eficientemente absorvido quanto o CaCO_3 purificado. Ascar et al. (1993) demonstraram que a suplementação da dieta com casca de ovo por 75 dias foi capaz de reverter a perda óssea de ratos adultos anteriormente mantidos em dieta hipocálcica por igual período. A densidade óssea permaneceu apenas 4% inferior ao grupo controle que recebeu dieta com teor adequado de Ca durante todo o período.

Outros estudos investigaram a biodisponibilidade do Ca da casca de ovo em modelo animal com balanço ósseo negativo (HIRASAWA; OMI; EZAWA, 2001; MAEHIRA; MIYAGI; EGUCHI, 2009). Hirasawa et al. (2001) demonstraram que a densidade mineral óssea e a absorção de Ca foram similares em ratas ooforectomizadas que receberam casca de ovo, em comparação ao grupo que recebeu CaCO_3 . Neste mesmo estudo, no grupo de ratas em que a casca de ovo foi fornecida juntamente com vitamina D_3 , a densidade mineral óssea mostrou-se superior aos grupos não suplementados com a vitamina, e também em relação ao grupo com CaCO_3 e a vitamina.

Maehira et al. (2009) estudaram os efeitos da casca de ovo como fonte de Ca sobre o metabolismo ósseo e a expressão gênica em cepa de camundongos com envelhecimento acelerado (SAMR1). Dietas contendo 1% de Ca de diferentes fontes foram mantidas por 6 meses. Apesar de não se detectar resultado superior no grupo casca de ovo sobre as propriedades biomecânicas e peso ósseo, este grupo apresentou supressão de genes associados à diferenciação dos osteoclastos e maior expressão de genes relacionados com a osteoblastogênese comparado ao grupo que recebeu CaCO_3 purificado.

Elias (2010) verificou em estudo *ex vivo* que polipeptídeos extraídos da casca de ovo apresentam efeito estimulatório sobre osteoblastos. Além do comprovado efeito biológico de proteínas da casca de ovo sobre o metabolismo ósseo, também foi observado efeito estimulatório de proteínas na absorção de Ca. Daengprok et al. (2003) observaram que uma proteína de 21kDa isolada da fração proteica solúvel da casca de ovo provocou um aumento de 64% no transporte de Ca por células Caco-2.

Alguns estudos avaliaram a biodisponibilidade de sais solúveis de Ca obtidos a partir da casca de ovo (BORON, 2004; LIN et al., 2012; YU et al., 2013). Boron (2004) comparou a biodisponibilidade de CaCO_3 e citrato de Ca purificados obtidos da casca de ovo com CaCO_3 purificado comercial. Ratos machos em crescimento que receberam as fontes de Ca obtidas da casca de ovo apresentaram mesmo ganho de peso, absorção de Ca e depósito mineral no osso, quando comparados entre si e também em relação ao CaCO_3 purificado. Lin et al. (2012) e Yu et al. (2013) também observaram boa biodisponibilidade dos sais de malato e citrato-malato de cálcio produzidos a partir da casca de ovo como fonte de Ca em camundongos.

Dentre os estudos encontrados na literatura, apenas um demonstra biodisponibilidade inferior do Ca da casca de ovo comparado ao CaCO_3 purificado. Jong et al. (1999) verificou que o teor de Ca ósseo e a força de quebra do osso de ratos em crescimento foram menores no grupo que recebeu casca de ovo em comparação ao grupo CaCO_3 e ao grupo Ca de ostra.

1.2.5 Biodisponibilidade do Ca da casca de ovo em humanos

Estudos em humanos também demonstraram efeito positivo da casca de ovo como fonte de Ca. Um estudo piloto foi conduzido com 9 mulheres e 1 homem com osteoporose ou osteopenia recebendo diariamente 3 g de casca de ovo, acrescido de vitamina D₃ e Mg. Outras 10 mulheres saudáveis na pós-menopausa, provenientes da mesma região, formaram o grupo controle, o qual não recebeu suplementação (SCHAAFSMA; PAKAN, 1999). O grupo tratado apresentou significativo aumento da densidade óssea da coluna e fêmur após 4 a 8 meses de intervenção; enquanto, neste período o grupo controle apresentou redução da densidade óssea nas mesmas regiões. Posteriormente, os mesmos pesquisadores conduziram um estudo controlado, duplo-cego com mulheres na menopausa (SCHAAFSMA et al., 2002). Um total de 85 pacientes foram divididos em 3 grupos: suplementado com casca de ovo acrescida de mistura de minerais e vitaminas, CaCO₃ purificado acrescido das mesmas vitaminas e minerais em mesma concentração e grupo placebo. Os suplementos continham 500 mg de Ca e deveriam ser consumidos duas vezes ao dia. Após 12 meses, as mulheres que consumiram Ca da casca de ovo tiveram a densidade óssea significativamente aumentada em comparação com os exames realizados antes da intervenção. No grupo tratado com CaCO₃, esse aumento não foi significativo. Os resultados de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo também foram mais favoráveis para o grupo suplementado com casca de ovo.

Resultados promissores também foram encontrados com pacientes com osteoartrite e pseudoartrose, nos quais a suplementação com cascas de ovo além de promover um aumento da densidade óssea, reduziu a dor e aumentou a mobilidade dos pacientes (ROVENSKÝ et al., 2003).

Observa-se que, além da casca de ovo ser uma fonte abundante de Ca de baixo custo, foi demonstrada, na maioria dos estudos realizados, uma boa disponibilidade do mineral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a composição mineral e a segurança microbiológica de cascas de ovo, bem como determinar a biodisponibilidade do Ca desta fonte em ratos Wistar em crescimento.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar minerais essenciais e tóxicos em amostras de casca de ovo provenientes da região central do Rio Grande do Sul;
- Avaliar a influência do sistema de criação das poedeiras e coloração das cascas na composição mineral;
- Comparar dois métodos de higienização das cascas de ovo quanto a segurança microbiológica do pó das cascas;
- Avaliar a biodisponibilidade do Ca de cascas de ovo com diferentes granulometrias comparado ao carbonato de cálcio purificado por meio da determinação da absorção intestinal de Ca, do peso, do conteúdo mineral e das propriedades biomecânicas do osso;
- Avaliar a influência do uso de cascas de ovo com diferentes granulometrias como fonte de Ca sobre a absorção intestinal de P e Mg em comparação ao carbonato de cálcio purificado.

3 MANUSCRITO 1*

1 **Casca de ovo como fonte de cálcio para humanos: Composição mineral e análise microbiológica**

2 **Eggshell as calcium source for humans: Mineral composition and microbiological analysis**

3 **Bruna Gressler Milbradt¹ Aline Lima Hermes Müller² Jéssica Soares da Silva³**

4 **Julianna Rodrigues Lunardi³ Liana Inês Guidolin Milani⁴ Érico Marlon de Moraes**

5 **Flores⁵ Maria da Graça Kolisnki Callegaro³ Tatiana Emanuelli^{3#}**

6 **RESUMO**

7 Este estudo teve como objetivo avaliar a composição mineral de diferentes tipos de cascas de
8 ovo, bem como a segurança microbiológica de amostras submetidas a diferentes métodos de
9 higienização. Para a obtenção do pó de casca de ovo, as cascas foram lavadas, higienizadas, secas em
10 estufa e trituradas em moinho. Cascas de ovo de granja (criação confinada), de coloração branca e
11 vermelha, e cascas de ovo coloniais (caipira) provenientes da região central do Rio Grande do Sul
12 foram comparadas quanto a sua composição mineral. O Ca, mineral predominante na casca de ovo, se
13 manteve em concentrações semelhantes nas diferentes amostras (cerca de 365 mg/g). As cascas de
14 ovo de granja apresentaram maior concentração de Mg e menor concentração de Sr que as cascas de
15 ovo coloniais. Não foram encontradas quantidades significativas de Fe, Cr, Mn, Mo, Ni, Se, Al, Cd e
16 Pb nas amostras analisadas. Adicionalmente, tanto amostras higienizadas com imersão em hipoclorito

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Química, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

³ Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: tatiemanuelli@gmail.com [#] Autor para correspondência.

⁴ Laboratório de Microbiologia, DTCA, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁵ Departamento de Química, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

* Manuscrito submetido à revista Ciência Rural (Anexo A) e configurado conforme as normas da mesma, listadas no Anexo B.

1 e posterior fervura em água quanto amostras nas quais a imersão em hipoclorito foi suprimida não
2 apresentaram contaminação por coliformes, estafilococos ou salmonela. Os resultados indicam que a
3 casca de ovo pode ser utilizada na nutrição humana já que é rica em Ca, não apresenta contaminação
4 por metais tóxicos e, se processada de forma adequada, apresenta boa qualidade higiênico-sanitária.

5 **Palavras-chave:** casca de ovo, cálcio, minerais, metais tóxicos, qualidade higiênico-sanitária.

6

7 **ABSTRACT**

8 This study aimed to evaluate the mineral composition of different kinds of eggshell,
9 as well as the microbiological safety of samples submitted to different sanitization procedures.
10 To obtain the eggshell powder, the shells were washed, sanitized, oven dried and grinded in a
11 mill. White- and brown-colored eggshells from confined laying hens and eggshells from free-
12 ranged laying hens from the central region of Rio Grande do Sul were compared for their
13 mineral composition. Ca, the predominant mineral in eggshells, remained at similar
14 concentrations in the different samples (approximately 365 mg/g). Eggshells from confined
15 laying hens had higher Mg concentration and lower Sr concentration than the shells from free-
16 ranged laying hens. No significant amounts of Fe, Cr, Mn, Mo, Ni, Se, Al, Cd or Pb were
17 found in the samples. Additionally, both samples that were sanitized by immersion in
18 hypochlorite and subsequently boiled in water as well as samples in which hypochlorite
19 immersion was suppressed did not show coliform, staphylococcus or salmonella
20 contamination. The results indicate that eggshell can be used in human nutrition since it is
21 rich Ca source, shows no contamination by toxic metals and has good sanitary quality when
22 properly processed.

23 **Key words:** eggshells, calcium, minerals, toxic metals, sanitary quality.

24

1 INTRODUÇÃO

2 O cálcio (Ca) é o mineral mais abundante no corpo humano, sendo responsável por
3 cerca de 1 a 2% do peso corporal (SILVA & COZZOLINO, 2007). Além da sua função
4 estrutural, uma vez que 99% de sua concentração encontra-se nos ossos e dentes, este
5 elemento é essencial na contração muscular, propagação do impulso nervoso, coagulação
6 sanguínea, entre outras funções (AWUMEY & BUKOSKI, 2006). A ingestão adequada de Ca é
7 importante para atingir e preservar a massa óssea ideal, além de estar associada à menor prevalência
8 de doenças crônicas (SCHULZE, 2013), entretanto, ela está frequentemente abaixo do recomendado.
9 No Brasil, aproximadamente 90% da população idosa não alcança o requerimento médio estimado
10 deste mineral através da alimentação (FISBERG et al., 2013).

11 A casca de ovo de galinha, que contém cerca de 40% de Ca na forma de carbonato de
12 cálcio (CaCO_3), poderia ser uma opção de baixo custo e fácil obtenção para atender as necessidades
13 nutricionais da população (SCHAAFSMA et al., 2000; ROVENSKÝ et al., 2003). Anualmente,
14 cerca de 6 milhões de toneladas de cascas de ovo são geradas nas residências e em empresas
15 alimentícias de todo o mundo (OLIVEIRA et al., 2013). A maior parte dessa produção é
16 destinada atualmente à agricultura para correção do pH do solo (KING'ORI, 2011). A
17 valorização deste subproduto pode reduzir a extração de reservas naturais não-renováveis de
18 CaCO_3 , como rocha calcária (OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, é importante ressaltar que
19 o Ca da casca de ovo possui elevada biodisponibilidade, demonstrada tanto em animais
20 experimentais quanto em humanos (SCHAAFSMA et al., 2002; NAVES, 2003; MAEHIRA et
21 al., 2009; BRUN et al., 2013).

22 Além do Ca, mineral mais abundante na casca de ovo, outros minerais podem ser
23 encontrados em menores concentrações, como magnésio (Mg), estrôncio (Sr), ferro (Fe),
24 selênio (Se), entre outros (ROVENSKÝ et al., 2003). No entanto, somente alguns estudos

1 avaliaram a composição mineral deste produto utilizando número expressivo de amostras
2 (SCHAAFSMA et al., 2000; KÜÇÜKYILMAZ et al., 2012; BRUN et al., 2013).

3 O sistema de criação das poedeiras é um possível fator de influência sobre a
4 composição mineral de cascas de ovo (SCHAAFSMA et al., 2000; KÜÇÜKYILMAZ et al.,
5 2012). Atualmente, a maioria dos ovos disponíveis para comercialização provém de galinhas
6 poedeiras criadas em granjas no sistema intensivo (confinadas em gaiolas), sendo que a
7 variação mais perceptível destes encontra-se na coloração das cascas (classificados em
8 brancos e vermelhos). Por outro lado, os ovos designados coloniais ou caipiras estão sendo
9 bastante valorizados e provém de galinhas poedeiras criadas em liberdade (sistema extensivo
10 ou semiextensivo). Ao contrário dos ovos de granja, os ovos coloniais não apresentam uma
11 categorização por cor, em função da variabilidade genética das poedeiras. No Brasil, existem
12 estudos avaliando o teor de Ca e outros minerais em amostra de casca do ovo (VILAR et al.,
13 2010; SANTOS et al., 2012), mas não há comparação entre amostras de diferentes sistemas de
14 criação, coloração e origens. Por sua vez, a relação entre a coloração da casca e sua
15 composição mineral ainda não foi estudada.

16 A segurança de suplementos naturais de Ca tem sido questionada devido a
17 possibilidade de contaminação por elementos tóxicos como chumbo (Pb), cádmio (Cd) e
18 mercúrio (Hg) (KIM, 2004; MATTOS et al., 2006). No Brasil, apenas VILAR et al. (2010) e
19 SANTOS et al. (2012) avaliaram níveis de metais tóxicos em amostra de cascas de ovo. Outro
20 aspecto que deve ser considerado para o uso de casca de ovo por humanos é sua segurança
21 microbiológica, por se tratar de um produto suscetível à contaminação por bactérias,
22 sobretudo do gênero *Salmonella* (NAVES et al., 2007).

23 O presente estudo teve como objetivos avaliar a influência do sistema de criação das
24 galinhas poedeiras e coloração das cascas na composição de minerais essenciais e tóxicos e a

1 influência da higienização com hipoclorito de sódio sobre a segurança microbiológica de pó de cascas
2 de ovo provenientes da região central do Rio Grande do Sul.

3

4 **MATERIAL E MÉTODOS**

5 Para a análise de minerais foram adquiridas entre julho e novembro de 2011 em mercados e
6 feiras da região central do Rio Grande do Sul 28 amostras, sendo cada unidade experimental composta
7 de 24 unidades de ovos. Os ovos foram procedentes de galinhas poedeiras mantidas confinadas em
8 gaiolas (ovos de granja) nas colorações de casca branca (N=11) e vermelha (N=9) e de galinhas
9 poedeiras criadas em liberdade em pequenas propriedades rurais (ovos coloniais) (N=8). Os ovos
10 coloniais não foram separados por coloração, já que há grande variação entre colorações e
11 tonalidades, diferindo mesmo entre as unidades que formavam uma amostra. As etapas envolvidas na
12 obtenção dos pós de cascas de ovo estão apresentadas na Figura 1.

13 Amostras de pó de casca de ovo (em triplicata) foram digeridas com ácido nítrico (Merck,
14 Alemanha) em bloco digestor e diluídas com água milli-Q. Ca, Mg e Sr foram analisados por
15 espectrometria de absorção atômica (AAS) de alta resolução (ContrAA 700 Analytikjena). Cd, Pb,
16 Cromo (Cr), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo), Níquel (Ni), e Se foram determinados utilizando
17 espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Perkin-Elmer-SCIEX, Elan
18 DRC II). Fe e Alumínio (Al) foram determinados utilizando espectrômetro de emissão óptica com
19 plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (Spectro Ciros CCD).

20 A qualidade microbiológica das cascas de ovo foi testada em 3 das amostras utilizadas para a
21 análise de minerais após higienização por imersão em hipoclorito de sódio 1% (0,48% de cloro livre)
22 durante 5 min., seguido de fervura em água por 10 min. (tratamento 1; higienização conforme
23 NAVES et al., 2007). Utilizou-se uma proporção de peso de casca para líquido de aproximadamente
24 1:10. Para avaliar se a imersão em hipoclorito poderia ser dispensável na higienização, 3 amostras
25 adicionais foram preparadas excluindo esta etapa (tratamento 2). A avaliação microbiológica consistiu
26 na contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva, determinação de coliformes totais e

1 termotolerantes e pesquisa de *Salmonella* sp., conforme os métodos oficiais (BRASIL, 2003a). A
2 interpretação dos resultados foi feita de acordo com os critérios microbiológicos para ovos
3 estabelecidos na legislação brasileira (BRASIL, 2001).

4 Os resultados de composição mineral das cascas foram submetidos à análise de variância de
5 uma via (ANOVA) e as diferenças entre os grupos foram avaliadas usando teste de Duncan
6 considerando o nível de 5% de significância. O software empregado foi Statistica 6.0 para Windows.

7

8 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

9 Na Tabela 1 é apresentado o conteúdo de minerais essenciais e não essenciais de cascas de
10 ovo de granja, brancas e vermelhas, e coloniais. Neste estudo não foram observadas diferenças na
11 composição mineral entre os ovos de granja brancos e vermelhos, possivelmente em função da maior
12 diferença entre essas cascas ser na sua composição orgânica (MINE, 2008). Por outro lado, ocorreram
13 pequenas diferenças de composição mineral entre cascas de ovo coloniais e de granja que serão
14 discutidas a seguir.

15 A concentração de Ca atingiu 37% do pó de casca de ovo em média em todas as amostras
16 analisadas (365,7 mg/g; Tabela 1). Este teor foi semelhante às concentrações encontradas por
17 SCHAAFSMA et al. (2000), em média 390 mg/g de pó de casca de ovo desprovidas de membranas,
18 como as analisadas neste estudo. Teores inferiores também são relatados na literatura (VILAR et al.,
19 2010; BRUN et al., 2013), mas tratam-se de amostras contendo as membranas proteicas que se
20 encontram aderidas à casca, ocasionando a redução da concentração mineral do material. Além disso,
21 neste estudo a concentração de Ca foi semelhante entre as cascas de ovo de granja e coloniais. Este
22 resultado está em concordância com estudos prévios que demonstraram níveis constantes de Ca em
23 cascas de ovo de poedeiras de sistemas de criação e dietas variadas (SCHAAFSMA et al., 2000;
24 KÜÇÜKYILMAZ et al., 2012; BRUN et al., 2013). Sabe-se que os ovos coloniais
25 normalmente apresentam cascas mais espessas do que as dos ovos de granja, podendo
26 apresentar maior proporção de Ca na casca em relação ao peso total do ovo (HOLT et al.,

1 2011). No entanto, como avaliamos a concentração do mineral por grama de casca e não em
2 relação ao ovo em si, essa diferença não pode ser observada.

3 Os teores de Mg nas cascas variaram de 3,04 a 3,65 mg/g (Tabela 1), em concordância com
4 estudos prévios (SCHAAFSMA et al., 2000; VILAR et al., 2010; KÜÇÜKYILMAZ et al., 2012).
5 Apesar do Mg ser o segundo mineral mais abundante nas cascas de ovo, a quantidade fornecida pelas
6 cascas não é expressiva. Enquanto o consumo de 2,7 g de casca de ovo fornece 100% da ingestão
7 diária recomendada (IDR) de Ca para adultos (IDR=1000 mg; BRASIL, 2003b), essa quantidade do
8 produto forneceria menos de 4% da IDR para o Mg (IDR= 260mg; BRASIL, 2003b). Ainda assim,
9 notou-se uma variação no teor deste mineral entre os tipos de cascas. As cascas de ovo coloniais
10 apresentaram teores de Mg aproximadamente 20% superiores em comparação as cascas de ovo de
11 granja, tanto brancas quanto vermelhas (Tabela 1; $p<0,05$). KÜÇÜKYILMAZ et al. (2012)
12 observaram pequeno aumento de Mg (10%) em cascas de ovo de poedeiras de sistema de
13 criação orgânico em comparação às mantidas confinadas, atribuindo esse resultado ao livre
14 acesso dessas poedeiras ao solo e pequenas pedras contendo Mg. Por outro lado,
15 SCHAAFSMA et al. (2000) e BRUN et al. (2013) encontraram quantidades semelhantes de
16 Mg independente do sistema de criação, possivelmente em função do material disponível no
17 ambiente em que as poedeiras estavam sendo criadas.

18 Além do Ca e Mg, foi detectado de 0,37 a 0,60 mg/g de Sr nas cascas de ovo, sendo que as
19 amostras de granja apresentaram teores superiores em comparação às coloniais (Tabela 1; $p<0,05$).
20 Este mineral não é considerado essencial a humanos, mas é utilizado no tratamento da osteoporose,
21 sendo associado ao aumento da formação, redução da reabsorção e melhora da microarquitetura óssea
22 (UNFER et al., 2007; BOYD et al., 2011). A ingestão diária normal de Sr situa-se entre 1 a 3 mg e,
23 conforme SCHAAFSMA et al. (2000), o consumo do pó da casca de ovo como fonte de Ca
24 acarretaria em aumento de 15 a 40% nesta ingestão. Embora a quantidade de Sr fornecida pela casca
25 de ovo esteja muito abaixo das doses terapêuticas, ela poderia trazer efeitos benéficos à saúde óssea

1 em longo prazo (SCHAASFSMA et al., 2002). Estudos prévios apontam teores de Sr variando de 0,1
2 até 1 mg/g no pó de casca de ovo (SCHAASFSMA et al., 2000; VILAR et al., 2010; BRUN et al.,
3 2013), variação que, assim como a deste estudo, podem ser explicadas por diferenças na dieta das
4 poedeiras, já que o teor de Sr depositado na casca de ovo é diretamente relacionado à sua ingestão
5 (SCHAASFSMA et al., 2000). Sugere-se que a maior concentração de Sr encontrada nas cascas de
6 granja em comparação às coloniais seja em decorrência das dietas destas poedeiras. Enquanto as
7 poedeiras de granja possuem dieta controlada, frequentemente suplementada com fontes minerais que
8 poderiam conter teores mais elevados de Sr, as poedeiras coloniais são alimentadas somente com
9 hortaliças e cereais.

10 Os microminerais Cr, Mn, Mo, Ni, Se e Al não foram detectados neste estudo (Tabela 1).
11 Do mesmo modo, estudos prévios não detectaram esses minerais ou os detectaram em concentrações
12 muito baixas (ng à poucos µg/g; SCHAASFSMA et al., 2000; VILAR et al., 2010). O micromineral
13 Fe foi detectado apenas em 5 amostras, atingindo o teor máximo de 6,25 µg/g (Tabela 1). Estudos
14 prévios relatam teores variados, de 1,5 até 23 µg/g de Fe na casca de ovo, denotando que a
15 concentração deste mineral pode variar nas cascas (SCHAASFSMA et al., 2000; VILAR et al., 2010;
16 KÜÇÜKYILMAZ et al., 2012).

17 A segurança de fontes naturais de cálcio para o consumo humano vem sendo questionada, já
18 que elas podem conter quantidades relevantes de minerais tóxicos (KIM, 2004; MATTOS et al.,
19 2005). No presente estudo não foram detectados Cd ou Pb em amostras de cascas de ovo
20 provenientes da região central do Rio Grande do Sul. De forma semelhante, VILAR et al. (2010) e
21 SANTOS et al. (2012) não detectaram contaminação por Cd, Pb ou Hg em amostra de casca de ovo
22 oriundas de Sorocaba/SP e Aracaju/Se, respectivamente. Segundo SCHAASFSMA et al. (2000), a
23 casca de ovo pode ser vantajosa em relação à outras fontes de Ca, já que não foram detectados Cd ou
24 Hg em amostras provenientes da Eslováquia, enquanto o Ca de ostras e o CaCO₃ purificado
25 apresentaram contaminação por estes metais.

1 As amostras de pó de cascas de ovo analisadas apresentaram condições sanitárias
2 satisfatórias quando comparadas ao padrão microbiológico estabelecido para ovos (BRASIL, 2001;
3 Tabela 2). A lavagem inicial seguida de fervura em água por 10 min (tratamento 2) foi tão eficiente
4 quanto o tratamento incluindo a imersão em hipoclorito a 1% para higienização das cascas de ovo
5 (tratamento 1). De acordo com NAVES et al. (2007), o procedimento de higienização proposto
6 também é eficiente para obter condições sanitárias satisfatórias para mesófilos aeróbios, bolores e
7 leveduras.

8

9 **CONCLUSÃO**

10 A casca pode ser considerada abundante em Ca, já que apenas 2,7 g do pó fornecem a
11 quantidade diária recomendada desse mineral para um adulto. As amostras coloniais e de granja,
12 brancas e vermelhas, apresentaram teores similares de Ca, mas as cascas de ovo de granja
13 apresentaram maior concentração de Mg e menor concentração de Sr que as coloniais. Não
14 foram encontradas quantidades significativas de outros minerais essenciais ou tóxicos nas
15 cascas de ovo. Além disso, a contaminação microbiana não é um fator de restrição ao uso da
16 casca de ovo por humanos, já que é possível obter pó de casca de ovo seguro em relação ao
17 caráter higiênico-sanitário utilizando fervura em água e secagem à 50°C por 24h.

18

19 **AGRADECIMENTOS**

20 Os autores agradecem ao programa Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) da UFSM pelos
21 recursos concedidos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
22 (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

23

1 REFERÊNCIAS

- 2 AWUMEY, E.M.; BUKOSKI R.D. Cellular functions and fluxes of calcium. In: WEAVER
3 C.M.; HEANEY, R.P. **Calcium in human Health**. Totowa: Springer, 2006. Cap.3, p.13-35.
- 4 BOYD, S.K.; et al. Increased bone strength is associated with improved bone microarchitecture in
5 intact female rats treated with strontium ranelate: A finite element analysis study. **Bone**, v.48, n.5,
6 p.1109-1116, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21276882>>. Acesso
7 em: 19 mar. 2014. doi: 10.1016/j.bone.2011.01.004.
- 8 BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de
9 Defesa Agropecuária. Instrução normativa n.62, de 26 de agosto de 2003a. Métodos analíticos
10 oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.
11 **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 set. 2003a. Seção 1,
12 p.14.
- 13 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 360,
14 de 23 de dezembro de 2003b. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos
15 embalados. Disponível em:
16 <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ec3966804ac02cf1962abfa337abae9d/Resolucao_RDC_n_360de_23_de_dezembro_de_2003.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 30 abr.
17 2014.
- 18
19 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12,
20 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.
21 **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p.45.
- 22 BRUN, L.R. et al. Chicken eggshell as suitable calcium source at home. **International Journal**
23 **of Food Sciences and Nutrition**, v.64, n.6, p.740-743, 2013.
24 doi:10.3109/09637486.2013.787399.

- 1 FISBERG, R.M. et al. Ingestão inadequada de nutrientes na população de idosos do Brasil:
2 Inquérito Nacional de Alimentação 2008-2009. **Revista de Saúde Pública**, v.47, p.S222-S230,
3 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102013000700008&lng=em)
4 [89102013000700008&lng=em](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102013000700008&lng=em)>. Acesso em: 2 jan. 2014. doi:[http://dx.doi.org/10.1590/S0034-](http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102013000700008)
5 [89102013000700008](http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102013000700008).
- 6 HOLT, P.S. et al. The impact of different housing systems on egg safety and quality. **Poultry**
7 **Science**, v.90, n.1, p.251-262, 2011. Disponível em:
8 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177467>>. Acesso em: 22 mar. 2014.
9 doi:10.3382/ps.2010-00794.
- 10 KIM, M. Mercury, cadmium and arsenic contents of calcium dietary supplements. Food
11 Additives and Contaminants, v.21, n.8, p.763-767, 2004. Disponível em:
12 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15370826>>. Acesso em: 9 jun. 2014. doi:
13 10.1080/02652030410001713861.
- 14 KING'ORI, A.M. A review of the uses of poultry eggshells and shell membranes. **International**
15 **Journal of Poultry Science**, v.10, n.11, p.908-912, 2011. Disponível em:
16 <<http://www.pjbs.org/ijps/fin2058.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2014.
- 17 KÜÇÜKYILMAZ, K. et al. Effect of an organic and conventional rearing system on the mineral
18 content of hen eggs. **Food Chemistry**, v.132, n.2, p.989-992, 2012. Disponível em:
19 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611016669>>. Acesso em: 19 mar.
20 2014. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.084.
- 21 MAEHIRA, F. Effects of calcium sources and soluble silicate on bone metabolism and the
22 related gene expression in mice. **Nutrition**, v.25, n.5, p.581-589, 2009. Disponível em:
23 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900708004541>>. Acesso em: 9 jun.
24 2014. doi:10.1016/j.nut.2008.10.023.

- 1 MATTOS, J.C.P. et al. Lead content of dietary calcium supplements available in Brazil. **Food**
2 **Additives & Contaminants**, v.23, n.2, p.133-139, 2006. Disponível em:
3 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449055>>. Acesso em: 06 abr. 2014.
4 doi:10.1080/02652030500316959.
- 5 MINE, Y. **Egg bioscience and biotechnology**. New Jersey: Wiley, 2008, 362 p.
- 6 NAVES, M.M.V. et al. Avaliação microbiológica do pó de casca de ovo e otimização da técnica
7 de elaboração do produto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.2, p.113-118, 2007.
8 Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/pat/article/view/1836/1748>>. Acesso em:
9 19 mar. 2014.
- 10 OLIVEIRA, D.A. et al. A literature review on adding value to solid residues: egg shells. **Journal**
11 **of Cleaner Production**, v.46, p.42-47, 2013. Disponível em:
12 <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652612005161>>. Acesso em: 19 mar. 2014.
13 doi:10.1016/j.jclepro.2012.09.045.
- 14 ROVENSKÝ, J. et al. Eggshell calcium in the prevention and treatment of osteoporosis.
15 **International Journal of Clinical Pharmacology Research**, v.23, n.2, p.83-92, 2003.
- 16 SANTOS, S.T.S. et al. Análises dos constituintes inorgânicos da casca do ovo. **Scientia Plena**,
17 v.8, n.3, p.1-4, 2012. Disponível em:
18 <<http://www.scienciaplena.org.br/ojs/index.php/sp/article/viewFile/917/476>>. Acesso em: 27 mar.
19 2014.
- 20 SCHAAFSMA, A et al. Positive effects of a chicken eggshell powder-enriched vitamin–mineral
21 supplement on femoral neck bone mineral density in healthy late post-menopausal Dutch women.
22 **British Journal of Nutrition**, v.87, n.3, p.267-275, 2002. Disponível em:
23 <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114502000570>. Acesso em: 25 fev 2014.
24 doi: 10.1079/BJN2001515.

- 1 SCHAAFSMA, A. et al. Mineral, amino acid, and hormonal composition of chicken eggshell
2 powder and the evaluation of its use in human nutrition. **Poultry Science**, v. 79, n.12, p. 1833-
3 1838, 2000. Disponível em: <<http://ps.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/ps/79.12.1833>>.
4 Acesso em: 12 dez. 2013. doi:10.1093/ps/79.12.1833.
- 5 SCHULZE, K.J. Calcium. In: CABALLERO B. et al. **Encyclopedia of Human Nutrition**. 3. ed.
6 Amsterdam: Elsevier, 2013. Cap. Calcium, p.228-234.
- 7 SILVA, A.G.H.; COZZOLINO, S.M.F. Cálcio. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de**
8 **nutrientes**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. Cap.22, p.456-481.
- 9 UNFER, T.C.et al. Sr and Fe relationship with hormone replacement therapy and bone
10 mineral density. **Clinica Chimica Acta**, v.384, n.1-2, p.113-117, 2007. Disponível em:
11 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000989810700335X>>. Acesso em: 6 abr.
12 2014. doi: 10.1016/j.cca.2007.06.010.
- 13 VILAR, J.S. et al. Composição química da casca de ovo de galinha em pó. **Boletim do Centro de**
14 **Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.28, n.2, p.247-254, 2010. Disponível em:
15 <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/20439/13698>>. Acesso em: 24 mar.
16 2014.

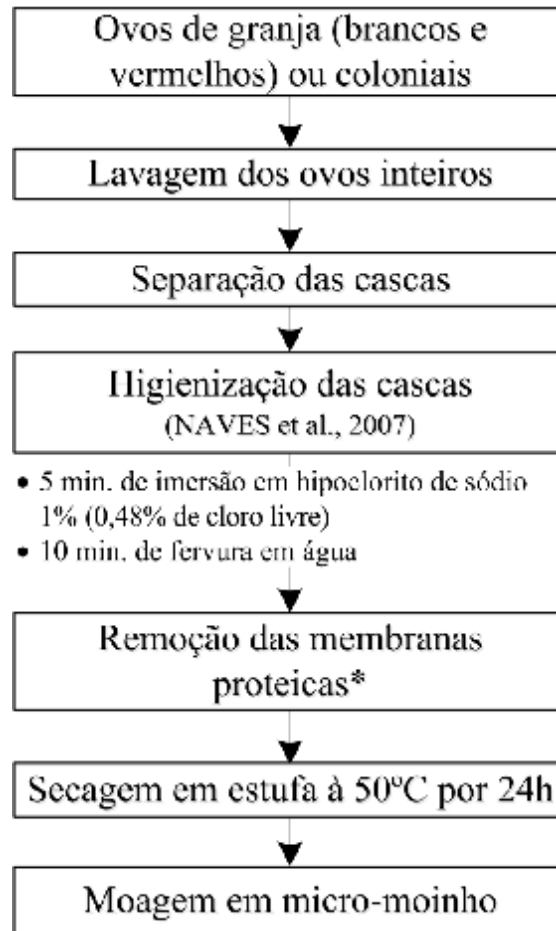


Figura 1 - Etapas de preparo das amostras de pó de casca de ovo.

*Moagem das cascas em liquidificador com água destilada e descarte da água contendo as membranas; repetiu-se este procedimento até obtenção de água límpida, o que indicava cascas de ovo livre de membranas.

Tabela 1 - Conteúdo de minerais em pós de cascas de ovo de granja e coloniais (média ± erro padrão).

	Cascas de ovo de granja		Cascas de ovo coloniais (n=8)
	Branco (n=11)	Vermelho (n=9)	
Minerais essenciais			
Ca (mg/g)	367,4 ± 2,5	368,2 ± 1,5	362,0 ± 3,0
Mg (mg/g)	3,08 ± 0,04	3,04 ± 0,03	3,65 ± 0,13 *
Fe (µg/g) #	<1,00 – 5,13	<1,00	<1,0 – 6,25
Cr (µg/g)	<0,3	<0,3	<0,3
Mn (µg/g)	<0,2	<0,2	<0,2
Mo (µg/g)	<0,2	<0,2	<0,2
Ni (µg/g)	<0,6	<0,6	<0,6
Se (µg/g)	<0,8	<0,8	<0,8
Minerais não-essenciais			
Sr (mg/g)	0,53 ± 0,02	0,60 ± 0,04	0,37 ± 0,04 *
Al (µg/g)	<0,7	<0,7	<0,7
Cd (µg/g)	<0,02	<0,02	<0,02
Pb (µg/g)	<0,2	<0,2	<0,2

* Valores estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Duncan (p<0,05).

Expresso em intervalo de concentração. Quantificado apenas em 3 amostras das cascas de ovo de granja branco e em 2 amostras das cascas de ovo coloniais.

Tabela 2 - Análises microbiológicas de cascas de ovo submetidas a diferentes processos de higienização.

Patógeno	Método de Higienização		
	Tratamento 1 (n = 3)	Tratamento 2 (n = 3)	Padrão microbiológico
Coliformes totais (NMP/g)	< 3,0	< 3,0	-- *
Coliformes termotolerantes (NMP/g)	< 3,0	< 3,0	10 (máx.)
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	5 x 10 ² (máx.)
<i>Salmonella</i> sp (em 25g de amostra)	Ausência	Ausência	Ausência

Tratamento 1: 5 min de imersão em hipoclorito de sódio 1% e 10 min de fervura com água.

Tratamento 2: 10 min de fervura com água.

NMP/g: número mais provável por grama de amostra.

UFC/g: unidades formadoras de colônia por grama de amostra.

* padrão microbiológico não estabelecido para ovos.

1 **4 MANUSCRITO 2 ***

2

3

4 **Eggshell fractions containing different particle size affects mineral absorption**
5 **but not bone mineral retention in growing rats**

6

7 Bruna G. Milbradt^{ab#}, Jéssica S. Silva^b, Andressa S. Silveira^b, Laila O. Dutra^b,
8 Rosana R. Pereira^b, Maria G. K. Callegaro^b, Tatiana Emanuelli^b

9

10 ^aGraduate Program in Food Science and Technology, Center of Rural Sciences,
11 Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

12 ^bIntegrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of
13 Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of
14 Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

15

16

17 # Corresponding author:

18 Tatiana Emanuelli

19 Tel.: +55 55 3220 8547; fax: +55 55 3220 8353.

20 E-mail address: tatiemanuelli@gmail.com

21

* Manuscrito em fase final de revisão pelos autores para submissão na revista *Nutrition Research*. Configurado conforme as normas da revista, listadas no anexo C.

22 Abbreviations

23 CaCO₃; Calcium carbonate

24 ES S; Small-sized particle eggshell fraction

25 ES M; Intermediate-sized particle eggshell fraction

26 ES L; Large-sized particle eggshell fraction

27 AIN; American Institute of Nutrition

28 ANOVA; Analysis of variance

29

30 **Abstract**

31 The purpose of this study was to compare the Ca bioavailability from eggshell
32 fractions containing different particle size to purified CaCO₃ in male growing rats.
33 Mineral absorption, bone mineral concentration and biomechanical properties were
34 evaluated. Ca absorption of rats fed with eggshell diets was 56.2% of the ingested
35 Ca, which is considered high. However, we observed lower Ca absorption in large-
36 sized particle eggshell fraction (ES L) and small-sized particle eggshell fraction
37 groups but similar Ca absorption in intermediate-sized particle eggshell fraction (ES
38 M) compared to the CaCO₃ group. Rats that received ES M and ES L had higher P
39 and Mg absorption than the CaCO₃ group. No changes were observed in the bone
40 mineral deposition, weight or mechanical resistance. We concluded that eggshell Ca
41 is well absorbed by the intestine and retained in bones of growing rats, being a low
42 cost alternative to achieve adequate Ca ingestion.

43

44 **Keywords**

45 Eggshell, rats, calcium, bioavailability, phosphorus, magnesium

46

47 1. Introduction

48

49 Calcium (Ca) is an essential mineral required for bone development, neuromuscular
50 functioning, coagulation, cell permeability, enzyme activation, hormone secretion and
51 many other extracellular and intracellular functions [1]. However, Ca dietary intake is
52 often insufficient [2], increasing the risk of osteoporosis, hypertension, obesity and
53 cancer [3].

54 Adequate dietary Ca levels are associated to the regular consumption of milk and
55 dairy products, which are the main sources of this mineral [4]. Nevertheless, these
56 foodstuffs are too expensive for low-income people, especially in developing
57 countries [5]. In addition, common problems as lactose intolerance and milk protein
58 allergies also limit dairy consumption [6].

59 Eggshell powder is a low-cost alternative to dairy products in order to provide
60 adequate Ca intake. It has been demonstrated to be a good Ca source in growing [7],
61 adult [8–10] and ovariectomized [11] animals and also in humans [12,13]. However, it
62 has been scarcely used in human nutrition despite being a natural, abundant and
63 renewable product, which is easily available at home and possesses lower levels of
64 toxic metals than other natural Ca sources [9,14,15].

65 The method of processing eggshell destined to human consumption was patented in
66 Slovakia and lately in many European countries and the United States, in the 1990s
67 [15]. Eggshell powder is also used in multimixture, a dietary supplement prepared
68 with low-cost ingredients and food byproducts, that is distributed for low-income
69 population in Brazil and other countries to counteract malnutrition [16]. Moreover, the
70 inclusion and acceptance of eggshell fortified food is the subject of several studies,
71 including products as sausage, cake, bread and pasta [9,17–19].

72 Eggshells are a matrix of interwoven protein fibers (about 2%) and calcified zones of
73 calcium carbonate crystals (CaCO_3 ; ranging between 95 and 98%) [14,20]. Ca is
74 nearly 40%, whereas magnesium (Mg) and phosphorus (P) are found at
75 concentrations near to 0.5 and 0.1%, respectively [21]. Moreover, eggshell contains
76 small amounts of other bone health-related minerals, such as strontium (Sr) and
77 selenium (Se), beyond low levels of hormones as calcitonin, transforming growth
78 factor- β 1 and progesterone [21]. The eggshell matrix protein is composed of soluble
79 and insoluble fractions with Ca-binding properties including proteoglycans,
80 glycoproteins and protein acid mucopolysaccharides [22].

81 Before human consumption, eggshell must be washed, dried, grinded and hygienized
82 [19,20]. Grinding is an important step since greater particle size may impair sensory
83 acceptance due to texture changes [9]. Domestic grinding may be achieved using a
84 rolling pin or a domestic blender followed by sieving to separate coarse particles
85 [9,19] but the particle size will be greater than that obtained in lab mill or in factory
86 scale [9]. In fact, the reduction of particle size was precisely the strategy used to
87 improve Ca absorption from carbonate in previous studies [23,24].

88 Eggshell Ca bioavailability was previously reported to be similar or even higher than
89 purified CaCO_3 [7,9,11–13]. Nevertheless, the influence of eggshell granulometry on
90 Ca absorption and bone properties has not been evaluated.

91 Our hypothesis is that the smaller eggshell particle size will increase the
92 gastrointestinal absorption and retention of Ca. The purpose of this study was to
93 compare the Ca bioavailability from eggshells containing different particle size to
94 purified CaCO_3 , by evaluating mineral absorption, bone mineral concentration and
95 biomechanical properties. Growing rats were used to simulate Ca absorption in the
96 infancy-adolescence period, since these stages of life are critical to reach adequate

97 bone mass and prevent or retard osteoporosis [25]. This study will be important to
98 elucidate a factor that may interfere in the bioavailability of eggshell Ca which is a
99 low-cost, safe, alternative Ca source.

100

101 **2. Methods and materials**

102

103 **2.1 Eggshell processing and characterization**

104

105 Different eggshell varieties from Santa Maria region (RS, Brazil) were used to obtain
106 the powder. Eggshells were washed with tap water and superficial sediment was
107 removed. To separate inner membranes, the eggshells were roughly triturated with
108 tap water in a blender (1:10 w/v) and the liquid containing membranes was
109 discarded. This step was repeated until obtaining an eggshell apparently free of
110 membranes (indicated by clear liquid). Then, samples were oven dried (50°C for 24h)
111 and milled in a knife mill (Marconi, MA 630). The mix of eggshell powder was
112 fractioned using a vibratory sieving machine (Servylab) attached to sequential 420,
113 212 and 106 μm -sieves to yield 3 eggshell fractions with decreasing particle size:
114 large (between 420 and 212 μm ; ES L), intermediate (between 212 and 106 μm ; ES
115 M), and small (< 106 μm ; ES S) particle fractions. The fraction retained in the 420
116 μm -sieve was discarded.

117 The eggshell fractions and the purified CaCO_3 (used in the control diet) were
118 evaluated in a multi-wave length laser diffraction analyzer (Beckman Coulter LS13
119 320) to determine the particle size. Figure 1 illustrates the particle size distribution of
120 the Ca sources used to formulate rat diets. The particle size (median or $d_{50} \pm \text{SD}$)
121 was $333 \pm 78 \mu\text{m}$ for ES L, $172 \pm 63 \mu\text{m}$ for ES M, $47 \pm 40 \mu\text{m}$ for ES S, whereas

122 CaCO₃ had the smallest particle size ($6.6 \pm 5.4 \mu\text{m}$). Figure 1 also shows that ES M
123 and ES L had a narrower range of particle dimension than ES S.

124

125 **2.2 Diets**

126

127 Diets were prepared according to the rodent diet from the American Institute of
128 Nutrition (AIN-93) [26]. The standard Ca source (CaCO₃; 99% purity; Dinâmica
129 Química, Diadema, São Paulo Brazil) was completely replaced by the different
130 eggshell powders to provide the same Ca concentration in all diets (500 mg%). The
131 amount of eggshell powder and CaCO₃ to be used in each diet was calculated after
132 Ca measurement in each Ca source separately. Ca concentration was $40.20 \pm 0.17\%$
133 in CaCO₃, $38.05 \pm 0.90\%$ in ES S, $39.09 \pm 1.41\%$ in ES M and $39.92 \pm 0.25\%$ in ES L. A
134 total of four diets were evaluated: CaCO₃ (standard) and ES S, ES M and ES L
135 (Table 1).

136 The moisture (method 925.10), ash (method 923.03), fat (method 945.39) and crude
137 protein (method 960.52, N x 6.25, micro-Kjeldahl method) of diets were evaluated as
138 stated by the Association of the Official Analytical Chemists [27]. The total dietary
139 fiber content was determined by the enzymatic-gravimetric method (985.29) [27]. The
140 available carbohydrates (nitrogen-free extract, NFE fraction) were calculated as
141 follows: NFE fraction % = $100 - (\text{moisture}\% + \text{crude ash}\% + \text{crude fat}\% + \text{crude}$
142 $\text{protein}\% + \text{dietary fiber}\%)$. Energetic value was calculated using the factors 37.6 kJ/g
143 for lipids and 16.7 kJ/g for protein and NFE fractions. Mineral content in diets was
144 determined as described in section 2.4.

145 Crude protein was also determined in triplicate in eggshell fractions. ES S had
146 $1.72 \pm 0.18\%$ protein while ES M and ES S had $1.83 \pm 0.18\%$ and $2.21 \pm 0.10\%$ protein,
147 respectively.

148 Eggshell powders did not add important amounts of P, Mg, protein or other
149 macronutrients to the diets (Table 1). Calcium concentrations in the experimental
150 diets were similar to control, as expected. However, Ca content of all diets was about
151 9% higher than the amount added to the diets (average content of 545 mg% vs.
152 expected 500 mg%). It possibly occurred due to the presence of Ca present in other
153 diet ingredients, mainly casein.

154

155 **2.3 Animals and experimental protocol**

156

157 Thirty-two male Wistar rats (3 weeks-old; weighing 62 ± 6 g) from our own breeding
158 colony were acclimated on the feeding system with AIN-93 diet during 5 days, and
159 further randomly divided into four experimental groups (n=8 per group). The animals
160 were individually housed in metabolic cages, under controlled room temperature (22
161 $\pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 5\%$) with 12:12 h light and dark cycle, and had free access
162 to drinking water and diet during the experimental period of 28 days. The feed intake
163 was recorded daily and the body weight of animals was obtained every 5 days.
164 These data were used to determine the feed efficiency ratio (g body weight gain/ g
165 food intake). Feces were quantitatively collected for each animal from days 15-25 of
166 the experiment, and subsequently dried, milled and stored. At the end of the
167 experiment, the animals were anesthetized with an intramuscular injection of xylazine
168 (10 mg/kg body weight) and ketamine (75 mg/kg body weight) and euthanized by
169 decapitation. Legs were collected and frozen intact (-20°C) to prevent bone
170 desiccation. All animals survived the experimental period but data from one rat of the
171 ES L group was excluded because of outlier results for dietary intake and weight
172 gain.

173 All animal procedures were conducted according to the Brazilian Guidelines for Care
174 and Use of Animals for Scientific and Educational Purposes [28] and were approved
175 by the Ethics and Animal Welfare Committee from the Federal University of Santa
176 Maria (protocol 038/2011).

177

178 **2.4 Minerals content and calculations**

179

180 The left legs were thawed and tibias were dissected, cleaned and dried overnight at
181 110°C, weighed and stored for mineral analysis. Diets and feces and the whole left
182 tibias were wet-digested with nitric and perchloric acids (Merk, Germany) [29]. Ca
183 and Mg concentrations were assessed by atomic absorption spectrometry using an
184 Atomic Absorption Spectrophotometer (SpectrAA-20 Plus, Varian) after adequate
185 dilutions with La₂O₃ solution (1%, Merck, Germany). A range of Ca (Titrisol, Merck,
186 Germany) and Mg (metallic, Merck, Germany) standards were used to obtain the
187 calibration curves. P concentrations were measured spectrophotometrically after
188 reaction with ammonium-molybdate and ammonium-metavanadate [30]. The intra-
189 and interassay coefficient of variation for Ca were 2.4 and 8.7%, for Mg were 1.4 and
190 5.6%, and for P were 0.9 and 1.5%, respectively. Every analysis was processed at
191 least in triplicate.

192 Mineral parameters (ingestion, fecal excretion and apparent absorption) were
193 obtained based on the mineral content of diets and feces. The mineral absorption
194 was calculated using the following equation:

$$195 \text{ Relative apparent absorption (\%)} = (\text{intake} - \text{fecal excretion}) \times 100 / \text{intake} \quad (1)$$

196

197 **2.5 Tibia biomechanical testing**

198

199 Right legs were slowly thawed and tibias were dissected, cleaned and wrapped in
200 saline-soaked gauze at 10°C overnight. Before testing, they were acclimated at room
201 temperature, while kept wet using saline.

202 Tibial 3-point flexural bending tests were conducted using a TA.XT plus texture
203 analyzer operated with the Exponent software 6.1.3.0 (Stable Micro Systems) and a
204 16 mm support span (HDP/3PB probe) attached to a 50 kg load cell, using crosshead
205 speed set at 0.6 mm/min. Bones were consistently oriented with the load applied on
206 the posterior side at mid-diaphyseal region. Load-displacement curve of each tibia
207 were used to determine yield point and ultimate load (N), displacement at the
208 ultimate load (mm), and stiffness (N/mm).

209

210 **2.6 Statistical analysis**

211

212 A power analysis was performed based on the Ca absorption data from a previous
213 study of our group in male growing Wistar rats [31]. A sample size of 8 rats per group
214 was required to detect a 15% difference in apparent mineral absorption among the
215 groups with 86% significance power, at $\alpha = 0.05$ level. Statistical analyses were
216 performed using Statistica 7.0 for Windows (Tulsa, OK, USA). Comparisons were
217 made using 1-way analysis of variance (ANOVA) between groups. An effect was
218 considered significant at $p \leq 0.05$. For all parameters with significant P-values,
219 intergroup differences were determined with Tukey unequal test. The results are
220 presented as the means \pm SEM of 8 animals per group, except for group ES L that
221 had $n=7$.

222 3. Results

223

224 3.1 Feed intake, growth and feed efficiency ratio

225

226 The growth parameters are shown in Table 2. Rats fed with eggshell or with CaCO₃
227 as Ca source had similar feed intake, body weight gain and feed efficiency ratio.

228

229 3.2 Apparent mineral absorption

230

231 Table 3 presents data on the ingestion and excretion of Ca, P and Mg, while figure 2
232 presents data on relative apparent absorption (%) of these minerals. All experimental
233 groups had a similar Ca ingestion during the absorption-measuring period, but Ca
234 fecal excretion was higher in rats fed with the ES L and ES S diets compared to the
235 CaCO₃ diet (Table 3). Ca absorption was high for all groups and ranged between
236 52.4 and 62.0%. Besides, it was similar for rats fed with ES M and the CaCO₃ diet,
237 whereas rats fed with ES S and ES L diets had lower Ca absorption than the CaCO₃
238 diet ($p < 0.05$; Figure 2).

239 P ingestion was similar for all groups, whereas Mg ingestion was greater in rats fed
240 the ES M diet than the CaCO₃ diet ($p < 0.05$). P excretion was lower in rats fed ES M
241 and ES L than the CaCO₃ diet, whereas the Mg excretion was lower in rats fed ES L
242 than the CaCO₃ diet ($p < 0.05$; Table 3). As the dietary concentration of P and Mg was
243 similar among all groups (Table 1), the lower excretion found was due to the
244 increased P and Mg absorption of the eggshell groups compared to the CaCO₃
245 group. Animals fed with ES M and ES L diets had presented greater P and Mg

246 absorption than CaCO₃ diet (p<0.05; Figure 2). In fact, P and Mg absorption were
247 strongly correlated (r= 0.75; p<0.05).

248

249 **3.3 Bone assays**

250

251 Table 4 presents the weight, mineral content and mechanical properties of tibias.
252 Rats that received eggshell powder as the unique dietary source of Ca had similar
253 bone Ca, P and Mg contents regardless of the particle size, and these contents were
254 also similar to the CaCO₃ diet. In addition, the weight and the biomechanical
255 properties of tibias were also similar among all treatments.

256

257 **4. Discussion**

258

259 Growing rats receiving eggshell as Ca source achieved the same body weight gain
260 and feed efficiency ratio as the control group that received CaCO₃, regardless of the
261 particle size. Previous studies evaluating Ca bioavailability from different sources in
262 growing rats also did not find differences in these parameters, despite unequal Ca
263 absorption [32,33]. In fact, when Ca is provided in sufficient amounts, changes in Ca
264 absorption may not alter growth parameters. In addition, Schaafsma and Beelen
265 (1999) did not observe variation on the feed intake or growth of piglets receiving
266 eggshell compared to CaCO₃ [7].

267 Mineral bioavailability is influenced by many factors, including those related to the
268 mineral source, namely speciation, molecular bonds, food matrix components and
269 disintegration; those related to the person, namely age, gender and nutritional state;
270 and others, namely mineral dietary intake and interaction with dietary components

271 [34–36]. The major determinant of bioavailability is the portion which is absorbed by
272 the gastrointestinal tract.

273 Intestinal Ca absorption consists of two processes: an active, saturable, hormone-
274 mediated, vitamin D-dependent, transcellular movement in the duodenum; and a
275 passive, nonsaturable, paracellular transport through the tight junctions between
276 mucosal cells of distal small intestine [37,38]. Since paracellular transport is
277 independent of nutritional and physiological regulation, its mechanism accounts for
278 most calcium absorption when calcium intake is adequate or high [38].

279 In this work, although only rats fed with ES M diet had the same Ca absorption as the
280 CaCO_3 group, the average Ca absorption of rats fed eggshell diets (56.2% of the
281 ingested Ca) was similar to other studies using AIN-93 diet containing conventional
282 Ca sources [16]. Previous papers indicated a similar or even superior Ca absorption
283 from eggshells compared to CaCO_3 but the effect of the particle granulometry has not
284 been previously evaluated. Ca absorption from eggshell was similar to that from
285 CaCO_3 in adult male rats [9] and in a rat model of osteoporosis [11]. Piglets had
286 similar Ca absorption from eggshell and CaCO_3 when casein was the protein source
287 of diet, and higher Ca absorption from eggshell than from CaCO_3 when the protein
288 source was soybean isolate [7].

289 We hypothesized that smaller particle size would enhance surface area facilitating
290 salt dissolution and improving calcium absorption from eggshell. Indeed, rats
291 receiving the ES L had lower Ca absorption than those receiving ES M and CaCO_3 .
292 However, animals that received the ES S also had lower Ca absorption than ES M
293 and the CaCO_3 groups. Eggshell is a complex tissue composed of multiple layers
294 which differ in the size and form of carbonate crystals [22]. Eggshell layers also have
295 protein matrix differences in interlacement and in chemical composition and solubility

296 [22]. The methodology used to obtain the eggshells fractions in the present study
297 could differentially separate the components of eggshell layers. Thus, we propose
298 that the interlacement of proteins with Ca crystals could hamper the disintegration of
299 ES S, and, consequently, its intestinal absorption. In the other hand, Ca absorption
300 impairment in group ES L could be mainly explained by its greater size, which would
301 delay its disintegration during the intestinal transit. In fact, we could observe eggshell
302 particles in the feces of ES L group rats.

303 The effects of CaCO_3 particle size has been previously tested for 13.5- and 18- μm
304 particle size that had no difference in the Ca absorption in adolescent girls and
305 ovariectomized rats [23,24]. In these cases, a potential limitation may be that the 4.5
306 μm difference was insufficient to show significant effects on Ca absorption.

307 Throughout this study we observed that the ES M group had similar Ca absorption to
308 the purified CaCO_3 , although its particle size was 26-fold larger. Additionally, the ES
309 L group, which had particle size 50-fold larger than CaCO_3 , had high Ca absorption,
310 although it was somewhat lower than that of the purified CaCO_3 group. These
311 findings are in agreement with previous studies, which suggested that eggshell has
312 good dissolution even at large granulometry, possibly due to its very porous physical
313 structure [20].

314 Furthermore, the amount of Ca is the major determinant of Ca absorption. Although
315 Ca absorption efficiency decreases with increasing Ca load, the total amount
316 absorbed still increases by paracellular route [38,39]. In this sense, extending the use
317 of eggshell as Ca source may be a good strategy in order to achieve daily positive
318 Ca balance.

319 P is an essential bone-forming element present in hydroxyapatite [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$],
320 which plays an important role in maintaining skeletal mechanical strength. A

321 depletion of serum phosphate leads to impaired bone mineralization and
322 compromised osteoblast function [40]. Mg is also involved in bone health. Bone
323 contains between 50% and 60% of body Mg, which is a surface constituent of the
324 hydroxyapatite that regulates crystal growth and stabilization [40,41].

325 Rats that received eggshell had higher P and Mg absorption than the CaCO₃ group,
326 which was statistically different only for the ES M and ES L groups. Since mineral
327 absorption was expressed as relative absorption, this effect of eggshell could not be
328 explained by the slightly higher amount of P and Mg found in the eggshell-containing
329 diets (Table 1) or by the higher Mg ingestion that occurred only in the ES M group
330 ($p < 0.05$; Table 3). We suggest that this eggshell effect could be related to some
331 protein that may have facilitated P and Mg absorption. Furthermore, there was a
332 direct relationship between the absorption of these minerals (positive correlation).

333 It has been demonstrated that soluble eggshell proteins improve Ca transport across
334 Caco-2 monolayers by 64% [42] but their effect on P and Mg absorption has not
335 been evaluated yet. The only study that evaluated Mg absorption from an eggshell-
336 containing diet in piglets did not find differences compared to the absorption from a
337 diet that had CaCO₃ as the Ca source [7]. P and Mg absorption was similar to
338 previous works with growing rats taking into account the daily animal ingestion
339 [16,31].

340 Since one of the primary functions of Ca is acting as a structural component of bone,
341 we have examined Ca bioavailability by measuring the degree of bone mineralization
342 and the mechanical properties of bones. Bone mineralization is at least partially
343 regulated by Ca availability [43]. Since the percentage of both P and Mg in bone are
344 significantly influenced by the dietary Ca level [43], we investigated whether changes
345 in absorption could lead to changes in bone accumulation of these minerals.

346 Although the ES L and ES S groups had significantly lower Ca absorption, whereas
347 the ES M and ES L groups had higher P and Mg absorption than the CaCO₃ group,
348 bone mineral content, weight and mechanical properties were not changed.

349 Ca deficiency clearly impaired bone mass, morphology, and biomechanical
350 properties in growing rats, but a previous study has shown that these parameters
351 were stabilized with Ca intakes of 250mg% through diet and were not further
352 improved with additional dietary Ca [44]. Another study evaluated eggshell as Ca
353 source at 1% in SAMR1 mice, finding similar bone weight, mineral content and
354 mechanical properties compared to CaCO₃ group [10].

355 We can identify as limitations of this study the method used to determine Ca
356 absorption, which did not take into account the endogenous excretion of Ca into the
357 feces and possible feces contamination with urinary Ca in same samples. Besides,
358 bone assays could be more sensitive to differences in absorption if Ca dietary levels
359 were low, which was not evaluated in this study.

360 This study shows that eggshell Ca is well absorbed by intestine and retained in
361 bones of growing rats. Although Ca absorption was reduced both in ES L and ES S
362 groups, whereas P and Mg absorption were increased with the increase in the
363 eggshell particle size, no changes were observed in the bone mineral deposition,
364 weight or mechanical resistance.

365

366 **Acknowledgment**

367

368 This work was supported by fellowship from Co-ordination for the Improvement of
369 Higher Education Staff (CAPES) and had financial support from Research Incentive
370 Fund of Federal University of Santa Maria (FIPE/UFSM), National Council for

371 Scientific and Technological Development (CNPq) (552440/2011-6) and Call
372 CAPES 13/2008 - Pró-Equipamentos Institucional.

373

374 **References**

375

- 376 [1] Awumey EM, Bukoski RD. Cellular functions and fluxes of calcium. In: Weaver
377 CM, Heaney RP, editors. Calcium Human Health. Totowa: Humana Press;
378 2006, p. 13–35.
- 379 [2] Looker AC. Dietary calcium: Recommendations and intakes around the world.
380 In: Weaver CM, Heaney RP, editors. Calcium Human Health. Totowa: Humana
381 Press; 2006, p. 105–27.
- 382 [3] Heaney RP, Barger-Lux MJ. Low calcium intake: The culprit in many chronic
383 diseases. *J Dairy Sci* 1994;77:1155–60.
- 384 [4] Schulze KJ. Calcium. In: Caballero B, Allen L, Prentice A, editors.
385 Encyclopedia of Human Nutrition. 3rd Ed. Amsterdam: Elsevier; 2013, p. 228–
386 34.
- 387 [5] Pereira GAP, Genaro PS, Pinheiro MM, Szejnfeld VL, Martini LA. Dietary
388 calcium - strategies to optimize intake. *Rev Bras Reumatol* 2009;49:164–71.
- 389 [6] Fox AT, Thomson M. Adverse reactions to cows' milk. *Paediatr Child Health*
390 (Oxford) 2007;17:288–94.
- 391 [7] Schaafsma A, Beelen GM. Eggshell powder, a comparable or better source of
392 calcium than purified calcium carbonate: piglet studies. *J Sci Food Agric*
393 1999;79:1596–600.
- 394 [8] Ascar JM, De Bortoli MA, Salinas E. Cáscara de huevo como suplemento
395 cálcico en la alimentación humana. *La Aliment Latinoam* 1993;197:61–4.
- 396 [9] Brun LR, Lupo M, Delorenzi DA, Di Loreto VE, Rigalli A. Chicken eggshell as
397 suitable calcium source at home. *Int J Food Sci Nutr* 2013;64:740–3.
- 398 [10] Maehira F, Miyagi I, Eguchi Y. Effects of calcium sources and soluble silicate
399 on bone metabolism and the related gene expression in mice. *Nutrition*
400 2009;25:581–9.
- 401 [11] Hirasawa T, Omi N, Ezawa I. Effect of 1 α -hydroxyvitamin D₃ and egg-shell
402 calcium on bone metabolism in ovariectomized osteoporotic model rats. *J Bone*
403 *Miner Metab* 2001;19:84–8.

- 404 [12] Schaafsma A, Pakan I. Short-term effects of a chicken egg shell powder
405 enriched dairy-based products on bone mineral density in persons with
406 osteoporosis or osteopenia. *Bratisl Lek Listy* 1999;100:651–6.
- 407 [13] Schaafsma A, van Doormaal JJ, Muskiet F a. J, Hofstede GJH, Pakan I, van
408 der Veer E. Positive effects of a chicken eggshell powder-enriched vitamin–
409 mineral supplement on femoral neck bone mineral density in healthy late post-
410 menopausal Dutch women. *Br J Nutr* 2002;87:267–75.
- 411 [14] Oliveira DA, Benelli P, Amante ER. A literature review on adding value to solid
412 residues: egg shells. *J Clean Prod* 2013;46:42–7.
- 413 [15] Rovenský J, Stancíková M, Masaryk P, Svík K, Istok R. Eggshell calcium in the
414 prevention and treatment of osteoporosis. *Int J Clin Pharmacol Res*
415 2003;23:83–92.
- 416 [16] Callegaro MGK, Dietrich T, Alves E, Milbradt BG, Denardin CC, Silva LP, et al.
417 Supplementation with fiber-rich multimixtures yields a higher dietary
418 concentration and apparent absorption of minerals in rats. *Nutr Res*
419 2010;30:615–25.
- 420 [17] Daengprok W, Garnjanagoonchorn W, Mine Y. Fermented pork sausage
421 fortified with commercial or hen eggshell calcium lactate. *Meat Sci*
422 2002;62:199–204.
- 423 [18] Salem IS, Ammar ASM, Habiba RA. Effect of eggshell powder addition as a
424 source of calcium fortification on butter cake quality. *J Agric Vet Sci*
425 2012;5:109–18.
- 426 [19] Naves MMV, Fernandes DC, Prado CMM, Teixeira LSM. Food fortification with
427 egg shell powder as a calcium source. *Food Sci Technol* 2007;27:99–103.
- 428 [20] Masuda Y, Hiramatsu H. Bioavailability and physiological function of eggshells
429 and eggshell membranes. In: Mine Y, editor. *Egg Bioscience and*
430 *Biotechnology*. New Jersey: Wiley; 2008, p. 129–40.
- 431 [21] Schaafsma A, Pakan I, Hofstede GJH, Muskiet FA, Van Der Veer E, De Vries
432 PJF. Mineral, amino acid, and hormonal composition of chicken eggshell
433 powder and the evaluation of its use in human nutrition. *Poult Sci*
434 2000;79:1833–8.
- 435 [22] Guru PS, Dash S. Sorption on Eggshell Waste—A review on ultrastructure,
436 biomineralization and other applications. *Adv Colloid Interface Sci* 2014; in
437 press.
- 438 [23] Shahnazari M, Martin BR, Legette LL, Lachcik PJ, Welch J, Weaver CM. Diet
439 calcium level but not calcium supplement particle size affects bone density and
440 mechanical properties in ovariectomized rats. *J Nutr* 2009;139:1308–15.

- 441 [24] Elble AE, Hill KM, Park CY, Martin BR, Peacock M, Weaver CM. Effect of
442 calcium carbonate particle size on calcium absorption and retention in
443 adolescent girls. *J Am Coll Nutr* 2011;30:171–7.
- 444 [25] Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, Looker A, Marcus R, Matkovic V,
445 et al. Peak bone mass. *Osteoporos Int* 2000;11:985–1009.
- 446 [26] Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A
447 diet. *Exp Biol* 1997;127:838–41.
- 448 [27] AOAC. Official methods of analysis of the Association of the Official Analytical
449 Chemists. Arlington, VA: 1995.
- 450 [28] Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diretriz brasileira
451 de prática para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e de
452 ensino. Brasil: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação; 2013.
- 453 [29] Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ. Análise de
454 solo, plantas e outros materiais. (Boletim nº 5), 2ª ed. Porto Alegre, Brasil,
455 Departamento de Solos: 1995.
- 456 [30] Quinlan KP, Sesa MA. Spectrophotometric determination of phosphorus as
457 molybdovanadophosphoric acid. *Anal Chem* 1955;27:1626–9.
- 458 [31] Callegaro MGK, Milbradt BG, Alves E, Diettrich T, Kemerich DM, Hausen BS,
459 et al. Effect of wheat bran and flaxseed on cadmium effects and retention in
460 rats. *Hum Exp Toxicol* 2011;30:981–91.
- 461 [32] Toba Y, Takada Y, Tanaka M, Aoe S. Comparison of the effects of milk
462 components and calcium source on calcium bioavailability in growing male rats.
463 *Nutr Res* 1999;19:449–59.
- 464 [33] Mora-Gutierrez A, Farrell HM, Attaie R, McWhinney VJ, Wang C. Effects of
465 bovine and caprine Monterey Jack cheeses fortified with milk calcium on bone
466 mineralization in rats. *Int Dairy J* 2007;17:255–67.
- 467 [34] Civitelli R, Ziambaras K, Leelawattana R. Pathophysiology of calcium,
468 phosphate, and magnesium absorption. In: Louis V. Avioli SMK, editor.
469 *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*, California: Academic
470 Press; 1997, p. 165–205.
- 471 [35] Emkey RD, Emkey GR. Calcium metabolism and correcting calcium
472 deficiencies. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012;41:527–56.
- 473 [36] Cozzolino SMF. Mineral Bioavailability. *Brazilian J Nutr* 1997;10:87–98.
- 474 [37] Bronner F. Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J Nutr*
475 1987;117:1347–52.

- 476 [38] Bronner F, Pansu D. Nutritional aspects of calcium absorption. *J Nutr*
477 1999;129:9–12.
- 478 [39] Weaver CM, Heaney RP. Food sources, supplements, and bioavailability. In:
479 Weaver CM, Heaney RP, editors. *Calcium Hum. Heal.*, Tatowa: Humana
480 Press; 2006, p. 129–42.
- 481 [40] Prentice A. Diet, nutrition and the prevention of osteoporosis. *Public Health*
482 *Nutr* 2004;7:227–43.
- 483 [41] Rude RK, Gruber HE. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and
484 human observations. *J Nutr Biochem* 2004;15:710–6.
- 485 [42] Daengprok W, Garnjanagoonchorn W, Onanong N, Pornsinlpatip P, Issigonis
486 K, Oshinori M. Chicken eggshell matrix proteins enhance calcium transport in
487 the human intestinal epithelial cells, Caco-2. *J Agric Food Chem*
488 2003;51:6056–61.
- 489 [43] Garcia-Lopez S, Miller GD. Bioavailability of calcium from four different
490 sources. *Nutr Res* 1991;11:1187–96.
- 491 [44] Hunt JR, Hunt CD, Zito CA, Idso JP, Johnson LK. Calcium requirements of
492 growing rats based on bone mass, structure, or biomechanical strength are
493 similar. *J Nutr* 2008;138:1462–8.
- 494

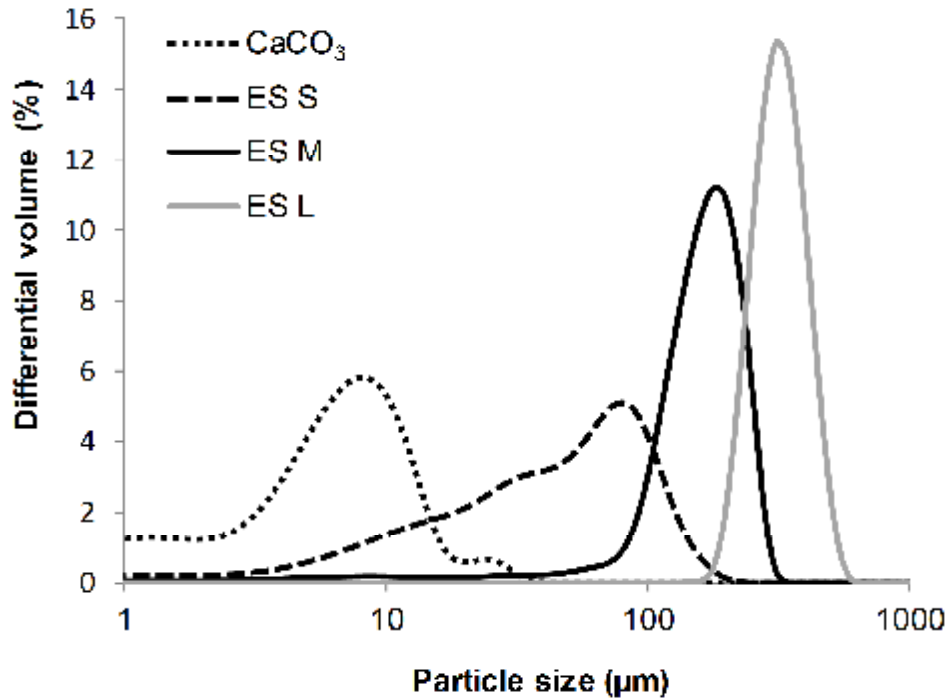


Figure 1 - Particle size of eggshells and CaCO₃ determined by a multi-wave length laser diffraction particle size analyzer.

Abbreviation: ES S: small-sized particle eggshell fraction; ES M: intermediate-sized particle eggshell fraction; ES L: large-sized particle eggshell fraction.

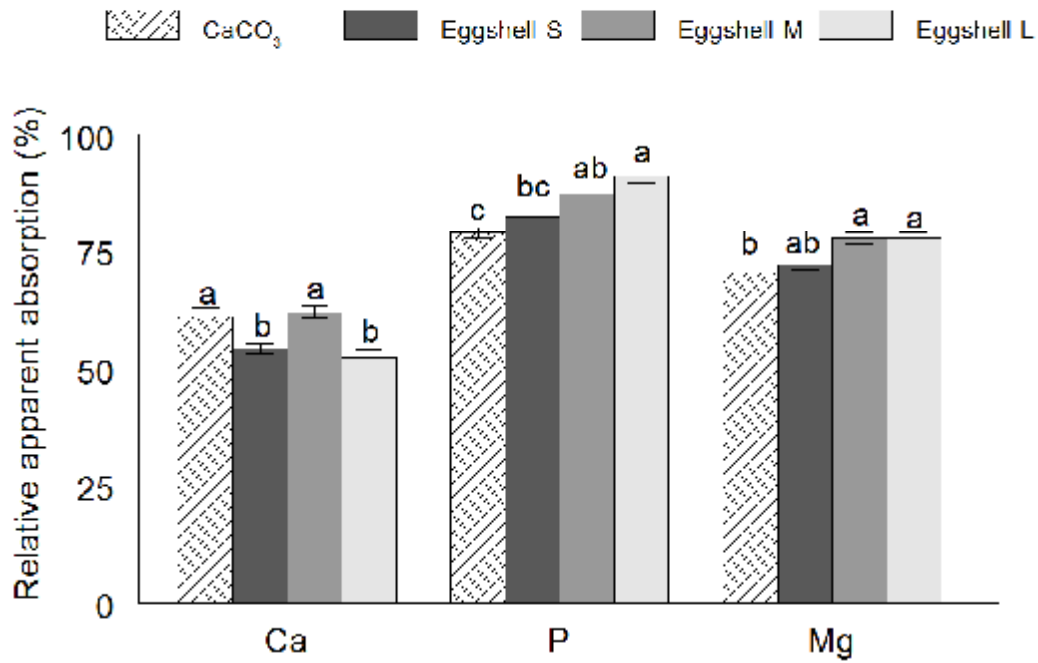


Figure 2 - Relative apparent absorption of Ca, P and Mg in rats fed with eggshell fractions containing different particle size as Ca source compared to CaCO₃. The results are expressed as means \pm SEM (n=8 for all groups, except for ES L that had n=7). Bars that have no common superscript letter within the metal are different (Tukey's test; $p < 0.05$). ES S: small-sized particle eggshell fraction; ES M: intermediate-sized particle eggshell fraction; ES L: large-sized particle eggshell fraction.

Table 1 - Ingredients and proximate composition of diets fed to growing rats.

	CaCO ₃	ES S	ES M	ES L
Ingredients (%)				
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0
Cornstarch	53.0	53.0	53.0	53.0
Sucrose	10.0	10.0	10.0	10.0
Soybean oil	7.0	7.0	7.0	7.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0
BHT ^a	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
Vit-mix ^b	1.0	1.0	1.0	1.0
L-Cystine	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25
Ca free Min-mix ^c	2.25	2.25	2.25	2.25
CaCO ₃	1.25			
ES S		1.32		
ES M			1.29	
ES L				1.26
Composition ^d				
Energy (kJ/100g)	1,559	1,555	1,557	1,561
Moisture (%)	8.8	8.8	8.9	8.6
Crude ash (%)	2.7	2.9	2.7	2.8
Crude fat (%)	7.7	7.7	7.7	7.4
Crude protein (%)	18.4	18.4	18.4	18.2
Total dietary fiber (%)	4.8	4.8	4.8	4.4
NFE fraction ^e (%)	57.6	57.4	57.5	58.6
Ca (mg/100g)	545.1	545.5	539.4	544.0
P (mg/100g)	324.2	334.3	335.6	325.3
Mg (mg/100g)	49.7	52.2	52.6	52.1

^a BHT (tertiary butyl hydroquinone)

^b AIN-93 vitamin mixture

^c Calcium free AIN-93 mineral mixture

^d Diet composition is shown as g/100g except for minerals, shown as mg/100g

^e NEF (nitrogen-free extract)

Abbreviation: ES S: small-sized particle eggshell fraction; ES M: intermediate-sized particle eggshell fraction; ES L: large-sized particle eggshell fraction.

Table 2 - Body weight gain, feed intake and feed efficiency ratio of rats fed with eggshell fractions containing different particle size as the Ca source compared to CaCO₃.^a

Parameters	Diets			
	CaCO ₃	ES S	ES M	ES L
Feed intake (g/day)	18.17 ± 0.39	18.36 ± 0.45	18.35 ± 0.32	17.66 ± 0.62
Body weight gain (g/day)	6.68 ± 0.18	6.71 ± 0.08	6.70 ± 0.30	6.46 ± 0.20
Feed efficiency ratio ^b	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.01

^aMale growing Wistar rats were fed diets containing different Ca sources for 28 days. Feed intake was measured daily and body weight was recorded every 5 days. The results are expressed as means ± SEM (n=8 for all groups, except for eggshell L that had n=7). No significant effect of diet was observed on the evaluated parameters (ANOVA, p>0.05).

^b g body weight gain/ g feed intake

Abbreviation: ES S: small-sized particle eggshell fraction; ES M: intermediate-sized particle eggshell fraction; ES L: large-sized particle eggshell fraction.

Table 3 – Ingestion and excretion of Ca, P and Mg in rats fed with eggshell fractions containing different particle size as Ca source compared to CaCO₃.^a

Parameters	Diets			
	CaCO ₃	ES S	ES M	ES L
Ca				
Ingestion (mg/day)	122.1 ± 3.2	126.9 ± 3.1	128.6 ± 3.0	120.2 ± 4.8
Fecal excretion (mg/day)	47.6 ± 2.6 ^c	58.1 ± 1.8 ^a	48.9 ± 2.2 ^{bc}	57.1 ± 2.4 ^{ab}
P				
Ingestion (mg/day)	72.6 ± 1.9	77.8 ± 1.8	80.0 ± 1.8	71.9 ± 2.8
Fecal excretion (mg/day)	15.3 ± 1.3 ^a	13.5 ± 0.9 ^{ab}	10.0 ± 0.8 ^{bc}	6.5 ± 1.2 ^c
Mg				
Ingestion (mg/day)	11.1 ± 0.3 ^b	12.1 ± 0.3 ^{ab}	12.5 ± 0.3 ^a	11.5 ± 0.5 ^{ab}
Fecal excretion (mg/day)	3.3 ± 0.3 ^a	3.4 ± 0.1 ^a	2.8 ± 0.1 ^{ab}	2.5 ± 0.1 ^b

^aData were obtained from diet intake and feces production from day 15 to 25 of the experiment with male growing Wistar rats that were fed diets containing different Ca sources for 28 days. The results are expressed as means ± SEM (n=8 for all groups, except for ES L that had n=7). Means that have no common superscript letter within the same line are different (Tukey's test; p<0.05).

Abbreviation: ES S: small-sized particle eggshell fraction; ES M: intermediate-sized particle eggshell fraction; ES L: large-sized particle eggshell fraction.

Table 4 - Weight, mineral content and biomechanical properties of tibias from rats fed with eggshell fractions containing different particle size as Ca source compared to CaCO_3 .^a

Parameters	Diets			
	CaCO_3	ES S	ES M	ES L
Tibia dry weight (g)	0.215 ± 0.004	0.214 ± 0.007	0.212 ± 0.002	0.203 ± 0.007
<i>Mineral content</i>				
Ca (% dry weight)	27.25 ± 0.29	26.94 ± 0.33	27.05 ± 0.29	26.65 ± 0.27
P (% dry weight)	11.07 ± 0.14	11.05 ± 0.14	10.96 ± 0.38	10.99 ± 0.42
Mg (% dry weight)	0.55 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.54 ± 0.01
<i>Biomechanical properties</i>				
Yield point (N)	33.4 ± 1.9	35.0 ± 1.5	32.4 ± 1.6	32.2 ± 1.6
Ultimate load (N)	42.6 ± 1.6	42.4 ± 1.3	40.2 ± 1.4	39.1 ± 1.8
Displacement at ultimate load (mm)	0.75 ± 0.04	0.86 ± 0.05	0.75 ± 0.04	0.84 ± 0.06
Stiffness (N/mm)	75.7 ± 2.1	71.8 ± 4.0	74.4 ± 1.6	67.9 ± 3.1

^aMale growing Wistar rats were fed diets containing different Ca sources for 28 days.

Left tibias were dried, weighed and submitted to mineral assays; right tibias were dissected and wrapped in saline-soaked gauze just before the mechanical tests in Texture analyzer (TA.XT plus). The results are expressed as means ± SEM (n=8 for all groups, except for eggshell L that had n=7). No significant effect of diet was observed on the parameters evaluated (ANOVA; $p > 0.05$).

Abbreviation: ES S: small-sized particle eggshell fraction; ES M: intermediate-sized particle eggshell fraction; ES L: large-sized particle eggshell fraction.

5 DISCUSSÃO

A fortificação de alimentos de consumo usual pela população e o uso de suplementos estão entre as linhas de ação recomendadas na prevenção e tratamento de problemas ósseos associados à baixa ingestão de Ca (PEREIRA et al., 2009). Diversos sais de Ca são disponíveis para esta finalidade, sendo o CaCO_3 o mais frequentemente utilizado por ser de baixo custo e possuir elevado teor de Ca no sal (WHITING; PLUHATOR, 1992; STRAUB, 2007). Embora pouco solúvel, já foi demonstrado que o CaCO_3 possui biodisponibilidade de Ca comparável à outras fontes solúveis deste mineral, como sais de citrato, malato e fumarato (WEAVER et al., 2002). Atualmente existe intensa busca por fontes naturais, puras e renováveis de CaCO_3 (MURAKAMI et al., 2007).

Neste contexto, a casca de ovo, contendo basicamente CaCO_3 , destaca-se como fonte de Ca tanto para uso em escala doméstica quanto para o processamento e distribuição em escala industrial (OLIVEIRA; BENELLI; AMANTE, 2013; BRUN et al., 2013). Considerando que a maioria dos estudos avaliando sua composição mineral restringem-se em determinar os níveis de Ca, neste estudo pesquisamos além deste mineral, as concentrações de Mg, Sr, Fe, Cr, Mn, Mo, Ni, Se, Al, Cd e Pb em cascas de ovo de diferentes origens, verificando também a influência do sistema de criação das poedeiras e coloração das cascas na composição desses minerais.

No presente estudo, a concentração de Ca foi constante e atingiu 37% do pó de casca de ovo, sendo que apenas 2,7 g do pó seriam suficientes para fornecer 100% ingestão diária recomendada de Ca para adultos (BRASIL, 2003). Com relação ao Mg, observou-se que as cascas de ovo de granja apresentaram maior concentração do que as dos ovos coloniais. No entanto, apesar do Mg ser o segundo mineral mais abundante nas cascas de ovo, a quantidade fornecida não chega a ser expressiva, considerando o consumo das cascas para atender as recomendações de Ca. Quanto ao Sr, encontrou-se maior concentração deste mineral nas cascas de ovo de granja, comparadas às coloniais. Sugere-se que esse resultado seja explicado pelo balanço mais adequado de Ca:P na dieta das poedeiras de granja em comparação às coloniais. Como o Sr é um mineral com elevada afinidade pelo P, os teores adequados de P na alimentação das poedeiras de granja ocasionaram maior depósito de Sr nas cascas. Mesmo considerando as maiores concentrações de Sr

encontradas nas amostras analisadas neste estudo, a ingestão deste mineral ainda será baixa (cerca de 1,6 mg/dia) se as cascas de ovo forem consumidas para atender as necessidades de Ca. O Sr é associado a efeitos ósseos positivos (BOYD; SZABO; AMMANN, 2011), no entanto, doses baixas como as encontradas na casca de ovo podem ter efeito benéfico à saúde óssea somente a longo prazo (SCHAAFSMA et al., 2000). Considerando este fato, seria pertinente controlar os níveis de Sr na dieta das poedeiras para que as cascas usadas como suplemento por humanos apresentassem maior teor deste mineral e efeito benéfico adicional.

Adicionalmente, não foi detectada contaminação por Cd e Pb nas amostras de casca de ovo analisadas provenientes da região central do Rio Grande do Sul. Os metais tóxicos, incluindo o Cd e Pb, são contaminantes ambientais que despertam grande preocupação em relação a exposição crônica, pois possuem meia vida longa em humanos (20 a 30 anos). Assim, mesmo a exposição a doses baixas causar prejuízos à saúde a longo prazo. A exposição crônica ao Pb está associado principalmente à disfunções renais e hematológicas (ATSDR, 2007). O Cd também causa danos renais, além de afetar o fígado, o sistema circulatório e os ossos (EMANUELLI et al., 2014). A via primária de exposição a metais tóxicos para a população em geral são os alimentos, e existe grande preocupação com a contaminação de fontes naturais de Ca por esses metais (KIM, 2004). Neste estudo, foi importante demonstrar que a casca de ovo pode ser uma fonte de Ca livre de contaminação por Cd e Pb, no entanto, este é um aspecto a ser investigado constantemente já que a ocorrência desses metais nas cascas irá depender da contaminação da dieta das poedeiras.

Pode-se notar que a qualidade da casca de ovo do ponto de vista de sua composição mineral não foi afetada pela coloração dos ovos e/ou pelo sistema de criação das poedeiras considerando os níveis constantes de Ca, níveis variáveis, mas pouco significativos de Mg e teores não detectáveis de Cd e Pb. Com relação ao Sr, poderia ser observado um aumento da qualidade das cascas controlando seus níveis na dieta das poedeiras, conforme discutido anteriormente, já que o teor de Sr depositado na casca de ovo é diretamente relacionado à sua ingestão (SCHAAFSMA et al., 2000).

Neste estudo não se determinou P nas diferentes cascas de ovo, mas de acordo com estudos prévios, sabe-se que sua concentração varia entre 0,6 a 2 mg/g (SCHAAFSMA et al., 2000). Apesar da concentrações pouco expressivas de P e Mg

nas cascas de ovo, no ensaio biológico com ratos observou-se que os grupos de animais que receberam casca de ovo de granulometria média e grossa tiveram absorção significativamente aumentada destes elementos comparados aos animais do grupo CaCO_3 . Sugere-se que esse achado possa ser em decorrência de proteínas presentes na casca de ovo que possam ter modificado sua absorção intestinal. Daengprok et al. (2003) detectou um aumento expressivo no transporte de Ca por células Caco-2 em presença de uma proteína de 21kDa isolada da fração proteica solúvel da casca de ovo. No entanto, o efeito de substâncias orgânicas da casca sobre a absorção de outros minerais essenciais ainda não foi estudada e consiste em um tema a ser elucidado.

A casca de ovo não deve ser considerada apenas uma simples fonte de CaCO_3 , tendo em vista que existem diversas evidências sugerindo efeito biológico superior em comparação com CaCO_3 purificado. Schaafsma et al. (2002), observaram resultados mais favoráveis na densidade óssea e parâmetros bioquímicos do metabolismo ósseo em mulheres recebendo Ca através da casca de ovo comparados ao grupo que recebeu CaCO_3 , em estudo duplo-cego de 12 meses. Camundongos SAMR1 que receberam casca de ovo como fonte de Ca por 6 meses apresentaram menor expressão de genes associados à diferenciação dos osteoclastos e maior expressão de genes relacionados com a osteoblastogênese comparado ao grupo que recebeu CaCO_3 purificado. Elias (2010) também observou em um ensaio *ex vivo* que polipeptídeos extraídos da casca de ovo estimulam a proliferação de osteoblastos. No entanto, os estudos *in vivo* supracitados não indicam a granulometria da casca de ovo utilizada.

Ao incentivar a aplicação de uma fonte não usual de Ca precisamos garantir que sua biodisponibilidade seja adequada. Vários fatores influenciam na biodisponibilidade mineral, dentre eles fatores relacionados à fonte de Ca como a desintegração, solubilidade e a matriz alimentar onde o mineral está contido (COZZOLINO, 1997). A trituração da casca de ovo é um fator importante no seu processamento e a influência da granulometria na biodisponibilidade do Ca deste produto foi investigada pela primeira vez neste estudo. Com o objetivo de avaliar a casca de ovo como fonte de Ca, excluímos as membranas proteicas durante o preparo do pó utilizado no ensaio biológico. No entanto, como as cascas também possuem proteínas entrelaçadas à matriz mineral, os pós obtidos ainda

apresentaram teores entre 1,72 e 2,21% de proteína em sua composição (dados não mostrados).

Apesar de ter sido observada menor absorção de Ca nos animais que receberam pó de casca de ovo de granulometrias grossa e fina em comparação aos que receberam CaCO_3 , deve-se ressaltar que todos os grupos apresentaram absorção elevada de Ca, superior a 50%. A partir destes resultados, levantou-se a hipótese de que o método utilizado para obter os pós de diferentes granulometrias pode ter separado de forma diferencial as camadas da casca de ovo, de modo que proteínas interligadas aos cristais de CaCO_3 na casca de granulometria fina tenha dificultado a dispersão de parte dos cristais nesse grupo.

Diferenças encontradas na biodisponibilidade de Ca da casca de ovo neste estudo e em outros estudos citados podem ser explicadas parcialmente por diferenças no processo de obtenção da casca de ovo utilizada no ensaio, como: inclusão das membranas protéicas, temperatura e processo de secagem desta fonte de Ca. É importante identificar e conhecer a estabilidade de substâncias orgânicas presentes na casca de ovo que podem estar modulando a absorção de minerais. Conhecendo esses aspectos, o processo de obtenção de casca de ovo para consumo humano poderia ser otimizado para não separar ou mesmo destruir estas substâncias durante o processo.

Em função do que foi observado neste estudo, sugere-se que cascas de ovo preparadas em escala industrial sejam trituradas até uma granulometria média igual ou inferior a 172 μm . Desta forma, o Ca seria absorvido ao máximo, suprimindo a dificuldade de dissolução observada neste estudo para os animais que receberam pó de granulometria grossa (333 μm).

No presente ensaio biológico, observou-se que os parâmetros ósseos, os quais representam a biodisponibilidade mineral, foram semelhantes para os grupos de diferentes granulometrias de casca de ovo, e também ao grupo CaCO_3 . No entanto, isto ocorreu quando o teor de Ca estava adequado nas dietas. Não se pode descartar que, em condições nas quais os níveis de Ca na dieta sejam insuficientes para atender as exigências nutricionais, o efeito da granulometria do pó na absorção de Ca resulte em diferenças detectáveis na formação óssea.

Se considerarmos que o preparo da casca de ovo será a nível doméstico, é recomendado separar as partículas mais grosseiras através de peneira fina ou pano, para triturá-las e posteriormente integrá-las ao pó final. Neste estudo não se avaliou

o tamanho de partículas de casca de ovo obtidas em domicílio, mas, de acordo com Brun et al. (2013), cascas trituradas com rolo de massa e posteriormente peneiradas tiveram tamanho de partícula de $450 \pm 250 \mu\text{m}$. O tamanho de partícula obtido no preparo doméstico pode ser um empecilho para uma máxima absorção do Ca da casca de ovo, mas ainda assim, uma boa parcela do Ca estará disponível para as funções biológicas. Do ponto de vista da qualidade higiênico-sanitária da casca de ovo, uma simples etapa de fervura por 10 minutos e posterior secagem seriam suficientes para tornar o produto seguro. Neste estudo, a secagem das cascas foi realizada em estufa a 50°C por 24h. No entanto, um tempo inferior de secagem já seria suficiente, como observa Naves et al. (2007a) com secagem à estufa por 1,5 horas ou mesmo secagem das cascas ao sol. Entretanto é importante que a secagem se dê em condições adequadas para que não ocorra recontaminação durante esta etapa.

6 CONCLUSÃO

- O teor de Ca foi constante nos diferentes tipos de casca de ovo analisadas. Contudo, cascas de ovo coloniais apresentaram maiores concentrações de Mg e menores concentrações de Sr em comparação à cascas de ovo de granja, tanto brancas quanto vermelhas;
- As cascas de ovo provenientes da região central do Rio Grande do Sul, independente da coloração e do sistema de criação das poedeiras não apresentaram contaminação por Pb e Cd em níveis detectáveis;
- A higienização das cascas de ovo através da submersão ou não em hipoclorito de sódio seguida de fervura foram igualmente eficientes para garantir a qualidade higiênica sanitária das cascas de ovo;
- O Ca da casca de ovo foi eficientemente absorvido por ratos Wistar em crescimento. No entanto, os grupos que receberam a casca de ovo em granulometria fina e grossa apresentaram absorção inferior deste mineral se comparadas ao grupo de granulometria média e grupo carbonato de cálcio;
- A casca de ovo provocou aumento da absorção intestinal de P e Mg;
- Usados em quantidade adequada para suprir as recomendações de cálcio dos ratos em crescimento, os pós de diferentes granulometrias proporcionaram formação óssea adequada, tendo como referência o CaCO_3 purificado, recomendado como fonte de cálcio padrão para estes animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, M. C. et al. Consumo de macronutrientes e ingestão inadequada de micronutrientes em adultos. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. S1, p. 177S-189S, 2013.

ASCAR, J. M.; BORTOLI, M. A.; SALINAS, E. Cáscara de huevo como suplemento cálcico en la alimentación humana. **La Alimentación Latinoamericana**, v. 197, p. 61-64, 1993.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Lead**. US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, 2007.

AWUMEY, E. M.; BUKOSKI, R. D. Cellular functions and fluxes of calcium. In: C. M. Weaver; R. P. Heaney (Eds.). **Calcium in Human Health**. Totowa: Humana Press, 2006. cap. 3, p.13-35.

BORON, L. **Citrato de cálcio da casca do ovo: biodisponibilidade e uso como suplemento alimentar**, 2004. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

BORON, L. et al. Avaliação da viabilidade do uso de citrato de cálcio obtido da casca do ovo como suplemento alimentar em iogurtes enriquecidos com cálcio. **Revista do Instituto de Laticíneos “Cândido Tostes”**, v. 350, n. 61, p. 3-10, 2006.

BOYD, S. K.; SZABO, E.; AMMANN, P. Increased bone strength is associated with improved bone microarchitecture in intact female rats treated with strontium ranelate: a finite element analysis study. **Bone**, v. 48, n. 5, p. 1109-1116, 2011.

BRASIL. Resolução n. 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: <http://websphere.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c2998004bc50d62a671ffbc0f9d5b29/RDC_N_360_DE_23_DE_DEZEMBRO_DE_2003.pdf?MOD=AJPERES.> Acesso: 8 maio 2014.

BRONNER, F. Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. **The Journal of Nutrition**, v. 117, n. 8, p. 1347-1352, 1987.

BRONNER, F.; PANSU, D. Nutritional aspects of calcium absorption. **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 9-12, 1999.

BRUN, L. R. et al. Chicken eggshell as suitable calcium source at home. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. 6, p. 740-743, 2013.

CALLEGARO, M. G. K. et al. Supplementation with fiber-rich multimixtures yields a higher dietary concentration and apparent absorption of minerals in rats. **Nutrition Research**, v. 30, n. 9, p. 615-625, 2010.

CÁMARA-MARTOS, F.; AMARO-LÓPEZ, A. Influence of dietary factors on calcium bioavailability. **Biological trace element research**, v. 89, p. 43-52, 2002.

COMINETTI, C.; JÚNIOR, A. B. G.; COZZOLINO, S. M. F. In: S. M. F. Cozzolino (Ed.). **Micronutrientes e cirurgia bariátrica**. 3. ed. Barueri: Manole, 2009. cap. 46, p. 842-867.

CASHMAN, K. Prebiotics and calcium bioavailability. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 4, p. 21-32, 2003.

CORDEIRO, C. M. M.; HINCKE, M. T. Recent patents on eggshell: shell and membrane applications. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2011.

COZZOLINO, S. M. F. Mineral Bioavailability. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 10, n. 2, p. 87-98, 1997.

DAENGPOROK, W.; GARNJANAGOONCHORN, W.; MINE, Y. Fermented pork sausage fortified with commercial or hen eggshell calcium lactate. **Meat Science**, v. 62, n. 2, p. 199-204, 2002.

DAENGPOROK, W. et al. Chicken eggshell matrix proteins enhance calcium transport in the human intestinal epithelial cells, Caco-2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 20, p. 6056-6061, 2003.

DAI, W. et al. Calcium deficiency-induced and TRP channel-regulated IGF1R-PI3K-Akt signaling regulates abnormal epithelial cell proliferation. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, p. 568-581, 2014.

DUTRA, L. O. et al. Avaliação sensorial de macarrão enriquecido com cálcio por adição de pó de casca de ovo. Anais da 28ª Jornada Acadêmica Integrada, Universidade Federal de Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2013. Disponível em: <http://portal.ufsm.br/jai/trabalho/anais.html>. Acesso em: 08 maio 2014.

ELBLE A. E. et al. Effect of calcium carbonate particle size on calcium absorption and retention in adolescent girls. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 30, n. 3, p. 171-177, 2011.

ELIAS, I. (DE/Estados Unidos). 2010. **Methods of use eggshell polypeptides**. US n. PCT/US2009/050253, 10 jul. 2009: 14 jan. 2010.

EMANUELLI, T. et al. Wheat bran and cadmium in human health. In: R. R. Watson; V. Preedy; S. Zibadi (Eds.). **Wheat and Rice in Disease Prevention and Health**. London: Elsevier, 2014. cap 19, p. 241-260.

ESTADOS UNIDOS. Institute of Medicine. **Dietary reference intakes (DRIs): Recommended intakes for individuals, Elements**. Washington: National Academies Press, 2005.

EUNICE, C. Y.; LI-CHAN; KIM, H.-O. Structure and chemical composition of eggs. In: Y. Mine (Ed.). **Egg bioscience and biotechnology**. New Jersey: Wiley, 2008. cap. 1, p.1-96.

FOX, A. T.; THOMSON, M. Adverse reactions to cows' milk. **Paediatrics and Child Health**, v. 17, n. 7, p. 288-294, 2007.

GALLAGHER, M.L. Os nutrientes e seu metabolismo. In: K. Mahan; S. Escott-Stump. **Krause, Alimentos, nutrição e dietoterapia**; [tradução PEREIRA, N. R. et al.] Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap 3, p 39-143.

GARCIA-LOPEZ, S.; MILLER, G. D. Bioavailability of calcium from four different sources. **Nutrition Research**, v. 11, n. 10, p. 1187-1196, 1991.

GUILHERME, F. C. C.; COZZOLINO, S. M. F. In: S. M. F. Cozzolino (Ed.). **Nutrientes e osteoporose**. 3. ed. Barueri: Manole, 2009. cap. 46, p.1024-1048.

GURU, P. S.; DASH, S. Sorption on Eggshell Waste—A review on ultrastructure, biomineralization and other applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. in press, 2014.

HEANEY R. P. et al. Peak bone mass. **Osteoporosis International**, v. 11, n. 12, p. 985-1009, 2000.

HEANEY, R. P. Bone as the calcium nutrient reserve. In: C. M. Weaver; R. P. Heaney (Eds.). **Calcium in Human Health**. Totowa: Humana Press, 2006a. cap 2, p.7-12.

HEANEY, R. P. Calcium in systemic human health. In: C. M. Weaver; R. P. Heaney (Eds.). **Calcium in Human Health**. Totowa: Humana Press. 2006b. cap. 19, p. 313-325.

HELBIG, E.; BUCHWEITZ, M. R. D.; GIGANTE, D. P. Análise dos teores de ácidos cianídrico e fítico em suplemento alimentar: multimistura. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 323-328, 2008.

HINCKE, M. T. et al. The eggshell: structure, composition and mineralization. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, p. 1266-1280, 2012.

HIRASAWA, T.; OMI, N.; EZAWA, I. Effect of 1 α -hydroxyvitamin D₃ and egg-shell calcium on bone metabolism in ovariectomized osteoporotic model rats. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 19, n. 2, p. 84-88, 2001.

HUNT J. R. et al. Calcium requirements of growing rats based on bone mass, structure, or biomechanical strength are similar. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 8, p. 1462-1468, 2008.

JONG E. V. et al. Fontes distintas de Ca na dieta: efeito na deposição de mineral e na força de quebra do osso. **Terra e Cultura**, n. 30, p. 3-13, 1999.

KIM, M. Mercury, cadmium and arsenic contents of calcium dietary supplements. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 8, p. 763-767, 2004.

KING'ORI, A. M. A Review of the Uses of Poultry Eggshells and Shell Membranes. **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 11, p. 908–912, 2011.

KÜÇÜKYILMAZ, K. et al. Effect of an organic and conventional rearing system on the mineral content of hen eggs. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 989-992, 2012.

LIN, S. et al. Optimized extraction of calcium malate from eggshell treated by PEF and an absorption assessment in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 5, p. 1327-1333, 2012.

LOOKER, A. C. Dietary calcium: Recommendations and intakes around the world. In: C. M. Weaver; R. P. Heaney (Eds.). **Calcium in Human Health**. Totowa: Humana Press, 2006. cap. 8, p.105-127.

MAEHIRA, F.; MIYAGI, I.; EGUCHI, Y. Effects of calcium sources and soluble silicate on bone metabolism and the related gene expression in mice. **Nutrition**, v. 25, n. 5, p. 581-589, 2009.

MASUDA, Y.; HIRAMATSU, H. Bioavailability and physiological function of eggshells and eggshell membranes. In: Y. Mine (Ed.). **Egg bioscience and biotechnology**. New Jersey: Wiley, 2008. cap. 3, p.129-140.

MICHÁLEK, K. (Trnava/ Czechoslovakia). 1991. **Compound and method of preparing compound for medical purposes from eggshells**. US n. 5,045,323, 25 jun. 1989: 3 set. 1991.

MURAKAMI, F. S. et al. Physicochemical study of CaCO₃ from egg shells. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 658-662, 2007.

NAVES, M. M. V. Avaliação microbiológica do pó da casca de ovo e otimização da técnica de elaboração do produto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 2, p. 113-118, 2007a.

NAVES, M. M. V. et al. Food fortification with egg shell powder as a calcium source. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 99-103, 2007b.

NAVES, M. M. V. Pó da casca de ovo como fonte de cálcio: qualidade nutricional e contribuição para o aporte adequado de cálcio. **Extensão e Cultura**, v. 5, p. 24-26, 2003. Revista da UFG, on line. Disponível em: <www.proec.ufg.br>. Acesso em: 28 abr. 2014. .

OLIVEIRA, D. A.; BENELLI, P.; AMANTE, E. R. A literature review on adding value to solid residues: egg shells. **Journal of Cleaner Production**, v. 46, p. 42-47, 2013.

PANSU, D. et al. Solubility and intestinal transit time limit calcium absorption in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1396-1404, 1993.

PEACOCK, M. Calcium metabolism in health and disease. **Clinical Journal of American Society of Nephrology**, v. 5, p. S23–S30, 2010.

PEREIRA, G. A. P. et al. Dietary calcium - strategies to optimize intake. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 2, p. 164-171, 2009. Sociedade Brasileira de Reumatologia.

PINHEIRO, M. M. et al. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women- the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Nutrition Journal**, v. 8, n. 6, p. 1-8, 2009.

ROVENSKÝ, J. et al. Eggshell calcium in the prevention and treatment of osteoporosis. **International Journal of Clinical Pharmacology Research**, v. 23, n. 2, p. 83-92, 2003.

SALEM, I. S.; AMMAR, A. S. M.; HABIBA, R. A. Effect of eggshell powder addition as a source of calcium fortification on butter cake quality. **Journal of Agricultural and Veterinary Sciences**, v. 5, n. 2, p. 109-118, 2012.

SANTOS, S. T. S. et al. Análises dos constituintes inorgânicos da casca do ovo. , v. 8, p. 1-4, 2012.

SCHAAFSMA, A. et al. Mineral, amino acid, and hormonal composition of chicken eggshell powder and the evaluation of its use in human nutrition. **Poultry Science**, v. 79, n. 12, p. 1833-1838, 2000.

SCHAAFSMA, A. et al. Positive effects of a chicken eggshell powder-enriched vitamin–mineral supplement on femoral neck bone mineral density in healthy late post-menopausal Dutch women. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. 03, p. 267-275, 2002.

SCHAAFSMA, A.; BEELEN, G. M. Eggshell powder, a comparable or better source of calcium than purified calcium carbonate: piglet studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 12, p. 1596-1600, 1999.

SCHAAFSMA, A.; PAKAN, I. Short-term effects of a chicken egg shell powder enriched dairy-based products on bone mineral density in persons with osteoporosis or osteopenia. **Bratislavské Lekárske Lstý**, v. 100, n. 12, p. 651-656, 1999.

SCHULZE, K. J. Calcium. In: B. Caballero; L. Allen; A. Prentice (Eds.); **Encyclopedia of Human Nutrition**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2013. p.228-234.

SILVA, A. G. H.; COZZOLINO, S. M. F. Cálcio. In: S. M. F. Cozzolino (Ed.). **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2. ed. Barueri: Manole, 2006. cap. 22, p.457-481.

SILVEIRA, A. S. et al. Análise sensorial de pães com adição de cálcio na forma de pó de casca de ovo em diferentes granulometrias. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: Impacto na Nutrição e Saúde, Campinas. **Anais...** Campinas: Galoá - Academic events, 2013. 1 CD-ROM.

SRUR, A. U. O. S.; VILAR, J. S.; MARQUES, R. G. **Tecnologia de obtenção de casca de ovo de aves domésticas em pó para o consumo humano e/ou animal**. Br. n. PI1004316-0A2, 21 jul. 2010: 17 abr. 2012.

STRAUB, D. A. Calcium supplementation in clinical practice : A review of forms, doses, and indications. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 22, p. 286-296, 2007.

STRAUSE et al. Spinal bone loss in postmenopausal women supplemented with Ca and trace elements. **The Journal of Nutrition**, v. 124, p. 1060-1064, 1994.

VEIGA, G. V. et al. Inadequate nutrient intake in Brazilian adolescents. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 212s-221s, 2013.

VILAR, J. S.; SABAA-SRUR, A. U. O.; MARQUES, R. G. Composição química da casca de ovo de galinha em pó. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 247-254, 2010. .

WEAVER, C. M. Absorption of calcium fumarate salts is equivalent to other calcium salts when measured in the rat model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4974-4975, 2002.

WEAVER, C. M.; HEANEY, R. P. Food sources, supplements, and bioavailability. In: C. M. Weaver; R. P. Heaney (Eds.). **Calcium in Human Health**. Totowa: Humana Press, 2006. cap. 9, p. 129-142.

WHITING, S. J.; PLUHATOR, M. M. Comparison of in vitro and in vivo tests for determination of availability of calcium from calcium carbonate tablets. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 11, n. 5, p. 553-560, 1992.

YU, Y. et al. Assessment the levels of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) on mice fed with eggshell calcium citrate malate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 253-257, 2013.

ANEXOS

Anexo A - Carta de submissão do manuscrito 1 à revista Ciência Rural.



Bruna Milbradt <brunamilbradt@gmail.com>

Ciência Rural - Manuscript ID CR-2014-0532

1 mensagem

vagner.neujahr@gmail.com <vagner.neujahr@gmail.com>

7 de abril de 2014 17:20

Para: tatiemanuelli@gmail.com

Cc: brunamilbradt@gmail.com, hermesaline@yahoo.com.br, jesika.ss@hotmail.com, 2nsjulianna@gmail.com, lianamilani@yahoo.com.br, ericommf@gmail.com, mariadagrakac@gmail.com, tatiemanuelli@gmail.com

07-Apr-2014

Dear Prof. Emanuelli:

Your manuscript entitled "Casca de ovo como fonte de cálcio para humanos: Composição mineral e análise microbiológica" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Ciência Rural.

Your manuscript ID is CR-2014-0532.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Ciência Rural.

Sincerely,
Ciência Rural Editorial Office

Anexo B - Norma para a publicação de artigos científicos submetidos à revista Ciência Rural.

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

4. A revisão bibliográfica (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

5. A nota (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests ***Tribolium confusum*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Tenebrio molitor*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Sitophilus granarius*** (Coleoptera: Curculionidae) and ***Plodia interpunctella*** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/S0022->

474X(00)00016-3>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

Anexo C - Norma para a publicação de artigos científicos submetidos à revista
Nutrition Research

Nutrition Research publishes original and review articles covering basic and applied research on all aspects of nutritional sciences. Subjects considered for publication include articles on nutritional biochemistry and metabolism; nutrient requirements in health and disease; digestion and absorption; nutritional anthropology and epidemiology; the influence of socioeconomic, cultural and political factors on nutrition of the individual and the community; the impact of nutrient intake on disease response, work performance and behavior; the consequences of nutritional deficiency on growth and development, endocrine and nervous systems, and immunity; food intolerance and allergy; nutrient-drug interactions; nutrition and aging; nutrition and chronic disease; obesity; and intervention programs.

Manuscripts on nutrition research in both humans and animals will be considered for publication. Issues of the Journal can contain research articles, clinical studies, communications, reviews of topical subjects, editorial commentaries, letters to the editor, and book reviews.

Contact Information:

Dr. Bruce A. Watkins, Editor-in-Chief
Angela Ranalli-Curtis, Managing Editor
Nutrition Research
University of Connecticut
Center on Aging UConn Health Center
Storrs, CT 06269-4123, USA
E-mail: bwatkin1@purdue.edu
Managing Editor: alrcurtis@gmail.com
Tel.: (860) 486-0866

General Guidelines: All manuscripts must be submitted to the journal web site (<http://ees.elsevier.com/nr>). Authors must submit the text, tables, and artwork in electronic form (Word file) to this web address. All figures and graphic presentation of data must be of the highest quality. Any questions regarding the submission process and all other inquiries should be sent via e-mail to the contacts in the editorial office.

Manuscripts must be written in high quality American English. For assistance, go to the Author's section on the Elsevier website and refer to the Resource Center and Language editing services at:

<http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/languagepolishing>

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere. In addition, the authors must respond to the questions related to the conflict of interest policy and scientific conduct and publication ethics.

The Journal will not consider for publication a manuscript or work that has already been reported in a publication or is described in a manuscript submitted or accepted for publication elsewhere. This rule does not refer to abstracts of communications presented at scientific meetings. When submitting a manuscript, an author should always make a full disclosure to the editor about all submissions that might be regarded as a duplicate publication of the same or similar work.

The editorial office reserves the right to reject manuscripts that do not comply with these requirements.

Authors

All authors listed in a manuscript submitted to Nutrition Research must have contributed substantially to the work, participated in the writing of the manuscript, and seen and approved the submitted version. All individuals who have contributed to the writing of the manuscript must be listed as authors.

How to submit

- Go to <http://ees.elsevier.com/nr>.
- Click on the "register" link and enter the requested information.
- Follow the instructions to upload your files.

Manuscript Guidelines: Research articles and Reviews should generally not exceed 6000 words and Communications should not exceed 2,500.

Each manuscript submitted must provide a title page, list of abbreviations, abstract page, introduction, methods and materials, results, discussion, list of references, and appropriate presentation of data in tables and figures. In some cases, the results and discussion sections can be combined (e.g., communications).

Text must be in 12-point font (Times New Roman or Arial), double-spaced, with 1-inch margins. Consecutive line numbers must be included in the left margin, starting with the title page and ending with the reference section. Page numbers must be included in the bottom right-hand corner of each page. Text must be aligned to the left only and include 2 hard returns at the end of each paragraph, heading, and subheading.

Text should be clear and concise. Tables, figures and references must be cited in sequence in the text. Past tense should be used in reference to the work on which the paper is based, while present tense is normally limited to existing knowledge and prevailing concepts. Previous knowledge and new contributions should be clearly differentiated.

File Submission and Arrangement: Files must be uploaded in the following order: cover letter, revision letter (when applicable), checklist, text, tables, and figures. All manuscript files must be uploaded separately and in an editable format (cover letter, revision letter, and checklist may be in PDF form). PDF files are not accepted for the text, table, or figure files. After all the files are uploaded, a PDF file is generated automatically.

For assistance with the electronic submission process, please utilize the 'Author Information' links located at <http://ees.elsevier.com/nr/>.

Cover letter must include the following:

- Corresponding author contact information (must have a PhD or MD). Students in graduate programs are not considered corresponding authors.
- Statement that the manuscript has not been submitted elsewhere for publication.
- Signatures of all authors and statement that all authors have contributed to the work and agree to submit it for consideration to Nutrition Research.
- Manuscripts describing research on human subjects and animal models must include a statement that the research was approved by the appropriate committee of the institution. The author must also note the line and page number in which this is indicated in the manuscript text.

Revision Letter must include the following:

- Point by point response to each issue raised by the editorial office and peer reviewers (must include line numbers).
- Contact information and name of company/individual who edited the manuscript for American English (if applicable).

Checklist

- Download from EES Website.
- Must be completed and signed by Corresponding Author.

Document File • Title page - page 1

- Title - single, declarative statement, stating the major finding of the work.
- First name, Middle initial, and Last name of each author (no titles such as MD or PhD).
- The affiliations of each author noted with superscripts.
- Complete contact information for corresponding author.
- Running heads, word counts, and any other information other than that stated above should not be included.
 - Abbreviations page - page 2
 - Must include 1 abbreviation with meaning per line.
 - Abbreviations should be listed first followed by a semicolon and then the meaning.
 - Abbreviations must be spelled out when used in the text for the first time.
 - Abstract page - page 3
 - A single, double-spaced paragraph (250 word limit) that includes the hypothesis for the study, experimental design, use of the model for the study, major results, and conclusion.
 - Do not include subheadings in this section.
 - It must follow the same format as the rest of the text (alignment, spacing, line numbering, etc.).
 - List of at least 5 keywords/phrases taken from the medical subject headings of the Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) below the abstract. The model used in the study must be included in the keywords.
 - Manuscript text
 - Main headings and subheadings must be numbered with Arabic numerals.
- Text must start on a new page and include the following main headings:
 - Introduction - must state the hypothesis for the research and the supporting objectives to test the hypothesis. Must also state how this study advances human nutrition.
 - Methods and materials - must explain the experimental design, control and treated groups; details of ingredient composition of diets should be presented in a table; all procedures and techniques must be explained and referenced; method of euthanasia for experimental animals must be stated; statistical analyses section must be complete with information on data presentation; must contain statistical tests and appropriate references; and must include an institutional statement of protocol approval for animal or human subjects (human consent is required).
 - Results - must thoroughly describe the data presented in tables and figures.
 - Discussion- should contain a specific description of the literature findings relevant to the results of the current investigation but not go beyond the data presented in the results. The limitations of the study should be included in this section.
 - Acknowledgment (note spelling)

- Technical or editorial assistance must be acknowledged.
- Financial (grants or gifts) and other support as deemed as appropriate for the study must be indicated.
- Do not include author contributions or individual titles (i.e., Dr., PhD, etc...) in this section.
- If there is a conflict of interest, that must be stated in this section.
 - References
- Number consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
- In-text citations and reference list numbers must be enclosed within brackets, e.g., [1,2].
- The author should make certain that there is a strict one-to-one correspondence between references cited in the text and those in the reference list.
- References should appear as follows:

Journal articles

[1] Alzghoul MB, Gerrard D, Watkins BA, Hannon K. Ectopic expression of IGF-I and Shh by skeletal muscle inhibits disuse-mediated skeletal muscle atrophy and bone osteopenia in vivo. *FASEB J* 2004;18:221-3.

[2] Friedman AN, Moe SM, Perkins SM, Li Y, Watkins BA. Fish consumption and omega-3 fatty acid status and determinants in long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2006;47:1064-71.

[3] Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE. Therapeutic perspectives on the combination of α -lipoic acid and vitamin E. *Nutr Res* 2006;26:1-5.

Books

[4] Katz DL. Nutrition in clinical practice: a comprehensive, evidence-based manual for the practitioner. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

Book chapters

[5] Hennig B, Toborek M, Ramadass P, Ludewig G, Robertson LW. Polychlorinated biphenyls, oxidative stress and diet. In: Preedy VR, Watson RR, editors. Reviews in food and nutrition toxicity. Vol. 3. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 93-128.

Note that a supplement on proper use of tables and figures is provided online via the EES website.

To properly submit digital artwork, please see "artwork guidelines" at <http://ees.elsevier.com/nr/> for details regarding format, dimensions, and format of your artwork.

Tables*

- Must be numbered consecutively with Arabic numerals.
- Start each table on its own page.
- Use minimal horizontal lines and no vertical lines.
- Must have a description so that reader can understand the table without referring to the text.
- Must have an explanation of the values and statistics used for analysis of the data and properly referenced.
- Tables must be in an editable (word) file.

* All studies that include experimental diets must provide a table that lists the

ingredients and enough detail for the nutrient content of those diets. Reference to established diets (such as AIN 93G) is appropriate when the major ingredients are listed and the premix levels are provided (actual details of each vitamin and mineral source listed is not necessary in this case). Diets that are developed with different lipid sources should provide a fatty acid compositional analysis of the lipids. In addition, studies that test a botanical or phytochemical ingredient should provide enough chemical compositional analysis as well as the amount of the active compounds.

Figures

- Must be numbered consecutively with Arabic numerals.
- Start each figure on its own page.
- Provide clear axes labels and scale.
- Use a simple space filling format (open, closed and hatched bars, etc.) for a clear and concise presentation of the data for easy interpretation.
- Must have a description that the reader can understand without referring to the text.
- Must have an explanation of the values and statistics used for analysis of the data.

Statistical Methods: Tests of statistical analysis must be fully described. Statements about statistical significance of results must be accompanied by indications of the level of significance. This information must be included where numerical and graphic presentation of data is made in the manuscript in footnotes to tables and in the captions of figures rather than in the text only. Also in the statistical methods section of the manuscript, indicate how the data are presented. For example, means - standard deviation must be shown. Always take special care to present only the significant figures for a measurement and appropriate sample size relevant to a power analysis.

Institutional Approval: Manuscripts describing research on human subjects must include a statement that the research was approved by the appropriate committee of the institution. For research on experimental animals, authors are expected to have followed the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals and indicate institutional approval. This statement must be included in the methods section of the manuscript and disclosed in the cover letter.

Abbreviations, Symbols and Units of Measure: Use only standard abbreviations (Scientific Style and Format, The CBE Style Manual for Authors, Editors, and Publishers, 6th ed. Council of Biology, Chicago IL 1994). Abbreviations should not be used in the title or major headings. The full term for which an abbreviation stands for should precede its first use in the text. The International System of Units (SI) should be used for all measurements.

Footnotes: Footnotes should be kept to a minimum and numbered consecutively throughout the text with superscript Arabic numerals. They should be double-spaced and not include displayed formulae or tables.

Displayed Formulae: Displayed formulae should be numbered consecutively throughout the manuscript as (1), (2), etc. against the right-hand margin of the page. In cases where the derivation of formulae has been abbreviated, it is of great help to

the referees if the full derivation can be presented on a separate sheet not to be published.

Conflict of Interest Policy: The journal now has instituted requirements for authors of submitted manuscripts to indicate their individual contributions and conflict of interest to the research. In doing so all authors must disclose all or any potential conflicts of financial or personal interest in a scientific project related to the publication. Financial support for the research must be included with the disclosed information. The conflict of interest must be included in the cover letter for the submitted manuscript. If a conflict of interest exists, the corresponding author must identify such in the acknowledgments section.

Scientific Integrity: Nutrition Research has a policy to follow all aspects of publication ethics and depends on the authors of submitted manuscripts to provide complete information on conflict of interests for the execution of research and data collection. The editorial office and publishers of Nutrition Research rely on the authors and their respective institutions to follow the policies to preserve scientific integrity in research and support publication ethics.

Suggested Reviewers: Authors must provide the names and complete contact information (including e-mail address, country, and affiliation) of up to 4 experts who may be called upon to review the manuscript. Authors should try to provide individuals from a global perspective.

Page Proofs: Page proofs will be sent to the corresponding author via e-mail. Proofs should be corrected carefully; the responsibility for detecting errors lies with the author. Corrections should be restricted to instances in which the proof is at variance with the manuscript. Extensive changes (any significant change in text or tables and figures) will be charged to the corresponding author. Offprints can be ordered from the publisher.

Publication of Accepted Manuscripts: This journal makes accepted manuscripts available online as soon as possible after acceptance. At this stage, the author's accepted manuscript (in both full-text and PDF) is given a Digital Object Identifier (DOI) and is fully citable, and searchable by title, author(s) name and the full-text. The article also carries a disclaimer noting that it is an unedited manuscript which has not yet been copyedited, typeset or proofread. When the fully copyedited version is ready for publication, it simply replaces the author accepted manuscript version.

AudioSlides: If your manuscript is accepted for publication, we encourage you to take advantage of the free AudioSlides service. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Copyright: Upon acceptance of an article for publication, the author(s) will be asked to transfer copyright of the article to the publisher. As a journal author, you

retain rights for a large number of author uses, including use by your employing institute or company. These rights are retained and permitted without the need to obtain specific permission from Elsevier. For more information, please visit <http://www.elsevier.com/authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open Access:

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Creative Commons Attribution (CC-BY): available only for authors funded by organizations with which we have established an agreement. For a full list please see www.elsevier.com/fundingbodies

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. www.elsevier.com/fundingbodies

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The Open Access publication fee for this journal is **\$USD 2500**, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy: www.elsevier.com/openaccesspricing

Updated June 2013