



Efeito da inclusão de óleo de linhaça sobre a composição lipídica e a concentração de prostaglandina (PGE₂) em ossos longos de frangos de corte¹

Elis Regina de Moraes Garcia^{2*}, Alice Eiko Murakami³, Makoto Matsushita⁴, Márcia Machado de Oliveira Dalalio⁵, Valter Augusto Della-Rosa⁶, Jovanir Inês Müller Fernandes²

¹ Projeto financiado pelo CNPq.

² Curso de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá/UEM – Maringá-PR.

³ Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá/UEM – Maringá-PR.

⁴ Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá/UEM – Maringá-PR.

⁵ Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá/UEM – Maringá-PR.

⁶ Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá/UEM – Maringá-PR.

RESUMO - O objetivo com este trabalho foi avaliar o perfil de ácidos graxos e a concentração de prostaglandina na tíbia de frangos de corte alimentados com rações contendo óleo de linhaça no período de 1 a 42 dias de idade. Nas fases inicial e de crescimento (1 a 21 dias e 22 a 42 dias, respectivamente), foi adotado um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (2,0; 3,5; 5,0 ou 6,5% de óleo de linhaça), 6 repetições e 50 aves/unidade experimental. No período de 1 a 42 dias de idade, o perfil lipídico das rações refletiu sobre o perfil de ácidos graxos dos ossos. O aumento do nível de óleo de linhaça às rações promoveu redução linear da concentração do ácido graxo 20:4n-6 nas células ósseas, porém com menor intensidade ao longo da idade. As concentrações dos ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (EPA – ácido eicosapentaenóico, DPA – docosapentaenóico e DHA – docosahexaenóico) nas células ósseas reduziram no decorrer da idade das aves, contudo, esse efeito do óleo de linhaça foi menos intenso para o EPA e DHA. A concentração de prostaglandina determinada no sobrenadante das células ósseas não foi influenciada pelos níveis de óleo de linhaça aos 21 e 42 dias de idade. A adição de 5,17 e 6,5% de óleo de linhaça às rações mostrou-se efetiva em potencializar a incorporação dos ácidos graxos 18:3n-3 e 20:5n-3 nos ossos dos frangos, respectivamente, no período de 1 a 42 dias de idade.

Palavras-chave: ácido araquidônico, EPA, lipídios, prostaglandina E₂, tíbia

Effect of linseed oil inclusion on fatty acid profile and prostaglandin (PGE₂) concentration in broiler chicken long bones

ABSTRACT- The objective of this study was to evaluate the fatty acid profile and PGE₂ concentration in tibia of broiler chickens fed on diets with different linseed oil (LO) levels from one to 42 days of age. At the initial and growing phases (1 to 21 days and 22 to 42 days of age, respectively) a completely randomized design was used with four treatments, six replications and 50 birds per experimental unit. The birds were fed diets with different linseed oil levels (2.0; 3.5; 5.0 and 6.5%). It was observed in the period from 1 to 42 days of age that the diet fatty acid profile reflected on the bone fatty acid profile. The increase in the amount of linseed oil in the diets promoted a linear reduction of 20:4n-6 in the linseed oil concentration in the bone cells, but lower over time. The eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) and docosahexaenoic acid (DHA) concentrations decreased in bone cells concentrations decreased in bone cells with birds age, but the effect of adding linseed oil to the diets was less intense for EPA and DHA. The bone PGE₂ concentration was not influenced by the linseed oil levels in the diets, in the period from 22 to 42 days of age. Diet with addition of 5.17% and 6.5% linseed oil was effective to enhance the incorporation of 18:3n-3 and 20:5n-3 in broiler chicken bones, respectively, in the period from 1 to 42 days of age.

Key Words: arachidonic acid, EPA, lipids, prostaglandin E₂, tibia

Introdução

O crescimento de um animal depende do desenvolvimento muscular e do suporte ósseo. Entretanto, nas linhagens modernas de frangos de corte, principalmente nos machos, a taxa de crescimento do tecido muscular é

extremamente elevada e se inicia em uma fase muito precoce pós-eclosão, sobre um suporte esquelético frágil (Gonzales & Mendonça Jr., 2006).

Dessa forma, a seleção genética para alta taxa de crescimento tem promovido maior peso do músculo do peito em comparação aos músculos e ossos das pernas,

Este artigo foi recebido em 1/2/2007 e aprovado em 14/10/2008.

Correspondências devem ser enviadas para: ermgarcia@uem.br

*Endereço atual: Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – UEMS/Unidade Universitária de Aquidauana.

umentando os problemas de pernas em frangos, em decorrência da distribuição desuniforme de peso (Yalcin et al., 2001).

Vários nutrientes influenciam o crescimento e o desenvolvimento dos ossos. Pesquisas têm comprovado que os lipídios da dieta são essenciais na biologia óssea, pois são capazes de influenciar a composição em ácidos graxos da membrana fosfolipídica e a atividade celular óssea (Watkins et al., 2000; Watkins, 2003). Essa influência parece estar relacionada à síntese de eicosanóides, principalmente prostaglandinas. A maioria dos eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas) é sintetizada a partir do ácido araquidônico, precursor das prostaglandinas da série 2 (PGE₂), enquanto os ácidos α -linolênico (20:3n-6) e eicosapentaenoico (20:5n-3) são substratos para a síntese das prostaglandinas das séries 1 (PGE₁) e 3 (PGE₃), respectivamente (Watkins, 2004).

Tanto a formação quanto a reabsorção óssea são influenciadas pela PGE₂ e esse efeito sobre o osso parece ser dependente da reabsorção óssea, ou seja, em altas concentrações, a PGE₂ inibe a formação da matriz óssea, enquanto, em baixas concentrações, pode estimular a formação do osso (Watkins et al., 2000; Liu & Denbow, 2001).

Cada tipo de ácido graxo dietético influencia a utilização de outros ácidos graxos. Dessa forma, a ingestão de maiores concentrações de óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados da série ômega 3 diminui a incorporação de ácido araquidônico nas membranas celulares e reduz a capacidade de síntese de eicosanóides provenientes desse ácido graxo (Calder, 1998; Liu, 2000).

O óleo de linhaça é muito insaturado e tem alta concentração de α -linolênico (Kratzer & Vohra, 2005), precursor dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série ômega 3.

Embora trabalhos evidenciem o efeito positivo dos ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 sobre o desenvolvimento dos ossos em aves, nem sempre altos níveis de EPA, 22:5N-3 e DHA, no fígado indicam maior concentração desses ácidos graxos nos tecidos. Resultados de pesquisas sugerem que a incorporação seletiva desses ácidos graxos gerados por processos de insaturação e alongamento assegura a funcionalidade dos tecidos (López-Ferrer et al., 2001).

Com base nessas informações, objetivou-se com este trabalho verificar o efeito da adição de óleo de linhaça nas rações sobre o perfil de ácidos graxos e a produção de prostaglandina em ossos de frangos de corte no período de 1 a 42 dias de idade.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá (UEM) utilizando-se 1.200 pintos de 1 dia de idade, linhagem Cobb[®], machos, pesando $45,5 \pm 0,6$ g, alojados em galpão convencional.

Água e ração foram fornecidas à vontade em um programa de alimentação dividido em duas fases: a inicial, de 1 a 21 dias de idade; e a de crescimento/acabamento, de 22 a 43 dias de idade. Durante os primeiros dez dias, adotou-se um programa contínuo de luz e, no restante do período experimental, 23 horas de luz/dia. As temperaturas médias dentro do galpão foram: máxima de $29,9 \pm 0,6^\circ\text{C}$, mínima de $22,6 \pm 0,6^\circ\text{C}$ e umidade relativa média de $48,2 \pm 2,7\%$.

As aves receberam rações formuladas com 2,0; 3,5; 5,0 ou 6,5% de óleo de linhaça, constituindo um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos, seis repetições e 50 aves/unidade experimental. As rações experimentais foram formuladas para atender às exigências nutricionais das fases: inicial (1-21 dias de idade) e de crescimento/acabamento (22-43 dias de idade), de acordo com recomendações de Rostagno et al. (2005), de forma a serem energéticas, isoaminoacídicas, isocálcicas e isofosfóricas (Tabelas 1 e 2).

O perfil de ácidos graxos e a concentração de prostaglandina (PGE₂) nos ossos foram avaliados utilizando-se as tíbias direita e esquerda das aves. Para as análises, foi amostrada 1 ave/repetição, representativa com peso da média do lote, aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de idade. Após o sacrifício por meio de atordoamento seguido de sangria (aprovado pelo Comitê de Ética Animal – Registro nº 069/2003), foram coletadas as tíbias esquerdas das aves, retirando-se os tecidos envolventes. As amostras foram mantidas congeladas (-18°C) até o início das análises do perfil de ácidos graxos. As tíbias direitas foram utilizadas para determinação de prostaglandina e processadas logo após a coleta.

As análises referentes ao perfil lipídico das rações e dos ossos foram realizadas no Laboratório de Química da Universidade Estadual de Maringá. A extração de ácidos graxos do osso cortical foi feita de acordo com metodologias descritas por Bligh & Dyer (1959) e Liu (2000). A tíbia esquerda foi descongelada, retirando-se o perióstio e a medula óssea, e lavada com soro fisiológico (0,9%) para retirada das células medulares remanescentes. Após a limpeza, o osso foi envolvido em papel-alumínio, congelado em nitrogênio líquido e, posteriormente, triturado em gral de porcelana com auxílio de um pistilo. A cada amostra, o

Tabela 1 - Composição das rações experimentais fornecidas na fase de 1 a 21 dias de idade

Ingrediente	Nível de óleo de linhaça (%)			
	2,0	3,5	5,0	6,5
Milho, grão	62,20	57,62	53,14	48,66
Farelo de soja, 45%	31,74	33,07	33,92	34,76
Fosfato bicálcico	1,88	1,89	1,90	1,91
Calcário	1,04	1,02	1,01	1,00
Óleo	2,00	3,50	5,00	6,50
Sal comum	0,43	0,43	0,43	0,43
DL-metionina, 98%	0,27	0,27	0,28	0,28
L-lisina HCl, 78%	0,28	0,26	0,24	0,22
Inerte	0,00	1,78	3,92	6,08
Suplemento mineral ¹	0,05	0,05	0,05	0,05
Suplemento vitamínico ²	0,10	0,10	0,10	0,10
Butil-hidroxi-tolueno	0,01	0,01	0,01	0,01
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Valores calculados				
Proteína bruta (%)	20,00	20,00	20,00	20,00
Energia metabolizável aparente (kcal/kg)	3.000	3.000	3.000	3.000
Metionina + Cistina (%)	0,897	0,897	0,897	0,897
Lisina (%)	1,263	1,263	1,263	1,263
Cálcio (%)	0,960	0,960	0,960	0,960
Fósforo disponível (%)	0,450	0,450	0,450	0,450
Extrato etéreo (%)	4,380	5,720	7,060	8,390
Sódio (%)	0,222	0,222	0,222	0,222

¹ Suplemento mineral[®] (Conteúdo por kg de premix): ferro - 100.000 mg; cobre - 16.000 mg; iodo - 2.400 mg; zinco - 100.000 mg; manganês - 140.000 mg; selênio - 400 mg; veículo q.s.p. - 1.000 g.

² Suplemento vitamínico inicial[®] (Conteúdo por kg de premix): vit. A - 7.000.000 UI; vit. D3 - 2.200.000 UI; vit. E - 11.000 mg; vit. K3 - 1.600 mg; vit. B1 - 2.000 mg; vit. B2 - 5.000 mg; vit. B12 - 12.000µg; vit. B6 - 3.000 mg; niacina - 35.000 mg; ácido pantotênico - 13.000 mg; ácido fólico - 800 mg; antioxidante - 100.000 mg; veículo q.s.p. - 1.000 g.

pistilo era lavado com água deionizada e com mistura clorofórmio:metanol.

Depois de trituradas, as amostras de ossos foram pesadas e colocadas em tubos de vidro para extração da matéria graxa total, adicionando-se 21 mL da solução clorofórmio:metanol (2:1, ou seja, 14 mL de clorofórmio e 7 mL de metanol), e mantidas em geladeira por 48 horas. Posteriormente, o sobrenadante da solução foi filtrado com auxílio de papel-filtro quantitativo e recuperado em funil de separação de 250 mL. Após a filtração, foram adicionados ao tubo de extração mais 14 mL da mistura clorofórmio:metanol, homogeneizando os fragmentos ósseos e a solução, e filtrando-se novamente após prévia agitação. O mesmo procedimento foi repetido por mais duas vezes, adicionando 12 e 6 mL da solução clorofórmio:metanol aos tubos de extração com os fragmentos ósseos.

O processo de extração dos lipídios totais das rações experimentais foi realizado segundo Bligh & Dyer (1959), com correção da umidade para 80%, utilizando-se mistura clorofórmio:metanol na proporção 2:1 (v/v). Uma amostra de 10 g (\pm 0,1 mg) foi pesada em béquer de 250 mL,

Tabela 2 - Composição das rações experimentais fornecidas na fase de 22 a 43 dias de idade

Ingrediente	Nível de óleo de linhaça (%)			
	2,0	3,5	5,0	6,5
Milho, grão	68,43	64,40	59,91	55,43
Farelo de soja, 45%	25,80	27,40	28,25	29,09
Fosfato bicálcico	1,66	1,68	1,69	1,69
Calcário	0,99	0,97	0,96	0,95
Óleo	2,00	3,50	5,00	6,50
Sal comum	0,37	0,37	0,37	0,37
DL-metionina, 98%	0,25	0,25	0,25	0,26
L-lisina HCl, 78%	0,34	0,30	0,28	0,27
Inerte	0,00	0,97	3,13	5,28
Suplemento mineral ¹	0,05	0,05	0,05	0,05
Suplemento vitamínico ²	0,10	0,10	0,10	0,10
Butil-hidroxi-tolueno	0,01	0,01	0,01	0,01
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Valores calculados				
Proteína bruta (%)	18,00	18,00	18,00	18,00
Energia metabolizável aparente (kcal/kg)	3.100	3.100	3.100	3.100
Metionina + Cistina (%)	0,825	0,825	0,825	0,825
Lisina (%)	1,156	1,156	1,156	1,156
Cálcio (%)	0,874	0,874	0,874	0,874
Fósforo disponível (%)	0,406	0,406	0,406	0,406
Extrato etéreo (%)	4,550	5,910	7,250	8,580
Sódio (%)	0,192	0,192	0,192	0,192

¹ Suplemento mineral[®] (conteúdo por kg de premix): ferro - 100.000 mg; cobre - 16.000 mg; iodo 2.400 mg; zinco 100.000 mg; manganês 140.000 mg; selênio 400 mg; veículo q.s.p. - 1.000 g.

² Suplemento vitamínico crescimento[®] (conteúdo por kg de premix): vit. A - 6.000.000 UI; vit. D3 - 2.000.000 UI; vit. E - 10.000 mg; vit. K3 - 1.600 mg; vit. B1 - 1.400 mg; vit. B2 - 4.000 mg; vit. B12 - 10.000µg; vit. B6 - 2.000 mg; niacina - 30.000 mg; ácido pantotênico - 11.000 mg; ácido fólico - 600 mg; antioxidante - 100.000 mg; veículo q.s.p. - 1.000 g.

adicionada de 60 mL de solução clorofórmio-metanol e agitada vigorosamente por 2 minutos. Depois, foram adicionados 20 mL de clorofórmio, agitando-se por 30 segundos, e 20 mL de água deionizada, agitando-se por mais 30 segundos. A mistura foi filtrada a vácuo em funil de Buchner com papel-filtro quantitativo. Ao resíduo, retornando ao béquer, foram adicionados 20 mL de clorofórmio, agitando-se por 2 minutos. O procedimento de filtração foi repetido e a solução resultante foi transferida para um funil de separação de 250 mL.

Para determinação do perfil lipídico das rações experimentais, dos ossos e das fontes de óleo, a amostra foi separada em fases; a fase inferior, contendo o clorofórmio e matéria graxa, foi drenada em erlenmeyer de 250 mL previamente pesado e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório com banho a 30°C. No caso dos ossos, adicionaram-se 25 mL de solução salina (9%) para que a separação das fases fosse otimizada. O teor de lipídios totais foi determinado gravimetricamente.

A transesterificação dos triacilgliceróis dos ossos, das fontes de óleo e das rações foi realizada conforme o

método 5509 da ISO (1978). A matéria lipídica extraída foi transferida para tubos de 10 mL com tampa rosqueável, com 2 mL de n-heptano e agitada até completa dissolução da matéria graxa. Em seguida, foram adicionados 2 mL de KOH (2 mol/L) em metanol; o frasco foi tampado e a mistura submetida a agitação vigorosa (± 3 minutos) até a obtenção de uma solução levemente turva. Após a separação das fases, a superior (n-heptano e ésteres metílicos de ácidos graxos) foi transferida para microtubos de 5 mL de capacidade, fechados hermeticamente e armazenados em congelador (-18°C) para posterior análise cromatográfica.

Os ésteres de ácidos graxos, tanto dos ossos como das fontes de óleo e das rações, foram analisados por meio do cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida. As áreas de picos foram determinadas por meio do Integrador-processador CG-300 (Instrumentos Científicos – CG) e a identificação dos picos foi realizada por meio da comparação dos tempos de retenção com os padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma, EUA).

A determinação da concentração de PGE_2 em culturas de células ósseas foi realizada no Laboratório de Imunologia Básica da Universidade Estadual de Maringá, de acordo com as metodologias descritas por Watkins et al. (1996), Li & Watkins (1998) e Liu & Denbow (2001).

A tíbia direita das aves, obtida aos 21 e 42 dias de idade, após a limpeza dos tecidos envolventes, foi dividida longitudinalmente e as células da medula óssea removidas por meio da lavagem com soro fisiológico (0,9%). Retirou-se uma secção da diáfise do osso (± 20 mm de comprimento), que foi imersa em 2 mL de solução salina balanceada de Hank's, e agitada por 2 horas a 37°C . Após o período de incubação, o meio de cultura de células foi coletado e estocado a -80°C para posterior análise de prostaglandina, que foi mensurada por meio de imunoensaio utilizando EIA kits® (Cayman). Os valores de prostaglandina foram expressos por unidades de peso de tecido ósseo. O anticorpo anti- PGE_2 possui as seguintes especificidades: PGE_2 – 100%, PGE_3 – 43 %, PGE_1 – 18,7% e PGF_{2a} < 0,01%.

Para avaliação da composição lipídica dos ossos, foi testada e admitida a distribuição normal. Os efeitos da idade e do nível de óleo de linhaça sobre o perfil de ácidos graxos na tíbia das aves foram avaliados por meio da análise de superfície de resposta, considerando os seguintes ácidos graxos: 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3, e o total de ácidos graxos ômega 6 e 3, que são importantes por atuarem como precursores e controladores da síntese de substâncias relacionadas ao metabolismo ósseo. Cada ácido graxo foi avaliado

individualmente, e o modelo estatístico considerou os efeitos do nível de óleo de linhaça, da idade e as interações nível de óleo de linhaça \times idade.

A análise estatística da concentração de prostaglandina foi realizada pelo método de modelos lineares generalizados (Nelder & Wedderburn, 1972), admitindo distribuição gama com função de ligação recíproca. O modelo estatístico utilizado não incluiu o efeito da idade e os efeitos de tratamento foram testados por meio do teste T de Student (distribuição gama) a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

De acordo com os dados, a inclusão de níveis crescentes de óleo de linhaça alterou o perfil de ácidos graxos das rações experimentais, com redução e aumento nas concentrações dos ácidos linoleico (18:2n-6) e α -linolênico (18:3n-3), respectivamente (Tabela 3).

Essas alterações refletiram nas relações entre o total de ácidos graxos da série ômega 6 e 3, visto que os ácidos 18:2n-6 e 18:3n-3 foram os representantes dessas classes encontrados em maiores proporções nas rações experimentais.

Os resultados comprovaram redução linear ($P < 0,05$) na concentração de 18:2n-6 com a inclusão de óleo de linhaça às rações (Figura 1A). Entretanto, com o avanço da idade, a concentração de 18:2n-6 na tíbia apresentou comportamento quadrático ($P < 0,05$), com valor mínimo estimado aos 11,77 dias.

Por meio da análise de superfície de resposta, observou-se que a adição de óleo de linhaça nas rações reduziu linearmente ($P < 0,05$) a concentração de 20:4n-6 na tíbia (Figura 1B) das aves em todas as idades avaliadas, todavia, esse efeito se tornou menos intenso ao longo do período de criação, provavelmente em virtude da menor incorporação desse ácido graxo nos ossos.

Considerando que a mesma sequência de enzimas está envolvida nos processos de insaturação e alongamento da cadeia dos ácidos graxos ômega 3 e 6 no fígado das aves, provavelmente o aumento no nível de óleo de linhaça às rações ocasionou competição entre os ácidos graxos 18:2n-6 e 18:3n-3 (Figura 2A) por essas enzimas, resultando em maior e menor concentração de 18:2n-6 e 20:4n-6, respectivamente, na tíbia dos frangos.

De acordo com Liu (2000), a enzima Δ -desaturase é considerada limitante na sequência de reações necessárias para produção de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa e sua preferência pelo substrato segue a seguinte ordem: ácido graxo α -linolênico > ácido graxo linoléico > ácido graxo oléico. Dessa forma, o aumento na concentração

Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos das rações experimentais utilizadas nas fases inicial (1-21 dias de idade) e de crescimento (22-42 dias de idade)¹

Ácidos graxos	Nível de óleo de linhaça (%)							
	2,0		3,5		5,0		6,5	
	Inicial	Crescimento	Inicial	Crescimento	Inicial	Crescimento	Inicial	Crescimento
14:0	1,45	1,20	1,35	0,68	1,12	0,69	0,82	0,41
14:n-7	0,05	ND	ND	0,04	ND	ND	ND	ND
16:0	12,89	10,97	10,92	9,85	10,39	9,21	8,96	7,94
16:n-9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16:n-7	0,30	ND	0,16	0,05	0,17	0,05	0,07	0,05
18:0	6,62	4,64	6,62	4,93	6,94	5,48	5,97	5,01
18:n-9	25,67	26,97	23,07	25,20	21,98	23,93	22,18	22,77
18:n-7	1,43	1,19	1,23	1,23	1,13	1,19	1,26	1,20
18:2n-6	35,98	36,75	28,39	30,24	23,86	25,99	22,38	23,24
18:3n-3	15,12	17,77	27,80	27,33	34,23	33,27	38,09	39,05
20:0	0,49	0,51	0,46	0,45	0,18	0,19	0,27	0,33
AGPI	51,10	54,52	56,19	57,57	58,09	59,26	60,47	62,29
AGMI	27,45	28,16	24,46	26,52	23,28	25,17	23,51	24,02
AGS	21,45	17,32	19,35	15,91	18,63	15,57	16,02	13,69
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100
n-6	35,98	36,75	28,39	30,24	23,86	25,99	22,38	23,24
n-3	15,12	17,77	27,80	27,33	34,23	33,27	38,09	39,05
AGPI/AGS ²	2,38	3,15	2,90	3,62	3,12	3,81	3,77	4,55
n-6/n-3 ³	2,38	2,07	1,02	1,11	0,70	0,78	0,59	0,60

¹ Dados obtidos com base na porcentagem de cada ácido graxo em relação aos lipídios totais.

² AGPI/AGS: relação ácidos graxos poliinsaturado:ácidos graxos saturados.

³ n-6/n-3: relação ácidos graxos ômega 6:ácidos graxos ômega 3.

ND – não-detectado.

$$\hat{Y} = 13,1794 - 0,11417 \cdot I + 0,00484909 \cdot I^2 - 0,178341 \cdot N \quad (R^2 = 0,99)$$

$$\hat{Y} = 4,07403 - 0,0851236 \cdot I - 0,405709 \cdot N + 0,00802521 \cdot I \cdot N \quad (R^2 = 0,99)$$

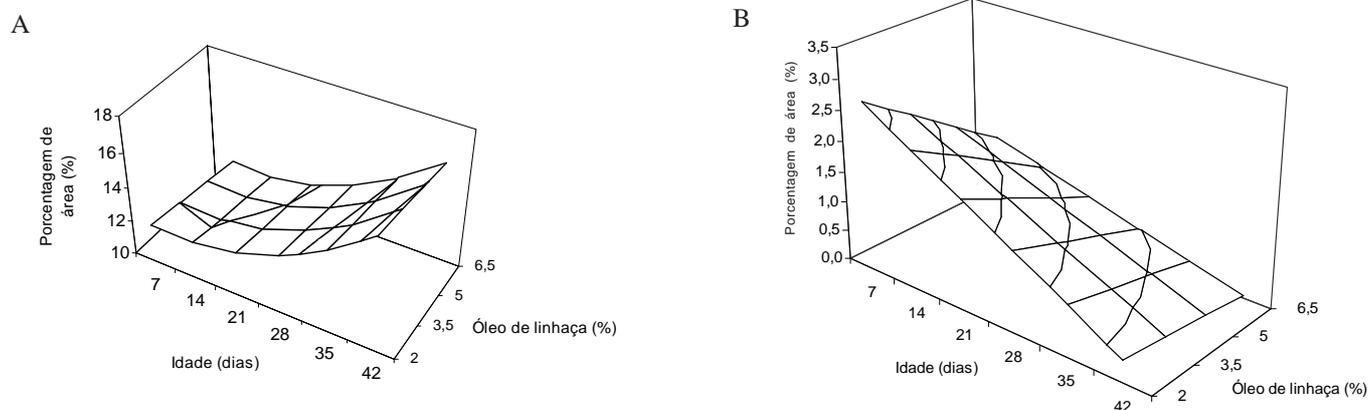


Figura 1 - Porcentagens dos ácidos linoléico, 18:2n-6 (A), e araquidônico, 20:4n-6 (B), determinadas na tíbia de frangos de corte no período de 1 a 42 dias de idade (dados obtidos em relação aos lipídios totais). I = idade; N = nível de óleo de linhaça.

do ácido 18:3n-3 nas rações pode interferir nos processos de insaturação e alongamento do 18:2n-6, reduzindo a concentração do 20:4n-6 nos tecidos.

Os ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e 6 também podem competir por limitado número de sítios de esterificação durante a biossíntese dos fosfolipídios (Sardesai, 1992). Portanto, quando se determina a quantidade de ácidos graxos ômega 3 necessária para

suprimir o metabolismo do ácido araquidônico, não apenas as concentrações absolutas mas também as relações ômega 3:ômega 6, devem ser consideradas (Boudreau et al., 1991).

Resultados semelhantes quanto à redução na incorporação do ácido araquidônico nos ossos de aves com a adição de ácidos graxos ômega 3 nas rações foram obtidos por Watkins et al. (1996, 1997), contudo, nesses trabalhos foram utilizadas fontes de origem marinha,

ricas em 20:5n-3, 22:5n-3 e 22:6n-3. Segundo López-Ferrer et al. (2001), o enriquecimento dos tecidos com ácidos graxos poliinsaturados, principalmente, os de cadeia longa da série ômega 3 provenientes de fontes de origem vegetal, é menos efetivo que os de origem marinha. Esse fato pode estar relacionado à atividade da enzima Δ -desaturase, fundamental nos processos de insaturação e alongamento dos ácidos graxos no fígado.

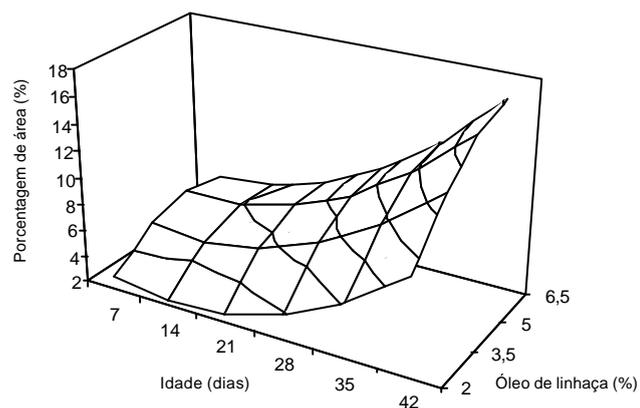
De acordo com Garg et al. (1990), o mecanismo de inibição da atividade da Δ -desaturase é diferente quando o 18:3n-3 ou o 20:5n-3 estão presentes na dieta. O 20:5n-3 parece inibir os processos de insaturação e alongamento da cadeia do 18:2n-6, agindo como um análogo do 20:4n-6, enquanto a inibição realizada pelo 18:3n-3 ocorre por meio da competição pela Δ -desaturase. Ainda conforme os

autores, o 18:3n-3 presente na dieta é tão eficiente quanto o 20:5n-3 em diminuir a concentração do 20:4n-6, desde que o conteúdo de 18:2n-6 seja baixo.

A inclusão de 5,17% de óleo de linhaça foi suficiente em proporcionar maiores concentrações de ácido α -linolênico (Figura 2A) nos ossos das aves em todas as idades avaliadas. Contudo, os menores valores foram obtidos aos 10,06 dias de idade.

Os resultados evidenciaram que o efeito da adição de níveis crescentes de óleo de linhaça nas rações sobre a concentração do ácido 18:3n-3 no osso cortical da tíbia foi potencializado na fase final de criação. Esse resultado sugere que a incorporação dos ácidos graxos nos tecidos depende do tempo de fornecimento das rações, conforme relatado por Liu & Denbow (2001). Segundo esses autores,

A
 $\hat{Y} = -0,450675 - 0,340102 \cdot I + 0,00948434 \cdot I^2 + 3,07589 \cdot N - 0,325641 \cdot N^2 + 0,0288592 \cdot I \cdot N$; ($R^2 = 0,99$)



B
 $\hat{Y} = 1,04186 - 0,0448425 \cdot I + 0,000709932 \cdot I^2 + 0,0254806 \cdot N$ ($R^2 = 0,99$)

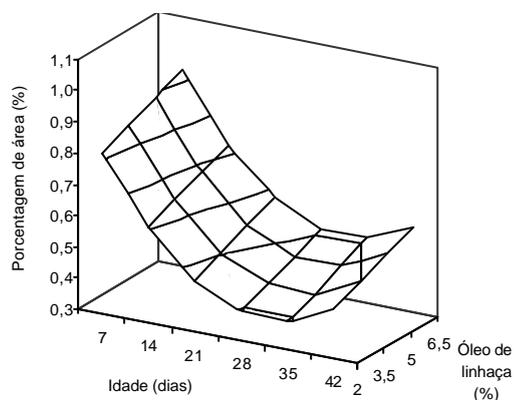
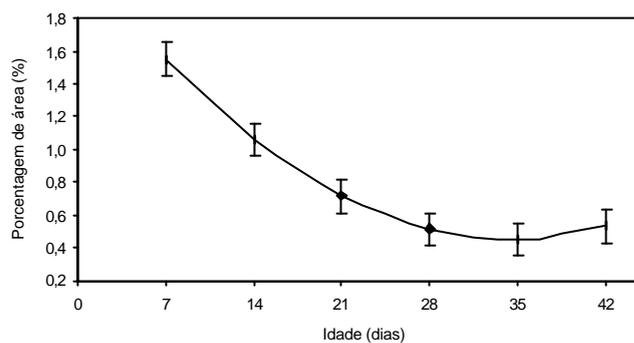


Figura 2 - Porcentagem de área dos ácidos linolênico, 18:3n-3 (A), e eicosapentaenóico, 20:5n-3 (B), determinada na tíbia de frangos de corte, no período de 1 a 42 dias de idade (dados obtidos em relação aos lipídios totais). I = idade; N = nível de óleo de linhaça.

A
 $\hat{Y} = 2,17609 - 0,0998392 \cdot I + 0,00144382 \cdot I^2$ ($R^2 = 0,99$)



B
 $\hat{Y} = 0,497392 - 0,0066275 \cdot I - 0,0154051 \cdot N$ ($R^2 = 0,99$)

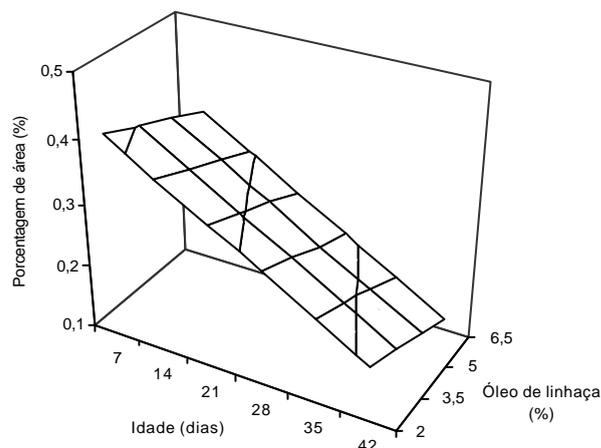


Figura 3 - Porcentagem de área dos ácidos docosapentaenóico, 22:5n-3 (A), e docosahexaenóico, 22:6n-3 (B), determinada na tíbia de frangos de corte no período de 1 a 42 dias de idade (dados obtidos em relação aos lipídios totais). I = idade; N = nível de óleo de linhaça.

a composição lipídica dos ossos é influenciada pelo perfil de ácidos graxos da ração, contudo, durante o período pós-eclosão, as aves refletem no tecido ósseo o perfil lipídico das rações fornecidas às matrizes por cerca de uma semana, diminuindo com a idade e desaparecendo completamente com duas semanas de idade.

A inclusão de óleo de linhaça às rações promoveu aumento linear ($P < 0,05$) na incorporação do ácido graxo 20:5n-3 (Figura 2B) nos ossos, porém de maneira menos intensa na fase de crescimento das aves, apresentando redução quadrática ($P < 0,05$) com ponto de mínimo estimado aos 31,58 dias de idade.

A concentração do ácido graxo 22:5n-3 não foi influenciada ($P > 0,05$) pela adição de óleo de linhaça às rações (Figura 3A). Entretanto, apresentou comportamento quadrático ($P < 0,05$) ao longo do período de criação, com ponto de mínimo estimado aos 34,57 dias de idade. Para a porcentagem de 22:6n-3 nos ossos das aves, os resultados indicaram redução linear ($P < 0,05$) com o aumento nos níveis de óleo de linhaça às rações e ao longo da idade (Figura 3B).

O comportamento observado para a incorporação dos ácidos graxos 18:3n-3 e 20:5n-3 nos ossos indica que a inclusão mínima de 5,17 e 6,5% de óleo de linhaça nas rações foi suficiente para promover maior incorporação desses ácidos graxos nos ossos das aves, respectivamente. Entretanto, as concentrações máximas de 20:5n-3, 22:5n-3 e 22:6n-3 na tíbia reduziram ao longo da idade.

Esses resultados estão em conformidade com relatos de Rymer & Givens (2005) de que, embora as aves sejam hábeis em sintetizar 20:5n-3 e 22:6n-3 a partir do ácido α -linolênico, nem sempre o aumento na concentração desse precursor na dieta resulta em aumento na incorporação desses ácidos graxos nos tecidos.

A concentração total dos ácidos graxos ômega 6 nas células ósseas foi influenciada de forma linear decrescente ($P < 0,05$) pelo aumento do nível de óleo de linhaça nas rações (Figura 4A). No entanto, a incorporação desses ácidos graxos apresentou comportamento quadrático ($P < 0,05$) com o avanço da idade, com ponto de mínimo estimado aos 19,59 dias de idade.

Para o total de ácidos graxos ômega 3 (Figura 4B), os dados evidenciaram que o ponto de máxima foi obtido aos 14,87 dias com 5,4% de óleo de linhaça nas rações e esse efeito foi mantido em todo o período avaliado. Esse resultado confirma que o efeito dos lipídios provenientes da alimentação materna sobre o perfil de ácidos graxos dos ossos das aves diminui com a idade e que os efeitos se tornam evidentes a partir da segunda semana de idade, conforme discutido por Liu & Denbow (2001).

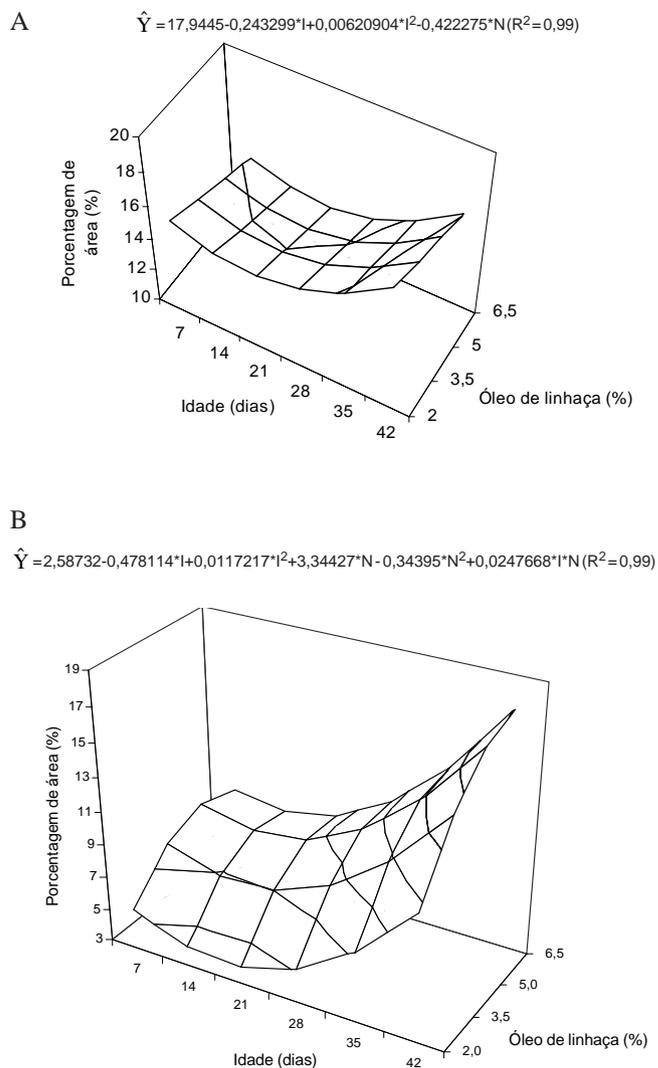


Figura 4 - Total de ácidos graxos ômega 6 (A) e ômega 3 (B) determinado na tíbia de frangos de corte no período de 1 a 42 dias de idade (dados obtidos com base na porcentagem de área de cada ácido graxo em relação aos lipídios totais). I = idade; N = nível de óleo de linhaça.

Esses valores são próximos aos obtidos para o 18:3n-3, pelo fato de esse ácido graxo ter sido incorporado em maior concentração nas células ósseas em comparação aos outros ácidos graxos da série ômega 3 analisados.

Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) na concentração de prostaglandina na tíbia de frangos aos 21 e 42 dias de idade (Tabela 4). Esses resultados diferem dos encontrados por Watkins et al. (1996, 1997) e Liu et al. (2004) em frangos de corte e codornas, respectivamente. Esses autores verificaram que a adição de ácidos graxos ômega 3 às rações reduz a concentração de prostaglandina em culturas de células ósseas.

Tabela 4 - Concentrações médias de prostaglandina E₂ (PGE₂) determinadas na tíbia de frangos de corte alimentados com rações contendo óleo de linhaça na fase de 21 a 42 dias de idade

Óleo de linhaça (%)	Prostaglandina (ng/g osso) ¹	
	21 dias	42 dias
2,0	152,50	86,14
3,5	100,70	119,42
5,0	151,90	102,48
6,5	116,50	69,37

¹Y ~ gamma, em que E(Y_{ij}) = (η)⁻¹

Considerando que a produção de prostaglandina nos ossos pode ser alterada pela inibição competitiva dos ácidos graxos 20:5n-3 e 22:6n-3 pela oxigenação do ácido araquidônico por meio da enzima ciclooxigenase (Watkins et al., 2003), ao avaliar o perfil de ácidos graxos nos ossos, observou-se redução na concentração de 20:4n-6 com a adição crescente de óleo de linhaça às rações, contudo, os valores encontrados, tanto para esse ácido graxo quanto para 20:5n-3 e 22:6n-3, foram inferiores aos relatados na literatura. Além disso, as rações experimentais foram elaboradas com outros ingredientes (antioxidantes, vitaminas e minerais) que também podem influenciar a formação dos eicosanóides, como as prostaglandinas (Sardesai, 1992).

Embora vários componentes localizados possam agir sobre as células ósseas, as prostaglandinas são os principais mediadores da função celular óssea, uma vez que sua biossíntese e liberação pelas células ósseas e tecidos associados podem ser induzidas por várias citocinas e fatores sistêmicos (Watkins et al., 2001), contudo, a síntese de prostaglandina é regulada pela disponibilidade de substrato, atividade das enzimas envolvidas no processo (fosfolipases A₂ e C, ciclooxigenase e lipoxigenase), tipo de célula e natureza do estímulo (Calder, 1998).

Considerando que as aves foram criadas em condições de campo, outras variáveis podem ter influenciado o metabolismo dos animais e a produção de prostaglandina.

Conclusões

O perfil lipídico das rações reflete sobre o perfil de ácidos graxos das células ósseas em frangos de corte, entretanto, esse efeito é mais evidente a partir da segunda semana de idade. O aumento do nível de óleo de linhaça nas rações promove redução linear na concentração do 20:4n-6 nas células ósseas, contudo, essa redução diminui ao longo da idade. A inclusão mínima de 5,17 e 6,5% de óleo de linhaça nas rações é suficiente para promover maior

incorporação dos ácidos graxos 18:3n-3 e 20:5n-3, respectivamente, nos ossos de frangos no período de 1 a 42 dias de idade. Entretanto, as concentrações máximas de 20:5n-3, 22:5n-3 e 22:6n-3 na tíbia reduzem ao longo da idade. A inclusão de até 6,5% de óleo de linhaça às rações de frangos de corte não influencia a concentração de prostaglandina nos ossos aos 21 e 42 dias de idade.

Literatura Citada

- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BOUDREAU, M.D.; CHANMUGAM, P.S.; HART, S.B. et al. Lack of dose response by different levels of dietary n-3 fatty acids at a constant n-3/n-6 fatty acid ratio in suppressing eicosanoid biosynthesis from arachidonic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, p.111-116, 1991.
- CALDER, P.C. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.467-490, 1998.
- GARG, M.L.; THOMSON, A.B.R.; CLANDININ, M.T. Interactions of saturated, n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids to modulate arachidonic acid metabolism. **Journal of Lipid Research**, v.31, p.271-277, 1990.
- GONZALES, E.; MENDONÇA JR., C.X. Problemas locomotores em frangos de corte. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 7., 2006, Chapecó. **Anais... Chapecó: Embrapa Suínos e Aves**, 2006. p.79-94.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. **Animal and vegetable fats and oils: preparation of methyl esters of fatty acids** (Method ISO 5509). Geneve: ISO, 1978. p.1-6.
- KRATZER, F.H.; VOHRA, P. [1996] **The use of flaxseed as a poultry feedstuff** Disponível em: <http://animalscience.ucdavis.edu/avian/pfs21.htm> Acesso em: 17/3/2005.
- LI, Y.; WATKINS, B.A. Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E₂ biosynthesis in rats n-6 or n-3 fatty acids. **Lipids**, v.33, n.4, p.417-425, 1998.
- LIU, D. **The effects of dietary lipids on bone chemical, mechanical, and histological properties in japanese quail (Coturnix c. japonica)**. 2000. 148 f. Thesis (Doctor of Philosophy in Animal and Poultry Sciences - Nutrition and Physiology) - Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, 2000.
- LIU, D.; DENBOW, D.M. Maternal dietary lipids modify composition of bone lipids and ex vivo prostaglandin E₂ production in early postnatal Japanese quail. **Poultry Science**, v.80, n.9, p.1344-1352, 2001.
- LIU, D.; VEIT, H.P.; DENBOW, D.M. Effects of long-term dietary lipids on matures bone mineral content, collagen, crosslinks, and prostaglandin E₂ production in Japanese quail. **Poultry Science**, v.83, p.1876-1883, 2004.
- LÓPEZ-FERRER, S.; BAUCCELLS, M.D.; BARROETA, A.C. et al. N-3 enrichment of chicken meat. 2. Use of precursors of long-chain polyunsaturated fatty acids: linseed oil. **Poultry Science**, v.80, p.753-761, 2001.
- NELDER, J.A.; WEDDERBURN, W.M. Generalized linear models. **Journal Royal Statistic Society**, v.135, n.3, p.370-384, 1972.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2005. 186p.
- RYMER, C.; GIVENS, D.I. N-3 fatty acid enrichment of edible tissue of poultry: a review. **Lipids**, v.40, n.2, p.121-130, 2005.

- SARDESAL, V.M. Biochemical and nutritional aspects of eicosanoids. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.3, p.562-579, 1992.
- WATKINS, B.A. [2003]. **Longitudinal growth and modeling of bone**. Disponível em: <http://www.novusint.com/Public/Library/Techpaper.asp?ID=9ift.confex.com/ift/200/techprogram/paper_4941.htm>. Acesso em: 12/2/2006.
- WATKINS, B.A. [2004]. **Essential fatty acids in poultry nutrition: their importance, metabolic and physiological significance and feeding considerations**. Disponível em: <www.novusint.com/Public/Library/DocViewer.asp?ID=94>. Acesso em: 14/9/2006.
- WATKINS, B.A.; SHEN, C.; ALLEN, K.G.D. et al. Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated and acetylsalicylic acid alter *ex vivo* PGE₂ biosynthesis, tissue IGF-I levels, and bone morphometry in chicks. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.11, n.9, p.1321-1332, 1996.
- WATKINS, B.A.; SHEN, C.; McMURTRY, J.P. et al. Dietary lipids modulate bone prostaglandin E₂ production, insulin-like growth factor – I concentration and formation rate in chicks. **Journal of Nutrition**, v.127, n.6, p.1084-1091, 1997.
- WATKINS, B.A.; LI, Y.; ALLEN, K.G.D. et al. Dietary ratio of (n-6)/(n-3) polyunsaturated fatty acids alters the fatty acid composition of bone compartments and biomarkers of bone formation in rats. **Journal of Nutrition**, v.130, n.9, p.2274-2284, 2000.
- WATKINS, B.A.; LI, Y.; LIPPMAN, H.E. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and skeletal health. **Journal of Experimental Medicine**, v.226, n.6, p.485-497, 2001.
- WATKINS, B.A.; LI, Y.; LIPPMAN, H.E. et al. Modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on osteoblast function and bone metabolism. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.68, p.387-398, 2003.
- YALCIN, S.; ÖZKAN, S.; COSKUNER, E. et al. Effects of strain, maternal age and sex on morphological characteristics and composition of tibial bone in broilers. **British Poultry Science**, v.42, n.2, p.184-190, 2001.