

**RITA DE CÁSSIA STAMPINI OLIVEIRA LOPES**

**AVALIAÇÃO DE FÊMURES DE FRANGOS DE CORTE  
ALIMENTADOS COM FARELO DE RESÍDUO DE MANGA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa como  
parte das exigências do Programa de Pós –  
Graduação em Bioquímica Agrícola para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

RITA DE CÁSSIA STAMPINI OLIVEIRA LOPES

**AVALIAÇÃO DE FÊMURES DE FRANGOS DE CORTE  
ALIMENTADOS COM FARELO DE RESÍDUO DE MANGA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa como  
parte das exigências do programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica Agrícola para  
obtenção do título e *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2009

---

Professor Luiz Fernando Teixeira Albino  
(Co-orientador)

---

Professora Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo

---

Professora Marli Lourdes de Oliveira

---

Professora Tânia Toledo de Oliveira

---

Prof. George Henrique Kling de Moraes  
(Orientador)

Ao meu marido Marco Antônio,  
Pelo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos de nossas vidas.

Aos meus filhos, Felipe e Jéssica,  
Fontes de inúmeras surpresas e alegrias infinitas

Aos meus pais, Adão e Aparecida,  
Que sempre me deram à oportunidade de estudar

Aos meus irmãos, Renato e Rosângela,  
Pelo incentivo e apoio

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

Dalai Lama

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, pela presença constante em minha vida.

Ao meu esposo, Marco Antônio, que desde o início colocou o meu estudo acima das suas necessidades.

Aos meus filhos, Felipe e Jéssica, que souberam entender os meus momentos de ausência.

Aos meus pais, Adão e Aparecida, que sempre acreditaram na minha capacidade e se esforçaram ao máximo para a minha formação.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de participar do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola.

Ao professor George Henrique Kling de Moraes, e aos co-orientadores Valéria Monteze Guimarães, Luiz Fernando Teixeira Albino e Conrado de Souza Rodrigues, pela amizade, orientação e confiança.

Aos membros da banca pela honra da presença e oportunidade de enriquecimento do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial ao amigo Jefferson Dias, do Laboratório de Bioquímica Animal, Eduardo Monteiro, da Secretaria da Pós-graduação em Bioquímica Agrícola e José Geraldo, do Laboratório de Biofármacos, pela amizade, colaboração e incentivo.

À amiga Solange Bigonha, que vem dividindo comigo todos os momentos de dificuldades desde o início do mestrado,

Aos amigos Anderson Barbosa, Elisa Müller e Patrícia Fontes Vieira, que estiveram sempre dispostos a me ajudar, independente de dia e hora e ao Igor Monteze, que foi presença marcante durante o período de laboratório.

OBRIGADA!!!!!!!!!!!!

## **BIOGRAFIA**

Rita de Cássia Stampini Oliveira Lopes, filha de Adão Gomes de Oliveira e Maria Aparecida Stampini, nascida em 10 de janeiro de 1975 na cidade de Visconde do Rio Branco, Minas Gerais.

Em fevereiro de 1990 iniciou o segundo grau no Colégio Universitário de Viçosa (COLUNI), concluindo os estudos em dezembro de 1992.

Em março de 1995 iniciou o curso de graduação em Nutrição, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, colando grau em agosto de 1999.

Em 2002 recebeu o título de especialista em Nutrição e Saúde, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2007 iniciou o curso de mestrado em Bioquímica Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de tese em julho de 2009.

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Tecido ósseo	03
2.1.1. Células do tecido ósseo	08
2.1.2. Formação e crescimento ósseo	10
2.1.3 Mineralização óssea	12
2.1.4 Fatores que influenciam o desenvolvimento e a resistência óssea	13
2.1.5. Métodos de avaliação óssea	14
2.1.5.1. Densitometria óssea	15
2.1.5.2. Ultrassonografia	16
2.1.5.3. Tomografia computadorizada quantitativa (TCQ)	16
2.1.5.4. Ressonância magnética	16
2.1.5.5. Marcadores bioquímicos	17
2.1.5.6. Testes biomecânicos	17
2.2. Manga	18
2.2.1 Constituintes do resíduo da manga	19
2.3. Taninos	20
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivos gerais	24
3.2. Objetivos específicos	24

4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Local de Trabalho	25
4.2. Animais, instalações e manejo	25
4.3. Tratamentos e rações	26
4.4. Análises experimentais	26
4.5. Variáveis analisadas	26
4.5.1. Aspectos mecânicos	29
4.5.2. Aspectos químicos	32
4.5.3. Aspectos bioquímicos	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Aspectos físicos da composição óssea	35
5.2. Aspectos químicos da composição óssea	38
5.3. Aspectos mecânicos da composição óssea	42
5.4. Aspectos bioquímicos da composição óssea	44
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
APÊNDICE	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Média das temperaturas, mínima e máxima, registrada no interior da instalação durante o período experimental.	25
<b>Tabela 2</b> - Composição das rações para o período de 1 a 21 dias de idade das aves	27
<b>Tabela 3</b> - Composição das rações para o período de 22 a 42 dias de idade das aves	28
<b>Tabela 4</b> – Teor de fenólicos totais nas rações	34
<b>Tabela 5</b> – Aspectos físicos dos fêmures das aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM)	35
<b>Tabela 6</b> – Composição química parcial dos fêmures das aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM)	38
<b>Tabela 7</b> – Aspectos mecânicos dos fêmures das aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM)	42
<b>Tabela 8</b> - Composição bioquímica (Proteínas colagenosas - PC e proteínas não colagenosas - PNC) dos fêmures de aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM)	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Corte de osso seco, evidenciando o osso compacto e esponjoso.	03
<b>Figura 2</b> - Ilustração das estruturas encontradas em osso longo.	04
<b>Figura 3</b> - Estrutura química do colágeno do tipo I. (a) Cadeia peptídica; (b) Enovelamento em tripla hélice.	05
<b>Figura 4</b> - Formação do colágeno.	06
<b>Figura 5</b> - Estrutura química do tanino hidrolisável, constituído de um açúcar ligado a radicais, representado aqui pelo ácido gálico.	21
<b>Figura 6</b> - Estrutura química do tanino condensado.	22
<b>Figura 7</b> – Estrutura química do tanino condensado tipo 1 (a) e tipo 2 (b).	22
<b>Figura 8</b> - Equipamento utilizado nos ensaios mecânicos de flexão (a) e detalhe do posicionamento dos ossos durante os ensaios (b).	29
<b>Figura 9</b> – Curva Força versus Deflexão.	30
<b>Figuras 10</b> - Variáveis geométricas determinadas na seção transversal do fêmur, considerando-o uma elipse oca.	30
<b>Figura 11</b> - Esquema da pesagem de massa submersa utilizada nas determinações de densidade e porosidade.	32
<b>Figura 12</b> – Variação do peso dos fêmures das aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM).	36
<b>Figura 13</b> – Variação da densidade e porosidade dos fêmures das aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM).	37
<b>Figura 14</b> – Variação dos teores de cinzas dos fêmures de aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM).	39
<b>Figura 15</b> – Variação da porcentagem de minerais nas aves de 14 dias de idade alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM).	41
<b>Figura 16</b> – Variação da tenacidade da flexão nos fêmures das aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM).	44

**Figura 17** – Variação das porcentagens de proteína colagenosa nos fêmures de aves alimentada com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM). 46

**Figura 18** – Variação das porcentagens de proteína não colagenosa nos fêmures de aves alimentada com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM). 48

## RESUMO

LOPES, Rita de Cássia Stampini Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Avaliação de fêmures de frangos de corte alimentados com farelo de resíduo de manga**. Orientador: George Henrique Kling de Moraes. Co-orientadores: Valéria Monteze Guimarães, Luiz Fernando Teixeira Albino e Conrado de Souza Rodrigues.

Visando o aproveitamento do resíduo agroindustrial da manga na alimentação animal, foi realizado um experimento objetivando avaliar fêmures de frangos de corte aos 14, 28 e 42 dias de idade. As aves foram alimentadas com rações à base de milho e farelo de soja contendo 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% de farelo do resíduo de manga (FRM), *Mangifera indica L.*, variedade Ubá. Foram utilizados 600 pintos de um dia machos, Ross, distribuídos em cinco tratamentos com seis repetições de 20 aves por unidade experimental em um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). As aves receberam rações para atender as exigências nutricionais do período inicial (1 a 21 dias) e crescimento (28 a 42 dias). Foram avaliados parâmetros físicos (massa óssea, comprimento, densidade e porosidade), mecânicos (área da seção transversal, momento de inércia, carga máxima na flexão, resistência à flexão e tenacidade), químicos (teores de cinzas e teores de cálcio, fósforo e magnésio nas cinzas e a relação Ca:P nas cinzas) e bioquímicos (teores de proteínas colagenosas ou PC e não colagenosas ou PNC). Os fêmures de frangos de corte de 14 dias de idade apresentaram alterações significativas ( $P < 0,05$ ) nos parâmetros físicos (massa óssea, densidade e porosidade), químicos (cálcio, fósforo e magnésio) e bioquímicos (PC e PNC) com a inclusão de 7,5% e 10% de FRM. Nos frangos de corte de 28 dias de idade os fêmures apresentaram alteração significativa ( $P < 0,05$ ) apenas nos parâmetros bioquímicos (PC e PNC) e nos de 42 dias de idade ocorreu alteração significativa ( $P < 0,05$ ) nos parâmetros químicos (cinzas) e mecânicos (tenacidade). A partir dos dados obtidos conclui-se que o FRM pode ser adicionado à ração de frangos de corte até 5% sem prejudicar o desenvolvimento do fêmur.

## ABSTRACT

LOPES, Rita de Cássia Stampini Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Evaluation of broiler chicken femurs fed with mango residue meal.** Adviser: George Henrique Kling de Moraes. Co-Advisers: Valéria Monteze Guimarães, Luiz Fernando Teixeira Albino e Conrado de Souza Rodrigues.

In order to use mango industry residue to feed chicks, it was conducted an experiment to evaluate femurs at 14, 28 and 42 days of age. 600 day old chicks, male, Ross, were fed corn soybean diets supplemented with 2.5; 5; 7.5 e 10% mango residue meal (MRM), *Mangifera indica L.*, variety Ubá. Chicks were distributed in the above five dietary treatments with six replicates with 20 animals per experimental units in a random experimental design. Diets were formulated to attend the nutritional requirements of the initial period (1 to 21 days) and termination period (22 to 42 days). Parameters evaluated: femur weight, length, density and porosity, transversal section area, moment of inertia, maximum charge, resistance, tenacity, levels of ash and ash calcium, phosphorus and magnesium and ash Ca:P ratio, collagenous proteins (CP) and noncollagenous proteins (NCP). Femur of 14 days old chicks was affected ( $P<0.05$ ) 7.5 and 10% of MRM in respect to weight, density, porosity and levels of ash calcium, phosphorus and magnesium and CP and NCP contents. At 28 days of age CP and NCP contents were influenced and at 42 days of age ash level and tenacity were affected. It was concluded that up to 5% of MRM can be used to feed chicks without affecting the femur development.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América, a produção mundial de carne de frango vem aumentando nos últimos tempos, representando em 2007 um aumento de 6,2% na produção mundial com 68 milhões de toneladas de frangos (ABEF, 2009). No Brasil, a avicultura de corte tem crescido nas últimas três décadas, totalizando em 2007, mais de 52% da produção de carne (ABEF, 2009). Esta produção, que em 2008 atingiu mais de 11 milhões de toneladas, representa um aumento de aproximadamente 6% na produção aviária e mantém o Brasil em terceiro lugar no ranking mundial, ficando atrás somente dos Estados Unidos e China, que apresentaram produção de 16,2 e 11,5 milhões de toneladas, respectivamente (Avisite, 2009). Do total produzido, 32% são destinados ao mercado externo, colocando o Brasil como o maior país exportador de carne de frango, e 68% supre o mercado interno, que em 2008 apresentou um consumo superior de 4,8% em relação a 2007, com um per capita de 38,9 Kg de carne de frango. O aumento desta produção foi influenciado pelos programas de melhoramento genético, que permitiu à indústria avícola comercializar aves mais pesadas em um menor período de tempo. Durante as últimas três décadas o peso vivo aumentou 30% e a idade de abate reduziu 27% (AVIAGEN, 2009). No entanto, a genética, a alimentação inadequada e a presença de fatores antinutricionais na ração, podem influenciar no metabolismo ósseo diminuindo a resistência óssea e trazendo problemas locomotores. Estes tipos de problemas são mais comumente observados durante a metade final do crescimento e são provavelmente em função do aumento de ganho de peso e do desenvolvimento desproporcional do músculo do peito, criando um desbalanço esquelético-biomecânico. Isto resulta em animais com baixo desempenho, rejeição de carcaça, aumento da mortalidade e redução na eficiência da produção comercial. No Brasil, as perdas relacionadas aos problemas de pernas foram estimadas em 12 milhões de quilos de carne anualmente nos abatedouros.

A alimentação é um fator determinante na integridade óssea animal e representa grande parte dos custos na produção avícola. A inclusão de fontes alternativas, como os resíduos gerados pela agroindústria, tem sido explorada, objetivando a diminuição dos custos de produção com redução do preço final do frango de corte ao consumidor e trazendo benefícios ao meio ambiente.

A manga (*Mangifera indica* L.) que pertence à família *Anacardiaceae* é uma fruta tropical com aceitação no mercado nacional e internacional. Muito utilizada na

agroindústria para produção de suco, gera grande quantidade de resíduos, com destino inadequado, que chega a equivaler de 35 a 60% do peso bruto da matéria-prima. A utilização deste resíduo na alimentação animal pode contribuir com a diminuição da poluição ambiental e reduzir custo de produção. Entretanto, a sua utilização na avicultura deve ser avaliada, devido à concentração de compostos fenólicos (taninos), que corresponde a 5,8%. A presença destes compostos pode prejudicar os índices produtivos da atividade, exercendo efeito negativo sobre o desenvolvimento aviário. Vieira et al. (2008) avaliou a viabilidade da inclusão do farelo de resíduo de manga na ração de frango de corte sobre ganho de peso, conversão alimentar e fatores séricos e concluiu que inclusão de até 5% de farelo do resíduo de manga na ração não afeta o desempenho de frangos no período de 1 a 42 dias de idade.

Os taninos são compostos polifenólicos que formam complexos fortes com proteínas e outras macromoléculas, e por isso são considerados como fatores antinutricionais. Também, inibem algumas enzimas digestivas e diminuem absorção de nutrientes devido à formação de complexos com íons divalentes de metais ( $\text{Ca}^{++}$ ) e provocam erosão de células epiteliais do intestino. Estudos realizados com dietas contendo elevados teores de tanino (sorgo) verificaram diminuição no crescimento e conversão alimentar de frangos, bem como aumento de anormalidades ósseas em pernas.

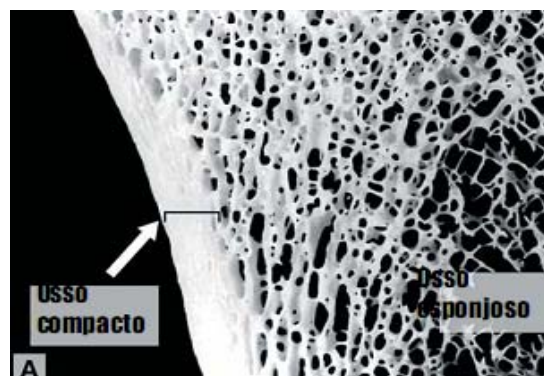
Os estudos sobre a utilização de resíduos de manga na alimentação animal ainda são escassos, mas o aumento no incentivo de pesquisas neste segmento pode surgir trazendo benefícios à saúde animal, ao custo de produção e ao impacto ambiental.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

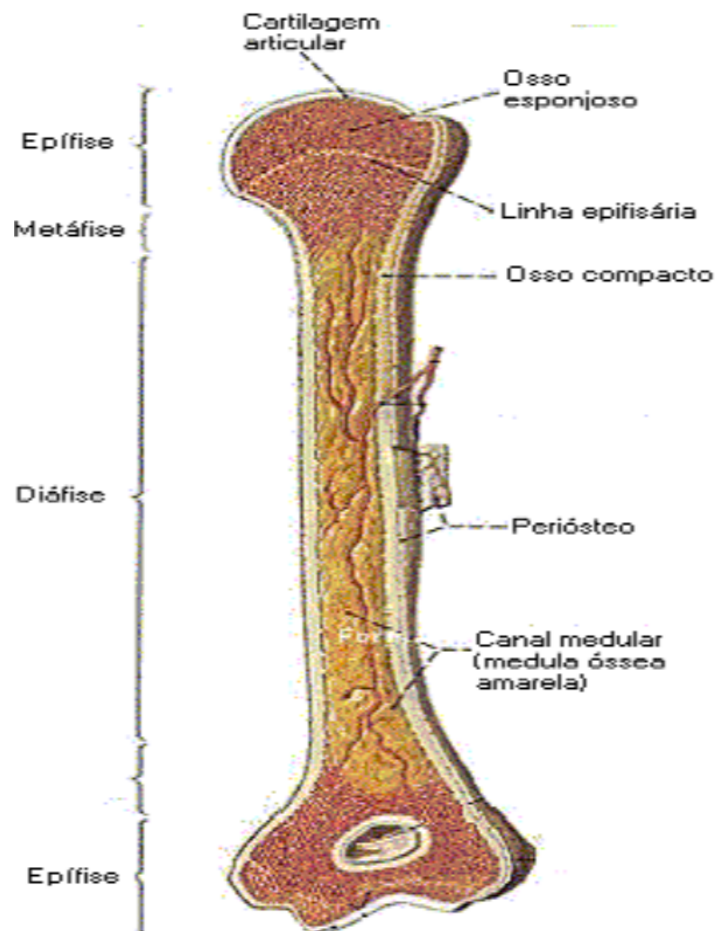
### 2.1. Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, dinâmico, vascular formado por uma matriz orgânica mineralizada e por uma população heterogênea de células (Watkins & Seifert, 2000). Possui funções mecânicas, biológicas e químicas diversas, como o armazenamento e proteção de células, sustentação estrutural e o controle da homeostase mineral (Rho et al., 1998).

Os ossos podem ser divididos em ossos longos (fêmur), chatos (esterno), irregulares (vértebras) e curtos (tarsos). Podem ser classificados como osso esponjoso ou trabecular, de estrutura esponjosa que corresponde a 20% do esqueleto; e osso compacto ou cortical, osso duro e denso que compõe 80% do esqueleto (Figura 1) (Martins & Dempster, 1998). Nos ossos longos as extremidades ou epífises são formadas por osso trabecular envolvido por uma fina camada compacta, e a diáfise, que é a parte cilíndrica, é formada quase que na sua totalidade de osso compacto, possuindo apenas na sua região mais interna uma pequena quantidade de osso trabecular, delimitando o canal medular (Junqueira & Carneiro, 2004). Os ossos longos são delimitados externamente pelo perióstio, que é formado por tecido conjuntivo denso, fibroso em sua parte externa e rico em células osteoprogenitoras e vasos sanguíneos na parte interna, é importante durante o crescimento e reparo de fraturas; e internamente, pelo endóstio, geralmente constituído por uma camada de células osteogênicas achatadas, revestindo o canal medular, conforme pode ser visualizado na Figura 2 (Martins & Dempster; 1998 e Pizauro Jr, 2002).



**Figura 1** - Corte de osso seco, evidenciando o osso compacto e esponjoso.  
Adaptado de Junqueira & Carneiro (2004).

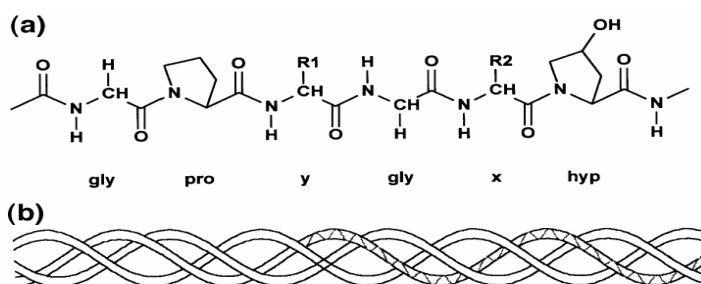


**Figura 2** - Ilustração das estruturas encontradas em osso longo. Fonte: Avancini de Brito & Favaretto (1997).

O osso é constituído de 70% de minerais, 22% de proteína e 8% de água, distribuídos pela matriz (Pizauro Jr, 2002). A matriz orgânica é responsável pela elasticidade do osso e representa 25% da massa seca e é formada por 95% de fibras de colágeno (com elevado conteúdo dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina) e 5% de proteoglicanas e proteínas não colagenosas (Currey, 1998; Marks Jr. & Hermey, 1996). Os componentes inorgânicos, que são responsáveis pela rigidez, representam 75% do peso seco, e são compostos formados por fosfato de cálcio e carbonato de cálcio. Os minerais estão presentes como uma mistura de cristais de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_3$ , fosfato de cálcio amorfo e outros materiais. Outros elementos químicos como magnésio, sódio, potássio, hidróxido, fluoreto, estrôncio, zinco, rádio,

cloreto e sulfato estão presentes em pequenas quantidades. A deposição destes sais complexos fortalece grandemente a estrutura óssea (Currey, 1998).

O colágeno é uma proteína fibrosa, encontrado em todos os tecidos do corpo e é sintetizado por fibroblastos e células relacionadas, tais como os condroblastos da cartilagem e os osteoblastos do osso. Foram identificados 20 tipos diferentes de colágenos que possuem diferentes especificidades entre os diversos tecidos animais (Young, 2003). Na cartilagem há o predomínio do colágeno fibrilar tipo II, enquanto que o osso é composto de colágeno fibrilar tipo I, podendo os dois tipos ser encontrados em tecidos sujeitos ao estresse de compressão e tensão. Caracterizado por uma tripla hélice o colágeno pode variar de 600 a 3.000 aminoácidos com seqüências repetidas de Glicina-X-Y, onde X e Y frequentemente é prolina e hidroxiprolina, conforme a Figura 3 (Veleman, 2000). A composição primária do colágeno de diferentes espécies contém, em média, 35,0% de glicina, 12,0% de prolina, 11,0% de alanina e 9,0% de hidroxiprolina (Freitas, 2002).



**Figura 3** - Estrutura química do colágeno do tipo I. (a) Cadeia peptídica; (b) Enovelamento em tripla hélice. Fonte: Friess, 1998.

A síntese do colágeno inicia-se no retículo endoplasmático rugoso das células produtoras, como o fibroblasto e o osteoblasto, na forma de procolágeno. A hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina, que ocorre após a formação do procolágeno e vai ser responsável pela estabilidade da tripla hélice, requer a presença de vitamina C como co-fator. Lançado no espaço extracelular ocorre o surgimento do tropocolágeno, após a remoção de extremidades não helicoidais conhecidas como telopeptídeos, que vão se agregar para a formação das fibras colágenas (Kierszenbaum, 2004). Depois de sintetizado, o colágeno forma uma rede fibrilar na matriz extracelular que é estabilizada pela formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares, formadas tanto enzimaticamente quanto não enzimaticamente, por condensação de resíduos de aminoácidos (Figura 4). As ligações cruzadas são responsáveis pela estabilização da

molécula e das fibras de colágeno e pela modulação das propriedades de resistência à tração conferida ao osso pelo colágeno, conferindo força ao tecido para suportar tais pressões (Veleman, 2000).

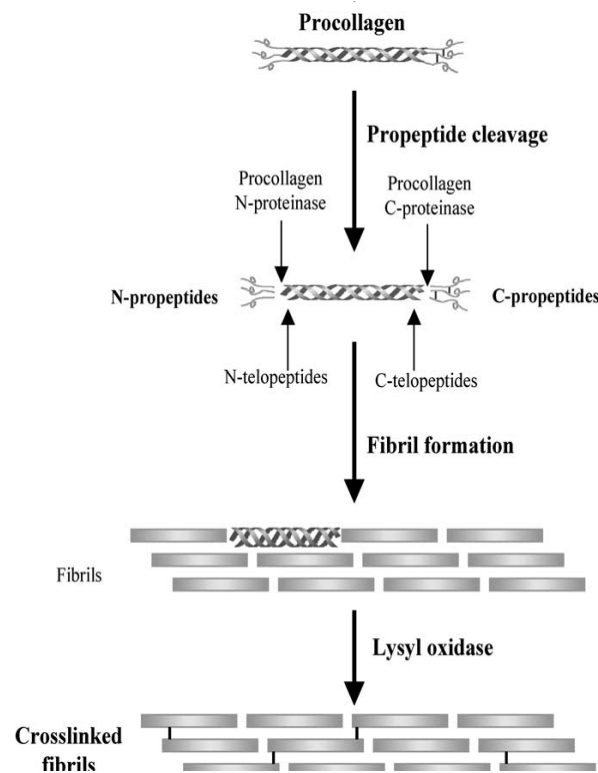


Figura 4 – Formação do colágeno. Fonte: Viguet-Carrin, 2006.

Proteoglicanos são macromoléculas caracterizadas por apresentar em sua estrutura protéica principal, ligações covalentes com moléculas de carboidratos conhecidos como glicosaminoglicanos (Gundberg, 2003). Glicosaminoglicanos são polímeros de dissacarídeos sulfurados que possui carga negativa responsável pela interação iônica com a água, importante na estrutura e formação do colágeno (Velleman, 2000)

Dentre as proteínas totais, as proteínas não colagenosas têm múltiplas funções nas células do osso, como a regulação da mineralização das fibras de colágeno, e a modulação da divisão, migração, diferenciação e maturação celular (Young, 2003). Dentre estas proteínas, têm-se como destaque algumas proteínas plasmáticas que foram sequestradas pela matriz mineral e outras proteínas específicas do osso, sendo que a principal é a osteocalcina ou Gla-proteína que corresponde a 10,0 a 20,0% do total de proteínas não colagenosas ou a 1,0% do total da proteína do osso (Hauschka et al., 1975). A osteocalcina é uma proteína de baixo peso molecular, formada por 49

aminoácidos, sintetizada pelos osteoblastos e incorporada à matriz óssea extracelular (Saraiva & Lazaretti-Castro, 2002). A sua síntese é regulada diretamente pela 1,25-di-hidroxi-vitamina D. A vitamina K é também necessária como co-fator essencial na formação dos resíduos de  $\gamma$ -carboxiglutâmico, aminoácido resultante da reação de carboxilação pós-traducional do resíduo glutamil. Estes resíduos de  $\gamma$ -carboxiglutâmico conferem à proteína a sua capacidade de ligar-se aos cristais de hidroxiapatita controlando o processo de mineralização da matriz óssea já formada (Saraiva & Lazaretti-Castro, 2002). Uma pequena fração de osteocalcina não é incorporada ao osso, mas liberada na circulação, podendo ser utilizada como medida de formação e de crescimento ósseo, assim como elevação do “turnover” ósseo (Oliveira et al., 2006). A osteonectina é uma glicoproteína fosforilada específica do osso com 32.000 daltons, representa 23% das PNC. Ela apresenta alta afinidade pelo cálcio, hidroxiapatita e colágeno tipo I (Raif & Harmand, 1993). Alguns trabalhos têm sugerido que a osteonectina é uma proteína tecido-específica, ligando a fase mineral e o colágeno do osso, talvez iniciando a mineralização ativa em tecidos esqueléticos normais (Fujisawa et al., 1996), e parece atuar como regulador negativo do crescimento do cristal (Roach, 1994).

O cálcio é um dos íons mais importantes do sistema ósseo, sendo que 99% do total existente no organismo são encontrados no tecido ósseo (Simões, 2009). Nas aves, o cálcio atua na formação e manutenção dos ossos, formação da casca do ovo, como ativador de sistemas enzimáticos, coadjuvante na secreção de alguns hormônios e regulando a contração muscular, transmissão do impulso nervoso, coagulação sanguínea e adesão celular. Devido a esta grande utilização encontra-se sempre em transição entre o plasma e os ossos (Macari et.al., 2002; Underwood & Suttle, 1999). O seu controle homeostático é mantido pela ação dos hormônios 1,25-di-hidroxi-colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>), calcitonina e hormônio da paratireóide (PTH), que controlam sua absorção, excreção e o metabolismo ósseo (Henry, 1995). Na fase de crescimento, o processo de calcificação dos ossos é mais intenso, por isso o conteúdo de cálcio aumenta de maneira rápida nos primeiros dias de vida de uma ave, chegando ao final do primeiro mês a 80% do total de cálcio da ave adulta. Uma suplementação mineral inadequada ou a não disponibilidade do cálcio dietético durante a fase de crescimento das aves, terá como consequência um desequilíbrio na homeostase mineral e desenvolvimento ósseo inadequado. No entanto, o cálcio em excesso pode dificultar a

absorção de alguns minerais tais como ferro, cobre, zinco, magnésio, sódio, potássio, entre outros (Smith & Kabaja, 1984; Waldroup, 1996).

Assim como o cálcio, o fósforo é importante no desenvolvimento ósseo animal. Juntos, eles formam o principal constituinte da matriz inorgânica, a hidroxiapatita (Henry, 1995). O fósforo atua na formação da estrutura óssea, participa da formação de membranas celulares, é componente dos ácidos nucleicos envolvidos no crescimento e na diferenciação celular, participa na manutenção do equilíbrio osmótico e eletrolítico, é essencial para utilização e transferência de energia (na forma de ATP), necessário para a formação dos fosfolípidos, ao transporte de gorduras e a síntese de aminoácidos e proteínas (Runho et al, 2001). Seus níveis sanguíneos, que também são controlados pelo PTH, vitamina D e calcitonina (Macari et al., 2002), em excesso, pode promover a síntese da fosfatase alcalina pelos osteoblastos, estimulando o processo de mineralização óssea ao mesmo tempo que atua a nível de osteoclastos, diminuindo a liberação da fosfatase ácida, que são responsáveis pela degradação do tecido ósseo (Christenson, 1997)

O cálcio e fósforo, no organismo, interagem de tal forma, que a deficiência ou excesso de um deles pode prejudicar a utilização do outro. Assim, a relação Ca:P deve ser mantida dentro de um nível adequado, que segundo Scott et al. (1982) deve ser de 2:1 em frangos de corte, podendo ocorrer pouca variação. Segundo Williams et al. (2000), esta relação é variável conforme a idade do animal, podendo variar de 1,82:1 à 3,89:1.

### **2.1.1. Células do tecido ósseo**

As células fundamentais do osso são: os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Estas são responsáveis pela síntese e mineralização da matriz óssea e são determinantes para os fatores químicos, geométricos e resistência do osso (Rath et al., 2000).

Os osteoblastos são células do tecido esquelético responsáveis pela síntese e regulação da matriz orgânica do osso (Junqueira & Carneiro, 2004). Participam do processo de mineralização óssea através da secreção da fosfatase alcalina (Ross & Rowrel, 1993), que atua na clivagem do pirofosfato, removendo, assim, sua influência estabilizadora e aumentando a concentração local de fosfato através da sua atuação sobre a hexose mono fosfato, produto derivado da quebra do glicogênio, promovendo a

crystalização óssea (Jonhson, 2000 e Pizauro Jr, 2002). Possui participação indireta no processo de reabsorção óssea por secretar fatores como interleucina-6 e prostaglandina E, que estimulam os osteoclastos (Duplomb et al., 2007). Os osteoblastos secretam matriz orgânica intercelular ao seu redor e ao redor dos prolongamentos citoplasmáticos que atuam como moldes para a formação de futuros canalículos. Estes canalículos têm como função fornecer um meio de comunicação entre os osteoblastos adjacentes e a superfície do osso que está sendo formada, permitindo a passagem de fluidos dos vasos capilares para o tecido ósseo, troca de nutrientes entre as células da matriz e a matriz intercelular bem como a troca de nutrientes entre matriz, fluido do osso e fluido extracelular (Marks Jr. & Hermey, 1996; Duplomb et al., 2007).

Os osteócitos são as células mais abundantes do osso, encontradas no interior da matriz óssea, achatadas, provenientes da transformação dos osteoblastos, encontradas no interior da matriz óssea. Cada osteócito ocupa um espaço, ou lacuna, dentro da matriz da qual partem canalículos ou prolongamentos que estabelecem contato com as células adjacentes através de junções comunicantes (Junqueira e Carneiro, 2004). É responsável pela manutenção da matriz óssea, pois possui a capacidade de sintetizar e reabsorver a matriz óssea em uma extensão limitada (Pizauro Jr, 2002).

Os osteoclastos são células polinucleadas móveis, gigantes e ramificadas, formados pela fusão de precursores mononucleados da superfície óssea, oriundos da medula óssea e conhecidos como pré-osteoclastos. São células de origem hemopoiética e pertencem à família de monócitos-macrófagos. Responsáveis pela reabsorção óssea, estas células liberam ácidos e enzimas colagenases e hidrolases que atuam digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os sais de cálcio (Mundy, 1999; Junqueira & Carneiro, 2004). No animal adulto, essas células são responsáveis pela remodelação e, se necessário, elas mantêm as exigências de cálcio necessário para a homeostase (Duplomb et al., 2007).

Além destes três tipos celulares, existem ainda as células osteoprogenitoras ou pré-osteoblastos que são células derivadas do mesênquima que estão em repouso e são capazes de divisão, podendo posteriormente se diferenciar em osteoblastos. São encontradas na porção interna do periósteo, no endósteo e nos canais ósseos que contêm vasos sanguíneos (Sommerfeldt & Rubin, 2001).

### **2.1.2. Formação e crescimento ósseo**

A formação do tecido ósseo pode ocorrer através de dois processos distintos: ossificação endocondral, onde a cartilagem serve como molde para a formação do tecido ósseo e é responsável pela formação e crescimento de ossos curtos e longos (Junqueira & carneiro, 2004); ou ossificação intramembranosa que ocorre pela diferenciação direta de células mesenquimais em osteoblastos, que depositam matriz orgânica no interior de uma membrana conjuntiva (Watkins & Seifert, 2000). É um processo que ocorre sem a participação de cartilagens, originando os ossos chatos e o crescimento em espessura dos ossos longos (Junqueira & carneiro, 2004).

O processo de ossificação intramembranosa acontece durante o desenvolvimento embrionário e inicia-se pela diferenciação de células mesenquimatosas em osteoblastos, que vão ser responsáveis pela síntese de osteóide no mesênquima e pelo aparecimento dos osteócitos (Junqueira e Carneiro, 2004). No caso dos ossos longos, a ossificação intramembranosa vai ser responsável pelo aparecimento do centro primário de ossificação na parte central do osso e vai crescer radialmente, produzindo uma rede de trabéculas ósseas (Guyton, 1997).

O processo de ossificação endocondral ocorre através de placas de crescimento, formadas por condrócitos e matriz extracelular, rica em proteoglicana e colágeno tipoII, onde os condrócitos estão organizados de acordo com o seu estágio de maturação (Farquharson & Jefferies, 2000). O processo ocorre em dois estágios, onde primeiro há redução e mineralização da matriz cartilaginosa, assim como proliferação e morte dos condrócitos por apoptose, deixando cavidades, que em seguida serão preenchidas por capilares sanguíneos e células osteogênicas que se diferenciam em osteoblastos que depositam matriz óssea sobre a cartilagem calcificada, transformando tecido cartilaginoso em tecido ósseo (Junqueira & Carneiro, 2004). A formação do tecido ósseo pela ossificação endocondral durante o desenvolvimento dentro do ovo é baixa. Após a eclosão, o crescimento passa de 3% no primeiro dia de vida para 20% ao dia no quinto dia, mantendo-se assim durante os primeiros 15 dias de vida (Dibner et al., 2007 e Dell'isola et al., 2003), O processo de ossificação endocondral pode ocorrer em menos de 24 horas, durante o pico de crescimento dos frangos de corte (Murakami, 2000).

O crescimento compreende o desenvolvimento de toda estrutura esquelética, tanto na largura quanto no comprimento (Barros et al., 2008). Devido a isso, os núcleos de ossificação se desenvolvem no centro e também nas extremidades dos ossos longos em

formação. Ao iniciar a ossificação, a diáfise se desenvolve longitudinalmente no centro pela ossificação intramembranosa e a epífise se desenvolvem em cada extremidade, não simultaneamente, através da ossificação endocondral (Dellmann & Eurell, 1998; Junqueira & Carneiro, 2004). Durante a formação óssea, anatomicamente, aparecem zonas de crescimento, que se distinguem pelo teor de modificações na cartilagem e pelos estágios de maturação dos condrócitos (Junqueira & Carneiro, 2004; Pizauro Jr., 2002):

- Zona de reserva: contém condrócitos aparentemente dispersos e inativos; e não há nenhuma alteração morfológica na cartilagem;
- Zona de proliferação: divisões rápidas dos condrócitos, oriundos das células progenitoras. O tempo de vida de um condrócito, entre o seu nascimento na zona proliferativa e morte na zona hipertrófica, é de aproximadamente três dias em aves de crescimento rápido;
- Zona de maturação: região onde os condrócitos passam de uma fase de pós-divisão a um estado de maturação. Caracterizado por uma fase de intensa síntese e secreção de matriz, e pelo aparecimento da enzima fosfatase alcalina.
- A zona hipertrófica: contém condrócitos volumosos e depósitos de glicogênio e lipídeos. Matriz reduzida a tabiques delgados. Início da apoptose dos condrócitos.
- Zona de calcificação: mineralização dos tabiques delgados da matriz cartilaginosa. Término da apoptose dos condrócitos.
- Zona de ossificação: região onde aparece tecido ósseo.

O fim do crescimento longitudinal do osso varia de acordo com a espécie e ocorre quando a cartilagem se torna cada vez mais delgada e a epífise e a metáfise se fundem. Segundo Rath et al., 2000, o crescimento longitudinal dos ossos de frango, continua até a 25 semana de vida.

O modelamento do osso é um processo adaptativo, responsável pelo aumento da resistência óssea, pelo ganho de massa e corresponde principalmente ao tamanho ósseo (Barros et al., 2008). Ocorre associado ao crescimento e termina quando a maturidade óssea é alcançada (Watkins & Seifert, 2000)

A remodelagem é o termo usado para descrever processos de reabsorção e formação de tecido mineralizado, responsável pela manutenção do esqueleto pela manutenção da massa óssea e da morfologia nas aves adultas (Tardin, 1995) e ocorre

devido a presença de unidades multicelulares básicas, como o osteoclasto e osteoblasto. O fenômeno é um processo contínuo que compreende dois mecanismos sucessivos: primeiramente ocorre a reabsorção, feita pelos osteoclastos, e em seguida a formação óssea, realizada pelos osteoblastos (Seeman, 2008). Os osteoblastos são responsáveis pelo depósito da nova matriz óssea, que se torna subsequentemente mineralizada (Watkins & Seifert, 2000). Em situações fisiológicas, a reabsorção e a formação são fenômenos acoplados e dependentes, e o predomínio de um sobre o outro e a concentração de cálcio, pode resultar em ganho ou perda de massa óssea (Saraiva & Lazaretti-Castro, 2002), por isso a manutenção de concentrações adequadas de cálcio no sangue é prioritária sobre a manutenção da integridade estrutural do osso (Johnson, 2000). O processo de remodelamento é regulado por hormônios e por fatores de crescimento produzidos em vários tecidos e células e podem ter atividades autócrinas ou parácrinas (Canalis et al., 1998). Os hormônios envolvidos na formação óssea incluem insulina, hormônio de crescimento e estrogênio, e os que estão envolvidos na reabsorção 1,25-dihidroxicolicalciferol (vitamina D3), PTH, hormônio da tireóide e glicocorticóide. O PTH estimula a reabsorção óssea ativando os osteoclastos, quando o nível de Ca no sangue está baixo. A calcitonina atua inversamente, inibindo a reabsorção óssea (Watkins & Seifert, 2000).

### **2.1.3 Mineralização óssea**

O processo de mineralização se inicia pela produção e liberação de vesículas extracelulares, ricas em fosfatase alcalina, pelos osteoblastos (Junqueira & Carneiro, 2004). O cálcio é transportado para dentro da vesícula através de canais de cálcio presentes na membrana. No interior das vesículas ele se liga aos lipídeos de membrana e as proteínas ligadoras. A fosfatase alcalina fornece o fósforo através da sua atuação sobre a hexose monofosfato, produto derivado da quebra do glicogênio. O aumento do produto iônico cálcio versus fósforo provoca a precipitação do fosfato de cálcio e a formação de cristais na forma de pequenas agulhas ou bastões. O acúmulo destes cristais rompe as membranas das vesículas e extravasam para o meio extracelular, provocando assim o crescimento dos cristais (Pizauro Jr, 2002). A forma do sal cristalino depositado sobre a matriz orgânica do osso é constituído principalmente de cálcio e fósforo na forma de hidroxiapatita (Junqueira & Carneiro, 2004).

#### **2.1.4 Fatores que influenciam o desenvolvimento e a resistência óssea.**

A resistência do osso é modulada pelos constituintes da matriz extracelular, sendo o colágeno responsável pela tenacidade e os minerais pela elasticidade do tecido ósseo (Velleman, 2000; Rath et al., 2000). Está diretamente relacionada com crescimento, sendo que o crescimento atinge seu máximo primeiro que a maturidade óssea (Rath et al., 1999).

Vários fatores afetam diretamente o crescimento e desenvolvimento normal do tecido ósseo, e conseqüentemente a resistência óssea. Dentre estes fatores destaca-se: fatores endócrinos, genética, sexo, idade, nutrientes (toxinas, antinutrientes, deficiências e imbalances), infecções e estresses, presença de patógenos, micotoxinas e doenças (Cook, 2000; Rath et al., 2000).

Fatores endócrinos são os fatores inerentes ao próprio animal. Dentre estes se destacam os hormônios sistêmicos, principalmente o PTH, 1,25(OH)2D3, calcitonina, estrogênios, glicocorticóides e retinóis. Dentre os fatores de ação local destacam-se as interleucinas, fatores de crescimento (tais como o IGF-I e II), prostaglandinas (especialmente a PGE2), neuropeptídeos e citoquinas (Price & Russel, 1992).

Fatores exógenos são fatores externos, que podem ser alterados durante a criação das aves e que são essenciais para o ótimo crescimento dos animais. A genética, um dos fatores exógenos, contribui para o aumento da taxa de má formação óssea em frangos, porque está voltada para o alto ganho de massa e elevadas taxas de crescimento com redução no tempo de abate (Bizeray et al., 2002). Com o melhoramento genético, houve um desenvolvimento desproporcional do músculo do peito, além de diminuir a proporção dos músculos e ossos da perna, criando um desbalanço esquelético-biomecânico, provocando disfunções estruturais e dor, comprometendo assim a locomoção normal das aves (Nestor et al., 1985; Lilburn, 1994).

O sexo e idade são fatores determinantes da resistência óssea. Com relação à idade, em seres humanos ocorre diminuição da força de resistência, principalmente em mulheres após o período de menopausa, tornado os ossos mais fracos e quebradiços. Mas em aves são poucos os dados sobre as mudanças ósseas relacionadas com a idade óssea. O sexo pode influenciar o crescimento e a resistência óssea devido a diferenças hormonais entre machos e fêmeas. Aves da mesma idade, porém de sexos diferentes apresentaram diferentes diâmetros de diáfise, com as fêmeas demonstrando sempre um

valor menor (Rath et al., 1999). Estudos realizados por Rose et al. (1996) e Barbosa (2005) demonstraram que fêmeas crescem menos e apresentam ossos menores por possuírem taxa de crescimento menor que os machos, mas apresentam menor porosidade e maiores teores de cinzas, conseqüentemente maior resistência óssea diminuindo a incidência de problema de pernas.

Infecções e estresse podem ser fatores de risco para a integridade óssea levando à fragilidade. Embora os elementos estruturais possam contribuir muito para a maturidade e a resistência do osso, eles podem ser afetados em condições adversas alterando o metabolismo normal do osso. Infecções ósseas tais como osteomielite e osteonecrose causam perda óssea levando à fragilidade óssea (Rath et al., 2000).

A nutrição desempenha um papel essencial para a obtenção de um tecido ósseo de alta qualidade. Dentre os nutrientes o cálcio e fósforo são os principais formadores da matriz mineral (Rath et al., 2000). Durante as últimas décadas, interesses têm sido focados no estudo do papel da vitamina D, cálcio, fósforo, cloro, zinco, cobre, cisteína, homocisteína e ácidos graxos, sobre o desenvolvimento ósseo das aves (Edwards, 2000), fornecendo uma base de recomendações específicas para estes nutrientes, principalmente, Ca e P na dieta de frangos de corte. O controle da homeostase de cálcio é uma importante força motora na manutenção da resistência óssea, uma baixa concentração pode aumentar os níveis de reabsorção óssea, diminuindo a resistência. A deficiência de Ca em aves não está relacionada à alimentação, e sim a problemas de má absorção que podem estar associada à presença de fatores antinutricionais, como o fitato, celulose e taninos, que se complexam com o cálcio, deixando-o indisponível à absorção intestinal. A suplementação adequada de vitamina D na alimentação pode ser útil para facilitar a absorção de Ca (Perry et al., 1991). Além de vitamina D, vitaminas B6, C, K e são determinantes para a saúde óssea devido ao seu envolvimento na síntese de constituintes da matriz, como o colágeno e osteocalcina, e a formação das ligações cruzadas do colágeno (Weber, 1999).

### **2.1.5 Métodos de avaliação óssea**

Existem diversas tecnologias para se avaliar a integridade óssea e uma única metodologia não deve ser utilizada como critério exclusivo no diagnóstico de deformidades ósseas. As informações obtidas nos diferentes métodos são

complementares e fornecem um diagnóstico mais completo sobre a estrutura, conteúdo mineral e resistência dos ossos (Mazzuco, 2005).

A determinação da integridade óssea muitas vezes utiliza técnicas invasivas como os testes biomecânicos (resistência de quebra), cinzas dos ossos e análise mineral das cinzas. Estas técnicas exigem que o animal seja sacrificado (eutanásia) para retirada dos ossos além da necessidade de maior número de animais para se obter amostragem significativa. No entanto são determinações de baixo custo, que não exige a utilização de aparelhos sofisticados.

Dentre as metodologias utilizadas, destaca-se:

#### **2.1.5.1. Densitometria óssea**

A densidade mineral é a massa de material ósseo, tanto orgânico quanto inorgânico, mensurada por volume, e depende da absorção de radiação pelo esqueleto, provendo medidas quantitativas expressas em g/cm<sup>2</sup> (Silva, 2003). Devido ao fato de a matriz inorgânica ser o principal componente da matriz óssea extracelular, a densidade mineral óssea reflete o status da mineralização do esqueleto. Sua acurácia é medida em termos do coeficiente de variação (CV) entre o peso das cinzas ósseas e o peso do conteúdo mineral ósseo (osso intacto) registrado pelo densitômetro (Hailey et al., 1996).

Dentre os métodos densitométricos, destaca-se o de absorciometria de energia dupla de raios X (DEXA), que é capaz de medir partes centrais do esqueleto (coluna e fêmur). Tem acurácia diagnóstica alta e dose de radiação baixa, quando comparadas aos outros métodos (Silva, 2003). Quando se utiliza a tecnologia DEXA para acessar a densidade mineral óssea em aves é necessário entender que qualquer perda de osso estrutural que ocorre com o envelhecimento pode ser mascarada pela formação do osso medular (Hester et al., 2004)

Diferenças quantitativas na densidade e conteúdo mineral ósseo foram detectadas acuradamente por Schreiweis et al. (2003) em aves alimentadas com dietas deficientes em cálcio através da tecnologia DEXA. Poedeiras comerciais submetidas à muda induzida e monitoradas pelo DEXA mostraram integridade óssea reduzida quando comparadas com aves controle, não induzidas à muda (Mazzuco, 2005). Um aumento na mineralização da tibia de poedeiras durante o segundo ciclo de produção foi detectado através da densitometria óssea; o componente medular da tibia muito

provavelmente contribuiu para esse aumento no conteúdo mineral (Mazzuco & Hester, 2005).

#### **2.1.5.2. Ultrassonografia**

É uma técnica relativamente nova e não mede a densidade mineral óssea propriamente. Quanto à capacidade de prever fraturas, as tentativas de comparação da sensibilidade do ultra-som com a da DEXA, para a coluna e fêmur, indicam que o ultra-som é menos sensível que a DEXA. Também o risco relativo de fratura ajustado por idade associado a um decréscimo no valor do parâmetro é menor na densitometria por ultra-som do que na densitometria por DEXA (Silva, 2003).

#### **2.1.5.3. Tomografia computadorizada quantitativa (TCQ)**

É uma técnica onde a tomografia computadorizada é aplicada à medida da absorção de raios X, pela utilização de um programa especial, utilizada na determinação de frações específicas dos ossos, uma vez que considera a distribuição das diferentes densidades minerais nos ossos (Silva, 2003). Uma das suas principais vantagens é o fato de que frações de osso cortical e trabecular (junto com o osso medular) podem ser mensuradas separadamente. A massa óssea presente em determinado segmento do esqueleto é expressa em  $\text{g/cm}^3$  (densidade volumétrica) diferindo da tecnologia DEXA (Mazzuco e Hester, 2005).

Utilizando a técnica TCQ, Riczu et al. (2004) mostraram que linhagens de poedeiras de ovos vermelhos preservaram mais o segmento cortical do esqueleto comparado com aves de postura comercial de ovos brancos, uma vez que o segmento medular dos ossos das primeiras foi mobilizado mais frequentemente durante a postura.

#### **2.1.5.4. Ressonância magnética**

O exame de Ressonância Magnética é um método de diagnóstico por imagem que não utiliza radiação e permite retratar imagens de alta definição dos órgãos de seu corpo. Tem como vantagem evidenciar tanto osso, como cartilagem e partes moles, sendo muito útil para o estudo de algumas fraturas complexas, principalmente no cotovelo, joelho e coluna. Entretanto, não é um exame rotineiro (Haddad et al., 2005).

#### **2.1.5.5. Marcadores bioquímicos**

Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo são substâncias encontradas no sangue, que retratam a formação e a reabsorção óssea, medindo a atividade de ação dos osteoblastos em diferentes estágios de diferenciação e dos osteoclastos. Os principais marcadores da formação óssea são: fosfatase alcalina, osteocalcina, propeptídeos do prócolagênio tipo I, hidroxiprolina, entre outros. O uso destes marcadores em combinação com outras técnicas tem sido empregado na prevenção do risco de fraturas decorrente da perda de massa óssea (Vieira, 1999 e Mazzuco, 2005)

#### **2.1.5.6. Testes biomecânicos**

A fragilidade óssea pode ser definida como susceptibilidade do osso a fraturas. De maneira mais específica pode-se dizer que o grau de fragilidade óssea pode ser monitorado conhecendo-se as propriedades estruturais e materiais dos ossos (Mazzuco, 2005). Parâmetros biomecânicos como resistência à quebra, módulo de elasticidade e tenacidade, são mensurados através de ensaios realizados pela área da engenharia, como os de tração, compressão e flexão com procedimentos padronizados pela Sociedade Americana de Engenharia Agrícola (ANSI/ASAE S459-98), e que se baseiam na quantidade e na qualidade relativa de colágeno, água e mineral do osso. (Turner & Burr, 1993 e Currey, 2003a).

O ensaio de flexão, o mais utilizado para ossos cilindros como o fêmur, mede a capacidade do osso em resistir à fratura através de uma força aplicada no centro ósseo. A força de quebra depende da forma e tamanho ósseo, além dos constituintes ósseos (Turner & Burr, 1993). Neste ensaio o osso é colocado sobre dois apoios com distância definida, para que seja aplicada continuamente no seu ponto médio, uma carga crescente fazendo com que o osso sofra deflexão até a sua quebra. O comportamento ósseo gera uma sucessão de pares de dados que são utilizados para traçar a curva de carregamento e deformação, de onde são determinadas suas propriedades mecânicas (Barbosa, 2005). Currey (2003b) demonstrou que quanto maior a quantidade de minerais, maior será a rigidez do osso, porém, o osso mais fica frágil, mais susceptível às pequenas trincas. Por isso, sugere que as diferenças observadas nas propriedades mecânicas do osso são determinadas pelo seu conteúdo mineral.

## 2.2 Manga

O Brasil destaca-se com um dos maiores produtores mundiais de frutas, com produção superior a 43 milhões de toneladas (IBRAF, 2009). Dentre as frutas de maior poder econômico, a manga em 2008, apresentou uma produção estimada de 1,27 milhões de toneladas contribuindo com 90 milhões de dólares em divisas para o país. Deste total, 17,4% é destinado à exportação e 82,6% permanecem no mercado interno, sendo consumida principalmente na forma in natura (Pinto, 2003).

Pertencente à família *Anacardiaceae*, a manga (*mangifera indica* L.) é um dos frutos mais antigos. Originária da Índia foi introduzida no Brasil, pelos portugueses, no século XVI, que iam ao continente Africano em busca de escravos. Depois de um longo período sem desfrutar de maior prestígio, pela fartura com que era encontrada em pomares domésticos, a produção comercial da manga atinge altos índices. Não só pela existência de um mercado interno disposto a remunerá-la adequadamente, desde que tenha boa apresentação e ótimas qualidades para o consumo, como também pelo crescente volume exportado, especialmente para a Europa.

Existem diversas variedades de manga. No Brasil as variedades mais cultivadas são *Bourbon*, *Espada*, *Coqueiro*, *Ouro*, *Tommy Atkins*, *Haden*, *Keitt*, *Palmere* e *Ubá* que são de ampla aceitação no mercado. Em relação ao consumo, a preferência do consumidor é por um fruto com baixa acidez, teores elevados de sólidos solúveis e ausência de fibras (Sugai, 2002). Por isso a comercialização centraliza-se na *Tommy Atkins*, que representa 79% da área plantada (Pinto, 2003).

A Zona da Mata Mineira destaca-se como grande produtora da variedade *Ubá* (*Mangifera indica* L.). É uma manga pequena, com peso médio de 125g, oval, de cor amarelada e fina. A polpa, que representa 70% da fruta é firme, saborosa e suculenta, e suas fibras são finas, curtas e macias. Devido às suas características sensoriais é uma fruta muito utilizada pelas indústrias alimentícias para produção de sucos, polpa e geléia (Ramos et al., 2005).

### 2.2.1 Composição do resíduo da manga

A utilização da manga pela agroindústria gera grande quantidade de resíduos, que equivalem a 35% a 60% do peso bruto da matéria prima (Larrauri et al, 1996). A deposição destes resíduos, que inclui cascas, caroços e frutas descartadas, por razões sanitárias, deve ser feita em locais distantes da unidade de processamento, o que gera aumento no custo de produção além de trazer consequências graves ao ambiente. A utilização destes resíduos como subproduto na alimentação animal poderá contribuir com a diminuição do impacto ambiental, porém sua inclusão deve ser bem avaliada para não atrapalhar o desenvolvimento animal.

A composição química da manga varia com as condições da cultura, variedade, estágio de maturação, e outros fatores, sendo constituídos principalmente de água, carboidratos, ácidos orgânicos, sais minerais, proteínas, vitaminas e pigmentos. Dentre as vitaminas, destacam-se a vitamina A (carotenóides), vitamina C (ácido ascórbico) e pequenas quantidades de vitaminas do complexo B (Cardello & Cardello,1998). No entanto o farelo obtido do resíduo da manga contém baixos teores de lipídios, minerais e proteínas (Vieira et al., 2008), porém é rico em lisina, segundo aminoácido limitante para frangos de corte, e rico também em ácidos graxos insaturados, como o oléico e o linoléico, que são considerados essenciais ao organismo (Sólis-Fuentes & Duran-de-Bázua, 2004 e Joseph, 1995). Vieira et al. (2008) verificaram que o óleo extraído da amêndoa da semente de manga Ubá apresentou 52,7% em ácidos graxos insaturados, com 43,7% de ácido oléico e 9,0% de linoléico. Lipídeos fornecidos na alimentação podem afetar a composição dos fosfolipídios presentes na membrana das vesículas extracelulares, influenciando o processo de mineralização óssea e podem atuar na regulação da modelagem óssea, por servirem de substratos para a síntese de eicosanóides que estão envolvidos na regulação local do crescimento e desenvolvimento ósseo (Watkins et al., 2000).

Segundo Vieira et al. (2008), a fibra é o componente mais abundante do resíduo, pois cascas e envoltórios da semente (epicarpo) são tecidos de revestimento e contêm elevados teores de celulose, hemicelulose e lignina. Leeson & Summers (2001) afirmam que os polissacarídeos não-amiláceos solúveis, como as hemiceluloses, possuem efeitos negativos sobre a digestibilidade dos nutrientes, devido à capacidade de se ligarem com a água, aumentando a viscosidade do fluído. A celulose por sua vez diminui a

digestibilidade dos nutrientes por reduzirem o tempo de permanência da digesta no trato gastrointestinal (Tavernari et al, 2008).

Ribeiro (2006), estudando a composição da polpa de quatro variedades de manga (Haden, Tommy Atkins, Palmer e Ubá), mostrou que a manga Ubá é superior em antioxidantes como a vitamina C, betacaroteno e compostos fenólicos totais. Foi identificado também, nos resíduos outros antioxidantes como mangiferina, quercetina e kenferol. Estas substâncias são essenciais para formação e metabolismo ósseo, principalmente a vitamina C, que participa da formação das ligações cruzadas do colágeno. Tais ligações cruzadas são as principais responsáveis pela orientação e estabilização da molécula e das fibras de colágeno, conferindo força e resistência tensil ao tecido ósseo (Knott & Bailey, 1998). A quercetina e o kenferol inibem a perda óssea, por afetar a síntese dos osteoclastos e regular vários fatores locais e sistêmicos como hormônios, citocinas inflamatórias e TNF (fator de necrose tumoral) nas células ósseas (Ribeiro, 2006).

Os compostos fenólicos, também presentes no resíduo da manga, são responsáveis pelas suas características sensoriais, como cor e sabor, além de proteger seu conteúdo nutricional. Em baixas concentrações, os compostos fenólicos podem proteger o alimento da deterioração oxidativa. Porém, em altas concentrações, contribuem para a perda de cor do alimento, adstringência e sabor amargo, além de interagir com proteínas, carboidratos e minerais, provocando redução do valor nutricional (Shahidi & Naczk, 1995). De acordo com Ribeiro (2006) e Vieira et al. (2008), a quantidade de fenóis totais encontrada no farelo do resíduo de manga Ubá foi aproximadamente 5,0%. As cascas de mangas contêm diferentes compostos fenólicos, incluindo glicosídeos de flavonóis e de xantonas, galatoninos, derivados de benzofenona e antocianinas (Berardini et al., 2005 e Schieber et al., 2001).

### **2.3 Taninos**

Os ácidos fenólicos, cumarinas e flavonóides, pertencem a uma classe de metabólitos secundários, largamente distribuídos em plantas. Eles contêm pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila, juntamente com outros substituintes (Salunkhe et al., 1990). O grupo de compostos flavonóides, do qual fazem parte os taninos, possui uma estrutura básica de C6-C3-C6 (Deshpande et al., 1986), e em baixas concentrações, contribui para a manutenção das características sensoriais do

alimento, como a aparência, cor, sabor, além de proteger seu conteúdo nutricional (Shahidi & Naczk, 1995).

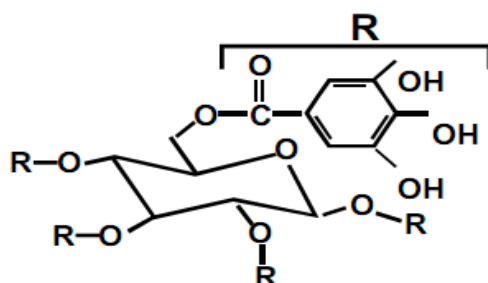
O tanino é encontrado na maioria dos vegetais e podem estar presentes nas raízes, no lenho, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva. O teor e a espécie de tanino variam não só de um vegetal para outro como também de uma parte para outra do mesmo vegetal (Santos, 2000)

Os taninos são compostos polifenólicos grandes, solúveis em água, que formam complexos fortes com proteínas e outras macromoléculas, devido a presença de grupos hidroxila-fenólicos que permite a formação de ligações cruzadas estáveis (Deshpande et al., 1992).

A ligação entre taninos e proteínas ocorre, através de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas. Para a formação destas ligações é necessário que a massa molecular dos taninos esteja compreendida entre 500 a 3000 Da (Monteiro et al., 2005).

Podem ser classificados em hidrolisáveis e não hidrolisáveis. Os taninos hidrolisáveis são unidos por ligações éster-carboxila que são quebradas em condições ácidas ou básicas liberando ácidos fenólicos: gálico, caféico, elágico e um açúcar, sendo geralmente uma D-glicose, que é a sua unidade estrutural básica (Figura 5). Estão presentes em folhas, galhos, cascas e madeiras de várias árvores (Hagerman & Butler, 1981).

Nos monogástrico, os taninos hidrolisáveis podem ser absorvidos e metabolizados, podendo causar efeitos tóxicos. São excretados pela via urinária, exigindo a suplementação de enxofre na forma pura ou via aminoácidos como a metionina para excreção dos seus metabólitos (Mansoori & Acamovic, 2007)



**Figura 5** - Estrutura química do tanino hidrolisável, constituído de um açúcar ligado a radicais, representado aqui pelo ácido gálico. Fonte: Batestin et al. (2004).



Para alguns monogástricos, como os suínos, as aves e os peixes, os taninos condensados afetam o valor nutricional dos alimentos, como consequência da formação de complexos com as proteínas dietéticas, pela formação de complexos com os carboidratos e outras macromoléculas alimentares; pela inibição da atividade de várias enzimas digestivas, pela diminuição da absorção de outros nutrientes através da parede celular, devido à formação de complexos com íons divalentes de metais e pela erosão de células epiteliais do intestino (WARREHAM et al., 1994). Seu grau de toxicidade nas diversas fontes dietéticas depende do tipo (hidrolisável ou condensado), da quantidade presente, no produto final de hidrólise e da espécie animal (Quintero Pinto et al., 2001).

De acordo com Zuanazzi (2000), a capacidade dos taninos de formar complexos com proteínas depende das características físico-químicas das proteínas :

- peso molecular: proteínas com alto peso molecular associam-se mais fortemente aos taninos;
- estrutura: proteínas com estruturas mais abertas e flexíveis têm mais afinidade pelos taninos; proteínas globulares por possuírem uma estrutura mais compacta têm uma menor afinidade com os taninos;
- ponto isoelétrico: a afinidade das proteínas com os taninos é maior no ponto isoelétrico da proteína;
- conteúdo de prolina: proteínas ricas em prolina, são mais lineares, uma vez que este aminoácido não se insere em uma estrutura alfa-hélice aumentando assim, a superfície de contato do polipeptídeo, com maior probabilidade de reação.

A manga possui elevado teor de taninos, encontrados em maior quantidade na amêndoa da semente do que na polpa, e estes taninos conferem efeito antioxidante a esta fruta (Yean Soong & Barlow, 2004). Alguns estudos indicam que a amêndoa da semente de manga pode ser incluída na dieta de espécies monogástricas sem causar efeitos adversos (Okai & Aboagye, 1990). Estudos realizados na Nigéria sugeriram que o caroço de manga, submetido ao cozimento, poderia ser adicionado na dieta de frangos de corte, numa proporção de até 20%, sem efeitos deletérios sobre a performance de crescimento das aves (Joseph & Abolaji, 1997). Estudos utilizando em ratos como modelos, mostraram que o óleo da amêndoa da semente de manga apresenta aspectos nutricionais adequados e é isento de toxicidade (Rukmini & Vijayaraghavan, 1984).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivos gerais**

Desenvolver um estudo sobre a utilização do uso do resíduo da manga na alimentação animal, visando à diminuição do custo de produção, sem atrapalhar o desenvolvimento ósseo animal e à eliminação da poluição ambiental. Além disso, o estudo do desenvolvimento ósseo em aves também poderá servir de base para o entendimento do metabolismo ósseo em humanos, auxiliando no diagnóstico e elucidação de determinadas desordens ósseas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Avaliar aspectos químicos, físicos, mecânicos e bioquímicos de fêmures de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga para verificar influência dos taninos no desenvolvimento ósseo animal. Para obtenção desses resultados, as seguintes etapas foram executadas nos fêmures aos 14, 28 e 42 dias de idade:

1. Determinação dos parâmetros biomecânicos: Carga máxima de ruptura, módulo de ruptura, tenacidade na flexão e momento de inércia;
2. Determinação dos parâmetros físicos: Peso, comprimento, densidade, porosidade e área da seção transversal;
3. Determinação dos parâmetros bioquímicos: Concentrações de proteínas colagenosas e não colagenosas;
4. Determinação dos parâmetros químicos: cinzas, teor de cálcio, fósforo, magnésio e a relação Ca:P.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Locais de trabalho

O trabalho de campo foi conduzido na Granja de Melhoramento de Aves do Departamento de Zootecnia e os ossos coletados foram analisados nos Laboratórios do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa.

### 4.2. Animais, instalações e manejo

Foram utilizados 600 pintos de corte de 1 dia de idade, machos, da linhagem Ross, até o período de 42 dias, com peso médio inicial de 43,0 g. As aves foram pesadas e distribuídas individualmente em cada unidade experimental com o objetivo de obter peso uniforme. As aves foram alojadas em galpão de alvenaria, com pé direito de 3,0 metros, contendo muretas laterais de 0,30 m, cortinas, tela, cobertura com telhas de amianto, piso de cimento e subdividido em 30 boxes de 1,5 x 2,0 m. Para forrar o piso de cimento do aviário, utilizou-se cepilho de maravalha como cama para as aves com espessura de 10 cm. O manejo adotado para a cama consistiu de seu revolvimento frequente para mantê-la sempre com baixo teor de umidade e baixa concentração de amônia. Durante o experimento foi adotado programa de luz contínuo (luz natural + artificial) e o fornecimento de ração e de água foi “*ad libitum*”. Para o registro diário de temperaturas foi utilizado termômetros de máxima e mínima que foram colocados num ponto estratégico na altura das aves em condições de ambiente termoneutro (Tabela 1).

**Tabela 1** - Média das temperaturas, mínima e máxima, registrada no interior da instalação durante o período experimental

Período	Temperatura do ar (°C)	
	Mínima	Máxima
01 a 21 dias	16,5 (15,0)*	26,5 (30,0)*
22 a 42 dias	18,0 (16,0)*	26,5 (28,0)*

\* Valores (máximos) e (mínimos) apresentados durante o período.

### **4.3. Tratamentos e rações**

As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (T<sub>1</sub> - 0%; T<sub>2</sub> - 2,5%; T<sub>3</sub> - 5,0%; T<sub>4</sub> - 7,5% e T<sub>5</sub> - 10,0%) de inclusão do farelo do resíduo de manga - FRM) e seis repetições de vinte aves por unidade experimental. O resíduo da manga constituído de cascas, de caroços e de frutas defeituosas foi obtido numa indústria de sucos. O material foi seco a 60°C e triturado em moinho desintegrador, peneira tipo três, para a obtenção do farelo. As rações foram formuladas para atenderem as exigências das aves de acordo com Rostagno et al. (2005). O FRM foi incluído nas rações, de maneira que todos ficassem isoprotéica e isocalórica (Tabelas 2 e 3).

### **4.4. Análises experimentais**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 2006, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa (2006). Foram feitas análises de variância e de regressão para os tratamentos dentro de cada idade. Para os parâmetros significativos foi realizado o Teste de Dunnett (5% de significância) Para as características mais importantes, foram construídos gráficos de colunas em função da inclusão do FRM.

### **4.5. Variáveis analisadas**

Aos 14, 28 e 42 dias de idade, uma ave de cada repetição com a massa média da unidade experimental foi sacrificada por deslocamento cervical. A seguir os fêmures foram removidos de ambas as pernas, identificados, limpos de todo tecido aderente, pesados em balança analítica e tiveram seus comprimentos medidos com paquímetro (precisão de 0,02m) e congelados a -20 graus para posteriores análises.

**Tabela 2** - Composição das rações para o período de 1 a 21 dias de idade das aves  
(Vieira et al., 2008)

Ingredientes	Níveis de inclusão de FRM (%)				
	0%	2,5%	5,0%	7,5%	10,0%
Farelo do resíduo da manga (FRM)	-	2,5	5,0	7,5	10
Milho (%)	60,110	56,350	52,590	48,830	45,070
Farelo de soja (%)	34,689	35,120	35,540	35,970	36,400
Óleo de soja (%)	1,180	2,020	2,850	3,690	4,520
Fosfato bicálcico (%)	1,815	1,820	1,830	1,830	1,840
Calcário 38% (%)	0,889	0,870	0,860	0,840	0,820
Sal comum (%)	0,494	0,500	0,500	0,500	0,500
DL-Metionina 99% (%)	0,253	0,260	0,270	0,280	0,280
L-Lisina.HCl 99% (%)	0,204	0,200	0,200	0,190	0,190
L-Treonina 99%	0,056	0,060	0,060	0,070	0,070
Salinomicina12% (%)	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Mistura Mineral (%)	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Mistura vitamínica <sup>2</sup> (%)	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Cloreto de colina 60%	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Antioxidante BHT (%)	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
TOTAL	100	100	100	100	100
Composição Calculada					
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.950	2.950	2.950	2.950	2.950
Proteína bruta (%)	21,000	21,000	21,000	21,000	21,000
Cálcio (%)	0,893	0,890	0,890	0,890	0,890
Fósforo disponível (%)	0,446	0,450	0,450	0,450	0,450
Sódio (%)	0,215	0,220	0,210	0,210	0,210
Lisina digestível (%)	1,172	1,170	1,170	1,170	1,170
Metionina digestível (%)	0,5458	0,550	0,550	0,560	0,560
Treonina digestível (%)	0,761	0,760	0,760	0,760	0,760
Fibra bruta (%)	2,917	3,240	3,560	3,890	4,210

<sup>1</sup> Suplemento mineral Roche: Níveis de garantia por quilo do produto: Mn, 16 g; Fe, 100 g; Zn, 100 g; Cu, 20 g; Co, 2,0 g; I, 2 g; e Veículo q.s.p., 1000 g.

<sup>2</sup> Suplemento vitamínico Roche: Níveis de garantia por quilo do produto: Vit. A, 10.000.000 UI; Vit. D<sub>3</sub>, 2.000.000 UI; Vit. E, 30.000 UI; Vit. B<sub>1</sub>, 2 g; Vit. B<sub>6</sub>, 4 g; Ácido pantotênico, 12 g; Biotina, 0,10 g; Vit. K<sub>3</sub>, 3 g; Ácido fólico, 1 g; Ácido nicotínico, 50 g; Vit. B<sub>12</sub>, 15.000 mcg; Se, 0,25 g; e Veículo q. s. p., 1.000 g.

**Tabela 3** - Composição das rações para o período de 22 a 42 dias de idade das aves (Vieira et al., 2008)

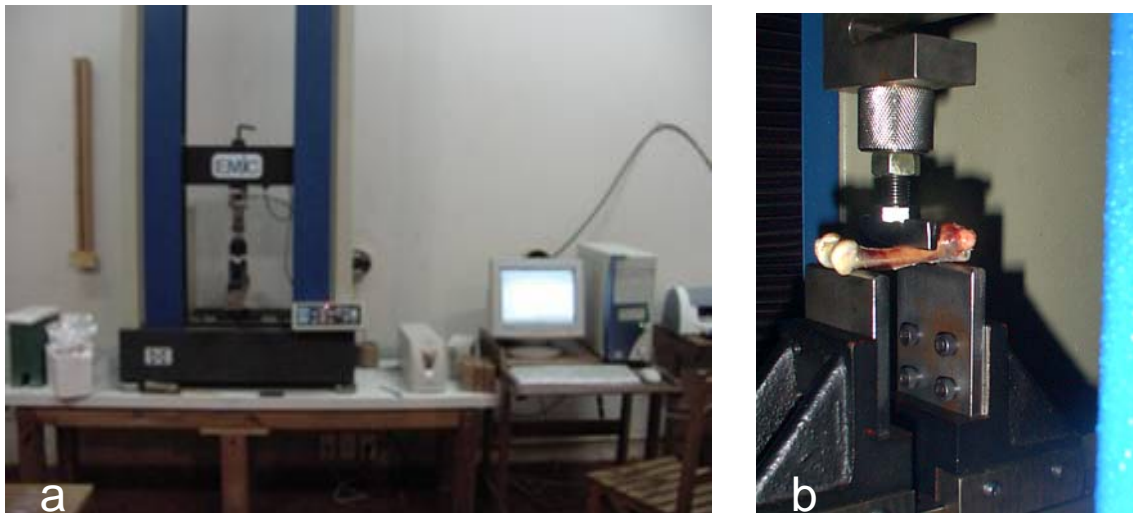
Ingredientes	Níveis de inclusão de FRM (%)				
	0%	2,5%	5,0%	7,5%	10,0%
Farelo do resíduo da manga (FRM)	0	2,5	5,0	7,5	10,0
Milho	65,170	61,380	57,590	53,790	50,000
Farelo de soja	28,550	29,020	29,490	29,960	30,430
Óleo de soja	2,500	2,640	3,700	4,760	5,820
Fosfato bicálcico	1,585	2,280	2,060	1,830	1,610
Calcário (38%)	0,820	0,800	0,790	0,770	0,760
Sal comum	0,457	0,460	0,460	0,460	0,460
DL-Metionina 99%	0,238	0,250	0,250	0,260	0,270
L-Lisina.HCl 99%	0,290	0,280	0,270	0,260	0,250
L-Treonina 99% (%)	0,080	0,080	0,090	0,090	0,090
Salinomicina 12% (%)	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Mistura mineral <sup>1</sup> (%)	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Mistura vitamínica <sup>2</sup> (%)	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Cloreto de colina 60% (%)	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Antioxidante BHT	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
TOTAL	100	100	100	100	100
Composição Calculada					
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.100	3.100	3.100	3.100	3.100
Proteína bruta (%)	18,770	18,770	18,770	18,770	18,770
Cálcio (%)	0,796	0,790	0,790	0,780	0,776
Fósforo disponível (%)	0,397	0,400	0,400	0,400	0,397
Sódio (%)	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
Lisina digestível (%)	1,093	1,090	1,090	1,080	1,077
Metionina digestível (%)	0,503	0,51	0,510	0,520	0,519
Treonina digestível (%)	0,700	0,700	0,700	0,700	0,700
Fibra bruta (%)	2,672	2,980	3,290	3,600	3,911

<sup>1</sup> Suplemento mineral Roche: Níveis de garantia por quilo do produto: Mn, 16 g; Fe, 100 g; Zn, 100 g; Cu, 20 g; Co, 2,0 g; I, 2 g; e Veículo q.s.p., 1000 g.

<sup>2</sup> Suplemento vitamínico Roche: Níveis de garantia por quilo do produto: Vit. A, 10.000.000 UI; Vit. D<sub>3</sub>, 2.000.000 UI; Vit. E, 30.000 UI; Vit. B<sub>1</sub>, 2 g; Vit. B<sub>6</sub>, 4 g; Ácido pantotênico, 12 g; Biotina, 0,10 g; Vit. K<sub>3</sub>, 3 g; Ácido fólico, 1 g; Ácido nicotínico, 50 g; Vit. B<sub>12</sub>, 15.000 mcg; Se, 0,25 g; e Veículo q. s. p., 1.000 g.

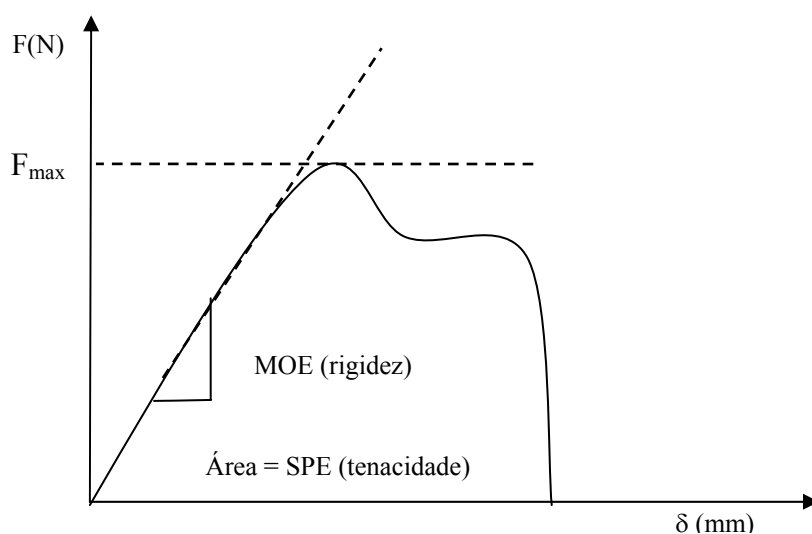
#### 4.5.1. Aspectos mecânicos

Na determinação dos parâmetros biomecânicos, os fêmures das pernas esquerdas foram descongelados até atingir temperatura ambiente e, posteriormente, submetidos a um ensaio de flexão em máquina universal de ensaios mecânicos da marca EMIC, pertencente ao Departamento de Engenharia Florestal, segundo a norma ANSI/ASAE S459-98 (1992) (Figura 8a). Todos os fêmures foram testados na mesma posição, com suas extremidades apoiadas em dois suportes apropriadamente afastados de acordo com seus comprimentos, e a carga sendo aplicada no centro (região da diáfise do osso) a uma velocidade constante de 10 mm/min (Figura 8b). A distância entre os dois suportes variou com a idade testada, acompanhando o aumento do comprimento longitudinal dos ossos.



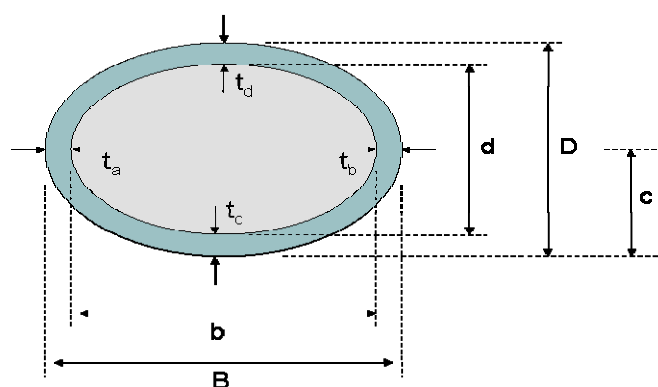
**Figura 8** - Equipamento utilizado nos ensaios mecânicos de flexão (a) e detalhe do posicionamento dos ossos durante os ensaios (b).

Durante a aplicação do carregamento, os pares de pontos carga x deflexão foram continuamente armazenados pelo sistema de aquisição de dados acoplados à máquina de ensaios, resultando na curva carga x deflexão ( $F \times \delta$ ) (Figura 9). A partir desta curva ( $F \times \delta$ ) foram determinados os parâmetros utilizados na caracterização do comportamento mecânico do osso, como módulo de ruptura, carga de ruptura e tenacidade na flexão. Mas para determinação destes parâmetros também foi necessária a determinação das variáveis geométricas empregadas para determinação do momento de inércia e da área da seção transversal do osso, mostradas na Figura 10, considerando-se a seção transversal do osso uma elipse oca.



**Figura 9** – Curva Força versus Deflexão

Na determinação destas variáveis geométricas após os ensaios de flexão, removeu-se a medula óssea com jatos de água destilada, e tomou-se as medidas dos diâmetros e espessura na região da diáfise, onde ocorre a ruptura do osso, com auxílio de um paquímetro (precisão de 0,02 mm).



**Figuras 10** - Variáveis geométricas determinadas na seção transversal do fêmur, considerando-o uma elipse oca. Fonte: Barbosa, 2005.

Na Figura 10, B representa o diâmetro externo correspondente à largura do osso e b o diâmetro interno, D representa o diâmetro externo correspondente à altura da seção transversal, pela disposição do osso no ensaio de flexão e d o diâmetro interno. Para a determinação dos diâmetros internos, foram empregados valores da espessura,  $t_a$ ,  $t_b$ ,  $t_c$  e  $t_d$  medidos no sentido da largura e altura. Utilizando-se as medidas das espessuras, as medidas dos diâmetros internos (b e d) foram calculadas pelas equações 1 e 2. A área da

seção transversal (A) foi determinada pela equação 3 e I é o momento de inércia (m<sup>4</sup>) calculado pela equação 4 (ASAE–Sociedade Americana de engenharia Agrícola):

$$b = B - 2\left(\frac{t_a + t_b}{2}\right) \quad \text{Eq 1}$$

$$d = D - 2\left(\frac{t_c + t_d}{2}\right) \quad \text{Eq 2}$$

$$A = \pi(BD - bd) \quad \text{Eq 3}$$

$$I = 0,049[(B.D^3) - (b.d^3)] \quad \text{Eq 4}$$

A resistência à flexão, ou módulo de ruptura, MOR [Pa ou N/m<sup>2</sup>] é dada pela equação 5 (ASAE):

$$\text{MOR} = \frac{FLc}{4I} \quad \text{Eq 5}$$

Onde: F é a força máxima aplicada [N], L é a distância entre os suportes [m], c é a posição na seção transversal onde a tensão é máxima, ou seja, na face tracionada ou comprimida, cuja medida equivale à metade da altura da seção transversal (1/2 do diâmetro ósseo externo) (Figura 10) e I é o momento de inércia.

A tenacidade na flexão é calculada pela área sob a curva (Figura 9).

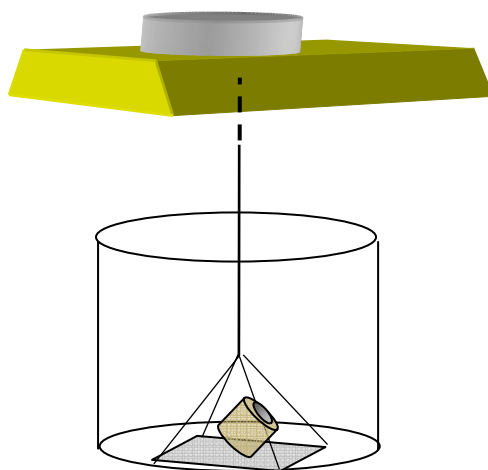
Para a determinação da densidade [d (g/cm<sup>3</sup>)] e porosidade [P (em %)], foi usado o princípio de Arquimedes que relaciona as massas seca, saturada e submersa das amostras (Rath et al, 1999). Foi removida dos fêmures direitos, após serem medidos e pesados, uma porção de aproximadamente 15 mm da região central da diáfise. A medula foi removida com jatos de água destilada e a gordura extraída utilizando-se éter de petróleo (temperatura de ebulição entre 40°C e 60°C), durante 12 horas, em aparelho Soxhlet.

A massa seca, P<sub>sec</sub>, foi determinada após a secagem do osso em estufa a 100°C por 16 horas ou peso constante em pesagens consecutivas. A determinação da massa saturada, P<sub>sat</sub>, foi feita a seguir, após um período de saturação do osso de 24 horas em água destilada. De acordo com as equações 7 e 8, tanto a densidade quanto a porosidade foram calculadas conhecendo-se o volume das amostras [vol (cm<sup>3</sup>)] que, pelo princípio

de Archimedes, é dado pela diferença  $P_{sat}-P_{sub}$  (g). A massa submersa,  $P_{sub}$ , foi obtida com a pesagem do osso saturado imerso em um recipiente com água destilada como mostrado na Figura 11.

$$d = \frac{P_{sec}}{Vol.} = \frac{P_{sec}}{P_{sat} - P_{sub}} \quad \text{Eq 7}$$

$$P = 100 \cdot \frac{Vol_{vazios}}{Vol.} = 100 \cdot \frac{P_{sat} - P_{sec}}{P_{sat} - P_{sub}} \quad \text{Eq 8}$$



**Figura 11** - Esquema da pesagem de massa submersa utilizada nas determinações de densidade e porosidade. Fonte: Reis, 2005.

#### 4.5.2. Aspectos químicos

Na determinação dos teores de cinzas e elementos químicos foram utilizados fragmentos ósseos anteriormente coletados para análise dos parâmetros geométricos devidamente desengordurados. As amostras foram incineradas em forno mufla, a 600°C por 3 horas, resfriadas dentro do dessecador e novamente pesadas. Os resultados foram expressos em termos de porcentagem de cinzas em relação à massa do osso seco e desengordurado (Thorp & Waddington, 1997).

Na determinação dos teores de cálcio e fósforo nas cinzas, 10 mL de ácido clorídrico, 6 mol/L foram adicionados às cinzas obtidas anteriormente após serem resfriadas. Estas amostras, contidas em cadinhos de porcelana, foram colocadas sobre uma placa de aquecimento e a solução foi evaporada até secar completamente. O

resíduo foi, então, dissolvido pela adição de água destilada e deionizada e a solução filtrada em papel filtro em um balão volumétrico de 100 mL (Thorp & Waddington, 1997).

As concentrações de cálcio e de magnésio foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica, comprimento de onda 422,7 nm utilizando-se o equipamento SpectrAA 220 FS da Varian e o fósforo foi determinado espectrofotometricamente, utilizando-se o método vanadato-molibdato (Sarruge & Haag, 1974). Os resultados foram expressos em termos de porcentagem de cada elemento químico em relação à massa de cinzas das amostras, além da relação Ca:P.

#### **4.4.3. Aspectos Bioquímicos**

Os fêmures direitos, utilizados para o teste de flexão, foram cortados longitudinalmente, removeu-se a medula óssea com jatos de água destilada e deionizada e foram desengordurados com éter de petróleo, em aparelho de Soxhlet, por 12 horas, para determinação das concentrações das proteínas não colagenosas e de proteínas colagenosas.

Os fêmures foram desmineralizados extensivamente com solução de sal dissódico de EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) 0,5 mol/L, pH 8,2, de acordo com o método proposto por Hauschka & Gallop (1977), para a extração das Gla-proteínas ósseas ou proteínas não colagenosas (PNC). O fim da extração foi confirmado com o ácido oxálico que permite identificar a desmineralização completa. As proteínas foram quantificadas na solução de EDTA pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Depois de desengordurados e desmineralizados, os fêmures foram lavados exaustivamente com água destilada e deionizada para a extração do excesso de EDTA e secos em estufa a 100°C por 16 horas. A seguir foram usados para determinação do teor de proteína colagenosa, utilizando-se o método de Berthelot modificado por Pezmenk & Nielsen, para estimar o nitrogênio total, com o emprego de fenol cristal, nitroprussiato de sódio, hipoclorito de sódio e, como padrão, o sulfato de amônio anidro. O teor de proteína colagenosa foi obtido multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 6,25.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 4 estão os valores de fenólicos totais encontrados em rações de aves com inclusão de farelo de resíduo de manga (FRM).

**Tabela 4** – Teor de fenólicos totais nas rações. Fonte: Vieira et al., 2008

Níveis de inclusão FRM	(g EAG*/100g <sup>-1</sup> )	
	Ração de 1-21 dias	Ração de 22-42 dias
0%	0,0728	0,0917
2,5%	0,1746	0,2350
5,0%	0,2764	0,3784
7,5%	0,3782	0,5216
10,0%	0,4800	0,6650

\*EAG – Equivalentes de Ácido Gálico.

O conhecimento do teor de fenólicos totais na ração após a inclusão do FRM é importante, visto que estes compostos contribuem para a manutenção das características sensoriais dos alimentos, além de proteger seu conteúdo nutricional. Em baixas concentrações, os compostos fenólicos podem proteger o alimento da deterioração oxidativa. Mas em altas concentrações, contribuem para a perda de cor do alimento, adstringência e sabor amargo, além de reduzir o valor nutricional dos alimentos (Shahidi & Naczk, 1995).

A quantidade de fenólicos totais presentes no farelo do resíduo de manga encontrado por Vieira et al. (2008) foi de 5,8%, semelhante à descrita por Ribeiro (2006). Estudos realizados com amêndoa da semente de manga têm mostrado elevado teor de taninos, correspondente a 5% a 7% (Cheeke, 1991).

A ração apresentou alto teores de fenólico totais com a inclusão de 10% de farelo de resíduo de manga, visto que os seus teores aumentaram cerca de 6,59 a 7,25 vezes, quando comparado com os valores obtidos com as rações sem esse subproduto fornecidas nos períodos de 1 a 21 e 22 a 42 dias, respectivamente (Tabela 4).

### 5.1. Aspectos físicos da composição óssea

Os resultados e os testes de significância, referentes aos aspectos físicos avaliados nas aves aos 14, 28 e 42 dias de idade encontram-se na Tabela 5. Houve influência da inclusão do FRM apenas aos 14 dias de idade no peso, densidade e porosidade do fêmur.

**Tabela 5** – Aspectos físicos dos fêmures das aves alimentadas com farelo de resíduo de manga (FRM)

Parâmetro	Idade (dias)	FRM (%)					F	
		0	2,5	5,0	7,5	10		
Massa (g)	14	2,422 <sup>a</sup>	2,285 <sup>a</sup>	2,296 <sup>a</sup>	2,191 <sup>a</sup>	2,023 <sup>b</sup>	3,45*	Linear
	28	8,349	8,267	8,360	8,366	7,953	0,29 <sup>ns</sup>	
	42	17,033	15,964	16,619	17,352	16,230	2,65 <sup>ns</sup>	
Comprimento (cm)	14	41,387	40,731	40,555	39,853	39,721	2,18 <sup>ns</sup>	
	28	60,980	61,703	61,365	61,201	64,120	0,86 <sup>ns</sup>	
	42	79,712	79,404	78,033	77,690	77,867	1,36 <sup>ns</sup>	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	14	0,883 <sup>a</sup>	0,846 <sup>a</sup>	0,8437 <sup>a</sup>	0,799 <sup>b</sup>	0,838 <sup>a</sup>	3,26*	Quadrática
	28	1,019	1,062	1,023	1,056	1,042	0,72 <sup>ns</sup>	
	42	0,986	0,949	0,972	0,969	0,990	1,21 <sup>ns</sup>	
Porosidade (%)	14	54,852 <sup>a</sup>	54,092 <sup>a</sup>	53,777 <sup>a</sup>	53,151 <sup>a</sup>	57,532 <sup>a</sup>	3,37*	Quadrática
	28	48,549	47,706	49,879	49,301	50,238	0,80 <sup>ns</sup>	
	42	39,728	39,123	39,851	41,439	38,819	1,85 <sup>ns</sup>	
Área (cm <sup>2</sup> )	14	0,177	0,157	0,161	0,145	0,143	1,90 <sup>ns</sup>	
	28	0,443	0,440	0,440	0,439	0,409	0,54 <sup>ns</sup>	
	42	0,574	0,604	0,588	0,624	0,533	2,23 <sup>ns</sup>	

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

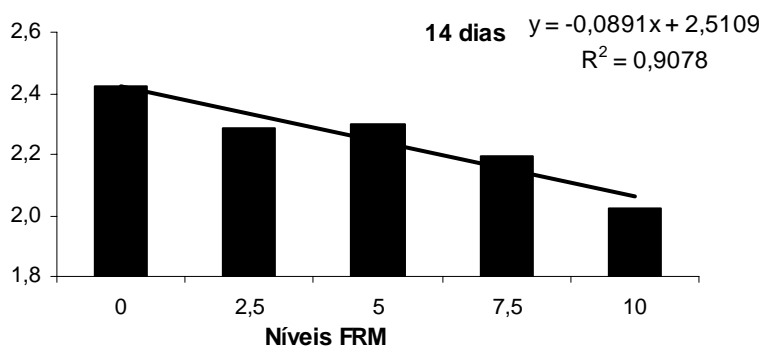
Médias seguidas pela letra b indicam que os tratamentos diferiram do tratamento controle (T1) pelo Teste de Dunnett a 5%.

As massas dos fêmures apresentaram modelo linear ( $P < 0,05$ ) aos 14 dias de idade (Figura 12). Foi observada diminuição das massas com a inclusão do FRM. A menor massa observada foi nas aves que receberam 10% de FRM com uma redução estimada de 35,48% em relação ao tratamento controle.

Os pintinhos aos 14 dias de idade apresentam tecido ósseo imaturo, onde persistem cones de cartilagem em ossos longos, sem presença de ossificação (Riddell, 1981) e necessitam de aminoácidos para síntese de colágeno na cartilagem. A inclusão de 10% do FRM aumentou o conteúdo em taninos na ração (Tabela 4),

podendo ter ocorrido efeitos antinutricionais. Os taninos complexam com proteínas da dieta e, conseqüentemente, prejudicam a digestibilidade e a absorção dos aminoácidos (Ravindran et al., 1996). Assim, menor quantidade de aminoácidos poderá ser disponibilizada para a síntese de proteínas interferindo na formação do tecido ósseo e seu peso.

Aos 28 e aos 42 dias de idade, a massa não foi afetada ( $P>0,05$ ) pelos níveis de inclusão, assim a inclusão de até 10% não prejudicou a massa óssea. Este resultado manteve conformidade com Joseph & Abolaji (1997) quando testaram a inclusão da farinha da semente da manga na ração de frangos de corte e não observaram alterações locomotoras em até 10% de inclusão.



**Figura 12** – Variação da massa dos fêmures das aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM).

O crescimento dos ossos longos é regulado por interações entre o potencial genético, fatores ambientais, nutrição e fatores antinutricionais presentes na dieta (Watkins, 1993). Neste trabalho, a presença de taninos nas rações experimentais não foi fator determinante para afetar o crescimento dos fêmures das aves em nenhuma das idades testadas ( $P>0,05$ ) (Tabela 5).

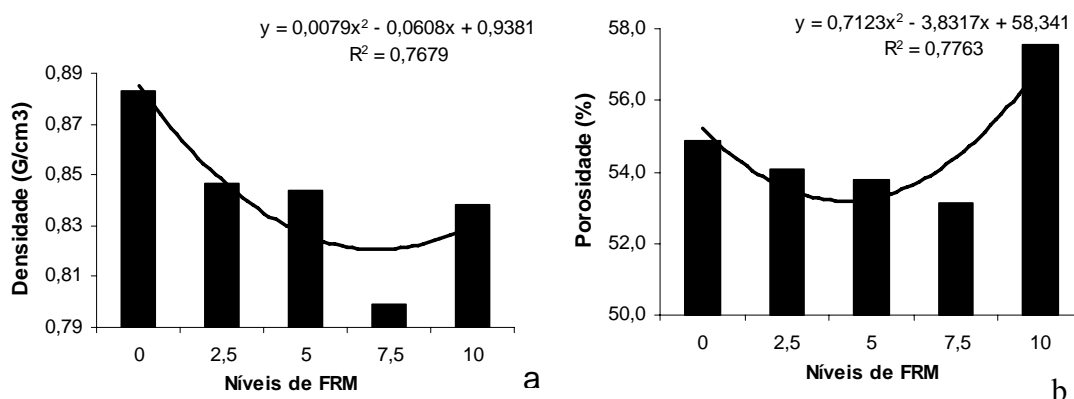
Densidade e porosidade dos fêmures das aves aos 14 dias de idade apresentaram modelo quadrático ( $P<0,05$ ) (Figura 13). Estes dois parâmetros estão relacionados com a quantidade de cinzas presentes nos ossos, ou seja, ossos com maior quantidade de cinzas terão maior densidade e menor porosidade (Rath et al., 2009).

A densidade reduziu a medida que reduziu o teor de cinzas do fêmur (Tabela 6). O menor resultado foi obtido nas aves alimentadas com 7,5% de FRM com redução

estimada de 1,24% em relação ao tratamento controle, diferindo negativamente pelo Teste de Dunnett (Tabela 5).

A porosidade foi indiretamente proporcional ao teor de cinzas (Tabela 6). O maior valor observado foi com a inclusão de 10% do FRM, com aumento estimado de 56,41% em relação ao tratamento controle. Apesar de ter sido um parâmetro significativo, nenhum dos tratamentos diferiu do tratamento controle pelo Teste de Dunnett.

Aos 28 e aos 42 dias de idade, a inclusão do FRM não interferiu ( $P>0,05$ ) nos valores de densidade e de porosidade, sugerindo que a concentração de tanino na ração não interferiu no processo de mineralização óssea (Tabela 5).



**Figura 13** – Variação da densidade (a) e porosidade (b) dos fêmures das aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM).

Em frangos de corte a presença do tanino está intimamente relacionada a problemas de pernas, devido à interação com proteínas e minerais (Elkin et al.,1978). No presente trabalho, no que se refere aos aspectos físicos, não foi observado o agravamento destes problemas de pernas relacionados à inclusão do FRM nas idades de 28 e de 42 dias de idade.

## 5.2. Aspectos químicos da composição óssea

Os resultados e os testes de significância, referentes aos aspectos químicos avaliados nos fêmures das aves aos 14, 28 e 42 dias de idade encontram-se na Tabela 6. Houve influência da inclusão do FRM nas aves aos 14 dias de idade nas concentrações de cálcio, fósforo e magnésio. Na idade de 42 dias a influência foi apenas para o teor de cinzas.

**Tabela 6** – Composição química parcial dos fêmures das aves alimentadas com diferentes níveis de farinha de resíduo de manga (FRM)

Parâmetro	Idade (dias)	FRM (%)					F	Modelo
		0	2,5	5,0	7,5	10		
Cinzas (%)	14	57,4836	53,7359	52,8002	52,9367	50,6305	0,623 <sup>ns</sup>	Linear
	28	57,8281	58,2487	57,9649	57,7645	58,2209	0,009 <sup>ns</sup>	
	42	59,0179 <sup>a</sup>	58,2316 <sup>a</sup>	58,7217 <sup>a</sup>	56,4134 <sup>b</sup>	55,1807 <sup>b</sup>	11,477*	
Cálcio (%)	14	31,0231 <sup>a</sup>	29,8563 <sup>a</sup>	31,6509 <sup>a</sup>	38,6627 <sup>a</sup>	48,7042 <sup>b</sup>	6,942*	Quadrático
	28	25,6830	25,7680	29,3535	29,5401	28,4889	1,060 <sup>ns</sup>	
	42	27,8107	28,3655	26,5864	25,4756	23,7195	0,792 <sup>ns</sup>	
Fósforo (%)	14	21,4466 <sup>a</sup>	22,5025 <sup>a</sup>	25,8314 <sup>a</sup>	25,3255 <sup>a</sup>	32,4770 <sup>b</sup>	2,837*	Quadrático
	28	17,5579	20,5579	23,5483	21,2872	23,5667	1,195 <sup>ns</sup>	
	42	16,4691	18,0456	16,6644	14,6178	14,8647	0,673 <sup>ns</sup>	
Magnésio (%)	14	0,4439 <sup>a</sup>	0,3220 <sup>a</sup>	0,2873 <sup>a</sup>	0,4234 <sup>a</sup>	0,6647 <sup>b</sup>	6,107*	Quadrático
	28	0,4495	0,4426	0,5515	0,52192	0,48932	0,764 <sup>ns</sup>	
	42	0,4628	0,4520	0,4895	0,4121	0,4157	0,604 <sup>ns</sup>	
Relação Ca:P	14	1,4711	1,3482	1,2537	1,5480	1,5294	2,108 <sup>ns</sup>	
	28	1,5149	1,3148	1,3423	1,4694	1,2129	0,802 <sup>ns</sup>	
	42	1,7126	1,7006	1,6879	1,7491	1,6607	0,037 <sup>ns</sup>	

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup>Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

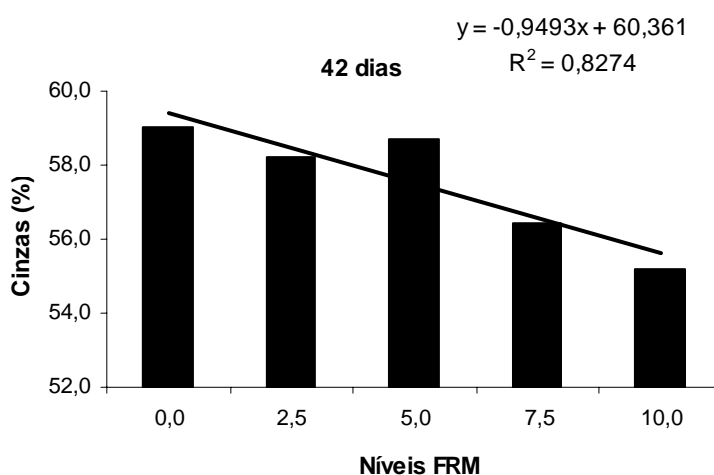
Médias seguidas pela letra b indicam que os tratamentos diferem do tratamento controle (T1) pelo Teste de Dunnett a 5%.

Foi observado que a porcentagem de cinzas dos ossos secos e desengordurados sofreu interferência da inclusão do FRM ( $P < 0,05$ ) apenas nas aves de 42 dias de idade. Os teores de cinzas tiveram modelo linear decrescente à medida que se aumentava a concentração de FRM na ração e apresentaram redução estimada de 15,73% para a inclusão de 10% de FRM (Figura 14). As inclusões de 7,5% e 10% de FRM diferiram

negativamente do controle pelo Teste de Dunnett, sugerindo efeito negativo dos taninos sob a mineralização óssea nestas duas concentrações (Tabela 6).

O conteúdo de cinzas que expressa o teor de minerais do osso está diretamente relacionado à resistência óssea (Rath et al., 1999). Assim, quanto menor o teor de cinzas, menor será a resistência óssea e maior a probabilidade dos frangos em apresentar problemas locomotores. Isto sugere que inclusões de FRM na ração de terminação a partir de 7,5%, acarretam problemas locomotores em frangos de corte.

Na idade de 14 dias, os valores tiveram uma queda com o aumento da quantidade do FRM e aos 28 dias os resultados apresentaram igualdade de valores em todas as concentrações do FRM (Tabela 6).



**Figura 14** – Variação dos teores de cinzas dos fêmures de aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM).

Analisando as porcentagens de minerais nas cinzas, não foi observado efeito negativo da inclusão do FRM ( $P > 0,05$ ) nas aves de 28 e 42 dias de idade (Tabela 6). Este resultado demonstra a capacidade do tecido ósseo de estabilizar a sua composição após a fase inicial de crescimento (21 dias de idade). Pode ser que após o período de crescimento ósseo, os frangos de corte já tenham apresentado bom desenvolvimento, não sendo afetado significativamente pela presença do tanino na ração.

Os frangos de corte de 14 dias de idade apresentaram modelo quadrático ( $P < 0,05$ ) para todos os minerais analisados (Figura 15). Os teores de cálcio, fósforo e magnésio nas cinzas apresentaram maior porcentagem com 10% de inclusão do FRM,

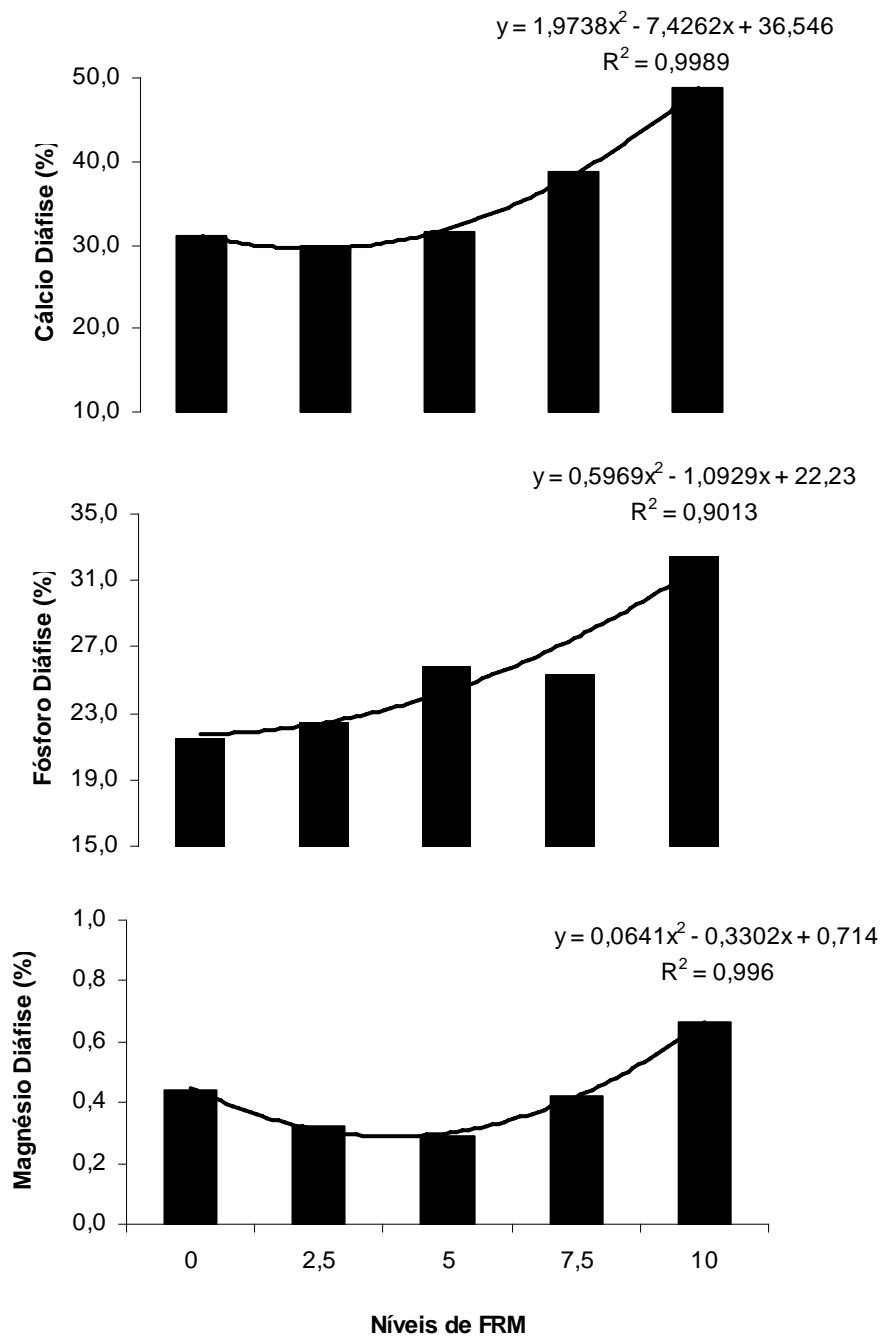
com aumento estimado de 77,11%, 68,68% e 22,97%, respectivamente, em relação ao tratamento controle. Pelo teste de Dunnett (Tabela 6) a inclusão de 10% do FRM foi estatisticamente superior.

Cálcio e fósforo são os minerais que estão em maior quantidade nos ossos (Junqueira & Carneiro, 2004), sendo que o cálcio corresponde a 37% dos minerais nas cinzas (Field, 2000). Neste trabalho, os teores de cálcio aos 14 dias de idade foram superiores e tiveram a interferência positiva da alta concentração de tanino na inclusão de 7,5% e 10% de FRM na ração. Elkin et al. (1978), avaliando o efeito de taninos em anormalidades de pernas de frangos, também, não acharam interferência dos taninos na mineralização óssea na fase inicial de crescimento.

O aumento das quantidades de Ca e de P nas cinzas não foram acompanhados do aumento das porcentagens de cinzas nesta idade. Isto caracteriza uma mudança na distribuição dos constituintes minerais nas cinzas dos ossos em relação a outros minerais presentes. Isto pode ocorrer em uma fase na qual ocorre maior mineralização óssea, que se inicia aos 11 dias (Williamns, 2000).

Outro fator que pode ter influenciado a taxa de mineralização óssea foi o ajuste dos valores energéticos das rações com acréscimo de óleo de soja. O aumento da quantidade de óleo de soja, rico em ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) pode ter superado o efeito indesejável do tanino na ração. Segundo Seifert e Waitkins (1997), os lipídios dietéticos têm importante papel no metabolismo ósseo devido à presença de fosfolipídeos nas vesículas da matriz orgânica. Estes fosfolipídeos, que são produzidos pelos PUFA, possuem alta afinidade de ligação por  $\text{Ca}^{+2}$  e P inorgânico, que no interior das vesículas vão formar cristais de apatita em torno das proteínas.

A relação Ca:P não foi afetada pela inclusão do FRM ( $P>0,05$ ) para nenhuma das idades (Tabela 6), não tendo portanto nenhum tratamento que tenha sido superior ou inferior ao tratamento controle nas idades testadas. A relação encontrada foi inferior a relação tida como a ideal 2:1 (Scott et al., 1982) (Tabela 6). Para a idade de 14 dias, Pellegrino & Biltz (1968) consideraram que a relação ideal é de 1,67 e Williamns (2000) diz que só é prejudicial relações acima de 2,97. É sugerido que alterações nesta relação possam comprometer a resistência óssea através da alteração na composição mineral do cristal ósseo (Thorp e Waddington, 1997).



**Figura 15** – Variação da porcentagem de minerais nas aves de 14 dias de idade alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM).

### 5.3. Aspectos mecânicos da composição óssea

Os resultados e os testes de significância, referentes aos aspectos mecânicos avaliados nas aves aos 14, 28 e 42 dias de idade encontram-se na Tabela 7. Houve influência da inclusão do FRM somente sobre o parâmetro tenacidade à flexão da idade de 42 dias.

**Tabela 7** – Aspectos mecânicos dos fêmures das aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM)

Parâmetro	Idade (dias)	FRM (%)					F
		0	2,5	5,0	7,5	10	
Carga máxima [N]	14	107,996	84,037	90,599	91,006	74,473	1,333 <sup>ns</sup>
	28	225,099	223,522	188,778	206,582	184,505	0,651 <sup>ns</sup>
	42	233,390	209,176	146,607	183,589	202,818	1,494 <sup>ns</sup>
Resistência à flexão (MOR) [MPa]	14	36,262	34,860	34,992	41,638	30,369	0,965 <sup>ns</sup>
	28	27,292	28,384	23,689	25,063	23,780	0,373 <sup>ns</sup>
	42	17,198	15,236	11,113	12,213	16,579	1,567 <sup>ns</sup>
Tenacidade à flexão SPE [KJ/m <sup>2</sup> ]	14	8,946	6,738	6,714	9,389	8,046	0,655 <sup>ns</sup>
	28	9,492	7,877	7,887	7,813	8,460	0,234 <sup>ns</sup>
	42	10,285 <sup>a</sup>	8,449 <sup>a</sup>	3,845 <sup>b</sup>	5,749 <sup>a</sup>	8,139 <sup>a</sup>	2,786* Quadrática
Inércia (I) 10 <sup>x10</sup> [m <sup>4</sup> ]	14	0,382	0,301	0,312	0,292	0,282	1,969 <sup>ns</sup>
	28	2,93	2,87	3,15	2,98	2,71	0,360 <sup>ns</sup>
	42	6,51	6,76	6,31	7,6E	5,88	1,430 <sup>ns</sup>

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Médias seguidas pela letra b indicam que os tratamentos diferem do tratamento controle (T1) pelo Teste de Dunnett a 5%.

A carga máxima à flexão não foi significativa ( $P > 0,05$ ) em nenhuma das idades estudadas. Com a inclusão do FRM, os ossos apresentaram uma diminuição da carga máxima suportada em relação ao tratamento controle (Tabela 7).

Currey (2003a) disse que a propriedade mecânica do osso é determinada pela interação entre o conteúdo mineral, água e a quantidade da matriz orgânica, principalmente do colágeno tipo I, e pode estar relacionado com a variação do teor de cinzas. E no presente trabalho houve concordância com esta observação, pois na idade de 42 dias houve diminuição significativa do conteúdo de cinzas para os níveis mais elevados de inclusão. Uma observação relevante é que as aves aos 28 dias de idade apresentaram carga máxima superior às aves de 42 dias, nas concentrações de 2,5% a

7,5% de FRM (Tabela 7). Este resultado difere de Barbosa (2005), que estudando frangos de corte em diferentes linhagens, observou que ocorre tendência de aumento da carga máxima ao longo das idades ajustando-se ao aumento da massa corporal.

A determinação do módulo de ruptura (MOR), leva em consideração tanto a força máxima quanto à geometria de um material e representa a qualidade intrínseca do material ósseo, definindo o seu grau de deformação quando submetido a uma força (Turner e Burr, 1993).

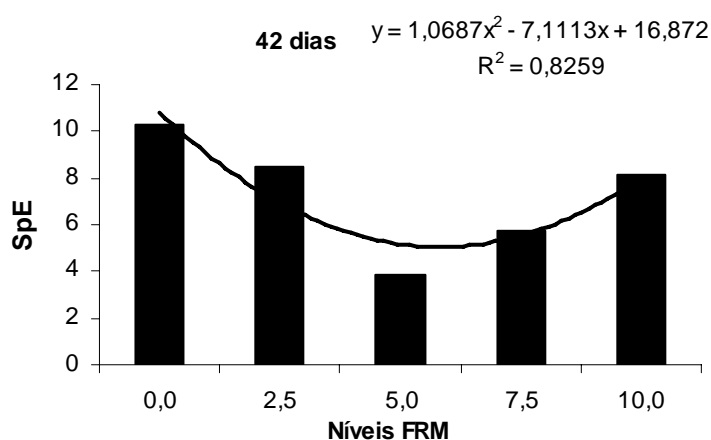
As aves, nas idades estudadas, não apresentaram alteração significativa nos ossos ( $P>0,05$ ) com a inclusão do FRM em relação à resistência à flexão (MOR) (Tabela 7), acompanhando, em geral, os resultados relacionados à força máxima. Apesar de não significativo dentro da mesma idade quando se comparou os tratamentos, observa-se que aos 42 dias esta propriedade óssea ficou severamente prejudicada, pois seus valores foram praticamente a metade do observado aos 28 dias. Levando-se em consideração que o MOR representa a qualidade intrínseca do material ósseo, pois é excluída a geometria óssea em seus cálculos, os fêmures nesta idade apresentaram pior qualidade, inclusive para o controle. Sendo assim deve-se levar em consideração que o fêmur por ser um osso, mais próximo ao corpo, sofre um processo de maturação mais tardio (Applegate e Lilburn, 2002). Portanto, este fato por si só pode ter influenciado na qualidade intrínseca do mesmo.

Nos fêmures das aves estudadas, o momento de inércia não sofreu nenhuma interferência significativa ( $P<0,05$ ) com a inclusão do FRM (Tabela 7), se comportando da mesma forma que a área da seção transversal. O momento de inércia apresentou tendência de igualdade nos diferentes níveis de FRM analisados aos 28 dias de idade (Tabela 7). Porém aos 14 dias de idade a inércia apresentou diminuição dos valores com a inclusão de 7,5% de FRM e aos 28 dias apresentou resultado oposto, onde a inclusão de 7,5% de FRM apresentou maior resultado.

A tenacidade na flexão (SpE), que está relacionada com o teor de proteínas colagenosas no osso, sofreu interferência da inclusão do FRM apenas nas aves de 42 dias de idade ( $P<0,05$ ). O modelo apresentado foi o quadrático (Figura 16), onde a inclusão de 5% apresentou redução estimada de 32,10% em relação ao tratamento controle. Não se percebeu alteração significativa da SpE, nos fêmures das aves de 14 e

28 dias de idade, que apresentaram, em geral, diminuição da SpE com a inclusão do farelo de resíduo de manga, quando comparado ao tratamento controle.

Determinou-se a tenacidade na flexão (SpE) no intuito de se correlacionar com a porcentagem de proteínas colagenosas. No entanto não se percebe uma similaridade nestes dois resultados (Figuras 17 e 18), assim como em Barbosa (2005) e Reis (2005). Sugere-se com isto, que além do teor de colágeno, outros fatores, como tipo de interações moleculares, possam contribuir para a determinação este parâmetro.



**Figura 16** – Variação da tenacidade da flexão nos fêmures das aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM)

#### 5.4. Aspectos bioquímicos da composição óssea

Os resultados e os testes de significância, referentes à composição bioquímica nos fêmures das aves aos 14, 28 e 42 dias de idade encontram-se na Tabela 8. A inclusão do FRM interferiu no teor de proteínas nos fêmures das aves de 14 e 28 dias de idade.

**Tabela 8** - Composição bioquímica (Proteínas colagenosas - PC e proteínas não colagenosas - PNC) dos fêmures de aves alimentadas com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM)

Parâmetro	Idade (dias)	FRM (%)					F	
		0	2,5	5	7,5	10		
PC (%)	14	38,9513 <sup>a</sup>	44,8312 <sup>a</sup>	38,4234 <sup>a</sup>	35,5656 <sup>a</sup>	35,3528 <sup>a</sup>	2,784*	Cúbica
	28	24,0188 <sup>a</sup>	24,0372 <sup>a</sup>	29,8282 <sup>b</sup>	34,7965 <sup>b</sup>	34,4085 <sup>b</sup>	14,583*	Linear
	42	50,9418	50,4423	50,5250	50,5560	50,2873	0,103 <sup>ns</sup>	
PNC (%)	14	1,6395 <sup>a</sup>	1,2030 <sup>a</sup>	1,2307 <sup>a</sup>	1,6138 <sup>a</sup>	3,1918 <sup>b</sup>	12,454*	Quadrática
	28	1,5114 <sup>a</sup>	1,4970 <sup>a</sup>	1,3647 <sup>a</sup>	1,6986 <sup>a</sup>	2,3783 <sup>b</sup>	6,122*	Quadrática
	42	1,0905	0,9374	1,2581	1,2835	1,3498	1,640 <sup>ns</sup>	

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup>Não significativo ao nível de 5% probabilidade.

Médias seguidas pela letra b indicam que os tratamentos diferem do tratamento controle (T1) pelo Teste de Dunnett.

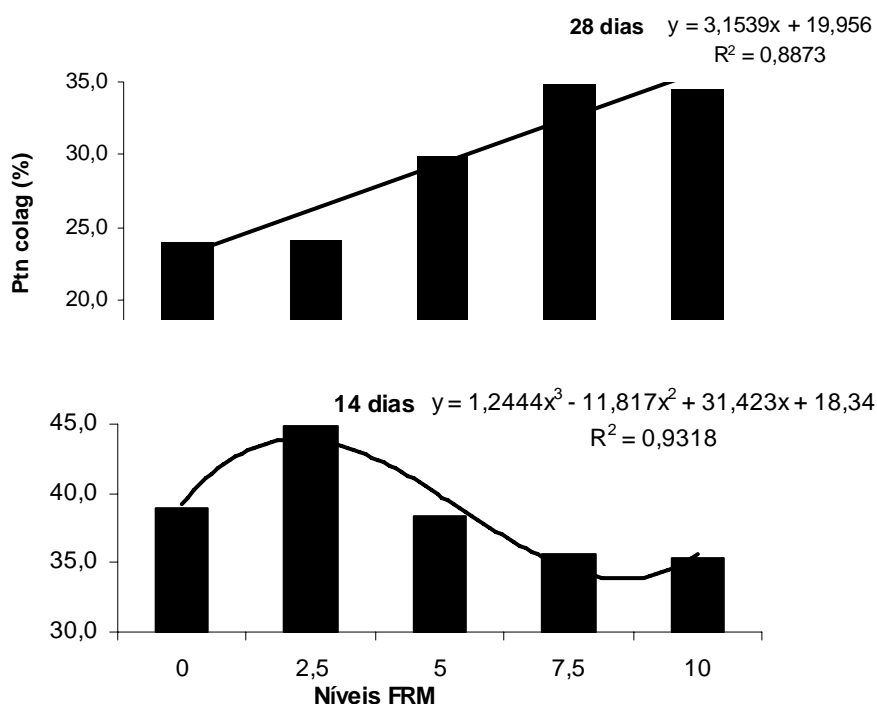
Os fêmures das aves de 14 dias de idade alimentadas com diferentes níveis de FRM apresentaram modelo cúbico ( $P < 0,05$ ) para o teor de proteínas colagenosas (Figura 17). O maior teor encontrado foi com a inclusão de 2,5% de FRM que apresentou aumento estimado de 56,83% em relação ao tratamento controle. A inclusão de 5% de FRM manteve os teores de proteínas colagenosas semelhantes ao tratamento controle, e a inclusão de 7,5% e 10% promoveu diminuição dos seus teores. Apesar de todas estas diferenças nenhum dos tratamentos diferiu do tratamento controle pelo Teste de Dunnett (Tabela 8).

O aumento da concentração de proteínas colagenosas com 2,5% de FRM na fase inicial do crescimento pode ser explicado pela necessidade de aumentar a quantidade de farelo de soja na ração, para torná-la isoprotéica, uma vez que o FRM possui menor conteúdo protéico, como também observado por Odunsi (2005). O teor de taninos encontrado na inclusão de 2,5% pode ter sido insuficiente para se complexar com estas proteínas, deixando-as livres para o processo de digestão e absorção. O aumento do teor de tanino associado a um sistema digestivo imaturo pode ter sido responsável pela diminuição do teor de proteínas colagenosas na inclusão de 7,5% e 10%.

Nos fêmures das aves de 28 dias de idade, o modelo apresentado para o teor de proteínas colagenosas foi linear crescente ( $P < 0,05$ ) (Figura 17). Considerando que as porcentagens de proteínas colagenosas são em relação ao peso do osso seco e desengordurado, e que os teores de cinzas também, é mais provável que este aumento

tenha sido influenciado pela redução dos teores de cinzas, influenciado pelos efeitos do tanino sobre a absorção de minerais.

O teor de proteínas colagenosas nos fêmures das aves com 42 dias de idade foi não significativo ( $P>0,05$ ), apresentando uma igualdade de valores nos diferentes níveis de FRM estudados (Tabela 8).



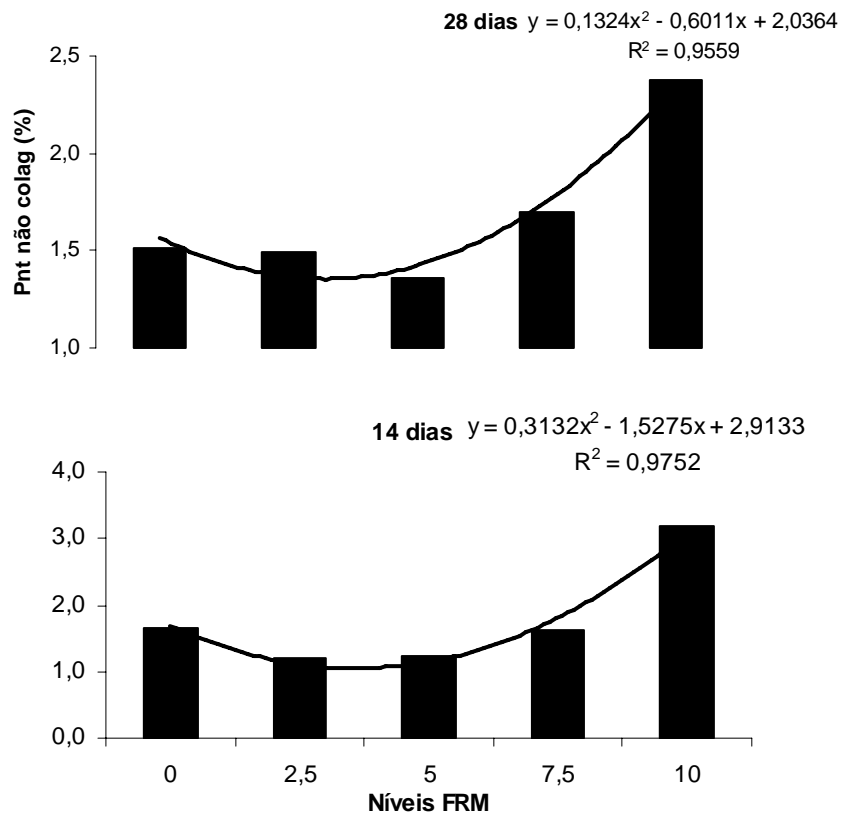
**Figura 17** – Variação das porcentagens de proteína colagenosa nos fêmures de aves alimentada com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM).

As proteínas não colagenosas podem contribuir com algumas funções específicas no osso, assim como estabilização da matriz, calcificação e outras atividades metabólicas reguladoras. Alteração na sua concentração pode sinalizar em anormalidades no tecido ósseo (Oliveira et al., 2006).

O teor de proteínas não colagenosas apresentou modelo quadrático ( $P<0,05$ ) nos fêmures de aves de 14 e 28 dias de idades alimentadas com diferentes níveis de FRM (Figura 14). Com a inclusão do FRM as proteínas não colagenosas apresentaram queda de seus teores, e tiveram com a inclusão de 10%, aumento acentuado, que em relação ao tratamento controle apresentaram aumento estimado de 84,63% e 90,43%, respectivamente.

Uma diminuição do teor de proteínas não colagenosas pode ser desejável porque pode indicar diminuição dos problemas de anormalidades ósseas em frangos de corte, relacionada a maior atividade das proteínas não colagenosas na desmineralização óssea (Price, 1985; Price & Russel, 1992). O aumento de Gla-proteínas (componentes das proteínas não colagenosas), pode inibir a mineralização dos ossos ou estimular a liberação de cálcio do osso tornando os ossos mais frágeis e susceptíveis à quebra (Vermeer et al.1995).

Os teores de proteínas não colagenosas nas aves de 42 dias de idade não apresentaram diferença estatística para entre os diferentes níveis de FRM ( $P > 0,05$ ) (Tabela 5). Os teores de proteínas não colagenosas apresentaram uma tendência à queda com a inclusão de 2,5% de FRM. A partir de 5% o teor de proteínas não colagenosas passou a apresentar um aumento (Figura 14). Esta tendência de aumento pode estar refletindo um aumento da demanda do Ca e P pelo organismo, em consequência das ações dos fenólicos totais na dieta, dificultando de alguma forma a absorção do Ca. Fato que também foi observado quando foi avaliado o MOR que demonstrou claramente piora da qualidade intrínseca do material ósseo.



**Figura 18** – Variação das porcentagens de proteína não colagenosa nos fêmures de aves alimentada com diferentes níveis de farelo de resíduo de manga (FRM).

## **6. CONCLUSÃO**

A inclusão do farelo de resíduo de manga na ração de frango de corte, nas concentrações de 7,5% e 10%, afetou a resistência óssea dos fêmures analisados. Por isso ele pode ser incluído até o nível de 5%, em substituição ao milho, sem afetar o tecido ósseo animal.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEF - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE FRANGO. Relatório Anual (2007-2008). [www.abef.com.br](http://www.abef.com.br) acessado em 15 de março de 2009.
- APPLEGATE, T. J.; LILBURN, M. S. Growth of the Femur and Tibia of a Commercial Broiler Line. **Poultry Science**, v.81, n.9, p.1289–1294, 2002.
- AVANCINE DE BRITO, E. ; FAVORETTO, J. A. Biologia: Uma abordagem evolutiva e ecológica. v.2, São Paulo: Editora Moderna, 655p, 1997
- AVIAGEN. Improving performance of broilers. [www.aviagem.com](http://www.aviagem.com), acessado em 10 de março de 2009.
- AVISITE. Produção de carne de frango. [www.avisite.com.br](http://www.avisite.com.br), acessado em 15 de março de 2009.
- BARBOSA, A. A. **Aspectos físicos, químicos e mecânicos de fêmures de frangos de corte**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 75p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- BARROS, R. V.; ABAD, C. C. C.; KISS, M. A. P. D. et al. Massa óssea e atividade física na infância e adolescência. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v.7, n.1, p.109-118, 2008
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.1, p.63-72, 2004.
- BERARDINI, N.; KNÖDLER, M.; SCHIEBER, A. et al. Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.6, n.4, p. 442-452, 2005.
- BIZERAY, D.; ESTEVEZ, I.; LETERRIER, C. et al. Influence of Increased Environmental Complexity on Leg Condition, Performance, and Level of Fearfulness in Broilers. **Poultry Science**, v.81, n.6, p. 767-773, 2002.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.2, p.248-254, 1976.
- CANALIS, E.; MCCARTHY, T.; CENTRELLA, M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. **Journal of Clinical Investigation** v. 81, n.2, p.277-281, 1988.

- CARDELLO, H. M. A. B; CARDELLO, L. Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*mangífera indica* l.) var. haden, durante o amadurecimento. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n. 2, p.211-217, 1998
- COOK, M. E. Skeletal deformities and their causes: Introduction. **Poultry Science**, v.79, n.7, p.982-984, 2000
- CHEEKE, P.R. **Applied animal nutrition: feeds and feeding**. New York: Macmilan Publishing Company, 1991. 504p.
- CHRISTENSON, R.H. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. **Clinical Biochemistry**, v.30, n.8, p.573-593, 1997.
- CURREY, J. D. Role of collagen and other organics in the mechanical properties of bone. **Osteoporosis International**, v.14, n.5, p.29-36, 2003a.
- CURREY, J.D. The many adaptations of bone. **Journal of Biomechanics**, v.36, n.10, p.1487-1495, 2003b.
- CURREY, J. D. The mechanical adaptations of bones. In: STEVENSON, J. C.; LINDAY, R. **Osteoporosis**. Princeton University Press. Chapman & Hall Medical. 1998.
- DELL'ISOLA, A. T. P. ; VELOSO, J. A. F.; BAIÃO, N. C. et al. Efeito do óleo de soja em dietas com diferentes níveis de cálcio sobre a absorção e retenção óssea de cálcio e de fósforo em frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.4, p.461-466, 2003.
- DELLMANN, D.H.; EURELL, A. J. **Textbook of Veterinary Histology**. 5 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Williams , 1998. 380p.
- DESHPANDE , S.S. Food legumes in Human nutrition: a personal perspective. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.32, n.4, p.333-363, 1992.
- DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D.; KITCHELL, M. L. et al. Metabolic challenges and early bone development. **Poultry Science**, v.16, n.1, p.126–137, 2007.
- DUPLOMB, L.; DAGOUASSAT, M.; JOURDON, P.; HEYMANN, D. Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. **Stem Cells** v.25 n.3, p.544 -552. 2007.
- EDWARDS, Jr, H. M. Nutrition and skeletal problems in poultry. **Poultry Science**, v.79, n.7, p.1018-1023, 2000.

- ELKIN, R. G.; FEATHERSTON, W. R.; ROGLER, J. C. Investigations of leg abnormalities in chicks consuming high tannin sorghum grain diets. **Poultry Science**, v.57, n.3, p.757-762, 1978
- FARQUHARSON, C.; JEFFERIES, D. Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyscondroplasia. **Poultry Science**, v.79, n.7, p.994-1004, 2000.
- FIELD, R. A. Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures. **Meat Science**, v.55, n.3, p. 255-264, 2000.
- FREITAS, H. T. **Efeitos de composição das dietas com níveis de proteínas e de nutrientes sobre o desempenho e as características ósseas de pintos de corte**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 144p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- FRIESS, W. Collagen – Biomaterial for Drug Deliver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.45, n.2, p. 113-136, 1998.
- FUJISAWA, R., WADA, Y., NODASAKA, YL, KUBOKI, Y. Acidic amino acid-rich sequences as binding sites osteonectin to hydroxyapatite crystals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1292, n.1, p. 53-60, 1996.
- GUNDBERG, C. M. Matrix proteins. **Osteoporosis International**, v.14, n.5, p. S37–S42, 2003.
- GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014p.
- HADDAD, M. C. L.; ZAGO, E.; ANDREASSA, F. J. Desconfortos referidos por indivíduos submetidos à ressonância magnética. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v.4, n. 2, p. 149-155, 2005.
- HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v.256, n.9, p.4494-4497, 1981.
- HAILEY, D.; SAMPIETRO-COLOM, L.; MARSHALL, D.; RICO, R.; GRANADOS, A.; ASUA, J. The effectiveness of bone density measurement and associated treatments for prevention of fractures: An International Collaboration Review. **International Journal for Technology Assessment in Health Care**, v.14, n.2, p.237-254, 1996.
- HAUSCHKA, P.V.; LIAN, J.B.; GALLOP, P.M. Direct identification of the calcium binding amino acid gamma-carboxyglutamic in mineralized tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.72, n.10, p.3925-3929, 1975.

- HAUSCHKA, P.V., GALLOP, P.M. Purification and calcium binding properties of osteocalcin, the carboxylglutamate containing protein of bone. In: WASSERMAN, R.H., **Calcium binding proteins and calcium function**. Amsterdam: Elsevier, 1977. p.338-347.
- HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 18ªed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1995. 1678p.
- HESTER, P. Y.; SCHREIWEIS, M. A.; ORBAN J. I.; MAZZUCO, H.; KOPKA, M. N.; LEDUR, M. C.; MOODY, D. E. Assessing bone mineral density in vivo: dual-energy-X-ray absorptiometry. **Poultry Science**, v. 83, n.2, p.215- 221, 2004.
- IBRAF – INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Produção brasileira de frutas. [www.ibraf.org.br](http://www.ibraf.org.br) acessado em 03 de agosto de 2009.
- JOHNSON, L.R. **Fundamentos de fisiologia médica**. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 502-511, 2000.
- JOSEPH, J.K. Physico-chemical attributes of wild mango (*Irvingiagabonensis*) seeds. **Bioresouce Technology**, v.53, n.22, p.179-181, 1995.
- JOSEPH, J. K.; ABOLAJI, J. Effects of replacing maize with graded levels of cooked nigerian mango-seed kernels (*Mangifera indica*) on the performance, carcass yield and quality of broiler chickens. **Bioresouce Technology**, v. 61, n.1, p.99-102, 1997.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 488p, 2004.
- KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 654p, 2004.
- KNOTT, L.; BAILEY, A.J. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. **Bone**, v. 22, n. 3, p.181-187, 1998.
- LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; BORROTO, B. et al. Mango peels as a new tropical fibre: preparation and characterization. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.29, n.8, p.729-733, 1996.
- LEESON, S.; SUMMERS, J.D. **Nutrition of the chicken**. 4nd ed. Guelph (Canadá): University Books, 591p 2001.
- LILBURN, M. S. Skeletal growth of commercial poultry species. **Poultry Science**, v.73, n.6, p.897-903, 1994.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada à frangos de corte**. Jaboticabal:FUNEP/UNESP, 375p, 2002.

- MARKS JR, S. C.; HERMEY, D.C. **The structure and development of bone : Principles of bone biology**. Chapter 1. Department of Cell Biology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts. 1996.
- MANSOORI, B.; ACAMOVIC, T. The effect of tannic acid on the excretion of endogenous methionine, histidine and lysine with broilers. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 134, n. 3-4, p. 198-210, 2007
- MARTINS, T. J.; DEMPSTER, D.W. Bone structure and cellular activity. In: STEVENSON J C.; LINDSAY R. **Osteoporosis**. Princeton University Press: Chapman & Hall Medical, 1998.
- MAZZUCO, H. Osteoporose em poedeiras comerciais: uso da densitometria óssea e outras técnicas. **Revista Avicultura Industrial**, v.96 n.1136, p.16-34, 2005
- MAZZUCO, H.; HESTER, P. Y. The effect of an induced molt and a second cycle of lay on skeletal integrity of White Leghorns. **Poultry Science**, v.84, n.5, p.771-781, 2005.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. et al. TANINOS: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- MUNDY, G. R. Cellular and molecular regulation of bone turnover. **Departments of Medicine and Endocrinology, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA**, v. 24, n. 5S, p. 355-385, 1999.
- MURAKAMI, A.E. **Balanco eletrolítico da dieta e sua influência sobre o desenvolvimento dos ossos de frangos**. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA. Anais, p.33-61, 2000.
- NESTOR, K.E.; BACON, W.L.; SAIF, Y.M. et al. The influence of genetic increases in shank width on body weight, walking ability and reproduction of turkeys. **Poultry Science**, v.64, n.12, p.2248-2255, 1985.
- ODUNSI, A. A. Responsive of laying hens and growing broilers to the dietary inclusion of mango (*Mangifera indica L.*) seed kernel meal. **Tropical Animal Health and Production**, v.37, n.2, p.139-150, 2005.
- OKAI, D. B.; ABOAGYE, J. The effects of mango seed kernel meal (MSKM) on the performance of growing rats. **Biological Wastes**, v.34, n.2, p.171-175, 1990.
- OLIVEIRA, N. A.; FERREIRA, A. S.; MORAES, G. H. K. et al. Deposição de proteínas no fêmur de frangos de corte em função do balanço eletrolítico das dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1758-1764, 2006.

- PELLEGRINO, E. D.; BILTZ, R. M. Bone carbonate and the Ca to P molar ratio. **Nature**, v.219, n.5160, p. 1261–1262, 1968.
- PERRY, R. W.; ROWLAND, G. N.; FOUTZ, T. L., GLISSON, J. R. Poultry malabsorption syndrome. III. Skeletal lesions inmarket age turkeys. **Avian Diseases**, v.35, n.4, p.707–713, 1991.
- PINTO, A.C.Q. Capa: a produção, o consumo e a qualidade da manga no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, p.597-796, 2003.
- PIZAURO JR, J. M. Estrutura e função do tecido ósseo. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p.247-265, 2002.
- PRICE, P.A. Vitamin K-dependent formation of bone Gla-protein (Osteocalcin) and its function. In: **Vitamins and hormones**. New York: Academic Press, v.42, 1985. p.65-109.
- PRICE, J. S.; RUSSEL, S. G. Bone remodeling: regulation by systemic and local factors. In: Whitehead, C. C. (Ed.). **Bone biology and skeletal disorders in poultry**. Poultry Science Symposium 23. Carfax Publishing Co., 1992. p.38-60,
- QUINTERO PINTO, L. G.; PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C.; BARROS, M. M. Desempenho do Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) arraçoado com dietas contendo diferentes teores de tanino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.4, p.1164-1171, 2001
- RAIF, E.M.; HARMAND, M.F. Molecular interface characterization in human bone matrix. **Biomaterials**, v.14, n.13, p.978-984, 1993.
- RAMOS, A. M.; COUTO, F. A. A.; RESENDE, P. M. et al. **Manga Ubá: Boas práticas agrícolas para produção destinada à agroindústria**. Viçosa: Editora UFV, 2005, 64p.
- RATH, N. C.; HUFF, G. R.; BALOG, J. M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry Science**, v.79, n.7, p.1024-1032, 2000.
- RATH, N. C.; BALOG, J. M.; HUFF, W. E. et al. Comparative differences in the composition and biomechanical properties of tibiae of seven- and seventy-two-week-old male and female broiler breeder chickens. **Poultry Science**, v.78, n.8 p.1232–1239, 1999.
- RAVINDRAN, V.; KORNEGAY, E.T.; RAJAGURU, A.S.B. et al. Cassava leaf meal as a replacement for coconut oil meal in broiler diets. **Poultry Science**, v.65, n.9, p.1720-1727, 1986.

- REIS, D. T. C. **Aspectos físicos, químicos e mecânicos de tíbias de frangos de corte.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 86p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- RIBEIRO, S.M.R. **Caracterização e avaliação do potencial antioxidante de mangas (*Mangifera indica* L.) cultivadas no estado de Minas Gerais.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 149p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- RICZU, C. M.; SAUNDERS-BLADES, J. L.; YNGVESSON, A. K.; ROBINSON, F. E.; KORVER, D. R. End-ofcycle bone quality in white- and brown-egg laying hens. **Poultry Science**, v.83, n.3, p.375-383, 2004.
- RHO, J.-Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical Engineering & Physics**, v.20, n.1, p.92–102, 1998.
- RIDDELL, C. Skeletal deformities in poultry. In: **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, vol. 24, Academic Press, 1981. p. 277-307.
- ROACH, H.I. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. **Cell Biology International**, v. 18, n. 6, p. 617-628, 1994.
- ROSE, N.; CONSTANTIN, P.; LETERRIER, C. Sex differences in bone growth of broiler chickens. **Growth, Development and Aging**, v.60, n.2, p.49-59, 1996.
- ROSS, M. H., ROWRELL, L. J. **Histologia- Texto e Atlas 2<sup>a</sup> ed.** São Paulo: Média Panamericana, 779p, 1993.
- ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos – Composição de alimentos e exigências nutricionais.** Viçosa: UFV, 2005. 186p.
- RUKIMINI, C.; VIJAYARAGHAVAN, M. Nutritional and toxicological evaluation of mango kernel oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.61, n.4, p.789 – 792, 1984.
- RUNHO, R. C.; GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. S. et al. Exigência de fósforo disponível para frangos de corte machos e fêmeas de 1 a 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.187-196, 2001
- SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S. **Dietary tannins: consequences and remedies.** Boca Raton: CRC Press, 1990. 200p.

- SANTOS, M. A. T. **Caracterização química das folhas de brócolis e couve-flor (*Brassica oleracea L.*) para utilização na alimentação humana.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, 2000.
- SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, n.1, p.72-78, 2002.
- SARRUGE, J.R., HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas.** Piracicaba: ESALQ/USP, 56p,1974.
- SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Byproducts of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments. **Trends Food Science Technology**, v.12, p.401-413, 2001.
- SCHREIWEIS, M. A.; ORBAN, J. I.; LEDUR, M. C.; HESTER, P. Y. The use of densitometry to detect differences in bone mineral density and content of live White Leghorns fed varying levels of dietary calcium. **Poultry Science**, v.82, n.8, p.1292-1301, 2003.
- SCOTT, M. L.; NESHEIM, M. C.; YOUNG, R. J. **Nutrition of the Chicken.** 3.ed. New York: M. L. Scott and Associates, 1982. p.287-304.
- SEEMAN, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, n.1, p. 1-8, 2008.
- SEIFERT, M.F.; WATKINS, B.A. Role of dietary lipid and antioxidants in bone metabolism. **Nutrition Research**, v.17, n.7, p. 1209-1228, 1997.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications.** Lancaster. Technomic Publishing Co.,1995. p.235-273.
- SILVA, L. K. Avaliação tecnológica em saúde: densitometria óssea e terapêuticas alternativas na osteoporose pós-menopausa. **Caderno de Saúde Pública**, v.19, n.4, p.987-1003, 2003.
- SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, v.12, n.1, p.21-32, 1999.
- SIMÕES, A. F. **Influência da atividade física no tratamento da osteoporose.** Disponível em: [www.cdof.com.br/fisio5](http://www.cdof.com.br/fisio5) acessado em 06 de maio de 2009.
- SMITH, O. B.; KABAJA, E. Effect of high dietary calcium and wide calcium/phosphorus rations in broiler diets. **Poultry Science**, v.64, n.9, p.1713-1720, 1984.

- SOLÍS-FUENTES, J.A.; DURÁN-DE-BAZÚA, M.C. Mango seed uses: thermal behavior of mango seed almond fat and its mixtures with cocoa butter. **Bioresource Technology**, v.92, n.1, p.71-78, 2004.
- SOMMERFELDT, D. W.; RUBIN, C. T. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. **European Spine Journal**, v. 10, n.2, p. S86-S95, 2001.
- SUGAI, A. Y. **Processamento descontínuo de purê de manga (*mangifera indica Linn.*), variedade haden: estudo da viabilidade do produto para pronto consumo**. São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2002. 82 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2002.
- TAVERNARI, F. C.; CARVALHO, T. A.; ASSIS, A. P.; D'AVILA LIMA, H. J. Polissacarídeo não amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, n.5, p. 673-689, 2008.
- TARDIN, A. C., **Visão nutricional dos problemas locomotores em frangos de corte**. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Campinas. Campinas: SP 1995. p.71-83.
- THORP, B. H., WADDINGTON, D. Relationships between the bone pathologies, ash and mineral content of long bones in 35-day-old broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, v.62, n.1, p.67-73, 1997.
- TURNER, C.H.; BURR, D.B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, v.14, n.4, p.595-608, 1993.
- UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **Mineral nutrition of livestock**. 3th ed. London: CAB International, 1999. 614 p
- VELLEMAN, S. G. The role of the extracellular matrix in skeletal development. **Poultry Science**, v.79, n.7, p.985-989, 2000.
- VIEIRA, P. A. F.; QUEIROZ, J. H.; ALBINO, L. F. T.; et al. Efeitos da inclusão de farelo do resíduo de manga no desempenho de frangos de corte de 1 a 42 dias. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.12, p.2173-2178, 2008.
- VIEIRA, J. G. H. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.43, n.6, p.415-422, 1999.
- VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P.D. The role of collagen in bone strength. **Osteoporosis International**, v.17, n.3 p.319-336, 2006.

- VERMEER, C.; JIE, K. S. G.; KNAPEN, H. J. Role of vitamin K in bone metabolism. **Annual Research Nutrition**, v.15, p.1- 22, 1995.
- WALDROUP, P.W. Bioassays remain necessary to estimate phosphorus, calcium bioavailability. **Feedstuffs**, v.68, n.46, p.13-20, 1996.
- WARREHAM, C.N., WISEMAN, J., COLE, D.J.A. Processing and antinutritive factors in feedstuffs. In: COLE, D.J.A., VARLEY, M.A. (Eds.) **Principles of pig sciences**. Nottingham: Nottingham University Press, 1994. 427p
- WATKINS, B. A.; SEIFERT, M. F. Conjugated Linoleic Acid and Bone Biology. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, n. 4, p. 478S-486S, 2000.
- WATKINS, B. A. Avian bone metabolism: Cell mediated mineralization and localized regulatory factors. **Journal of Nutritional**, v.123, n.2, p.299-300, 1993.
- WEBER, P. The role of vitamins in the prevention of osteoporosis: a brief status report. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 69, n.3 p.194–197, 1999.
- WILLIAMNS, B.; WADDINGTON, D.; SOLOMON, S. et al, Dietary effects o bone quality and turnover, and Ca and P metabolism in chickens. **Research in Veterinary Science**, v.69, n.1, p.81-87, 2000.
- YEAN SOONG, Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v.88, n.3, p. 411-417, 2004
- YOUNG, M.F. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. **Osteoporosis International**, v.14, n. 3, p. 35-42, 2003.
- ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÔES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000, p.489-640.

## APÊNDICE

**Quadro 1** - Análise de variância dos aspectos físicos: peso (PO), comprimento (CO), relação PO/PV (peso vivo), densidade (D), porosidade (PR) e área da seção transversal (A) dos fêmures aos 14, 28 e 42 dias de idade

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		PO (g)		
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	0.1311315*	0.1851205 <sup>ns</sup>	1.928365 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	0.3800575E-01	0.6377092	0.7276577
CV (%)		8.689	9.669	5.126
		CO (cm)		
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	2.783885 <sup>ns</sup>	9.875436 <sup>ns</sup>	5.329495 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	1.272648	11.40448	3.896225
CV (%)		2.789	5.458	2.513
		D (g/cm <sup>3</sup> )		
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	0.5333961E-02*	0.2210910E-02 <sup>ns</sup>	0.1586976E-02 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	0.1632115E-02	0.3049447E-02	0.1306721E-02
CV (%)		4.797	5.308	3.714
		PR (%)		
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	17.49589*	6.270262 <sup>ns</sup>	6.140487 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	5.189932	7.759667	3.314360
CV (%)		4.166	5.669	4.575

		<b>A (cm<sup>2</sup>)</b>		
		<b>14 dias</b>	<b>28 dias</b>	<b>42 dias</b>
Linhagem	4	0.1169669E-02 <sup>ns</sup>	0.1232190E-02 <sup>ns</sup>	0.7073949E-02 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	0.6150169E-03	0.2281019E-02	0.3167080E-02
CV (%)		15.833	10.996	9.627

\* Efeito significativo (P<0,05).

<sup>ns</sup> Não significativo.

**Quadro 2** - Análise de variância da composição química: teor de cinzas (TC), teor de cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg) nas cinzas e relação Ca:P (Ca:P) dos fêmures de frangos de corte aos 14, 28 e 42 dias de idade

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		TC (%)		
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	37.44633 <sup>ns</sup>	0.2951406 <sup>ns</sup>	16.33655*
Resíduo	25	60.06754	31.48409	1.423410
CV (%)		14.482	9.673	2.074
		Ca (%)		
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	374.8722*	21.78144 <sup>ns</sup>	20.89073 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	53.99675	20.55438	26.36965
CV (%)		20.423	16.328	19.458
		P (%)		
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	111.3503*	37.11989 <sup>ns</sup>	11.93659 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	39.25539	31.05366	17.74495
CV (%)		24.554	26.158	26.112
		Mg (%)		
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	0.1309490*	0.1302018E-01 <sup>ns</sup>	0.6414474E-02 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	0.2144298E-01	0.1703934E-01	0.1061130E-01
CV (%)		34.192	26.585	23.075

		<b>Ca:P</b>		
		<b>14 dias</b>	<b>28 dias</b>	<b>42 dias</b>
Tratamentos	4	0.9491452E-01 <sup>ns</sup>	0.8906338E-01 <sup>ns</sup>	0.6355014E-02 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	0.4503035E-01	0.1110790	0.1725178
CV (%)		14.838	24.311	24.401

\*Efeito significativo (P<0,05).

<sup>ns</sup> Não significativo.

**Quadro 3** – Análise de variância dos aspectos mecânicos: carga máxima (F), resistência á flexão ou modulo de ruptura (MOR), momento de inércia (I) e energia específica (SPE), dos fêmures de frangos de corte aos 14, 28 e 42 dias de idade

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		I (m <sup>4</sup> )		
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	0.1836401E-21 <sup>ns</sup>	0.1529699E-20 <sup>ns</sup>	0.2455006E-19 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	0.9326571E-22	0.4245589E-20	0.1717242E-19
CV (%)		32.035	22.249	19.811
<b>F (N)</b>				
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	901.7527 <sup>ns</sup>	2145.465 <sup>ns</sup>	6311.964 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	676.5675	3296.355	4224.780
CV (%)		29.023	27.912	33.313
<b>MOR (MPa)</b>				
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	97.76982 <sup>ns</sup>	26.77818 <sup>ns</sup>	43.25155 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	101.2719	71.80433	27.60394
CV (%)		28.249	33.047	36.315
<b>SPE(KJ/m<sup>2</sup>)</b>				
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	9.104291 <sup>ns</sup>	3.051094 <sup>ns</sup>	37.92189*
Resíduo	25	13.90879	13.03620	13.61230
CV (%)		46.813	43.470	50.587

\*Efeito significativo (P<0,05).

<sup>ns</sup> Não significativo.

**Quadro 4** – Análise de variância dos aspectos bioquímicos: proteína colagenosa (PC) e proteína não colagenosa (PNC) dos fêmures de frangos de corte aos 14, 28 e 42 dias de idade

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		PC (%)		
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	88.09777*	168.1579	0.3521484 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	31.64348	11.53131	3.430856
CV (%)		14.564	11.543	3.664
		PNC (%)		
		14 dias	28 dias	42 dias
Tratamentos	4	4.012675*	0.9731166*	0.1686181 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	0.3222097	0.1589470	0.1028366
CV (%)		31.966	23.591	27.088

\*Efeito significativo (P<0,05).

<sup>ns</sup> Não significativo.

**Quadro 5** – Resultados dos testes de Dunnett nas variáveis significativas dos fêmures de frangos de corte de 14 dias de idade

<b>Variável = Peso ósseo (0.3800575E-01)</b>					
TRAT	Descrição Dados	Médias	Diferenças	DMS	5%
1	6	2.4221	0.0000	0,26	A
2	6	2.2854	-0.1367	0,26	A
3	6	2.2960	-0.1261	0,26	A
4	6	2.1912	-0.2309	0,26	A
5	6	2.0237	-0.3983	0,26	B
D(0.05, 25) = 2.274 DMS = 0.2559					
<b>Variável = Densidade (0.1632115E-02)</b>					
TRAT	Descrição Dados	Médias	Diferenças	DMS	5%
1	6	0.8831	0.0000	0.05	A
2	6	0.8464	-0.0368	0.05	A
3	6	0.8437	-0.0394	0.05	A
4	6	0.7992	-0.0839	0.05	B
5	6	0.8384	-0.0447	0.05	A
D(0.05, 25)= 2.274 DMS = 0.0530					
<b>Variável = Porosidade (5.189932)</b>					
TRAT	Descrição Dados	Médias	Diferenças	DMS	5%
1	6	54.8525	0.0000	2.99	A
2	6	54.0923	-0.7602	2.99	A
3	6	53.7774	-1.0751	2.99	A
4	6	53.1511	-1.7014	2.99	A
5	6	57.5325	2.6800	2.99	A
D(0.05, 25)= 2.274 DMS = 2.9910					

**Variável = Cálcio (53.9967)**

TRAT	Descrição Dados	Médias	Diferenças	DMS	5%
1	6	31.0231	0.0000	9.65	A
2	6	29.8563	-1.1668	9.65	A
3	6	31.6509	0.6278	9.65	A
4	6	38.6627	7.6396	9.65	A
5	6	48.7042	17.6811	9.65	B

D(0.05, 25)= 2.274 DMS = 9.6475

**Variável = Fósforo (39.25539)**

TRAT	Descrição Dados	Médias	Diferenças	DMS	5%
1	6	21.4466	0.0000	8.23	A
2	6	22.5025	1.0559	8.23	A
3	6	25.8314	4.3848	8.23	A
4	6	25.3255	3.8789	8.23	A
5	6	32.4770	11.0305	8.23	B

D(0.05, 25)= 2.274 DMS = 8.2258

**Variável = Magnésio (0.2144298E-01)**

TRAT	Descrição Dados	Médias	Diferenças	DMS	5%
1	6	0.4439	0.0000	0.19	A
2	6	0.3220	-0.1219	0.19	A
3	6	0.2873	-0.1566	0.19	A
4	6	0.4234	-0.0206	0.19	A
5	6	0.6647	0.2207	0.19	B

D(0.05, 25)= 2.274 DMS = 0.1923

**Variável = PNC (0.3222097)**

TRAT	Descrição Dados	Médias	Diferenças	DMS	5%
1	6	1.6395	0.0000	0.75	A
2	6	1.2030	-0.4365	0.75	A
3	6	1.2307	-0.4088	0.75	A
4	6	1.6138	-0.0257	0.75	A
5	6	3.1918	1.5523	0.75	B

$D(0.05, 25) = 2.274$  DMS = 0.7452

**Variável = PC (31.64348)**

TRAT	Descrição Dados	Médias	Diferenças	DMS	5%
1	6	38.9513	0.0000	7.39	A
2	6	44.8312	5.8800	7.39	A
3	6	38.4234	-0.5278	7.39	A
4	6	35.5656	-3.3857	7.39	A
5	6	35.3528	-3.5984	7.39	A

$D(0.05, 25) = 2.274$  DMS = 7.3854

**Quadro 6** – Resultados dos testes de Dunnett nas variáveis significativas dos fêmuress de frangos de corte de 28 dias de idade

<b>Variável = PNC (0.1589470)</b>					
TRAT	Descrição Dados	Médias	Diferenças	DMS	5%
1	6	1.5114	0.0000	0.52	A
2	6	1.4970	-0.0144	0.52	A
3	6	1.3647	-0.1466	0.52	A
4	6	1.6986	0.1873	0.52	A
5	6	2.3783	0.8669	0.52	B
D(0.05, 25)= 2.274 DMS = 0.5234					
<b>Variável = PC (11.53131)</b>					
TRAT	Descrição Dados	Médias	Diferenças	DMS	5%
1	6	24.0188	0.0000	4.46	A
2	6	24.0372	0.0184	4.46	A
3	6	29.8282	5.8094	4.46	B
4	6	34.7965	10.7776	4.46	B
5	6	34.4085	10.3897	4.46	B
D(0.05, 25)= 2.274 DMS = 4.4583					

**Quadro 7** – Resultados dos testes de Dunnett nas variáveis significativas dos fêmuress de frangos de corte de 42 dias de idade

<b>Variável = SPE (13.61230)</b>					
TRAT	Descrição Dados	Médias	Diferenças	DMS	5%
1	6	10.2854	0.0000	4.84	A
2	6	8.4490	-1.8364	4.84	A
3	6	3.8448	-6.4406	4.84	B
4	6	5.7488	-4.5366	4.84	A
5	6	8.1390	-2.1464	4.84	A
D(0.05, 25)= 2.274 DMS = 4.8439					
<b>Variável = CINZAS (1.423410)</b>					
TRAT	Descrição Dados	Médias	Diferenças	DMS	5%
1	6	59.0179	0.0000	1.57	A
2	6	58.2316	-0.7863	1.57	A
3	6	58.7217	-0.2961	1.57	A
4	6	56.4134	-2.6045	1.57	B
5	6	55.1807	-3.8372	1.57	B
D(0.05, 25)= 2.274 DMS = 1.5664					