

MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS EM AMOSTRAS DE MÚSCULO DE PEIXE LIXIVIA ISÓTOPO DE NITROGÊNIO *

Eduardo Gianini ABIMORAD^{1,2}; Carlos DUCATTI³; Daniela CASTELLANI¹;
Rosângela Kiyoko JOMORI⁴; Maria Célia PORTELLA⁵; Dalton José CARNEIRO⁵

¹ Pesquisador Científico da APTA – Pólo Noroeste Paulista

² Endereço/Address: CP: 61 - CEP: 15500-970 – Votuporanga - SP. e-mail: abimorad@apta.sp.gov.br

³ Prof. Dr. Centro de Isótopos Estáveis Ambientais - IB/UNESP – Botucatu - SP

⁴ Prof.^a Faculdade Dr. Francisco Maeda, Laboratório de Aquicultura - FAFRAM/FE – Ituverava - SP

⁵ Prof. Dr. Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP- Jaboticabal - SP

* Suporte Financeiro: Projeto Temático FAPESP, processo nº 08/57411-4

Palavras-chave: Isótopos estáveis; nutrição; *Piaractus mesopotamicus*; desengorduramento.

INTRODUÇÃO

A aplicação de isótopos estáveis como traçadores naturais em pesquisas, na área de nutrição animal, vem aumentando nas últimas décadas, especialmente para avaliar taxas de turnover em tecidos. A extração de lipídeos das amostras de tecidos é uma prática comumente usada neste tipo de estudo para evitar interferências do tecido adiposo, que tem assinaturas e taxas isotópicas distintas. Delta de carbono 13 ($\delta^{13}\text{C}$) e delta de nitrogênio 15 ($\delta^{15}\text{N}$) representam as razões entre $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ da amostra em relação a padrões internacionais, respectivamente. É esperado que, após a extração de lipídeos, a amostra de tecido perca somente átomos de carbono, podendo manter a mesma assinatura isotópica ou não. Entretanto a lixiviação de outros isótopos (ex. nitrogênio) pode ocorrer em função do método de extração de lipídeos adotado. O objetivo deste estudo foi avaliar os valores de meias-vidas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, em amostras de músculo de juvenis de pacu alimentados com uma dieta deficiente e outra suplementada em lisina, antes e após extração de lipídeos pelo método Soxhlet.

METODOLOGIA

Exemplares juvenis de pacu ($10,2 \pm 1,3$ g), num total de 240, foram distribuídos em oito tanques (450 L) e alimentados com duas dietas práticas (23% PD), uma deficiente (NS) e outra suplementada em lisina (L), de acordo com ABIMORAD (2010). Quatro peixes/dia, de cada tratamento, foram pesquisados ao longo do período experimental (13 amostragens em 100 dias), para análises isotópicas do tecido muscular. Após a obtenção dos fragmentos de músculo, as amostras foram divididas em duas subamostras, uma integral (CG) e outra desengordurada (SG) pelo método de Soxhlet, que consiste em banhos de éter etílico por 5 horas. Foram determinados os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das subamostras por espectrometria de massa de razão isotópica. Para mensurar as taxas de turnover (k) no tecido muscular, os

valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ foram plotados em função do tempo e posteriormente ajustados ao modelo exponencial descrito por DUCATTI *et al.* (2002): $\delta_{(t)} = \delta_{(f)} + [\delta_{(i)} - \delta_{(f)}] e^{-kt}$

Com base nos valores da constante k , as meias-vidas ($T_{50\%}$) de carbono e nitrogênio no tecido muscular dos peixes, foram calculadas de acordo com a equação: $T_{50\%} = \ln 2/k$, (dia).

As médias dos valores de meias-vidas para ambos os isótopos, C e N, foram submetidas a análises de variância e ao teste de Tukey, em 5% de probabilidade, em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos em esquema fatorial 2x2, sendo duas subamostras (CG e SG) e dois tratamentos alimentares (NS e L).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito dos tratamentos alimentares sobre $\delta^{13}\text{C}$. Para $\delta^{15}\text{N}$, os peixes alimentados com dieta suplementada em lisina apresentaram maiores valores de meias-vidas em relação aos peixes que receberam dieta deficiente ($P < 0,05$), o que sugere redução da taxa de turnover e consequentemente menor degradação proteica muscular.

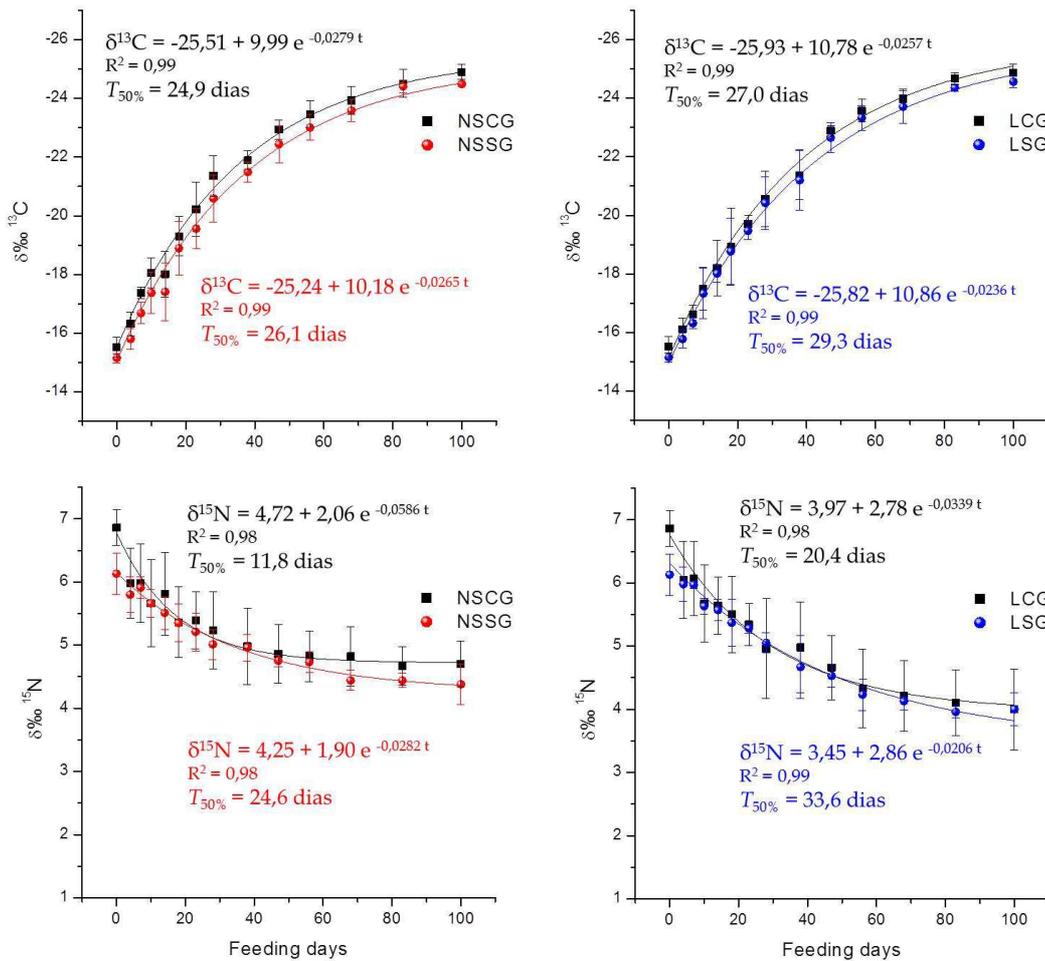


Figura 1. Taxas de turnover e meias-vidas de C e N em músculo de pacus alimentados com uma dieta deficiente e outra suplementada em lisina.

A extração de lipídeos pelo método de Soxhlet resultou em aumento de $\delta^{13}\text{C}$ e redução de $\delta^{15}\text{N}$ nas amostras de tecido muscular dos peixes, em ambos os tratamentos alimentares, influenciando as taxas de turnover e valores de meia-vida.

Os valores de meias-vidas para carbono foram aproximadamente dois dias a mais para ambos os tratamentos alimentares ($P>0,05$), o que sugere pouca influência da extração de lipídeos. Para o nitrogênio, os valores de meias-vidas foram aproximadamente 13 dias a menos para ambos os tratamentos alimentares ($P<0,05$), indicando interferência significativa na interpretação dos dados (Figura 1).

Em um estudo com salmão *Salmo solar*, em que se utilizou para extração de lipídeos o método de BLIGH e DYER (1959), também foi observado aumento de $\delta^{13}\text{C}$; mas, ao contrário do presente estudo, TRUEMAN *et al.* (2005) observaram aumento de $\delta^{15}\text{N}$ nas mostras de músculo e fígado e relataram que isto pode ser devido à lixiviação de moléculas pobres em ^{15}N e solúveis em água, como a amônia.

No presente estudo, o aumento dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ pode estar relacionado à perda de moléculas enriquecidas em ^{15}N e não polares, como lipoproteínas, visto que a extração por Soxhlet, a quente e utilizando éter, é não-específica.

CONCLUSÃO

Dada as imprevisíveis mudanças em $\delta^{15}\text{N}$ devido aos métodos de extração de lipídeos, recomenda-se utilizar as amostras íntegras de tecidos para avaliação de turnover deste isótopo.

REFERÊNCIAS

- ABIMORAD, E.G.; FAVERO, G.C.; SQUASSONI, G.H.; CARNEIRO, D.J. 2010 Dietary digestible lysine requirement and essential amino acid to lysine ratio for pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture Nutrition*, 16: 370-377.
- BLIGH, E.G. e DYER, W.J. 1959 A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917.
- DUCATTI, C.; CARRIJO, S.A.; PEZZATO, A.; MANCERA, P.F.A. 2002 Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Scientia Agrícola*, 59: 29-33.
- TRUEMAN, C.N.; MCGILL, R.A.R.; GUYARD, P.H. 2005 The effect of growth rate on tissue-diet isotopic spacing in rapidly growing animals. An experimental study with Atlantic salmo (*Salmo solar*). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19: 3239-3247.