

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**METODOLOGIA PARA APLICAÇÃO DA L-[¹³C₁]METIONINA
COMO TRAÇADOR EM TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE**

ANA CRISTINA STRADIOTTI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU – SP
Fevereiro - 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**METODOLOGIA PARA APLICAÇÃO DA L-[¹³C₁]METIONINA
COMO TRAÇADOR EM TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE**

ANA CRISTINA STRADIOTTI
Zootecnista

Orientador: Prof. Ass. Dr. ANTONIO CELSO PEZZATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU – SP
Fevereiro - 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S895m Stradiotti, Ana Cristina, 1983-
Metodologia para aplicação da L-[¹³C₁]metionina como traçador em tecidos de frangos de corte / Ana Cristina Stradiotti. - Botucatu : [s.n.], 2010.
vii, 52 f. : fots. color., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010

Orientador: Antonio Celso Pezzato
Inclui bibliografia.

1. Aminoácido enriquecido. 2. Isótopos estáveis. 3. Metodologia. I. Pezzato, Antonio Celso. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

DEDICATÓRIA

A Deus, por sempre estar “à minha frente a me guiar, ao meu lado a me acompanhar, às minhas costas a me guardar e acima de mim a me abençoar”, oferecendo-me tudo que preciso para ser feliz e confortar meu coração.

Aos meus pais Luiz Carlos Stradiotti e Sônia Maria Rebôlla Stradiotti “in memoriam”, pilares da minha vida, pelo exemplo de força, perseverança, coragem e fé, e pelo amor constante, apoio e pela educação.

Aos meus irmãos Alessandra Mara Stradiotti e Luiz Carlos Stradiotti Filho, pelo carinho e apoio incondicionais e amizade eterna.

À minha sobrinha Maria Luiza Rosa Stradiotti, pela alegria e graciosidade acrescentada à minha vida.

Aos demais familiares pelo apoio sempre prestado.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP-Botucatu, pela minha formação profissional e pessoal, oferecendo-me apoio institucional e infraestrutura necessária para o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP-Botucatu, pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo e Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida.

À VACCINAR[®] e TORTUGA[®], pela doação dos suplementos vitamínico-minerais.

Ao Prof. Ass. Dr. Antonio Celso Pezzato, do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ/UNESP-Botucatu, pela orientação, amizade, atenção, confiança, pelo incentivo, auxílio, e que, ao longo desses anos de convivência se mostrou um exemplo de caráter, honestidade e competência. Seus ensinamentos nunca serão esquecidos. Agradeço também pelas boas horas de descontração e por estar sempre presente em todas as fases importantes da minha vida profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti, do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do IB/UNESP-Botucatu, pela doação da L-[¹³C₁]metionina utilizada nesta pesquisa e colaboração, buscando contribuir da melhor forma.

Ao Prof. Dr. José Albertino Bendassolli, do Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP-Piracicaba, com quem tive o prazer de conviver, sempre me acolhendo com muito carinho, paciência e boa vontade.

Aos professores do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ/UNESP-Botucatu, em especial: Dr. José Roberto Sartori, Dra. Margarida Maria Barros, Dr. Luiz Edivaldo Pezzato e Dra. Cyntia Ludovico Martins, pelos ensinamentos, amizade, colaboração, incentivo e exemplo de profissionalismo.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação em Zootecnia da FMVZ/UNESP-Botucatu, Posto de Serviço Lageado, Seila Cristina Cassinelli Vieira, Danilo Juarez Teodoro Dias e Carlos Pazini Júnior, pela prestação de serviços nos momentos requeridos.

Aos funcionários do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ/UNESP-Botucatu, Luis Carlos Fernandes, Silene Vitoratti Mamede, Magali de Arruda e Ana Pires Piraglia, pela amizade, atenção e auxílio.

Aos funcionários da fábrica de ração e supervisão de fazendas da FMVZ/UNESP-Botucatu, pelos auxílios prestados.

A toda a equipe do Laboratório de Nutrição de Aves da FMVZ/UNESP-Botucatu, Arlindo Braga, Wanderley Thiago da Silva, Fabyola Barros de Carvalho, Vitor Barbosa Fascina, Vanessa Cristina Pelícia, Mariana Kiyomi Maruno, Gustavo do Vale Polycarpo, Carolina Carvalho de Miranda, Juliana Spanguero Kanayama, Estela Valéria Siloto, Thaila Cristina Putarov, Everton Moreno Muro, Luciano Aparecido Pereira, Ivan Mailinch Gonçalves Pereira de Souza, Pedro Gibim Castelo, Renata Mendes Dolazza, Cláudia Scobosa Sassamoto, Andréa Mesquita Bolguese Orelhana, Henrique Vieira Kibune e Roberta Krem, pela amizade, incentivo, apoio e importante ajuda na condução dos experimentos.

A toda a equipe do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do IB/UNESP-Botucatu, Cibele Regina de Souza Kruliski, Silvia Regina Américo Maschette, Juliana Célia Denadai, Rosana Gottmann, Luciene Aparecida Madeira, Valquíria Cação da Cruz, Priscila Cavalca de Araujo, Cleusa Móri, Melissa Gaste Martinez, e em especial

ao Técnico de Laboratório Evandro Tadeu da Silva pelo cuidado na realização das análises isotópicas.

Aos meus amigos, Patrícia Conceição Rosa Stradiotti, Matteo Bernardi, Caroline Pelegrina Teixeira, Daniella Aparecida Berto, João Fernando Albers Koch, Marcos Paulo Benedetti, Érica Regina Sernagiotto, Kelen Cristiane Zavarize, Ademir Calvo Fernandes Junior, Cleise Sigarini, Mariela Akie Okino Mituo, Rosângela do Nascimento Fernandes, Andréia Pissinim Soares, Tatiana Beretta e Antonio Guerreiro Neto, pela alegre convivência e preciosa amizade.

Ao meu namorado Lúcio Vilela Carneiro Girão pelo amor, pela dedicação, paciência, pelos momentos maravilhosos que passamos juntos e pela felicidade que trouxe à minha vida.

Aos demais colegas não citados, que eu possa ter cometido a injustiça de esquecê-los neste momento, mas que merecem igual agradecimento e respeito.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a ocorrência desta pesquisa e auxiliaram a realizar mais este sonho, que marcou a minha história.

SUMÁRIO

	Página
<i>CAPÍTULO I</i>	1
Considerações iniciais.....	2
1. Introdução geral.....	2
2. Revisão de literatura.....	3
2.1. Metionina na nutrição de frangos de corte.....	3
2.2. Exigência de metionina para frangos de corte.....	4
2.3. Fontes de grupo metil lábil.....	6
2.4. Papel dos doadores de grupo metil lábil no metabolismo de lipídeos.....	7
2.5. Utilização de isótopos estáveis como traçadores naturais.....	8
2.6. Compostos enriquecidos em ¹³ C.....	12
2.7. Diluição isotópica.....	13
2.8. <i>Turnover</i> isotópico.....	16
3. Justificativas e objetivos.....	19
4. Referências bibliográficas.....	20
 <i>CAPÍTULO II</i>	 26
Incorporação da L-[¹³ C ₁]metionina como traçador em tecidos de frangos de corte no período de 35 a 49 dias de idade.....	27
Resumo.....	27
Abstract.....	28
1. Introdução.....	29
2. Material e métodos.....	31
3. Resultados e discussão.....	39
4. Conclusões.....	48
5. Referências bibliográficas.....	49
 <i>CAPÍTULO III</i>	 51
Implicações.....	52

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO II	26
Incorporação da L-[¹³ C ₁]metionina como traçador em tecidos de frangos de corte no período de 35 a 49 dias de idade.....	27
Tabela 1. Composição e valores nutricionais calculados das rações.....	32
Tabela 2. Valores médios analisados de $\delta^{13}\text{C}$ (médias \pm desvio padrão), expressos em ‰, dos tecidos plasma (PL), fígado (FI), músculo <i>Pectoralis major</i> (PM) e gordura abdominal (GA) de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via oral de solução contendo L-[¹³ C ₁]metionina.....	40
Tabela 3. Valores médios analisados de $\delta^{13}\text{C}$ (médias \pm desvio padrão), expressos em ‰, dos tecidos plasma (PL), fígado (FI), músculo <i>Pectoralis major</i> (PM) e gordura abdominal (GA) de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via intravenosa de solução contendo L-[¹³ C]metionina.....	40
Tabela 4. Equações exponenciais de enriquecimento isotópico em função do tempo no plasma (PL), fígado (FI) e músculo <i>Pectoralis major</i> (PM), de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R ²), a partir da primeira hora de administração via intravenosa (VI) ou oral (VO).....	41
Tabela 5. Valores calculados de meia-vida (horas) no plasma (PL), fígado (FI) e músculo <i>Pectoralis major</i> (PM), de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, a partir da primeira hora de administração via intravenosa (VI) ou oral (VO).....	41
Tabela 6. Porcentagem da massa de ¹³ C incorporada no plasma (PL), fígado (FI) e músculo <i>Pectoralis major</i> (PM), em relação à dosagem administrada via intravenosa, de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade.....	47
Tabela 7. Porcentagem da massa de ¹³ C incorporada no plasma (PL), fígado (FI) e músculo <i>Pectoralis major</i> (PM), em relação à dosagem administrada via oral, de frangos de corte dos 35 aos 49 dias idade.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I	1
Considerações iniciais.....	2
Figura 1. Fórmula estrutural da metionina.....	4
Figura 2. Espectro de massas de $^{13}\text{CO}_2$, para amostra de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, massa 44, 45 e 46.....	11
Figura 3. Diluição isotópica de ^{13}C	14
 CAPÍTULO II	 26
Incorporação da L- $^{13}\text{C}_1$]metionina como traçador em tecidos de frangos corte no período de 35 a 49 dias de idade.....	27
Figura 1. Modelo exponencial do enriquecimento isotópico de ^{13}C (média \pm desvio padrão) no plasma, fígado, músculo <i>Pectoralis major</i> e gordura abdominal de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via oral de solução contendo L- $^{13}\text{C}_1$]metionina.....	42
Figura 2. Modelo exponencial do enriquecimento isotópico de ^{13}C (média \pm desvio padrão) no plasma, fígado, músculo <i>Pectoralis major</i> e gordura abdominal de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via intravenosa de solução contendo L- $^{13}\text{C}_1$]metionina.....	43
Figura 3. Modelo exponencial no período de enriquecimento isotópico de ^{13}C no plasma de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via intravenosa e oral de solução contendo L- $^{13}\text{C}_1$]metionina.....	44
Figura 4. Modelo exponencial no período de enriquecimento isotópico de ^{13}C no fígado de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via intravenosa e oral de solução contendo L- $^{13}\text{C}_1$]metionina.....	44
Figura 5. Modelo exponencial no período de enriquecimento isotópico de ^{13}C no músculo <i>Pectoralis major</i> de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via intravenosa e oral de solução contendo L- $^{13}\text{C}_1$]metionina.....	45

CAPÍTULO I

Considerações iniciais

1. Introdução geral

Avanços no melhoramento genético de frangos de corte têm gerado aves com potencial cada vez maior para ganho de peso e rendimento de peito e pernas. Porém, é necessário, além de boas práticas de manejo, o fornecimento de dietas adequadamente balanceadas para que a ave expresse todo seu potencial genético para crescimento e rendimento das partes de maior interesse.

A suplementação com aminoácidos, vitaminas e minerais em dietas de frangos de corte é prática comum visto que, os ingredientes basais das rações não fornecem a quantidade exigida de alguns nutrientes aos animais. Aminoácidos são essenciais para o crescimento tecidual. A suplementação da dieta com aminoácidos sintéticos reduz custos, permite melhor ajuste nutricional visando cobrir as exigências nutricionais das aves e também possibilita redução do excesso de proteína bruta das rações (BERTECHINI, 2006).

Metionina, colina, betaína e ácido fólico, doadores de grupos metil, são essenciais à nutrição animal em diversas rotas metabólicas. Os grupos metil lábeis participam da síntese de aminoácidos, fosfolípidios e de DNA e RNA (SAUNDERSON e MACKINLAY, 1990). Visto que as aves não são capazes de sintetizá-los, estes devem ser suplementados na dieta. Sob condições de campo, a metionina é adicionada para suprir necessidades específicas deste aminoácido e para fornecer quantidade suficiente de grupos metil para outros aminoácidos sulfurados, de tal forma a se obter desempenho ideal do animal.

A utilização de isótopos estáveis nas pesquisas na área da nutrição é recente e promissora. Gannes et al. (1998), em revisão sobre o uso potencial da variação natural dos isótopos estáveis, destacaram o papel dos fisiologistas no uso dessa ferramenta para esclarecer questões fisiológicas e ecológicas, bem como assegurar os fundamentos teóricos e experimentais para a aplicação dos isótopos estáveis em outras áreas. Dentre as diretrizes para futuras pesquisas com os isótopos estáveis destacadas por esses autores, receberam ênfase o balanço protéico, a alocação de nutrientes e o *turnover* tecidual.

Nas três últimas décadas, a técnica dos isótopos estáveis tem sido aplicada de forma crescente e contínua em estudos agrícolas, ecológicos e de digestibilidade e metabolismo humano e animal. Estas investigações demonstraram que as composições isotópicas dos tecidos de animais dependem principalmente da alimentação, da água ingerida e dos gases inalados e, associado a isto, os efeitos dos isótopos estão ligados aos processos metabólicos (KENNEDY e KROUSE, 1990).

Estudos em nutrição de aves usando os isótopos estáveis como traçadores em suas dietas dão estimativas de quão rapidamente os isótopos estáveis dos tecidos são substituídos por isótopos derivados da dieta (DENADAI et al., 2007; MITUO et al., 2007; PELÍCIA et al., 2007).

A existência dos isótopos raros mais pesados como, por exemplo, do ^{13}C , bem como de outros elementos, possibilita a produção de compostos marcados ou enriquecidos nestes isótopos, caracterizados por apresentarem abundâncias isotópicas acima da natural. Assim como os isótopos estáveis de dietas contrastantes, compostos enriquecidos também podem ser utilizados como traçadores para se avaliar processos metabólicos em seres vivos (BARNES et al., 2002; MURAMATSU et al., 1987), porém são poucos os trabalhos nessa área, devendo-se aprimorar as técnicas de administração destes compostos em animais que são muito invasivas.

O estudo do fluxograma da metionina em diferentes tecidos da carcaça de frangos de corte, pela técnica de isótopos estáveis com metionina enriquecida, poderá permitir maior entendimento da dinâmica dos grupos metil no metabolismo nutricional das aves, uma vez que a alimentação constitui um dos principais fatores para o desenvolvimento eficiente e saudável dos animais.

2. Revisão de literatura

2.1. Metionina na nutrição de frangos de corte

A metionina é um aminoácido essencial, nutricionalmente indispensável para mamíferos e aves, sintetizado naturalmente por plantas e microorganismos a partir do aspartato. Na forma de S-adenosilmetionina, a metionina é o maior doador de radicais metil no organismo animal, sendo necessária para biossíntese de creatina, poliaminas,

epinefrina, colina e melatonina, que são componentes fundamentais para o desenvolvimento das aves (LEHNINGER et al., 2002).

Dentre as funções conferidas à metionina, a principal é ser substrato para síntese de proteínas, além disto, é intermediária nas reações de transmetilação e da rota catabólica da colina e precursora de outros aminoácidos sulfurados, notadamente da cisteína e taurina (STORCH et al., 1990). A Figura 1 ilustra a fórmula estrutural da metionina.

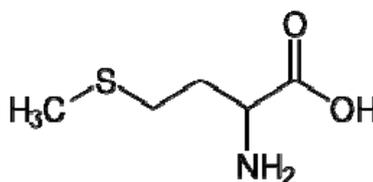


Figura 1. Fórmula estrutural da metionina (LEHNINGER et al. 2002).

A metionina e a cisteína são dois aminoácidos sulfurados, que não só entram na composição dos tecidos corporais, como também do ovo (TORRES, 1989), sendo que a cisteína é sintetizada a partir da serina e da homocisteína, um produto da degradação da metionina (VOET et al., 2000).

Segundo Bertechini (2006), a metionina é um aminoácido essencial, pois não pode ser sintetizada em velocidade e quantidade necessária pelo organismo animal, necessitando, desta forma, ser administrada via dieta. Devido essas características e pelos baixos níveis de metionina na dieta, conduzem rapidamente a um quadro de deficiência, causando redução no desempenho dos animais.

2.2. Exigência de metionina para frangos de corte

As exigências das aves por metionina são afetadas pela sua interação com várias substâncias. Keshavarz e Fuller (1971) verificaram que níveis elevados de arginina em dietas à base de milho e soja, limitantes em metionina, produziram depressão no desempenho dos frangos de corte, com aumento na excreção de creatinina. Quando a metionina ou a betaína foram suplementadas, os efeitos adversos foram superados. O resultado obtido também indicou que a formação da creatinina é um dos mecanismos relacionados na interação de arginina e metionina. A possibilidade da betaína melhorar

o desempenho das aves evidencia que a metionina atua como doadora de grupos metil (ZHAN et al., 2006).

Em dietas contendo níveis tóxicos de metionina, a adição de glicina, serina e treonina, diminuiu o efeito negativo desse excesso, porém a arginina não teve o mesmo efeito (KATZ e BAKER, 1975). Existem exigências fisiológicas tanto para metionina quanto para cisteína, ou seja, quando a metionina está em excesso e a cisteína é deficiente, parte da metionina pode ser convertida em cisteína. O catabolismo da metionina tem a função de eliminar os excessos de metionina, devido a sua toxicidade, e de superar uma deficiência de cisteína. Graber e Baker (1971) verificaram menores exigências de aminoácidos quando a dieta foi suplementada com cistina ou cisteína, do que quando foi suplementada somente com metionina. Picard et al. (1993) determinaram que dietas deficientes em metionina, lisina e triptofano influíram negativamente no consumo de ração.

Frangos de corte alimentados com níveis sub-ótimos de proteína bruta e suplementados com metionina e lisina apresentaram desempenho similar, ou melhor, do que os obtidos com frangos alimentados com dietas de alto nível de proteína bruta (BORNSTEIN e LIPSTEIN, 1975). Segundo Pesti (1981), as exigências de metionina ou colina são aumentadas pelas altas concentrações de proteína dietética, ou pelo excesso de nitrogênio proveniente de um aminoácido.

As exigências de metionina e de aminoácidos sulfurados foram de 0,397% e 0,714%, respectivamente, para frangos de corte machos entre 34 a 42 dias de idade, alimentados com ração contendo 3100 kcal EM/kg de ração (ROSTAGNO et al., 2005). Jensen et al. (1989) propõe o nível de 0,78% de aminoácidos sulfurados para máxima eficiência no desempenho e qualidade de carcaça. Schutte e Pack (1995) observaram que as exigências de aminoácidos sulfurados para frangos de corte (14 a 38 dias de idade) foram de 0,88% (0,46% metionina + 0,42% cisteína), quando estimado em base da eficiência alimentar ou da produção de carne de peito. Milan e Craig (1996) utilizando dietas altamente protéicas estimaram as exigências de 0,44% para metionina e 0,66% para aminoácidos sulfurados.

A metionina é conhecida por ser o fator chave na regulação do metabolismo do ácido fólico. A suplementação de ácido fólico forma mais grupos metil lábeis disponíveis para remetilação da homocisteína para formar metionina *in vivo*. As inter-

relações metabólicas entre metionina e ácido fólico podem ser nutricionalmente importantes na fase inicial de frangos de corte em termos de melhor desenvolvimento corporal (RYU et al., 1995).

Em estudos realizados por Pesti et al. (1991) foi observado que pintainhos alimentados com dieta basal (milho e soja) sem a suplementação de metionina ou colina, responderam à suplementação de ácido fólico, porém, quando metionina e colina foram suplementados não se detectou resposta do ácido fólico.

Os requerimentos de grupo metil lábil são determinados somente quando ácido fólico está adequadamente presente na dieta, estando suprida por metionina ou colina, ou ambos (PESTI et al., 1991).

2.3. Fontes de grupo metil lábil

Os grupos metil são necessários em várias reações metabólicas, tais como a síntese da metionina, carnitina e creatina. Visto que as aves não são capazes de sintetizar grupos metil, estes devem ser suplementados na dieta, sendo que a metionina e colina podem fornecê-los (DEVLIN, 1998). Quando se considera as formulações das rações comerciais, metionina e colina são adicionadas para suprir necessidades específicas destes compostos, e para fornecer quantidade suficiente de grupos metil de tal forma a se obter o desempenho ideal do animal.

Um grupo metil é formado por três átomos de hidrogênio e um átomo de carbono. É chamado grupo metil lábil ou grupo metil pré-formado quando pode ser transferido de uma molécula para outra nas células do animal (PESTI, 1989).

Uma reação importante promovida pela betaína é a transferência de grupo metil da colina ou da metionina ao tetrahidrofolato e a síntese de purina, para a excreção de nitrogênio. Para cada mol de nitrogênio a ser excretado, são necessários dois moles de metil. Assim, como consequência, em dietas com excesso de proteína, a exigência de grupo metil lábil aumenta (PESTI, 1981).

Pesti et al. (1979) exemplificam que numa ração comercial a base de milho e soja a necessidade de suplementação com metionina e colina deve-se basicamente a necessidade de suprir grupos metil. A suplementação do grupo metil, em níveis de até 2000 ppm, melhorou o rendimento dos frangos de corte e a substituição de colina por betaína resultou em rendimento igual ou superior do animal.

O nível de metionina na dieta é importante em relação à necessidade de colina como doador de grupo metil e vice-versa. A colina pode substituir a metionina em algumas funções, porém não nas necessidades básicas de metionina para a síntese protéica, a menos que a dieta contenha homocisteína (BERTECHINI, 2006).

2.4. Papel dos doadores de grupo metil lábil no metabolismo de lipídeos

Os fosfolipídios são constituintes vitais dos tecidos estando presentes nas camadas lipídicas das membranas celulares e da cartilagem da matriz óssea. Por conseqüência, são importantes na prevenção da perose nas aves e, as lipoproteínas desempenham papel fundamental na prevenção do acúmulo de gordura no fígado, também denominado síndrome do fígado gordo (BERTECHINI, 2006).

A deficiência de metionina nas dietas produz maior deposição de gordura, devido ao aumento na atividade das enzimas responsáveis pela formação do ácido úrico, provocando maior catabolismo da proteína, o que contribui para que a energia se deposite como gordura (MORAN, 1994). Schutte e Pack (1995) observaram que níveis sub-ótimos de metionina+cistina produzem maior acúmulo de gordura abdominal e nos órgãos, ao contrário de Liu et al. (2007) que suplementaram frangos de corte com dois níveis de metionina e verificaram aumento na deposição de músculo do peito e diminuição da gordura abdominal, demonstrando o efeito positivo e a importância da suplementação e atendimento dos requerimentos deste aminoácido.

As reações de metilação são da maior importância no metabolismo das gorduras. Geralmente as fontes de grupo metil induzem à mobilização de lipídios no fígado e este efeito foi demonstrado em ratas alimentadas com dietas altas em colesterol, suplementadas com betaína (SUGIYAMA et al., 1986). A suplementação com betaína na dieta preveniu de forma eficaz a síndrome do fígado gordo induzido experimentalmente em ratas (BARAK et al., 1992).

Além da vantagem de prevenção contra fígado gordo, a suplementação com grupos metil, pode reduzir o conteúdo de gordura e melhorar sua distribuição na carcaça.

2.5. Utilização de isótopos estáveis como traçadores naturais

O termo isótopo foi criado pelo Sr. Frederick Soddy e vem do grego *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato de que são elementos que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica.

Os isótopos podem ser definidos como átomos do mesmo elemento químico, que apresentam o mesmo número de prótons e diferentes números de nêutrons, portanto diferem em número de massa. Pode-se dizer que apresentam as mesmas propriedades químicas e diferentes propriedades físicas.

Como a eletrosfera do átomo é comum a todos os isótopos, ou seja, com mesmo número de elétrons, ela mascara o conteúdo do núcleo do átomo, enganando o processo seletivo de uma membrana biológica vegetal ou animal, e devido a isso funcionam como excelentes traçadores (DUCATTI, 2007). Por não emitirem radiação, pois são estáveis, foram usados inicialmente em estudos geológicos e arqueológicos, principalmente, os isótopos de carbono, que se apresentam como alternativa para estudar os processos relacionados à digestão, absorção e metabolismo de nutrientes, por estarem presentes em todos os nutrientes capazes de gerar energia aos animais e por representarem cerca de 50% dos elementos químicos que compõem o corpo dos animais superiores (MURRAY, 1990). Segundo DeNiro e Epstein (1978), a integração da composição isotópica do carbono incorporado no corpo do animal e o que foi perdido na respiração e excreção deve ser igual à composição isotópica de carbono da dieta.

Os elementos naturais que constituem os isótopos estáveis, como por exemplo, carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O) e nitrogênio (N), ocorrem naturalmente através da atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera. A maioria dos elementos apresenta um isótopo estável leve dominante: ^{12}C , ^1H , ^{16}O e ^{14}N e um ou dois isótopos estáveis pesados: ^{13}C , ^2H , ^{17}O , ^{18}O e ^{15}N , com abundância ou concentração natural expressa em átomos % (DUCATTI, 2007).

Naturalmente há ocorrência de dois isótopos estáveis de carbono: ^{12}C e ^{13}C , com abundâncias naturais de aproximadamente 98,89 e 1,11 átomos %, respectivamente (KENNEDY e KROUSE, 1990), que variam nos tecidos vegetais de acordo com o ciclo fotossintético das plantas do ciclo C_3 e do ciclo C_4 , onde o composto orgânico formado é um ácido carboxílico com três e quatro átomos de carbono, respectivamente.

A terminologia comumente empregada na detecção dos valores do enriquecimento relativo dos elementos naturais é expressa pela linguagem delta per mil ($\delta\%$) e por átomos por cento (atm $\%$) para compostos naturais e enriquecidos, respectivamente (BARRIER e PROSSER, 1996, citados por VASCONCELLOS, 2001).

A razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra é obtida em relação a um padrão internacional definido, PeeDee Belemnite (PDB). Segundo Friedman e O'Neill (1977), citados por Ducatti et al. (1979), o padrão PDB é aceito universalmente na comparação das composições isotópicas do carbono. Trata-se de um carbonato de cálcio sólido de *Belemnitella cretaceos*, *Belemnitella americana*, da formação PeeDee da Carolina do Sul - EUA, empregado inicialmente como padrão por Craig (1957). Foi detectada variação significativa neste padrão (material não homogêneo) sendo assim, utiliza-se o termo Vienna-PeeDee Belemnite (V-PDB), que é a nova referência calibrada laboratorialmente. Atualmente é utilizado como padrão de trabalho rocha carbonatada (mármore) com alta pureza em calcita (DUCATTI et al., 1979).

A determinação dos valores isotópicos, ou sinal isotópico é conseguido a partir de amostras do material orgânico que são analisadas pelo equipamento conhecido como espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS), que mede a concentração dos diferentes isótopos do elemento, admitido no sistema sob a forma gasosa (ex.: H_2 , CO_2 , N_2), com erro analítico de 0,2%. Neste sistema, de acordo com Ducatti (2007), a amostra e o padrão são admitidos na forma de dióxido de carbono e após a passagem por uma fonte de ionização, os feixes dos íons gerados são separados por um campo magnético de acordo com suas relações massa/carga.

A medida da relação entre isótopos estáveis mensurados por espectrometria de massa de baixa resolução é obtida pela expressão (1) de enriquecimento isotópico relativo:

$$\delta i_{(\text{amostra, padrão})} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 10^3 \quad (1)$$

A simbologia da expressão (1) indica que (*i*) refere-se ao isótopo pesado do elemento químico em consideração e (R) refere-se à razão entre o isótopo pesado e o leve, tanto para a amostra quanto para seu padrão internacional. A terminologia δ reflete o enriquecimento relativo da razão isotópica da amostra (expresso em $\delta\%$),

comparativamente a razão isotópica do padrão internacional, e é utilizada na análise de mensuração das variações isotópicas naturais.

Na análise de compostos enriquecidos, fez-se uso do espectrômetro de massas, ATLAS MAT CH4 de fluxo molecular, o $^{13}\text{CO}_2$ foi introduzido, sob baixa pressão ($\pm 10^{-8}$ mbar), dentro de uma câmara de ionização, de onde as moléculas do gás foram bombardeadas por um feixe de elétrons emitidos por um filamento (rênio) aquecido, produzindo íons gasosos positivos. Na seqüência, os íons foram acelerados em placas negativas de 400 a 4000 V e aplicou um campo magnético perpendicular à trajetória dos íons. Como resultado dessa interação os íons foram desviados e separados de acordo com a relação carga/massa (q/m). Assim o íon $^{13}\text{CO}_2^+$ (q/m = 45) atingiu o eletrodo negativo em um local diferente do íon $^{12}\text{CO}_2^+$ (q/m = 44). Cada um destes íons foi concebido em um coletor tipo faraday e várias massas referentes à região dos íons CO_2^+ são coletados: 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$), 45 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$; $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$), 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$ e $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$), 47 ($^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{18}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$ e $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$), 48 ($^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ e $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{18}\text{O}$) e 49 ($^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$).

Considerando que as combinações referentes às massas 47, 48, 49 são de baixa intensidade em relação às outras (SANTROCK et al., 1985), pode-se restringir o espectro aos números de massa: 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$), 45 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$; $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$). Sendo que a intensidade dos feixes de íons da massa 46 representa $< 0,02\%$ da somatória de todas as intensidades. Assim foi calculada a abundância de ^{13}C de uma determinada amostra pela equação (1):

$$\% \text{ em átomos de } ^{13}\text{C} = 100 - 100/[I_{45}/I_{44} - 0,00075] + 1 \quad (1)$$

Onde:

I_{44} = intensidade do feixe de íons de massa 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$);

I_{45} = intensidade do feixe de íons de massa 45 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$; $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$);

0,00075 = valor do coeficiente angular da reta entre as razões I_{45}/I_{44} e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

Os valores utilizados na equação (1) são obtidos de espectro de massas 44 e 45, contendo 3 repetições, para cada amostras de CO_2^+ . Um espectrômetro de massas obtido no espectrômetro, em escala logarítmica, pode ser visualizado na Figura 2.

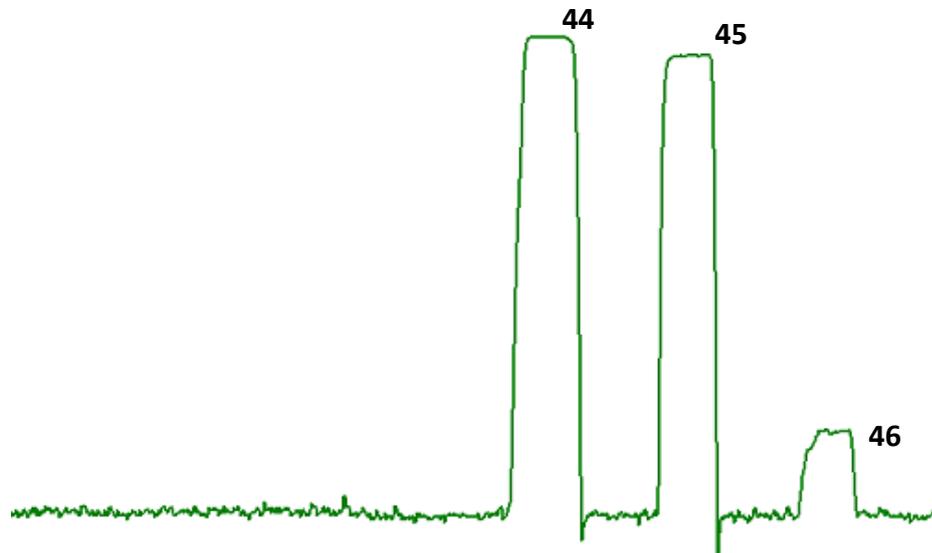


Figura 2: Espectro de massas de $^{13}\text{CO}_2$, para amostra de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, massa 44, 45 e 46 (SANTROCK et al., 1985).

Se durante o experimento houver diluição isotópica de modo que não se consiga resultados em átomos %, pode-se converter esses valores para escala delta per mil.

O contraste existente na relação isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ das plantas de ciclo fotossintético C_3 e C_4 tem possibilitado estudos na área de nutrição e metabolismo animal, os quais têm como marcador o ^{13}C e sua concentração natural existente nos alimentos. Como as plantas são consumidas pelos animais, a *impressão digital isotópica* destas fontes será refletida nos tecidos específicos dos animais, após certo tempo de metabolismo (GANNES et al., 1998; DeNIRO e EPSTEIN, 1978). Esta metodologia isotópica, entretanto, não pode substituir as técnicas convencionais onde informações dietéticas detalhadas são necessárias e principalmente quando várias opções dietéticas estão disponíveis (HOBSON e CLARK, 1992b). Entretanto, existem vantagens importantes para o uso de isótopos estáveis, que ocorrem naturalmente como indicadores dietéticos, sobre as técnicas convencionais, dentre as quais, as estimativas dietéticas isotópicas são baseadas nos alimentos assimilados e não apenas nos alimentos ingeridos e, comparativamente, podem ser obtidas informações de dietas consumidas a longos períodos (HOBSON e CLARK, 1992b).

Gannes et al. (1998) em revisão sobre o uso potencial da variação natural dos isótopos estáveis, destacam o uso dessa ferramenta para esclarecer questões fisiológicas

e ecológicas, bem como assegurar os fundamentos teóricos e experimentais para aplicação dos isótopos estáveis em outras áreas. Dentre as diretrizes para futuras pesquisas com os isótopos estáveis destacadas por esses autores, receberam ênfase o balanço protéico, a alocação de nutrientes e o *turnover* tecidual.

2.6. Compostos enriquecidos em ^{13}C

Determinam-se as propriedades químicas dos elementos quase que exclusivamente pelo número e arranjo dos elétrons atômicos, os quais, por sua vez, se determinam pela carga nuclear. Os isótopos de um mesmo elemento terão, praticamente, propriedades químicas idênticas. Existem, portanto mínimas diferenças nas propriedades químicas devidas às pequenas variações no tamanho nuclear e às pequenas distinções de massas entre diferentes isótopos, suficientes para permitir a separação de isótopos de um mesmo elemento. A diferença de comportamento pode, inclusive, influenciar o conjunto dos níveis energéticos dados pelo nível vibracional, rotacional e translacional, quando as espécies isotópicas de um mesmo elemento são comparadas entre si. Com relação a métodos utilizados para a separação dos isótopos estáveis de carbono (^{12}C e ^{13}C), pode-se destacar a cromatografia de troca iônica (TAKEDA et al., 1987) e a destilação (McLNTEER, 1980).

Assim como no uso de isótopos radioativos, pode ser realizado o enriquecimento da fonte em termos de seus isótopos estáveis (VASCONCELLOS, 2001). Por exemplo, plantas colocadas em ambiente controlado, enriquecidas em $^{13}\text{CO}_2$, produzirão fotoassimilados enriquecidos em ^{13}C , conseqüentemente alterando seu sinal isotópico e possibilitando sua determinação (direção de translocação) onde quer que estejam alocados. Dessa forma, se utiliza os isótopos estáveis como “traçadores” ou “marcadores” a semelhança dos isótopos radioativos.

A existência dos isótopos raros mais pesados como, por exemplo, do ^{13}C , bem como de outros elementos, possibilita a produção de compostos marcados ou enriquecidos nestes isótopos, caracterizados por apresentarem abundâncias isotópicas acima da natural.

A técnica isotópica que emprega o ^{13}C como traçador consiste, basicamente, em fornecer ao organismo em estudo um composto químico no qual a razão isotópica

($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) do composto considerado é diferente da natural e, em seguida, avaliar a distribuição do isótopo no sistema em estudo.

O equilíbrio entre compostos enriquecidos naturais segue o fenômeno de troca, que está baseado na aplicação da lei de diluição isotópica, utilizado nos estudos das reações de troca isotópica. Uma reação de troca isotópica é uma reação segundo a qual dois átomos com o mesmo número atômico, mas com número de massa diferente substituem-se mutuamente. Desse modo, a quantidade de um elemento marcado fixado em um órgão ou tecido, em um dado período de tempo, fornece uma estimativa de troca, ou do modelo de partição do referido elemento. Porém, a medida desta estimativa requer condições específicas para determinação precisa. Para tanto, uma análise das medidas do isótopo marcado nos diferentes órgãos, durante o período de enriquecimento, acompanhado de uma análise compartimental, permite elaboração de um modelo a partir do qual o tamanho dos compartimentos e os parâmetros de transferência possam ser avaliados. O tempo da diluição isotópica também é importante, pois enriquecimento por longo tempo permite obter um equilíbrio de troca entre a fonte enriquecida e os vários órgãos ou tecidos, de forma que o fluxo do elemento marcado será proporcional ao do elemento não marcado (DELÉENS et al., 1994).

Alguns trabalhos já foram realizados para se avaliar processos metabólicos em aves, utilizando-se aminoácidos enriquecidos através infusões intravenosas, sendo possível, através desta técnica, obter os resultados promissores como os obtidos por vários pesquisadores (BARNES et al., 2002; MURAMATSU et al., 1987).

2.7. Diluição isotópica

O método da diluição isotópica está baseado no balanço isotópico entre os isótopos de um elemento numa amostra antes e depois da adição do material enriquecido num dos isótopos. As equações (2 e 3) adaptadas por Trivelin et al. (1994) evidenciam o balanço de massa isotópico, para as condições do trabalho em apreço, fazendo-se uso da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina.

$$f_{\text{met}} \cdot \text{Ab}_{\text{met}} + f_{\text{nat}} \cdot \text{Ab}_{\text{bat}} = (f_{\text{met}} + f_{\text{nat}}) \cdot \text{Ab}_p \quad (2)$$

$$f_{\text{met}} + f_{\text{nat}} = 1 \quad (3)$$

Onde:

f_{met} e f_{nat} = frações de carbono no produto proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina e de fonte natural, respectivamente;

Ab_{met} , Ab_{nat} e Ab_{p} = abundância (% em átomos de ^{13}C) no aminoácido L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina, fonte natural e produto, respectivamente.

A partir do balanço de massa isotópico pode-se determinar, no produto final, a contribuição da fonte de carbono proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina, e da fonte natural no isótopo ^{13}C . A Figura 3 ilustra esquematicamente o processo de formação do produto final (plasma, fígado e músculo *Pectoralis major*) a partir de duas fontes com diferentes abundâncias isotópicas de ^{13}C .

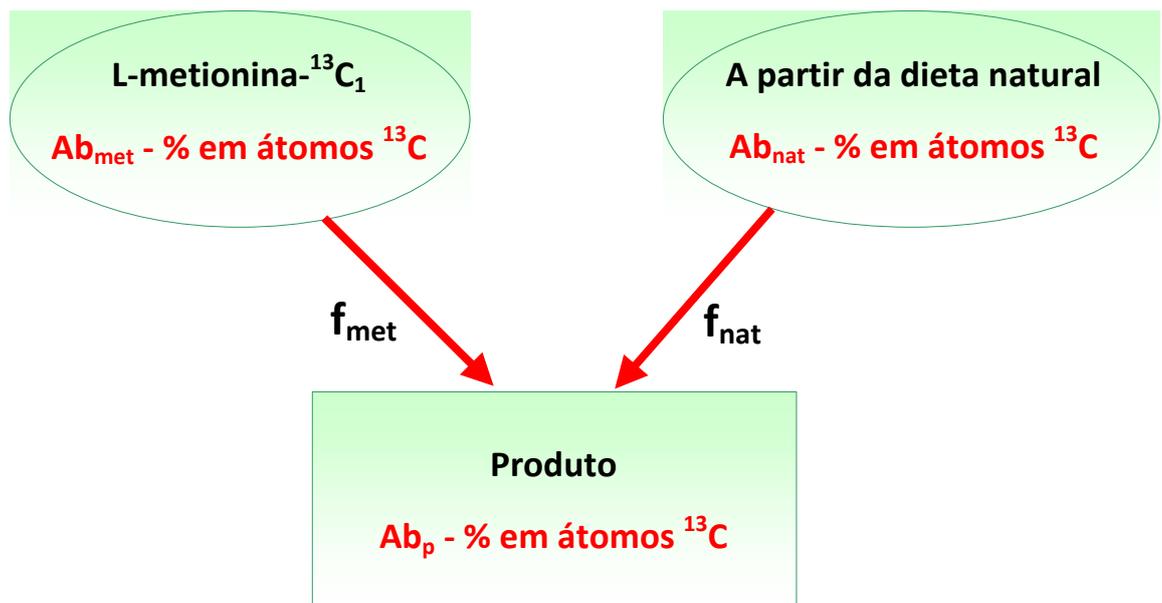


Figura 3. Diluição isotópica de ^{13}C .

Neste esquema exemplificado na Figura 3, f_{met} representa a fração de carbono no produto final, proveniente do aminoácido L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina; f_{nat} , a fração de carbono no produto final, proveniente da dieta fornecida (amostra controle em uso da molécula marcada) e Ab_{met} , Ab_{nat} e Ab_{p} correspondem, respectivamente a abundância isotópica de ^{13}C (% em átomos de ^{13}C) no aminoácido L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina, nas partes do frango a partir da dieta natural e no produto final após aplicação de material enriquecido em ^{13}C .

O método de diluição isotópica consiste na adição de uma quantidade conhecida e exata do material enriquecido num dos isótopos de um elemento. Deve-se esperar o equilíbrio entre os isótopos da amostra e do material enriquecido, resultando na formação de uma mistura final de razão isotópica diferente das razões isotópicas da amostra (produto) e do material enriquecido (fonte empregada ou L-[¹³C₁]metionina). Os espectrômetros de massas permitem a obtenção de um espectro de massas que é usado para medir a alteração da razão isotópica e então a razão isotópica da mistura final (Ab_p).

O valor da abundância natural (Ab_{nat}) no isótopo ¹³C é obtido a partir de ensaios, em triplicata, não empregando material enriquecido na dieta alimentar das aves. A abundância natural no isótopo ¹³C foi obtida para cada uma das frações ou produtos avaliados no presente trabalho.

A partir das equações 2 e 3, pode-se escrever:

$$f_{met} = (Ab_p - Ab_{nat}) / (Ab_{met} - Ab_{nat}) \quad (4)$$

Em termos percentuais a equação (4) pode ser escrita da seguinte maneira:

$$\% CPP_{met} = [(Ab_p - Ab_{nat}) / (Ab_{met} - Ab_{nat})] \cdot 100 \quad (5)$$

Onde:

$\% CPP_{met}$ = percentual de carbono no produto proveniente do aminoácido L-[¹³C₁]metionina.

A partir da massa do produto (M_p) avaliado, pode-se obter a quantidade de carbono em cada uma das frações (equação 6), sendo:

$$CPP_{met} = [(Ab_p - Ab_{nat}) / (Ab_{met} - Ab_{nat})] \cdot (\%Ct_p) \cdot (M_p) \quad (6)$$

Onde:

CPP_{met} = carbono no produto proveniente da L-[$^{13}C_1$]metionina (μg);

M_p = massa total do produto (μg);

% Ct_p = percentual de carbono total no produto.

2.8. Turnover isotópico

Os constituintes corporais se encontram em estado dinâmico, sendo continuamente formados e utilizados para diferentes propósitos, com renovação contínua dos elementos químicos e, conseqüentemente, de seus isótopos que compõem o tecido corporal ou o organismo como um todo. Esse processo é geralmente chamado *turnover*. Todas as substâncias do corpo, sejam metabólitos orgânicos ou inorgânicos, estão sujeitas ao *turnover* (HETENYI et al., 1983).

Turnover isotópico é a renovação contínua dos elementos químicos e, conseqüentemente, de seus isótopos que compõem o tecido corporal ou o organismo como um todo, podendo ocorrer por meio de renovação tecidual resultante do processo de síntese e degradação em tecidos adultos e/ou pelo próprio crescimento nos tecidos em formação (diluição isotópica) (CARRIJO e DUCATTI, 2007).

Segundo Gannes et al. (1998), dietas com assinaturas isotópicas contrastantes podem ser usadas para mensurar o *turnover* de componentes corporais e órgãos de animais. Após a mudança da dieta, a alteração da composição isotópica no tecido depende da velocidade com que esses constituintes são substituídos (TIESZEN et al., 1983).

Tecidos com *turnover* isotópico rápido retratam dietas mais recentes, enquanto aqueles com *turnover* mais lento refletirão dietas de períodos anteriores. Tecidos metabolicamente mais ativos (sangue, fígado, pâncreas) apresentam taxas de *turnover* mais rápidas que os menos ativos (colágeno dos ossos) (HOBSON e CLARK, 1992a), embora as escalas de tempo associadas a tais alterações não estejam esclarecidas (FRAZER et al., 1997). Portanto, a escolha do tipo de tecido para análise isotópica irá depender do interesse em questão.

Zuanon (2003) afirma que existem dois tecidos de grande importância para as funções fisiológicas do corpo: o fígado e o tecido muscular. Estes se comportam de maneiras diferentes. O fígado que é um órgão homeostático, redistribui os metabólitos

para os demais tecidos corporais. Os músculos tendem a reagir mais lentamente que o fígado, em termos metabólicos, basicamente em função da dieta (PERAGÓN et al., 2001; CRUZ, 2002).

Os estudos avícolas que usam isótopos estáveis como traçadores em suas dietas dão estimativas de quão rapidamente os isótopos estáveis dos tecidos são substituídos por isótopos derivados da dieta (DENADAI et al., 2007; MITUO et al., 2007; PELÍCIA et al., 2007). Do mesmo modo, ao se utilizar aminoácidos enriquecidos, estes podem atuar como traçadores, possibilitando observar taxas de *turnover* em tecidos animais, bem como a obtenção da rota e porcentagem destes destinados a diferentes tecidos, quando conhecida sua dosagem.

Ducatti et al. (2002) propuseram modelo teórico capaz de exprimir os resultados do enriquecimento relativo do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em função do tempo de alimentação, fornecendo dietas contrastantes em $\delta^{13}\text{C}$ (formuladas com grãos de plantas do ciclo C_3 e C_4) a animais adultos. Partindo do pressuposto que o metabolismo de determinado tecido animal depende da taxa de entrada de compostos de carbono provenientes da dieta e da taxa de substituição dos compostos pré-existentes, os autores chegaram à equação (7):

$$\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)]e^{-kt} \quad (7)$$

Onde:

$\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento isotópico relativo no tecido em qualquer tempo (t), expresso em ‰. Adimensional;

$\delta^{13}\text{C}(f)$ = enriquecimento isotópico relativo no tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final, expresso em ‰. Adimensional;

$\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento isotópico relativo no tecido, na condição inicial, expresso em ‰. Adimensional;

k = constante de troca (*turnover*) em unidades de horas⁻¹;

t = tempo (em horas) desde a substituição da ração.

Segundo Zuanon (2003), o modelo matemático proposto para avaliar a substituição do carbono tecidual em animais adultos mostrou-se adequado para animais em desenvolvimento.

Partindo do pressuposto que a incorporação de uma molécula no tecido depende dos processos de síntese e degradação (*turnover*), é possível verificar, através da fórmula desenvolvida por Ducatti et al. (2002), a velocidade de incorporação de determinadas moléculas (exemplo: compostos enriquecidos nos isótopos estáveis de ^{13}C , ^{15}N , ^{34}S , etc.) nos tecidos dos animais.

3. Justificativas e objetivos

O estudo do fluxograma da metionina em diferentes tecidos da carcaça de frangos de corte, pela técnica de isótopos estáveis com metionina enriquecida, poderá permitir maior entendimento da dinâmica dos grupos metil no metabolismo nutricional das aves, uma vez que a alimentação se constitui um dos principais fatores para o desenvolvimento eficiente e saudável dos animais.

Metodologias para diversos tipos de análises vêm sendo desenvolvidas buscando-se maior eficiência e maior facilidade de obtenção dos resultados. Sendo assim, a técnica dos isótopos estáveis com aminoácidos enriquecidos pode mostrar-se eficiente ferramenta para se determinar a rota, bem como a porcentagem de aminoácidos destinados para diferentes partes do corpo do animal e assim relacionar a importância destes para cada tecido.

Alguns trabalhos foram realizados com aminoácidos enriquecidos em seres vivos, onde a via de administração é geralmente intravenosa, porém esta é uma via pouca prática para se utilizar em animais, pois é estressante para os mesmos. Como nas pesquisas deve-se levar em consideração o bem-estar animal, é necessário testar outros métodos de administração que possam propiciar menor sofrimento aos mesmos, sem que os resultados sejam prejudicados.

O Capítulo II, denominado **“INCORPORAÇÃO DA L-[¹³C₁]METIONINA COMO TRAÇADOR EM TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE NO PERÍODO DE 35 A 49 DIAS DE IDADE”**, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na *Revista Brasileira de Ciência Avícola – Brazilian Journal of Poultry Science*, publicada pela *Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de incorporação da L-[¹³C₁]metionina no plasma, fígado, músculo *Pectoralis major* e gordura abdominal de frangos de corte no período de 35 a 49 dias de idade pela técnica dos isótopos estáveis, bem como determinar dosagem e a melhor forma de administração desse aminoácido enriquecido.

4. Referências bibliográficas

BARAK, A. J. et al. Dietary betaine promotes generation of hepatic S-adenosylmethionine and protects the liver from ethanol-induced fatty infiltration. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY BY BIOMEDICAL RESEARCH ON ALCOHOLISM, 6th, 1992, Bristol, **Proceedings...** United Kingdom, v. 17, p. 552-555, 1992.

BARNES, D. M. et al. Protein metabolism during an acute phase response in chickens. **Amino Acids**, Austria, v. 22, p. 15-26, 2002.

BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: Editora UFLA, 301 p., 2006.

BORNSTEIN, S.; LIPSTEIN, B. The replacement of some of the soybean meal by the first limiting amino acids in practical broiler diets. **Journal of British Poultry Science**, Israel, v. 16, p. 177-188, 1975.

CARRIJO, A. S.; DUCATTI, C. Utilização de isótopos estáveis do carbono para a rastreabilidade de rações. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2007, Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, p. 289-307, 2007.

CRAIG, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Chicago, v. 12, p. 133-149, 1957.

CRUZ, V. C. **Livre escolha de alimentos dos ciclos fotossintéticos C₃ e C₄, fracionamento e turnover dos isótopos estáveis do carbono em tecidos de frangos de corte**. 2002. 65 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

DELÉENS, E.; CLIQUET, J. B.; PRIOL, J. L. Use of ¹³C and ¹⁵N plant label near natural abundance for monitoring carbon and nitrogen partitioning. **Australian Journal Plant Physiology**, France, v. 21, p. 133-146, 1994.

DENADAI, J. C. et al. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 8, p. 251-256, 2007.

DeNIRO, M. J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, California, v. 42, p. 495-506, 1978.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, p. 368-407, 1998.

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu: UNESP, Instituto de Biociências, 201 p., 2007.

DUCATTI, C. et al. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono – 13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 29-33, 2002.

DUCATTI, C.; SALATI, E.; MATSUI, E. Método de análise da ração $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em matéria orgânica e das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ em carbonatos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 2, p. 275-286, 1979.

FRAZER, T. K. et al. Turnover of carbon and nitrogen during growth of larval krill, *Euphausia superba* Dana: a stable isotope approach. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, California, v. 212, p. 259-275, 1997.

GANNES, L. Z.; DEL-RIO, C. M.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Comparative Biochemistry Physiology**, New York, v. 119A, n. 3, p. 725-737, 1998.

GRABER, G.; BAKER, D. H. Sulfur amino acid nutrition of the growing chick: quantitative aspect concerning the efficacy of dietary methionine, cysteine and cystine. **Journal of Animal Science**, v. 5, p. 1005-11, 1971.

HETENYI, G. J. R.; PEREZ, G.; VRANIC, M. Turnover and precursor-product relationships of non lipid metabolites. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 63, n. 2, p. 606-667, 1983.

HOBSON, K. A.; CLARK, R. G. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ^{13}C in tissues. **The Condor**, Los Angeles, v. 94, p. 181-188, 1992a.

HOBSON, K. A.; CLARK, R. G. Assessing avian diets using stable isotopes II: Factors influencing diet-tissue fractionation. **The Condor**, Los Angeles, v. 94, p. 189-197, 1992b.

JENSEN, L. S.; WYATT, C. L.; FANCHER, B. I. Sulfur amino acid requirement of broiler chickens from 3 to 6 weeks of age. **Journal of Poultry Science**, v. 68, p. 163-168, 1989.

KATZ, R. S.; BAKER, D. H. Methionine toxicity in the chicks: nutritional and metabolic implications. **Journal of Nutrition**, Illinois, v. 105, p. 1168-1175, 1975.

KENNEDY, B. V.; KROUSE, H. R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, Canada, v. 68, p. 960-972, 1990.

KESHAVARZ, K.; FULLER, H. L. Relationship of arginine and methionine in nutrition of chick and significance of creatinine biosynthesis in their interaction. **Journal of Nutrition**, Georgia, v. 101, p. 855-862, 1971.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 975p., 2002.

LIU, Y. L. et al. Impact of feeding 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid and DL-methionine supplemented maize-soybean-rape seed meal diets on growth performance and carcass quality of broilers. **Journal of British Poultry Science**, China, v. 48(2), p. 190-197, 2007.

McLNTEER, B. B. Isotope separation by distillation: design of a carbon-13 plant. **Separation Science and Technology**, Tennessee, v. 15, n. 3, p. 491-508, 1980.

MILAN, H.; CRAIG, N. C. The estimation of dietary requirements for combined methionine and cystine for broiler chicks using the concept of excreta nitrogen determination. In: ANNUAL MEETING OF THE POULTRY SCIENCE ASSOCIATION, 5th, 1996, **Proceedings...** 40 p., 1996.

MITUO, M. A. O. et al. Incorporação do carbono-13 em músculo peitoral e sangue de frangos de corte no período inicial de crescimento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44, 2007, Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal: SBZ, 2007. 1 CD-ROM.

MORAN E. T., Jr. Response of broiler strains differing in body fat to inadequate methionine: live performance and processing yields. **Journal of Poultry Science**, Alabama, v. 73(7), p. 1116-26, 1994.

MURAMATSU, T. et al. Effect of protein starvation on protein turnover in liver, oviduct and whole body of laying hens. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Japan, v. 87(2), n. 2, p. 227-232, 1987.

MURRAY, R. K. **Biomoléculas e métodos bioquímicos**. In: MURRAY, R. K. (Ed). Harper: Bioquímica. São Paulo: Atheneu, p. 4-11, 1990.

PELÍCIA, V. C. et al. Efeito dos nucleotídeos na dieta sobre o *turnover* do carbono – 13 da mucosa intestinal de frangos de corte. In: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA BRASIL, 20, 2007, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre: ALA, p. 43-45, 2007.

PERAGÓN, J. et al. Growth, protein-turnover and nucleic-acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during development. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, Spain, v. 33, p. 1227-1238, 2001.

PESTI, G. M. The nutrition of labile methyl group donors in broiler chickens. **Georgia Nutrition Conference**. Georgia, p. 145–150, 1989.

PESTI, G. M. Choline and methionine nutrition and its applications in broilers. **Hot Spring Nutrition inc Symposium Arkansas Nutrition Conference**. Arkansas, p. 17-28, 1981.

PESTI, G. M.; HARPER, A. E.; SUNDE, M. L. Sulfur amino acid and methyl donor status of corn soy diets fed to starting broiler chicks and turkey poults. **Journal of Poultry Science**, v. 58, p. 1541-1547, 1979.

PESTI, G. M.; ROWLAND, G. N. 3rd; RYU, K. S. Folate deficiency in chicks fed diets containing practical ingredients. **Journal of Poultry Science**, Georgia, v. 70(3), n. 3, p. 600-4, 1991.

PICARD, M. L. et al. Food intake adjustments of chicks: short term reactions to deficiencies in lysine, methionine and tryptophan. **Journal of British Poultry Science**, France, v. 34, p. 737-746, 1993.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa: UFV, 186 p., 2005.

RYU, K. S. et al. The folic acid requirements of starting broiler chicks fed diets based on practical ingredients. 2. Interrelationships with dietary methionine. **Journal of Poultry Science**, Georgia, v. 74(9), p. 1456-62, 1995.

SANTROCK, J.; STEPHEN, A. S.; HAYES, J. M. Isotopic analysis based on the mass spectrum of carbon dioxide. **Analytical Chemistry**, Indiana, v. 57, p. 1444-1448, 1985.

SAUNDERSON, C. L.; MACKINLAY, J. Changes in body weight, composition and hepatic enzyme activities in response to dietary methionine, betaine and choline levels in growing chicks. **British Journal of Nutrition**, Roslin, v. 63, p. 339-349, 1990.

SCHUTTE, J. B.; PACK, M. Sulfur amino acid requirement of broiler chicks from fourteen to thirty-eight days of age. 1: performance and carcass yield. **Journal of Poultry Science**, The Netherlands, v. 74(3), p. 480- 487, 1995.

STORCH, K. J. et al. [1-¹³C; methyl-2H₃] methionine kinetics in humans: methionine conservation and cystine sparing. **American Journal the Physiology**, Cambridge, v. 258, n. 5, p. 790-798, 1990.

SUGIYAMA, K.; AKAI, H.; MURAMATSU, K. Effects of methionine and related compounds on plasma cholesterol level in rats fed high cholesterol diet. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 32, p. 537-549, 1986.

TAKEDA, K.; OBANAWA, H.; MORITA, N. Equilibrium behavior in acid-base chromatography for carbon isotope separation. **Separation Science and Technology**, Japan, v. 22, n. 1, p. 103-119, 1987.

TIESZEN, L. L. et al. Fractionation and turnover of stable carbon isotope in animal tissues: implication for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. **Oecologia**, Heidelberg, v. 57, p. 32-37, 1983.

TORRES, A. P. Proteína e aminoácidos. In: **Alimentos e Nutrição das Aves Domésticas**, 2. ed. São Paulo: Nobel, cap. 8, p. 150-165, 1989.

TRIVELIN, P. C. O. et al. Evaluation of a ¹⁵N plot design for estimating plant recovery of fertilizer nitrogen applied to sugar cane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, p. 226-234, 1994.

VASCONCELLOS, M. A. S. **Uso do carbono-13 como marcador na partição de fotoassimilados em maracujazeiro doce (*Passiflora alata Dryander*)**. 2001. 106 p., Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. São Paulo: ARTMED, 620p., 2000.

ZHAN, X. A. et al. Effects of methionine and betaine supplementation on growth performance, carcass composition and metabolism of lipids in male broilers. **Journal of British Poultry Science**, China, v. 47(5), n. 5, p. 576-580, 2006.

ZUANON, J. A. **Turnover de carbono em tecido muscular de alevinos de tilápias do Nilo**. 2003. 96 p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

CAPÍTULO II

Incorporação da L-[¹³C₁]metionina como traçador em tecidos de frangos de corte no período de 35 a 49 dias de idade

Resumo - O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de incorporação da L-[¹³C₁]metionina no plasma (PL), fígado (FI), músculo *Pectoralis major* (PM) e gordura abdominal (GA) de frangos de corte no período de 35 a 49 dias de idade pela técnica dos isótopos estáveis, bem como determinar dosagem e a melhor forma de administração desse aminoácido enriquecido. Foram utilizados 99 frangos de corte machos da linhagem Cobb[®], que receberam doses de 29 μmol/kg de peso vivo/h, durante 6h, submetidos à administração via intravenosa (VI) e via oral (VO), de solução contendo L-[¹³C₁]metionina. Nos tempos 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 12; 24; 48; 72; 96; 120; 144; 168; 336h, após a primeira dosagem e no tempo 0h (controle), foram abatidas 3 aves/tempo de coleta/tratamento, para coleta dos tecidos. Os dados relativos à velocidade de incorporação da L-[¹³C₁]metionina, obtidos pela análise isotópica foram analisados por meio do método de equação exponenciais de primeira ordem do software Origin[®] 6.0 Professional (Microcal Software, 1999). Comparando os resultados dos dois grupos de animais (VI e VO) para os três tecidos estudados (PL, FI e PM), o valor de meia vida encontrado para os animais submetidos à VO foi parecido em relação àqueles recebendo VI, indicando assim semelhança na velocidade de troca de carbono, o que implica em mesma velocidade de enriquecimento dos tecidos. A dosagem de 29 μmol de L-[¹³C₁]metionina/kg de peso vivo/h, durante 6h, em frangos de corte de 35 a 49 dias de idade, é suficiente para enriquecer e determinar a quantidade de metionina nos tecidos estudados, sendo a VO a melhor forma de administração. A metionina fornecida aos frangos nesta idade é aproveitada na proporção de 3; 5 e 24% para síntese de PL, LI e PM, respectivamente. Não há incorporação deste aminoácido na GA.

Palavras-chave: aminoácido enriquecido, isótopos estáveis, metodologia.

L-[¹³C₁]methionine incorporation as a tracer in broiler tissues from 35 to 49 days of age

Abstract - The aim of this study was to evaluate the L-[¹³C₁]methionine incorporation in plasma (PL), liver (LI), *Pectoralis major* muscle (PM) and abdominal fat (AF) of broilers from 35 to 49 days of age by stable isotope technique and determine dosage and the best way of administration of this amino acid enriched. A total of 99 male Cobb[®] broilers, which received doses of 29 μmol/kg body weight/hr, for 6hr, subjected to intravenous (VI) and oral (VO) administration of solution containing L-[¹³C₁]methionine. At the times 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 336hr, after the first dose and at time 0hr (control) were slaughtered 3 broilers/sampled time/treatment for sampled of tissues. The data related to the rate of incorporation of L-[¹³C₁]methionine obtained by isotopic analysis were analyzed by the method of exponential equation of first order the software Origin[®] 6.0 Professional (Microcal Software, 1999). Comparing the results of two groups of animals (VI and VO) for the three tissues studied (PL, LI and PM), the value of half life found in animals subjected to VO was similar for those receiving VI, thus indicating similarity in rate of exchange of carbon, which implies the same rate of enrichment of tissues. The dosage of 29 μmol L-[¹³C₁]methionine/kg body weight/h, 6h in broilers from 35 to 49 days of age, is enough to enrich and determine the amount of methionine in the tissues studied, VO being the best form of administration. Methionine given to chickens at this age is exploited in the proportion of 3; 5 and 24% for synthesis of PL, LI and PM, respectively. There is no incorporation of this amino acid in AF.

Key words: amino acid enriched, methodology, stable isotopes.

1. Introdução

Avanços no melhoramento genético de frangos de corte têm gerado aves com potencial cada vez maior para ganho de peso e rendimento de peito e pernas. Porém, faz-se necessário, além de boas práticas de manejo, o fornecimento de dietas adequadamente balanceadas para que a ave possa expressar todo seu potencial genético para crescimento e rendimento das partes de maior interesse.

A suplementação com aminoácidos, vitaminas e minerais em dietas de frangos de corte é prática comum visto que, os ingredientes basais das rações não fornecem a quantidade exigida de alguns nutrientes aos animais. Aminoácidos são essenciais para o crescimento tecidual. A suplementação da dieta com aminoácidos sintéticos reduz custos, permite melhor ajuste nutricional visando cobrir as exigências nutricionais das aves e também possibilita redução do excesso de proteína bruta das rações (BERTECHINI, 2006).

Metionina, colina, betaína e ácido fólico, doadores de grupos metil, são essenciais à nutrição animal em diversas rotas metabólicas. Os grupos metil lábeis participam das sínteses de aminoácidos, fosfolipídios, e de DNA e RNA (SAUNDERSON e MACKINLAY, 1990). Visto que as aves não são capazes de sintetizá-los, estes devem ser suplementados na dieta. Sob condições a campo, a metionina é adicionada para suprir as necessidades específicas deste aminoácido e para fornecer uma quantidade suficiente de grupos metil para os outros aminoácidos sulfurados, de tal forma a se obter o desempenho ideal do animal.

A utilização de isótopos estáveis nas pesquisas na área da nutrição é recente e promissora. Gannes *et al.* (1998) em revisão sobre o uso potencial da variação natural dos isótopos estáveis, destacam o papel dos fisiologistas no uso dessa ferramenta para esclarecer questões fisiológicas e ecológicas, bem como assegurar os fundamentos teóricos e experimentais para a aplicação dos isótopos estáveis em outras áreas. Dentre as diretrizes para futuras pesquisas com os isótopos estáveis destacadas por esses autores, receberam ênfase o balanço protéico, a alocação de nutrientes e o *turnover* tecidual.

Nas três últimas décadas, a técnica dos isótopos estáveis tem sido aplicada de forma crescente e contínua em estudos agrícolas, ecológicos e de digestibilidade e

metabolismo humano e animal. Estas investigações demonstraram que as composições isotópicas dos tecidos de animais dependem principalmente da alimentação, da água ingerida e dos gases inalados e, associado a isto, os efeitos dos isótopos estão ligados aos processos metabólicos (KENNEDY e KROUSE, 1990).

Estudos em nutrição de aves usando os isótopos estáveis como traçadores em suas dietas dão estimativas de quão rapidamente os isótopos estáveis dos tecidos são substituídos por isótopos derivados da dieta (DENADAI *et al.*, 2007; MITUO *et al.*, 2007; PELÍCIA *et al.*, 2007).

A existência dos isótopos raros mais pesados como, por exemplo, do ^{13}C , bem como de outros elementos, possibilita a produção de compostos marcados ou enriquecidos nestes isótopos, caracterizados por apresentarem abundâncias isotópicas acima da natural. Assim como os isótopos estáveis de dietas contrastantes, compostos enriquecidos também podem ser utilizados como traçadores para se avaliar processos metabólicos e seres vivos (BARNES *et al.*, 2002; MURAMATSU *et al.*, 1987), porém são poucos os trabalhos nessa área, devendo-se aprimorar as técnicas de administração destes compostos em animais que são muito invasivas.

O estudo do fluxograma da metionina em diferentes tecidos da carcaça de frangos de corte, pela técnica de isótopos estáveis com metionina enriquecida, poderá permitir um maior entendimento da dinâmica dos grupos metil no metabolismo nutricional das aves, uma vez que a alimentação constitui um dos principais fatores para o desenvolvimento eficiente e saudável dos animais.

Metodologias para diversos tipos de análises devem ser desenvolvidas buscando-se maior eficiência e maior facilidade de obtenção dos resultados. Sendo assim, a técnica dos isótopos estáveis com aminoácidos enriquecidos pode mostrar-se eficiente ferramenta para se determinar a rota, bem como a porcentagem de aminoácidos destinados para diferentes partes do corpo do animal e assim relacionar a importância destes para cada tecido.

Alguns trabalhos foram realizados com aminoácidos enriquecidos onde a via de administração é geralmente intravenosa, porém esta é uma via pouca prática para se utilizar em animais, bem como estressante para os mesmos. Como se deve levar em consideração o bem-estar animal durante as pesquisas, é necessário testar outras formas

de administração que possam propiciar menor sofrimento aos animais, sem que os resultados sejam prejudicados.

Em função do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de incorporação da L-[¹³C₁]metionina no plasma, fígado, músculo *Pectoralis major* e gordura abdominal de frangos de corte no período de 35 a 49 dias de idade pela técnica dos isótopos estáveis, bem como determinar dosagem e a melhor forma de administração desse aminoácido enriquecido.

2. Material e métodos

O experimento foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, no Laboratório de Nutrição de Aves, durante o período de julho a agosto de 2009.

Foram utilizados 270 pintainhos machos de corte com um dia de idade, da linhagem Cobb[®], vacinados no incubatório contra as doenças de Gumboro, Marek e Bouba Aviária. As aves foram alojadas em 9 boxes de 2,5 m² cada, sendo 30 aves/boxe, em uma densidade de 12 aves/m², ao longo do aviário tipo convencional.

Água e a ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental. A temperatura e ventilação foram controladas manualmente, manejando-se as cortinas laterais do galpão. O programa de luz utilizado durante o período experimental foi de 24h até os 21 dias de idade e de luz natural a partir do 22^o dia de idade.

A composição das matérias primas utilizadas foram analisadas no Laboratório de Nutrição de Aves da FMVZ, UNESP - Câmpus de Botucatu, segundo as normas da AOAC (1995), e as rações experimentais foram formuladas e balanceadas, adaptando-as às recomendações de Rostagno *et al.* (2005), para frangos de corte machos. O programa de arraçamento foi dividido em quatro fases: pré-inicial (1-7), inicial (8-21), crescimento I (22-35) e crescimento II (36-49) dias de idade. A fim de manter o sinal isotópico dos tecidos das aves durante o período de coleta (35 a 49 dias de idade), a ração da fase de crescimento II apresentava níveis nutricionais semelhantes a da fase de crescimento I diferindo na porcentagem de metionina que foi ideal para esta fase, como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1. Composição e valores nutricionais calculados das rações.

Ingredientes (%)	Fases			
	Pré-inicial	Inicial	Crescimento I	Crescimento II
Milho, grão	56,220	59,320	62,140	62,130
Soja, farelo	37,240	34,430	30,840	30,860
Soja, óleo	2,070	2,300	3,260	3,270
Fosfato bicálcico	1,950	1,800	1,670	1,670
Calcário calcítico	0,940	0,900	0,840	0,840
DL-metionina	0,217	0,155	0,155	0,134
L-lisina	0,335	0,185	0,203	0,203
L-treonina	0,135	0,050	0,050	0,050
Cloreto de colina	0,060	0,050	0,050	0,050
Anticoccidiano ¹	0,025	0,025	0,025	0,025
Sal comum	0,515	0,495	0,470	0,470
Suplemento vit/min ²	0,300	0,300	-	-
Suplemento vit/min ³	-	-	0,300	0,300
Níveis Nutricionais				
EM, kcal/kg	2.950	3.000	3.100	3.100
PB, %	22,040	20,790	19,410	19,410
Ca, %	0,940	0,880	0,820	0,820
P disp., %	0,470	0,440	0,410	0,410
Met, %	0,519	0,447	0,429	0,407
Met+Cys, %	0,940	0,810	0,770	0,770
Lys, %	1,330	1,150	1,070	1,070
Tre, %	0,870	0,750	0,700	0,700
K, %	0,590	0,590	0,590	0,590
Na, %	0,220	0,210	0,210	0,210
Cl, %	0,200	0,190	0,180	0,180
Valores Isotópicos⁴				
$\delta^{13}\text{C}$	-18,81	-18,42	-18,10	-18,10

¹Monenpac mc 400[®]: Monensina sódica (40%);

²Suplemento vitamínico-mineral inicial TORTUGA[®] (por kg de ração): manganês 559,86 mg, ferro 434,37 mg, zinco 433,56 mg, cobre 85,65 mg, iodo 5,61 mg, selênio 3,39 mg, vitamina A 106.560 U.I., vitamina D3 25.537,5 U.I., vitamina E 148,77 mg, vitamina K3 18 mg, vitamina B1 20,1 mg, vitamina B2 45 mg, vitamina B6 24,9 mg, vitamina B12 120 mcg, niacina 300 mg, ácido fólico 117,45 mg, ácido pantotênico 7,5 mg, biotina 0,99 mg, antioxidante 42 mg;

³Suplemento vitamínico-mineral engorda TORTUGA[®] (por kg de ração): manganês 559,85 mg, ferro 434,37 mg, zinco 433,56 mg, cobre 85,65 mg, iodo 5,61 mg, selênio 3,39 mg, vitamina A 88.054,5 U.I., vitamina D3 21.264,23 U.I., vitamina E 124,17 mg, vitamina K3 15 mg, vitamina B1 16,74 mg, vitamina B2 37,47 mg, vitamina B6 20,73 mg, vitamina B12 99,9 mcg, niacina 249,75 mg, ácido fólico 97,74 mg, ácido pantotênico 6,27 mg, biotina 0,84 mg, antioxidante 42 mg;

⁴Valores isotópicos médios expressos em $\delta^{13}\text{C}$ relativos ao padrão *PeeDee Belemnite* (PDB).

Ao 33^o dia de idade, todas as aves foram pesadas e, posteriormente, 99 aves foram redistribuídas nos boxes em dois grupos (para administração via intravenosa e oral) com peso médio 2.162,5 g, \pm 112,5 g. A administração via intravenosa e oral foi realizada no 35^o dia de idade.

A escolha desta idade proporcionou maior facilidade de administração via intravenosa devido ao maior calibre dos vasos sanguíneos.

Em trabalho piloto foi utilizada a dosagem preconizada por Muramatsu *et al.* (1987), que trabalhou com DL-[¹⁵N]metionina em estudos envolvendo galinhas *White Leghorn* (5,8 µmol/kg de peso vivo/h durante 6h). Com essa dosagem preconizada não foi possível detectar enriquecimento nos tecidos analisados, fato esse que pode ser explicado por ocorrer uma grande diluição entre os demais átomos de carbono contidos nos tecidos. Dessa forma, foi necessário aumentar a dosagem cinco vezes para se obter enriquecimento.

A partir dessa constatação em ensaios pilotos, a dosagem utilizada neste experimento foi de 29 µmol de L-[¹³C₁]metionina/kg de peso vivo/h durante 6h, quantidade cinco vezes superior a utilizada por Muramatsu *et al.* (1987). Essa dosagem foi obtida a partir de produto comercial com abundância isotópica de 92 atm % de ¹³C adquirido da ISOTEC INC., A Matheson, USA Company.

Para determinação da concentração da metionina enriquecida, seguindo as recomendações de Muramatsu *et al.* (1987), foi estimado o peso médio das aves no dia das administrações. Portanto, 29 µmol de L-[¹³C₁]metionina/kg de peso vivo/h x 2,5 kg x 6h (administrações intravenosa e via oral) = 435 µmol de L-[¹³C₁]metionina. O peso molecular da metionina corresponde a 149,99 µg de metionina, portanto, 149,99 µg de metionina/1 µmol de L-[¹³C₁]metionina x 435 µmol de L-[¹³C₁]metionina = 65.246 µg, que equivale a 65,246 mg de metionina, e esse valor obtido, dividido pelo número de doses, no caso foram seis, corresponde a 10,874 mg de metionina/dose aplicada.

Para a obtenção do valor da massa de ¹³C aplicada por dose fez-se necessário realizar o seguinte cálculo: em 149,99 µg de metionina (peso molecular da metionina) contém 12,92 µg de ¹³C, em 10.874,28 µg de metionina conterá 936,70 µg de ¹³C/dose aplicada.

Foi preparada uma solução fisiológica para infusão de 0,3 mL/dose, via veia braquial e 0,6 mL/dose (0,3 mL da solução diluída contendo metionina enriquecida + 0,3 mL de solução fisiológica), para administração oral, utilizando-se de seringas de insulina de 1 mL, a qual correspondia à aplicação de 10,874 mg de metionina enriquecida ou 936,70 µg de ¹³C/dose.

O procedimento de administração via intravenosa e oral das dosagens foram realizados de hora em hora até completar 6 horas após a primeira aplicação (tempo 0). Nos tempos 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 12; 24; 48; 72; 96; 120; 144; 168 e 336h após a primeira dosagem e no tempo 0h (controle negativo), foram abatidas 3 aves por tempo de coleta para cada via de administração, por deslocamento da articulação crânio-cervical e posteriormente, sangria.

O tempo de colheita das amostras foi concentrado nas primeiras horas do início do período experimental, devido à maior velocidade na diluição isotópica do carbono no tecido durante essa fase (RIEDIJK *et al.*, 2007; HOBSON e CLARK, 1992; MURAMATSU *et al.*, 1987).

A seguir, para as análises isotópicas, foram colhidas amostras sangue, fígado e músculo peitoral e gordura abdominal. As amostras de músculo peitoral foram obtidas a partir de uma fatia de 5 mm do terço médio longitudinal do *Pectoralis major* esquerdo; da gordura, as amostras foram coletadas da gordura abdominal; do fígado, as amostras foram retiradas do terço central do órgão; e do sangue, as amostras foram obtidas por punção da jugular sendo condicionadas em tubos de ensaio contendo heparina. As amostras de sangue foram centrifugas a 5000G por 4 minutos para separar as frações plasmáticas, de acordo com as recomendações de Muramatsu *et al.* (1987), sendo o plasma devidamente condicionado em tubo plástico de 2,0 mL com tampa e em seguida congelado.

As amostras de músculo peitoral, fígado e gordura abdominal foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e imediatamente congeladas a -20°C até sua preparação para as análises isotópicas.

Para realização das análises isotópicas dos tecidos, as amostras foram descongeladas e secas em estufa de esterilização e secagem com circulação de ar a 56°C por um período de 48 horas. As amostras dos tecidos e dietas experimentais foram moídas em moinho criogênico, à temperatura em torno de -196°C. Aproximadamente 2,0 g de amostra foram condicionados em frascos de policarbonato juntamente com uma barra magnética e após o moinho ser devidamente fechado foi imerso em nitrogênio líquido. Promoveu-se em um primeiro momento um pré-congelamento de um minuto e posteriormente, congelamento e pulverização através do impacto entre amostra e barra magnética, compreendendo em três minutos para os tecidos e cinco minutos para as

dietas experimentais, em frequência máxima (15 impactos/s) a fim de obter material homogêneo de finíssima granulometria (menor que 60 μm), com aspecto de talco (DUCATTI, 2007; LICATTI, 1997).

Após a moagem, amostras de fígado passaram por processo de extração da gordura com éter etílico utilizando aparelho de Soxhlet, durante 4 horas. Estas amostras foram moídas novamente para obter homogeneização.

Em virtude da gordura possuir alto teor de carbono, a quantidade de tecido utilizado para análise foi extremamente pequena. Após ser mantida em estufa de ventilação forçada, apenas uma fração de cada uma das amostras atingiu o estado líquido, da qual foi retirado o conteúdo para ser analisado.

As análises isotópicas das amostras foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências (CIEA/IBB) da UNESP, *Campus* de Botucatu.

Para determinação da composição isotópica das amostras com abundância próxima da natural foi utilizado o espectrômetro de massa de razões isotópicas (Delta S-Finnigan Mat, Bremen, Alemanha) acoplado ao Analisador Elementar (EA 1108 – CHN – Fisons Instruments, Rodano, Itália), no qual em presença de oxigênio (O_2) e óxido de cobre (CuO) a amostra foi queimada quantitativamente para obtenção de CO_2 .

Foram pesadas em cápsulas de estanho, aproximadamente 60 a 70; 50 a 70; 60 a 70 μg ; das amostras de músculo peitoral, fígado e ração, respectivamente, utilizando-se duplicatas. Posteriormente, as amostras de plasma e gordura abdominal foram descongeladas e analisadas na forma líquida e pipetadas, 1,0 μL em cápsulas de estanho. Os resultados foram expressos em notação $\delta^{13}\text{C}$, em relação ao padrão *Peedee Belemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2‰ e calculado pela equação 1:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{amostra, padrão}) = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 10^3 \quad (1)$$

Onde:

$\delta^{13}\text{C}$ = enriquecimento relativo da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação ao padrão PDB, em partes per mil (‰). Adimensional;

R = razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) da amostra e do padrão. Adimensional.

Para mensurar a velocidade de substituição do carbono nos tecidos das aves depois de determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela equação 2 (DUCATTI et al., 2002):

$$\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)]e^{-kt} \quad (2)$$

Onde:

$\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento isotópico relativo no tecido em qualquer tempo (t), expresso em ‰. Adimensional;

$\delta^{13}\text{C}(f)$ = enriquecimento isotópico relativo no tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final, expresso em ‰. Adimensional;

$\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento isotópico relativo no tecido, na condição inicial, expresso em ‰. Adimensional;

k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo em horas⁻¹;

t = tempo (em horas) a partir da parada de administração intravenosa e via oral.

A meia vida do ¹³C para os tecidos na condição de substituição dos 50% dos átomos trocados pode ser mensurada pela equação (3):

$$T = \ln 2/k \quad (3)$$

Onde:

T = meia-vida, tempo (dias);

ln = logaritmo niperiano;

k = constante da taxa de *turnover* no tecido, tempo⁻¹, fornecendo uma idéia de velocidade no processo de troca dos isótopos estáveis nos tecidos (DUCATTI et al., 2002; DUCATTI, 2007).

Para se obter a quantidade de carbono utilizada nos cálculos de diluição isotópica em cada tecido foi necessário saber a sua massa seca e a percentagem de carbono tecidual.

A percentagem de carbono em cada um dos tecidos estudados correspondeu à: 41,56; 41,21; 69,44 e 2,71%, para músculo *Pectoralis major*, fígado, gordura abdominal e plasma, respectivamente.

Tomando-se como base um frango com 2,5 kg, para se estimar a quantidade de massa seca em cada tecido e após a separação das partes de interesse secas em estufa, obtivemos os seguintes valores: 133,22; 9,37 e 37,93 g de massa seca, para músculo *Pectoralis major*, fígado e gordura abdominal, respectivamente.

Sabendo-se que a quantidade total de sangue equivale a 6,3% do peso vivo do frango e que o plasma representa 62,5% em relação ao volume total de sangue, tivemos em um frango com 2,5 kg uma quantidade de 98,438 g de plasma.

Sendo assim, as quantidades de carbono utilizadas nos cálculos em cada tecido foram: 55.365; 9.372; 37.926 e 2.667 mg de carbono para músculo *Pectoralis major*, fígado, gordura abdominal e plasma, respectivamente.

O método da diluição isotópica está baseado no balanço isotópico entre os isótopos de um elemento numa amostra antes e depois da adição do material enriquecido num dos isótopos. As equações (4 e 5) adaptadas por Trivelin *et al.* (1994) evidenciam o balanço de massa isotópico, para as condições do trabalho em apreço, fazendo-se uso da L-[¹³C₁]metionina.

$$f_{\text{met}} \cdot \text{Ab}_{\text{met}} + f_{\text{nat}} \cdot \text{Ab}_{\text{bat}} = (f_{\text{met}} + f_{\text{nat}}) \cdot \text{Ab}_{\text{p}} \quad (4)$$

$$f_{\text{met}} + f_{\text{nat}} = 1 \quad (5)$$

Onde:

f_{met} e f_{nat} = frações de carbono no produto proveniente da L-[¹³C₁]metionina e de fonte natural, respectivamente;

Ab_{met} , Ab_{nat} e Ab_{p} = abundância (% em átomos de ¹³C) no aminoácido L-[¹³C₁]metionina, fonte natural e produto, respectivamente.

A partir do balanço de massa isotópico pôde-se determinar, no produto final, a contribuição da fonte de carbono proveniente da L-[¹³C₁]metionina, e da fonte natural no isótopo ¹³C.

O método de diluição isotópica consiste na adição de uma quantidade conhecida e exata do material enriquecido num dos isótopos de um elemento. Deve-se esperar o equilíbrio entre os isótopos da amostra e do material enriquecido, resultando na formação de uma mistura final de razão isotópica diferente das razões isotópicas da amostra (produto) e do material enriquecido (fonte empregada ou L-[¹³C₁]metionina). Os espectrômetros de massas permitem a obtenção de um espectro de massas que é usado para medir a alteração da razão isotópica e então a razão isotópica da mistura final (Ab_p).

O valor da abundância natural (Ab_{nat}) no isótopo ¹³C foi obtido a partir de ensaios, em triplicata, não empregando material enriquecido na dieta alimentar das aves. A abundância natural no isótopo ¹³C foi obtida para cada uma das frações ou produtos (plasma, fígado e músculo *Pectoralis major*) avaliados no presente trabalho.

A partir das equações 4 e 5, pode-se escrever:

$$f_{met} = (Ab_p - Ab_{nat}) / (Ab_{met} - Ab_{nat}) \quad (6)$$

Em termos percentuais a equação (6) pode ser escrita da seguinte maneira:

$$\% CPP_{met} = [(Ab_p - Ab_{nat}) / (Ab_{met} - Ab_{nat})] \cdot 100 \quad (7)$$

Onde:

$\% CPP_{met}$ = percentual de carbono no produto proveniente da L-[¹³C₁]metionina.

A partir da massa do produto (M_p) avaliado, pode-se obter a quantidade de carbono em cada uma das frações (equação 8), sendo:

$$CPP_{met} = [(Ab_p - Ab_{nat}) / (Ab_{met} - Ab_{nat})] \cdot (\% Ct_p) \cdot (M_p) \quad (8)$$

Onde:

CPP_{met} = carbono no produto proveniente da L-[¹³C₁]metionina (μg);

M_p = massa total do produto (μg);

$\% Ct_p$ = percentual de carbono total no produto.

Os dados relativos à velocidade de incorporação da L-[¹³C₁]metionina, obtidos pela análise isotópica, foram analisados utilizando-se o método de equações exponenciais de primeira ordem do software Origin[®] 6.0 Professional (MICROCAL SOFTWARE, 1999).

3. Resultados e discussão

A mudança nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ dos tecidos ao longo do tempo ocorreu gradativamente durante o período analisado, conforme pode ser observado nas Tabelas 2 e 3.

O pico de enriquecimento do plasma foi atingido após 6 horas a partir da primeira administração via intravenosa de solução contendo L-[¹³C₁]metionina e após 12 horas a partir da primeira administração via oral de solução contendo L-[¹³C₁]metionina (Tabelas 2 e 3). Esse resultado era esperado, pois nas aves que receberam solução via intravenosa a L-[¹³C₁]metionina já estava imediatamente disponível para incorporação nos tecidos, enquanto que nas aves que receberam solução via oral, a L-[¹³C₁]metionina precisou ser absorvida primeiramente pelos enterócitos no intestino para depois cair na corrente sanguínea, sendo que após 12 horas da primeira dose administrada ainda tinha L-[¹³C₁]metionina sendo incorporada no plasma. O mesmo ocorreu no fígado, onde o pico de enriquecimento ocorreu após 6 horas e após 12 horas da administração via intravenosa e oral, respectivamente. No músculo peitoral o pico de enriquecimento ocorreu 72 horas após a administração da primeira dose de solução contendo L-[¹³C₁]metionina, não havendo diferenças entre as formas de administração, tanto pela via intravenosa quanto pela oral, porém com incorporação mais lenta no músculo peitoral que no plasma e fígado, devido a taxa de metabolismo deste tecido.

Pode-se observar também nas Tabelas 2 e 3, que a gordura abdominal não apresentou alteração nos sinais isotópicos, o que se pode concluir que o ¹³C₁ da metionina enriquecida não foi incorporado nesse tecido.

Tabela 2. Valores médios analisados de $\delta^{13}\text{C}$ (médias \pm desvio padrão), expressos em ‰, dos tecidos plasma (PL), fígado (FI), músculo *Pectoralis major* (PM) e gordura abdominal (GA) de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via oral de solução contendo L- $^{13}\text{C}_1$ metionina.

Coleta (h)	PL		FI		PM		GA	
0	-19,29	$\pm 0,08$	-18,67	$\pm 0,40$	-19,49	$\pm 0,15$	-21,48	$\pm 0,47$
0,5	-18,50	$\pm 0,28$	-17,62	$\pm 0,34$	-19,31	$\pm 0,23$	-21,30	$\pm 0,30$
1	-17,94	$\pm 0,21$	-17,36	$\pm 0,18$	-19,04	$\pm 0,15$	-22,22	$\pm 0,27$
2	-18,07	$\pm 0,59$	-16,84	$\pm 0,52$	-19,23	$\pm 0,19$	-21,85	$\pm 0,41$
3	-15,88	$\pm 0,43$	-15,43	$\pm 0,51$	-18,64	$\pm 0,08$	-21,63	$\pm 0,23$
4	-14,95	$\pm 0,33$	-14,10	$\pm 0,22$	-18,39	$\pm 0,23$	-21,54	$\pm 0,13$
5	-14,80	$\pm 0,92$	-13,80	$\pm 0,10$	-18,37	$\pm 0,43$	-21,55	$\pm 0,28$
6	-13,41	$\pm 0,36$	-13,35	$\pm 0,30$	-18,06	$\pm 0,37$	-21,72	$\pm 0,38$
12	-13,27	$\pm 0,04$	-13,27	$\pm 0,10$	-17,91	$\pm 0,45$	-22,04	$\pm 0,03$
24	-15,19	$\pm 0,45$	-15,04	$\pm 0,49$	-17,81	$\pm 0,39$	-22,31	$\pm 0,22$
48	-16,21	$\pm 0,26$	-15,97	$\pm 0,46$	-17,78	$\pm 0,16$	-21,46	$\pm 0,47$
72	-17,14	$\pm 0,24$	-16,69	$\pm 0,18$	-17,65	$\pm 0,23$	-21,75	$\pm 0,07$
96	-17,67	$\pm 0,41$	-17,40	$\pm 0,71$	-18,00	$\pm 0,19$	-22,46	$\pm 0,33$
120	-17,95	$\pm 0,35$	-17,43	$\pm 0,19$	-18,02	$\pm 0,30$	-21,87	$\pm 0,42$
144	-18,13	$\pm 0,41$	-17,48	$\pm 0,23$	-18,13	$\pm 0,44$	-21,73	$\pm 0,10$
168	-18,06	$\pm 0,17$	-17,10	$\pm 0,02$	-18,02	$\pm 0,22$	-21,74	$\pm 0,06$
336	-18,75	$\pm 0,17$	-18,47	$\pm 0,29$	-18,47	$\pm 0,59$	-22,73	$\pm 0,38$

Tabela 3. Valores médios analisados de $\delta^{13}\text{C}$ (médias \pm desvio padrão), expressos em ‰, dos tecidos plasma (PL), fígado (FI), músculo *Pectoralis major* (PM) e gordura abdominal (GA) de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via intravenosa de solução contendo L- $^{13}\text{C}_1$ metionina.

Coleta (h)	PL		FI		PM		GA	
0	-19,29	$\pm 0,08$	-18,67	$\pm 0,40$	-19,49	$\pm 0,15$	-21,48	$\pm 0,47$
0,5	-18,39	$\pm 0,35$	-17,46	$\pm 0,37$	-19,12	$\pm 0,23$	-21,42	$\pm 0,35$
1	-17,64	$\pm 0,06$	-17,55	$\pm 0,13$	-19,03	$\pm 0,06$	-21,00	$\pm 0,48$
2	-17,18	$\pm 0,29$	-17,09	$\pm 0,48$	-19,14	$\pm 0,26$	-21,41	$\pm 0,19$
3	-16,43	$\pm 0,06$	-16,61	$\pm 0,35$	-18,81	$\pm 0,13$	-21,62	$\pm 0,48$
4	-16,08	$\pm 0,22$	-16,25	$\pm 0,00$	-18,53	$\pm 0,09$	-21,44	$\pm 0,45$
5	-15,10	$\pm 0,53$	-15,74	$\pm 0,40$	-18,46	$\pm 0,31$	-21,40	$\pm 0,44$
6	-14,08	$\pm 0,11$	-14,53	$\pm 0,29$	-18,26	$\pm 0,21$	-21,19	$\pm 0,22$
12	-15,95	$\pm 0,04$	-15,38	$\pm 0,53$	-18,08	$\pm 0,29$	-20,76	$\pm 0,40$
24	-16,52	$\pm 0,47$	-16,09	$\pm 0,28$	-17,83	$\pm 0,60$	-21,62	$\pm 0,42$
48	-16,99	$\pm 0,13$	-16,91	$\pm 0,57$	-18,53	$\pm 0,30$	-21,66	$\pm 0,12$
72	-17,14	$\pm 0,23$	-17,09	$\pm 0,43$	-17,69	$\pm 0,07$	-21,09	$\pm 0,43$
96	-17,60	$\pm 0,11$	-17,50	$\pm 0,38$	-17,78	$\pm 0,28$	-21,24	$\pm 0,46$
120	-17,72	$\pm 0,25$	-17,44	$\pm 0,25$	-17,81	$\pm 0,07$	-22,00	$\pm 0,45$
144	-18,01	$\pm 0,05$	-18,14	$\pm 0,14$	-18,25	$\pm 0,27$	-21,37	$\pm 0,35$
168	-18,18	$\pm 0,14$	-18,04	$\pm 0,46$	-18,30	$\pm 0,24$	-21,24	$\pm 0,18$
336	-18,44	$\pm 0,09$	-18,50	$\pm 0,10$	-18,19	$\pm 0,22$	-21,90	$\pm 0,12$

A Tabela 4 mostra as equações exponenciais de enriquecimento isotópico em função do tempo e os coeficientes de determinação do plasma, fígado e músculo *Pectoralis major*. Os valores calculados de meias-vidas estão contidos na Tabela 5, representando a velocidade de incorporação da L-[¹³C₁]metionina nos diferentes tecidos, plasma, fígado e músculo peitoral. As Figuras 1 e 2 ilustram o comportamento do enriquecimento relativo do ¹³C em função do tempo de administração via intravenosa e oral de solução contendo L-[¹³C₁]metionina no plasma, fígado, músculo peitoral e gordura abdominal, respectivamente.

Tabela 4. Equações exponenciais de enriquecimento isotópico em função do tempo no plasma (PL), fígado (FI) e músculo *Pectoralis major* (PM), de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R²), a partir da primeira hora de administração via intravenosa (VI) ou oral (VO).

Tecidos	Administração	Tempo	Equações	R ²
PL	VI	0-6h.	$\delta^{13}\text{C} = -9,29-9,70e^{-0,1100t}$	0,963
	VO	0-12h	$\delta^{13}\text{C} = -13,03-6,28e^{-0,2748t}$	0,998
FI	VI	0-12h	$\delta^{13}\text{C} = -14,45-4,01e^{-0,2616t}$	0,898
	VO	0-12h	$\delta^{13}\text{C} = -13,01-6,51e^{-0,5094t}$	0,937
PM	VI	0-72h	$\delta^{13}\text{C} = -17,74-1,58e^{-0,1660t}$	0,958
	VO	0-72h	$\delta^{13}\text{C} = -17,62-1,86e^{-0,1942t}$	0,965

Tabela 5. Valores calculados de meia-vida (horas) no plasma (PL), fígado (FI) e músculo *Pectoralis major* (PM), de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, a partir da primeira hora de administração via intravenosa (VI) ou oral (VO).

Tecidos	Administração	Tempo	Meia-Vida (h)
PL	VI	0-6h	6,30
	VO	0-12h	2,52
FI	VI	0-12h	2,65
	VO	0-12h	1,36
PM	VI	0-72h	4,18
	VO	0-72h	3,57

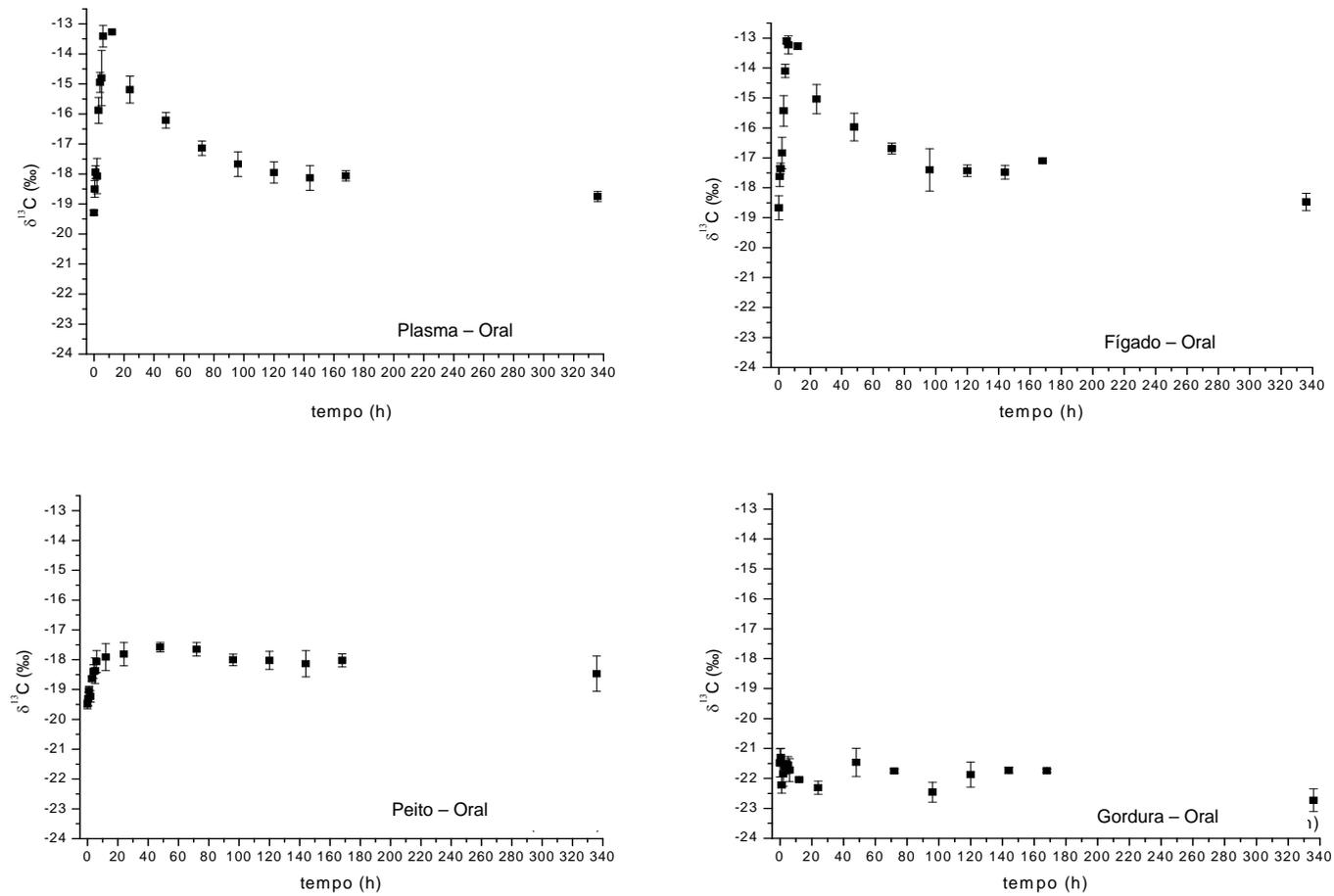


Figura 1. Modelo exponencial do enriquecimento isotópico de ^{13}C (média \pm desvio padrão) no plasma, fígado, músculo *Pectoralis major* e gordura abdominal de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via oral de solução contendo L- $[^{13}\text{C}_1]$ metionina.

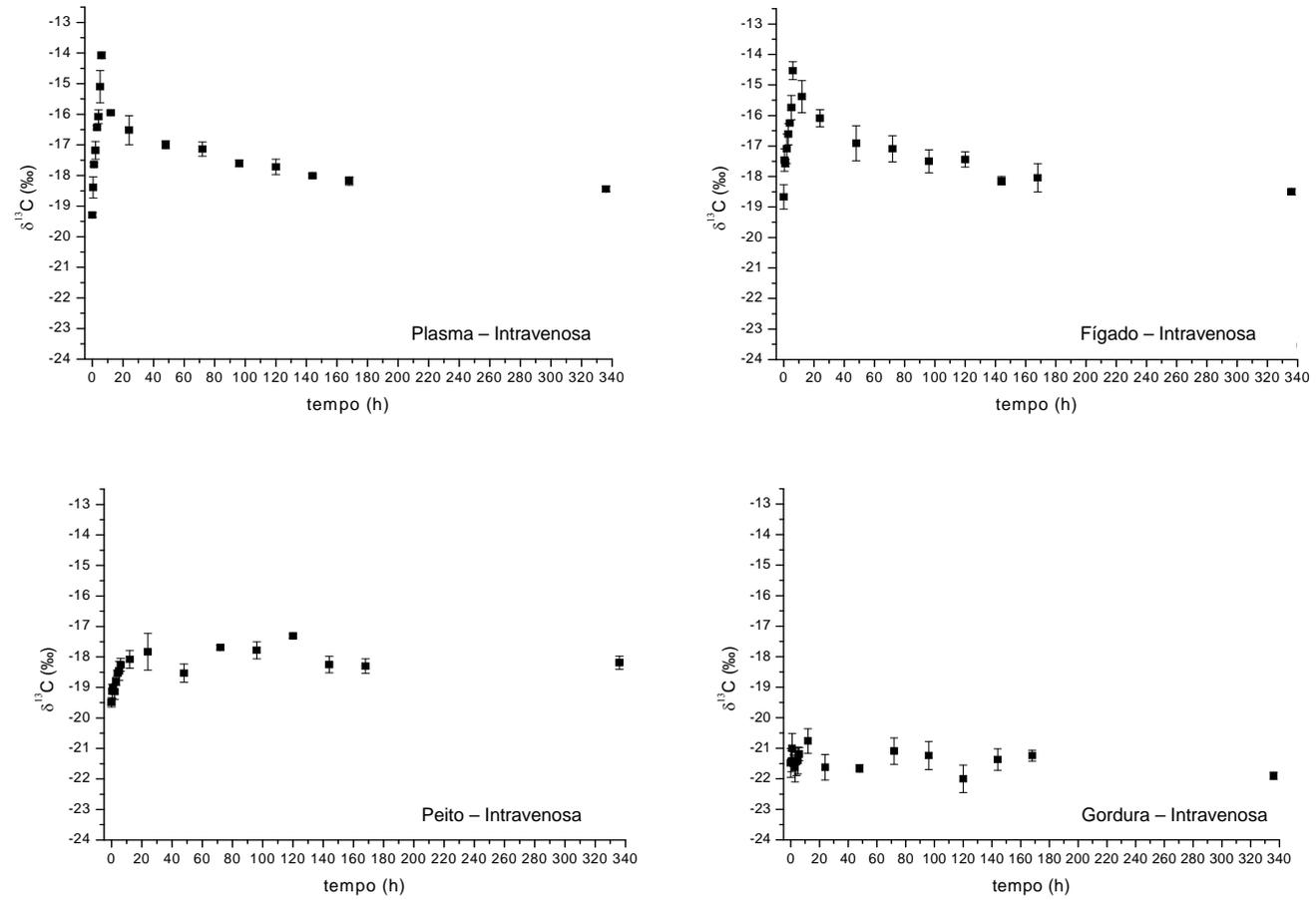


Figura 2. Modelo exponencial do enriquecimento isotópico de ^{13}C (média \pm desvio padrão) no plasma, fígado, músculo *Pectoralis major* e gordura abdominal de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via intravenosa de solução contendo L- $[^{13}\text{C}_1]$ metionina.

Analisando as Figuras 1 e 2, observamos o enriquecimento dos tecidos em função do tempo até poucas horas após a última dose administrada nas aves de solução contendo L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina, onde ocorre um pico de enriquecimento dos tecido e, a partir de então, em função da continuidade dos processos metabólicos de síntese e degradação dos tecidos (*turnover*) observa-se uma diluição do sinal isotópico, ou seja, uma diminuição na concentração de ^{13}C proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina, o que é absolutamente normal, quando não há mais administração do aminoácido enriquecido. Dessa forma, serão discutidos os resultados referentes ao período de enriquecimento dos tecidos analisados expostos nas Figuras 3, 4 e 5.

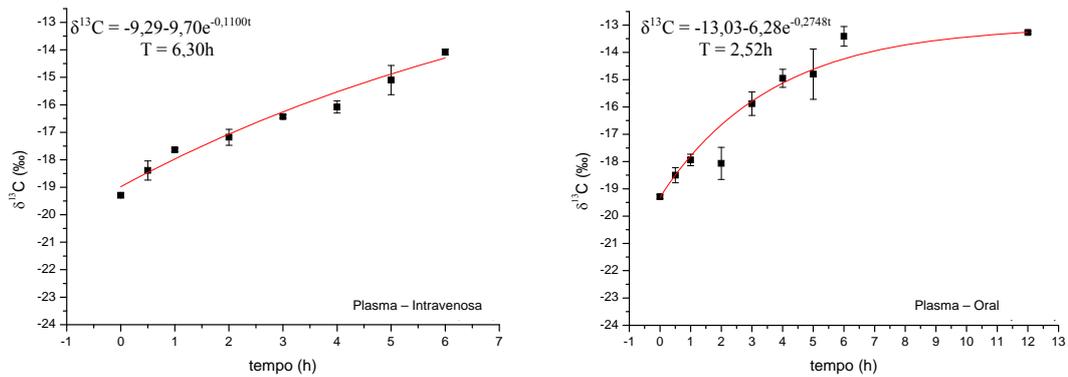


Figura 3. Modelo exponencial no período de enriquecimento isotópico de ^{13}C no plasma de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via intravenosa e oral de solução contendo L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina.

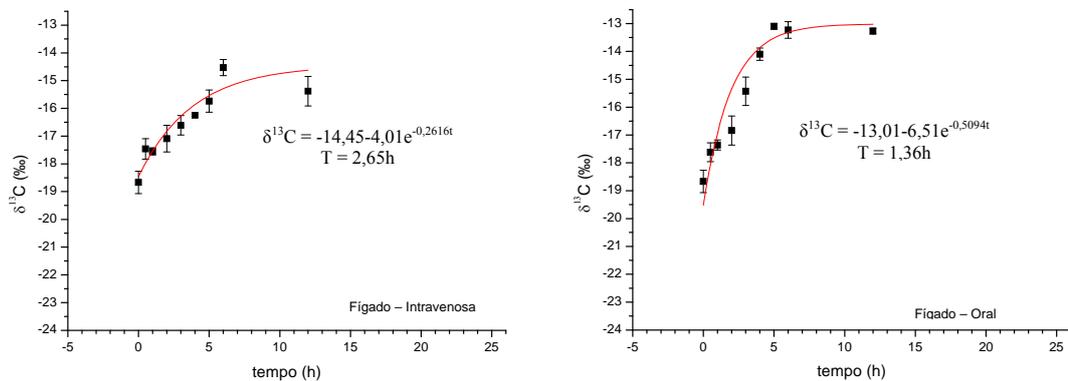


Figura 4. Modelo exponencial no período de enriquecimento isotópico de ^{13}C no fígado de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via intravenosa e oral de solução contendo L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina.

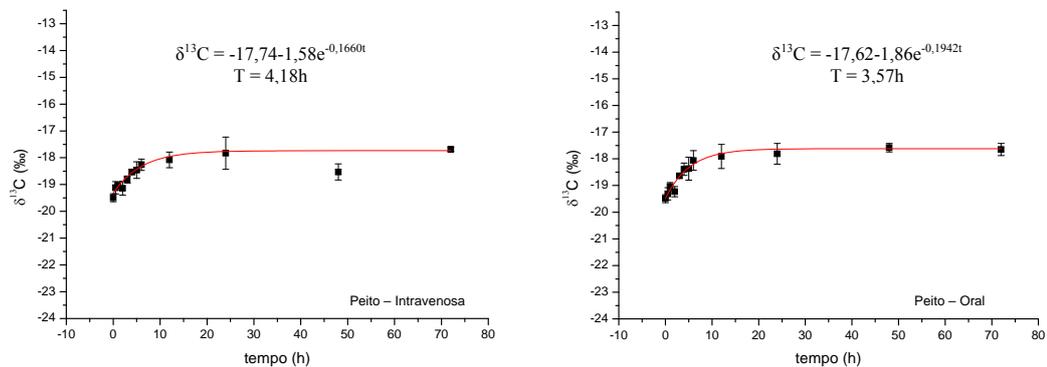


Figura 5. Modelo exponencial no período de enriquecimento isotópico de ^{13}C no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade, submetidos à administração via intravenosa e oral de solução contendo L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina.

A análise dos resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do plasma (Figura 3) do grupo que foi submetido à administração via intravenosa resultou na expressão $\delta^{13}\text{C} = -9,29 - 9,70e^{-0,1100t}$ com meia vida do carbono calculada de 6,3 horas e para os animais que foram submetidos a administração via oral a expressão obtida foi: $\delta^{13}\text{C} = -13,01 - 6,51e^{-0,5094t}$ com meia vida do carbono de 2,52 horas. A análise dos resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do fígado (Figura 4) do grupo que foi submetido à administração via intravenosa resultou na expressão $\delta^{13}\text{C} = -14,45 - 4,01e^{-0,2616t}$ com meia vida do carbono calculada de 2,65 horas e para os animais que foram submetidos a administração via oral a expressão obtida foi: $\delta^{13}\text{C} = -13,01 - 6,51e^{-0,5094t}$ com meia vida do carbono de 1,36 horas. A análise dos resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do músculo *Pectoralis major* (Figura 5) do grupo que foi submetido à administração via intravenosa resultou na expressão $\delta^{13}\text{C} = -17,74 - 1,58e^{-0,1660t}$ com meia vida do carbono calculada de 4,18 horas e para os animais que foram submetidos a administração via oral a expressão obtida foi: $\delta^{13}\text{C} = -17,62 - 1,86e^{-0,1942t}$ com meia vida do carbono de 3,57 horas. Comparando os resultados dos dois grupos de animais (submetidos à administração via intravenosa e oral) para os três tecidos estudados, o valor de meia vida encontrado para o grupo dos animais que foram submetidos à administração via oral foi parecido em relação àqueles recebendo administração via intravenosa, indicando assim semelhança na velocidade de troca de carbono, o que implica em mesma velocidade de enriquecimento dos tecidos.

Porém, numericamente, há maior velocidade de enriquecimento dos tecidos das aves submetidas à administração via oral que, provavelmente está relacionada ao maior

pico de enriquecimento dos mesmos. Analisando os valores dos sinais encontrados para os tecidos em cada forma de administração da solução contendo L-[¹³C₁]metionina (Tabelas 2 e 3), observamos que os tecidos dos grupos submetidos a administração via oral atingem maior pico de enriquecimento, ou seja ficam mais enriquecidos que os tecidos dos animais submetidos a administração via intravenosa. Isso pode ter ocorrido devido a possíveis perdas de parte da solução durante as infusões (administração via intravenosa) ocasionadas pela maior dificuldade de administração e pela movimentação das aves. Como para administração via intravenosa a massa de L-[¹³C₁]metionina foi concentrada em apenas 0,3 mL de solução, por mínima que seja a perda de solução, esta pode representar em grande quantidade de L-[¹³C₁]metionina que não será incorporada aos tecidos. Já para a administração via oral, a mesma massa de L-[¹³C₁]metionina foi diluída em 0,6 mL de solução. Dessa maneira, além da maior facilidade de administração da solução via oral, uma mínima perda durante a administração via intravenosa, representará uma significativa perda de L-[¹³C₁]metionina no momento da administração nas aves.

Os bons resultados observados pela administração via oral facilitará a realização de análises em fases mais jovens de criação, onde os vasos sanguíneos são de espessura fina e de pequeno calibre.

Na maioria das pesquisas com aminoácidos enriquecidos, os autores utilizam a via intravenosa para administrar dosagem com soluções purificadas destes aminoácidos ou em dietas parenterais (BARNES *et al.*, 2002; MURAMATSU *et al.*, 1987). Porém, com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, a via de administração via oral, se mostrou mais eficiente sob todos os aspectos que a via intravenosa.

Nas Tabelas 6 e 7, encontram-se os valores da massa de ¹³C (μg) proveniente da L-[¹³C₁]metionina para cada tecido analisado das aves submetidas à administração via oral e intravenosa, respectivamente, exceto no tecido gorduroso, onde não foi observado enriquecimento pelo aminoácido em estudo.

Tabela 6. Porcentagem da massa de ^{13}C incorporada no plasma (PL), fígado (FI) e músculo *Pectoralis major* (PM), em relação à dosagem administrada via intravenosa, de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade.

Coleta (h)	Dosagem ($\mu\text{g } ^{13}\text{C}$)	^{13}C Recuperado (μg)			Incorporação (%)		
		PL	FI	PM	PL	FI	PM
0,5	936,70	32,81	43,43	315,08	3,50	4,64	33,64
1	936,70	33,21	51,69	336,76	3,55	5,52	35,95
2	1873,40	45,11	64,33	317,48	2,41	3,43	16,95
3	2810,10	67,54	73,55	502,54	2,40	2,62	17,88
4	3746,80	71,45	107,74	634,32	1,91	2,88	16,93
5	4683,50	76,61	142,04	584,07	1,64	3,03	12,47
6	5620,20	144,04	245,44	969,96	2,56	4,37	17,26
12	5620,20	102,14	221,52	1143,95	1,81	3,92	20,24
24	5620,20	76,52	147,72	1246,45	1,35	2,61	22,06
48	5620,20	54,78	84,69	925,24	0,97	1,50	16,37
72	5620,20	54,11	104,18	1427,79	0,96	1,84	25,27
96	5620,20	54,39	78,59	1419,65	0,96	1,39	25,12
120	5620,20	47,62	64,54	1355,03	0,84	1,14	23,98
144	5620,20	42,63	25,53	1356,22	0,75	0,45	24,00
168	5620,20	39,77	19,87	1129,15	0,70	0,35	19,98
336	5620,20	33,26	15,99	1292,33	0,59	0,28	22,87

Tabela 7. Porcentagem da massa de ^{13}C incorporada no plasma (PL), fígado (FI) e músculo *Pectoralis major* (PM), em relação à dosagem administrada via oral, de frangos de corte dos 35 aos 49 dias de idade.

Coleta (h)	Dosagem ($\mu\text{g } ^{13}\text{C}$)	^{13}C Recuperado (μg)			Incorporação(%)		
		PL	FI	PM	PL	FI	PM
0,5	936,70	22,82	46,41	35,04	2,44	4,95	3,74
1	936,70	38,21	53,90	266,15	4,08	5,75	28,41
2	1873,40	37,15	83,40	209,77	1,98	4,45	11,20
3	2810,10	79,57	132,82	611,50	2,83	4,73	21,76
4	3746,80	110,43	210,95	779,29	2,95	5,63	20,80
5	4683,50	106,35	261,58	914,61	2,27	5,59	19,53
6	5620,20	157,04	262,05	1166,51	2,79	4,66	20,76
12	5620,20	158,62	270,64	1241,58	2,81	4,79	21,97
24	5620,20	98,85	176,38	1205,93	1,75	3,12	21,34
48	5620,20	78,91	152,25	1288,50	1,40	2,69	22,80
72	5620,20	59,01	115,99	1336,09	1,04	2,05	23,64
96	5620,20	50,93	71,98	1196,88	0,90	1,27	21,18
120	5620,20	40,88	70,44	1124,73	0,72	1,25	19,90
144	5620,20	39,05	74,78	1070,51	0,69	1,32	18,95
168	5620,20	39,93	94,92	1080,92	0,71	1,68	19,13
336	5620,20	27,51	30,66	791,75	0,49	0,54	14,01

Com base nos resultados expostos nas Tabelas 6 e 7, encontramos a porcentagem da massa de carbono-13 proveniente da L-[¹³C₁]metionina, que representa a quantidade de metionina destinada a cada um destes tecidos, na concentração administrada e naquele dado tempo analisado.

Observa-se que 2,56; 4,37 e 25,27% da L-[¹³C₁]metionina administrada via intravenosa e 2,81; 4,79 e 23,64% da L-[¹³C₁]metionina administrada via oral ficou retida no plasma, fígado e músculo *Pectoralis major*, respectivamente, no pico de enriquecimento.

Esse resultado sugere que de toda metionina enriquecida ingerida pelo frango de corte, cerca de 24%, é destinada a síntese de músculo *Pectoralis major*, evidenciando dessa forma a importância deste aminoácido para a formação deste tecido. Já na gordura abdominal, não houve incorporação do carbono do grupo metil da metionina enriquecida, o que é uma constatação esperada, uma vez que os aminoácidos ingeridos têm como função primordial sintetizar, entre outros, tecidos protéicos.

Mais pesquisas utilizando esse e outros aminoácidos marcados devem ser realizados para se estimar a porcentagem de incorporação dos mesmos, bem como a realização de análises em outros tecidos para verificar o grau de importância de cada aminoácido nos estudos da nutrição do frango de corte.

4. Conclusões

A dosagem de 29 µmol de L-[¹³C₁]metionina por quilo de peso vivo por hora, durante 6 horas, em frangos de corte de 35 a 49 dias de idade, é suficiente para enriquecer e determinar a quantidade de metionina nos tecidos estudados, sendo a via oral a melhor forma de administração. A metionina fornecida aos frangos nesta idade é aproveitada na proporção de 3; 5 e 24% para síntese de plasma, fígado e músculo *Pectoralis major*, respectivamente. Não há incorporação deste aminoácido na gordura abdominal.

5. Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 16th, Ed. Arlington: AOAC, VA, 1995.

BARNES, D. M.; SONGS, Z.; KLASING, K. C.; BOTJE, W. Protein metabolism during an acute phase response in chickens. **Amino Acids**, Austria, v. 22, p. 15-26, 2002.

BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: Editora UFLA, 301 p., 2006.

DENADAI, J. C.; DUCATTI, C.; PEZZATO, A. C.; CARRIJO, A. S.; CALDARA, F. R.; OLIVEIRA, R. P. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 8, p. 251-256, 2007.

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu: UNESP, Instituto de Biociências, 201 p., 2007.

DUCATTI, C.; CARRIJO, A. S.; PEZZATO, A. C.; MANCERA, P. F. A. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono – 13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 29-33, 2002.

GANNES, L. Z.; DEL-RIO, C. M.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Comparative Biochemistry Physiology**, New York, v. 119A, n. 3, p. 725-737, 1998.

HOBSON, K. A.; CLARK, R. G. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ¹³C in tissues. **The Condor**, Los Angeles, v. 94, p. 181-188, 1992.

KENNEDY, B. V.; KROUSE, H. R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, Canada, v. 68, p. 960-972, 1990.

LICATTI, F. **Isótopos estáveis do carbono (¹³C/¹²C) em plantas do ciclo bioquímico C₃ e C₄**. 1997. 65 p. Monografia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

MICROCAL SOFTWARE ORIGIN[®] 6.0 Professional. **Origin Data Analysis and Technical Graphics**. USA, Microcal Software Inc., 1999.

MITUO, M. A. O.; DUCATTI, C.; SARTORI, J. R.; DENADAI, J. C.; GOTTMANN, R.; PELÍCIA, V. C. Incorporação do carbono-13 em músculo peitoral e sangue de frangos de corte no período inicial de crescimento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44, 2007, Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal: SBZ, 2007. 1 CD-ROM.

MURAMATSU, T.; HIRAMOTO, K.; TASAKI, I.; OKUMURA, J. I. Effect of protein starvation on protein turnover in liver, oviduct and whole body of laying hens. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Japan, v. 87(2), n. 2, p. 227-232, 1987.

PELÍCIA, V. C.; SARTORI, J. R.; ZAVARIZE, K. C.; DUCATTI, C.; MITUO, M. A. O.; PEZZATO, A. C. Efeito dos nucleotídeos na dieta sobre o *turnover* do carbono – 13 da mucosa intestinal de frangos de corte. In: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA BRASIL, 20, 2007, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre: ALA, p. 43-45, 2007.

RIEDIJK, M. A.; STOLL, B.; CHACKO, S.; SCHIERBEEK, H.; SUNEHAG, A. L.; VAN GOUDOEVER, J. B.; BURRIN, D. G. Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. **PNAS**, Illinois, v. 104, n. 9, p. 3408-3413, 2007.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV, 186 p., 2005.

SAUNDERSON, C. L.; MACKINLAY, J. Changes in body weight, composition and hepatic enzyme activities in response to dietary methionine, betaine and choline levels in growing chicks. **British Journal of Nutrition**, Roslin, v. 63, p. 339-349, 1990.

TRIVELIN, P. C. O.; LARA CABEZAS, W. A. R.; VICTÓRIA, R. L.; REICHARDT, K. Evaluation of a ¹⁵N plot design for estimating plant recovery of fertilizer nitrogen applied to sugar cane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, p. 226-234, 1994.

CAPÍTULO III

Implicações

A utilização de isótopos estáveis em pesquisas nas áreas de ciências da vida vem crescendo, principalmente devido à suas inúmeras aplicabilidades. Dentre elas, a avaliação do metabolismo animal através de *turnover* tecidual, fornecendo entendimento para uma série de mecanismos fisiológicos e pesquisas aplicadas.

Este estudo com a L-[¹³C₁]metionina como traçador nos estudos de nutrição de frangos de corte apresentou resultados satisfatórios. Todavia, seriam necessários estudos posteriores, mais aprofundados, que indiquem a incorporação de ¹³C nas diferentes fases de criação e em outros tecidos, bem como maior tempo de coleta para tecidos de metabolismo mais lento.

Deve-se ressaltar que pesquisas nesta área têm elevados custos, principalmente as relacionadas à aquisição desses aminoácidos enriquecidos e das respectivas análises isotópicas. Esses fatores podem dificultar e até inviabilizar outras pesquisas nessa área, principalmente quando se levar em consideração o número de aminoácidos a serem estudados, as diferentes fases da criação e os inúmeros órgãos e tecidos que deveriam ser pesquisados.

Entretanto, este trabalho abre uma promissora linha de pesquisa básica na área de nutrição animal, pois se mostrou eficiente e esclarecedor, e principalmente, pela ausência de estudos com a aplicação desta técnica.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)