

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

TÉCNICA DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS NA INCORPORAÇÃO DE ^{13}C
PROVENIENTE DA L-METIONINA NOS TECIDOS DE FRANGOS DE
CORTE EM FASES DE CRESCIMENTO

ANA CRISTINA STRADIOTTI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração: Nutrição e Alimentação Animal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

Botucatu - SP
Agosto, 2013

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

TÉCNICA DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS NA INCORPORAÇÃO DE ^{13}C
PROVENIENTE DA L-METIONINA NOS TECIDOS DE FRANGOS DE
CORTE EM FASES DE CRESCIMENTO

ANA CRISTINA STRADIOTTI
Zootecnista

Orientador: Prof. Ass. Dr. ANTONIO CELSO PEZZATO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração: Nutrição e Alimentação Animal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

Botucatu - SP
Agosto, 2013

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

S895t Stradiotti, Ana Cristina, 1983-
Técnica dos isótopos estáveis na incorporação de ¹³C proveniente da L-metionina nos tecidos de frangos de corte em fases de crescimento / Ana Cristina Stradiotti. - Botucatu : [s.n.], 2013
x, 82 f. : ils., tabs., grafs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2013

Orientador: Antonio Celso Pezzato
Inclui bibliografia

1. Frango de corte. 2. Aminoácido marcado. 3. Diluição isotópica. 4. Isótopos estáveis. 5. Traçador isotópico. 6. Metionina. I. Pezzato, Antonio Celso. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

“Lute com determinação. Abrace a vida com paixão. Perca com classe e vença com ousadia.

Porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”

Charles Chaplin

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros foram”

Alexandre Graham Bell

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 nos momentos de provações.

Aos meus pais Sônia Maria Rebôlla Stradiotti “in memoriam” e Luiz Carlos Stradiotti, pilares da minha vida, pelo amor constante, incansável apoio, por me possibilitarem e incentivarem o estudo, sempre valorizando e se orgulhando de cada progresso acadêmico realizado.

Aos meus irmãos Alessandra Mara Stradiotti e Luiz Carlos Stradiotti Filho, pelo carinho incondicional, presença constante e amizade sincera.

À minha sobrinha Maria Luiza Rosa Stradiotti, pela inocente alegria, graciosidade e ar angelical que ilumina a minha vida e a enche de felicidade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, pela minha formação profissional, oferecendo-me apoio institucional e infraestrutura necessária para o desenvolvimento das atividades dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, vinculado à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, pela oportunidade de realização do curso de doutorado e excelência de formação.

À Coordenadoria de Apoio a Pesquisa e Ensino Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo e Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (Processo 2010/18911-1, Subprojeto 24) e financiamento do Projeto Temático “Isótopos Estáveis Ambientais em Zootecnia” (Processo 2008/57411-4). Ressalto ainda que esta fundação, por meio da Reserva Técnica da Bolsa de Doutorado, viabilizou a realização de estágio na área de Ciência Animal, na Purdue University at West Lafayette, Indiana, EUA, contribuindo imensamente para o meu aprimoramento na área.

Às empresas VACCINAR[®] Nutrição e Saúde Animal, CEVA[®], e Zanchetta Alimentos[®], pela gentileza e imprescindíveis doações dos suplementos vitamínico-minerais, da vacina contra a Doença de Gumboro, e dos aminoácidos sintéticos, respectivamente.

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

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti, do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do IB/UNESP, Campus de Botucatu, por buscar sempre contribuir da melhor forma durante a condução deste e de outros trabalhos e incentivar-me ao longo de minha

caminhada acadêmica. Sua alegria e acima de tudo sincera amizade tem lugar cativo em meu coração.

Ao Prof. Dr. José Albertino Bendassolli, do Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP, Campus "Luiz de Queiroz", à quem tive o prazer em conhecer, conviver e respeitar. Agradeço por acolher-me sempre com muito carinho, paciência e contribuir ativa e imprescindivelmente com seus preciosos conhecimentos, que somente uma mente brilhante é capaz de realizar.

Aos professores da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, em especial Dr. José Roberto Sartori, Dra. Margarida Maria Barros, Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, Dra. Cyntia Ludovico Martins, Dr. Dirlei Antonio Berto e Dr. Roberto de Oliveira Roça, pelos ensinamentos, colaboração, incentivo, exemplo de profissionalismo e pela grande e verdadeira amizade.

Aos funcionários e ex-funcionários da Seção de Pós-Graduação em Zootecnia, do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, da Fábrica de Ração e da Supervisão de Fazendas da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, em especial Seila Cristina Cassinelli, Carlos Pazini Júnior, Aline Eliane Couto, Luis Carlos Fernandes, Silene Vitoratti Mamede e Paulo Sérgio dos Santos, pela prestação de serviços nos momentos requeridos, atenção e carinho.

A toda a equipe do Laboratório de Nutrição de Aves da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu: Vanessa Cristina Pelícia, Priscila Cavalca de Araujo, Fabiana Golin Luiggi, Ricardo Fasanaro, Mariana Kiyomi Maruno, Vitor Barbosa Fascina, Carolina Carvalho de Miranda, Estela Valéria Siloto, Thaila Cristina Putarov, Ivan Mailinch Gonçalves Pereira de Souza, Francine Vercese, Juliana Cristina Ramos Rezende, Jéssica Conteçote Russo, Guilherme Aguiar Mateus Pasquali, Natani Cruz Alexandre, Nathália Martins Guerra Causso, Renata Sena de Souza Gomes de Oliveira, Lívia Carrasco Dornelas, Nathália Monteiro, Fernanda Uhlmann de Godoy, Perterson Dante Gavasso Pacheco, Mônica Megumi Aoyagi, Ricardo Fasanaro, Edgard Onoda Luiz Caldas, Lucimara Patricia Centenaro, Cynthia Pieri Zeferino, Ana Beatriz Garcia Faitarone e Daniella Aparecida Berto, pela amizade, incentivo, apoio e imprescindível ajuda na condução do experimento.

A toda a equipe do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do IB/UNESP, Campus de Botucatu: Silvia Regina Américo Maschette, Mariana Sasso Andreasi,

Guilherme Emygdio Mendes Pimenta, Barbara Cristina da Silva Fernandes, Michele Novaes Ravelli, Regina Maria Nascimento Augusto, Vivian Lo Tierzo, Adriele Nayara Dias Ishizuka, Marco Antônio Gonzales de Carvalho, Marcela Buosi Martins, Rhani Ducatti, Vania Luzia Fournou de Lima e Luciane do Carmo Seraphim. Em especial às professoras colaboradoras, Juliana Célia Denadai e Maria Márcia Pereira Sartori, e aos assistentes de suporte acadêmico Cibele Regina de Souza-Kruliski e Evandro Tadeu da Silva. Agradeço pelo auxílio durante a condução do experimento, cuidado na realização das análises isotópicas, amizade e alegre convívio diário.

Ao meu namorado e acima de tudo, meu grande amigo e companheiro, Lúcio Vilela Carneiro Girão, pelo amor, dedicação, paciência, apoio, incentivo, e felicidade constante que traz aos meus dias.

Aos demais colegas e familiares não citados, que eu possa ter cometido a injustiça em esquecê-los neste momento de emoção, mas que merecem igual agradecimento, consideração, respeito, e que contribuíram direta ou indiretamente para a ocorrência desta pesquisa e auxiliaram a finalizar mais esta importante etapa, que certamente marca a minha história.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
1. Introdução.....	2
2. Revisão de literatura	3
2.1. Metionina na nutrição de frangos de corte.....	3
2.2. Moléculas de metionina e seus análogos	4
2.3. Digestão, absorção e metabolização de metionina	5
2.4. Fontes de grupo metil lábil	5
2.5. Papel dos doadores de grupo metil lábil no metabolismo de lipídios.....	6
2.6. Utilização de isótopos estáveis como traçadores naturais	7
2.7. Compostos enriquecidos isotopicamente.....	10
2.8. Diluição isotópica	11
2.9. Turnover isotópico	13
3. Referências bibliográficas	15
CAPÍTULO 2.....	20
Taxa de incorporação do ¹³ C proveniente da L-metionina nos tecidos de frangos de corte em crescimento.....	21
RESUMO	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO.....	49
LITERATURA CITADA.....	49
CAPÍTULO 3.....	53
Balanço de massa do ¹³ C proveniente da L-metionina nos tecidos de frangos de corte em crescimento.....	54
RESUMO	54
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
CONCLUSÃO.....	76
LITERATURA CITADA.....	77
CAPÍTULO 4.....	81
IMPLICAÇÕES	82

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Composição nutricional, calculada e isotópica analisada das rações experimentais	25
Tabela 2. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{m\acute{a}x}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}C_1$]metionina em mucosa duodenal de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo	32
Tabela 3. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{m\acute{a}x}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}C_1$]metionina em plasma sanguíneo de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo	33
Tabela 4. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{m\acute{a}x}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}C_1$]metionina em fígado de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo	34
Tabela 5. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{m\acute{a}x}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}C_1$]metionina em coxa de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo	35
Tabela 6. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{m\acute{a}x}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}C_1$]metionina em sobrecoxa de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo	36
Tabela 7. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{m\acute{a}x}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}C_1$]metionina em peito de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo	37
Tabela 8. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{m\acute{a}x}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}C_1$]metionina em penas de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo	38

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Composição nutricional, calculada e isotópica analisada das rações experimentais	57
Tabela 2. Massa de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE) e penas (PN) de frangos de corte e total (TOT) no G1 (1-7 dias de idade) avaliado ao longo do tempo (t)	65
Tabela 3. Massa de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE) e penas (PN) de frangos de corte e total (TOT) no G2 (8-14 dias de idade) avaliado ao longo do tempo (t)	66
Tabela 4. Massa de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE) e penas (PN) de frangos de corte e total (TOT) no G3 (15-21 dias de idade) avaliado ao longo do tempo (t)	67
Tabela 5. Massa de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE) e penas (PN) de frangos de corte e total (TOT) no G4 (22-28 dias de idade) avaliado ao longo do tempo (t)	68
Tabela 6. Massa de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC) e peito (PE) de frangos de corte e total (TOT) no G5 (29-35 dias de idade) avaliado ao longo do tempo (t).....	69
Tabela 7. Massa de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC) e peito (PE) de frangos de corte e total (TOT) no G6 (36-42 dias de idade) avaliado ao longo do tempo (t).....	70
Tabela 8. Médias e seus respectivos erros padrão da massa de carbono-13 recuperada em relação à administrada, proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina, nos picos de enriquecimento em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE) e penas (PN) de frangos de corte nos grupos (G) avaliados	71

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1	
Figura 1. Fórmula estrutural da metionina.....	4
Figura 2. Diluição isotópica do carbono-13, proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina nos tecidos de frangos de corte.....	12
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em mucosa duodenal de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.	40
Figura 2. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em plasma sanguíneo de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.	41
Figura 3. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em fígado de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.	42
Figura 4. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em coxa de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.....	43
Figura 5. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em sobrecoxa de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.	44
Figura 6. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em peito de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.....	45
Figura 7. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[¹³ C ₁]metionina em penas de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21) e G4 (22-28) dias de idade.....	46

CAPÍTULO 3

Figura 1. Porcentagem de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³C₁]metionina, nos picos de enriquecimento em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE) e total (TOT) de frangos de corte nos grupos avaliados: G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade 72

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Introdução

O Brasil é atualmente, considerado no cenário mundial, o terceiro maior produtor e o maior exportador de carne de frango (UBABEF, 2013). Apesar desta atividade apresentar importante papel no setor agropecuário, os produtores trabalham com reduzida margem de lucro, sendo a eficiência produtiva essencial para a rentabilidade deste setor.

O progresso genético na avicultura exige constante adequação dos parâmetros nutricionais. Para frangos de corte, a alimentação representa cerca de 70% do custo de produção, sendo fundamental o fornecimento de dietas balanceadas de acordo com as necessidades das aves, proporcionando melhor eficiência alimentar e máximo desempenho dos animais (NASCIMENTO et al., 2009).

Os aminoácidos sintéticos tem sido utilizados no ajuste das formulações de rações, possibilitando assim, atender os níveis exigidos em aminoácidos essenciais. A metionina é um desses aminoácidos essenciais que possui maior impacto no desempenho das aves em função das mesmas serem incapazes de sintetizá-lo em velocidade e quantidade suficiente para suprir sua exigência, o que torna imprescindível o conhecimento do nível presente nos alimentos e seu aproveitamento pelos animais.

A disponibilização de metionina sob a forma sintética torna-se necessária na formulação de dietas para frangos de corte, devido às rações a base de milho e farelo de soja possuírem baixo teor desse aminoácido. As exigências em metionina para a manutenção e, deposição óssea, muscular e adiposa se alteram durante as fases de crescimento e situações fisiológicas do animal, devido a isso, a determinação das exigências nesse aminoácido para frangos de corte persiste como fator de elevada importância para a avicultura industrial atual.

A utilização de isótopos estáveis em pesquisas na área de nutrição animal vem crescendo nas últimas décadas. Em revisão sobre o uso potencial da variação natural dos isótopos estáveis, autores destacaram o uso dessa ferramenta pelos fisiologistas para esclarecer questões fisiológicas e ecológicas (GANNES; DEL-RIO; KOCH, 1998).

Hoje, o principal foco no uso dos isótopos estáveis envolve pesquisas relacionadas ao *turnover* tecidual, alocação de nutrientes e balanço proteico.

A existência de isótopos marcados disponíveis no mercado, possibilita sua utilização por apresentarem abundâncias isotópicas acima da natural. Assim como os isótopos estáveis de dietas contrastantes, os compostos enriquecidos também podem ser utilizados como traçadores isotópicos para se avaliar processos metabólicos em seres vivos (MURAMATSU et al., 1987; BARNES et al., 2002; STRADIOTTI et al., 2013).

Diante deste contexto, considerando a relevada importância do referido aminoácido para as aves e a diversa aplicabilidade da técnica dos isótopos estáveis, objetivou-se com o presente estudo utilizar esta técnica como ferramenta para avaliar o processo da taxa de incorporação e balanço de massa do ^{13}C , proveniente de L-metionina, nos tecidos de frangos de corte em distintos períodos de crescimento.

2. Revisão de literatura

2.1. Metionina na nutrição de frangos de corte

A metionina ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$) é um aminoácido essencial nutricionalmente indispensável para manutenção e crescimento dos animais. Esse nutriente desempenha diversas funções no organismo das aves, tendo efeito em sistema imune (KALINOWSKI; MORAN Jr.; WYATT, 2003a,b), deposição proteica (HRUBY, 1998), metabolismo de lipídeos (JENSEN, 1990) e metabolismo energético (BOOMGARDT e BAKER, 1973).

Na forma de S-adenosilmetionina, esse aminoácido é o maior doador de radicais metil no organismo animal. É precursora para biossíntese de cistina, através do mecanismo de transulfuração, além de creatina, poliaminas, epinefrina, colina e melatonina, que são componentes fundamentais para o desenvolvimento das aves (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Sintetizada naturalmente por plantas e microrganismos a partir do aspartato, dentre as importantes funções metabólicas 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.

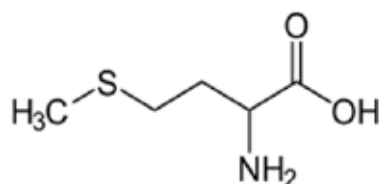


Figura 1. Fórmula estrutural da metionina (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

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. Além de ser descrita por diversos autores como primeiro aminoácido limitante para aves e considerado essencial na síntese proteica.

A metionina e a cisteína são dois aminoácidos sulfurados, que 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; VOET; PRATT, 2000).

São disponibilizados na indústria de alimentos diferentes fontes sintéticas desse aminoácido. As fontes mais utilizadas são a DLM, na forma em pó e MHA-AL, na forma líquida (BARBI; DIBNER; PEAK, 2004).

2.2. Moléculas de metionina e seus análogos

O que diferencia a metionina de seus análogos é a ausência do grupo amina (NH_2) nestes. O hidroxí análogo apresenta-se como um ácido (ácido 2-hidróxi-4-metiltiobutírico) na forma líquida e encontra-se uma hidroxila (OH) na posição da amina. Segundo Penz Jr. (1994), na forma em pó, apresenta-se como um sal de cálcio (MHA-Ca).

Além disso, essas substâncias possuem dois isômeros ópticos (L e D), com carbono alfa assimétrico em suas moléculas. Sabe-se que as aves somente utilizam o L-isômero da metionina na síntese proteica (PENZ Jr., 1994). Portanto, os D-aminoácidos devem ser convertidos em L-aminoácidos (LEWIS e BAKER, 1995; LEESON e

SUMMERS, 2001), por meio de duas reações, oxidação para ceto-análogo e transaminação para L-aminoácido (BAKER, 1994).

2.3. Digestão, absorção e metabolização de metionina

A absorção dos nutrientes presentes no lúmen intestinal é dependente de um sistema de transporte que ocorre através da membrana lipoproteica das células intestinais. A rota metabólica da metionina e de seus análogos são diferentes. O fígado é o principal local de metabolismo da metionina (WANG et al., 2001) e onde ocorre a maior parte da conversão de MHA-AL e D-metionina para L-metionina, forma bioquimicamente ativa.

Os mecanismos de absorção dos isômeros de metionina são diferenciados. Os MHA-AL isômeros são absorvidos por difusão passiva, ocorrendo passagem do meio mais concentrado da substância para meio com menor concentração. Já os L e D isômeros são absorvidos de forma ativa, transportadas contra um gradiente de concentração (PENZ Jr., 1994). Esse sistema de transporte ativo tem maior afinidade pela forma L-metionina do que pela DL-metionina.

Em estudo comparando a absorção de MHA-AL e DLM, constatou-se que ambas são absorvidas pelas aves (ESTEVE-GARCIA e AUSTIC, 1988; 1993). As formas MHA-AL ou D isômero da DLM, após serem absorvidas, devem ser convertidas em L-metionina para serem incorporadas em proteínas nos tecidos animais ou no metabolismo intermediário (BARBI; DIBNER; PEAK, 2004).

A absorção das fontes de metionina diferem, sendo a forma DLM mais rapidamente absorvida na parte inicial do intestino delgado, e a absorção da MHA-AL mais lenta e ineficiente pelo trato digestivo. Segundo Dibner et al. (1988) a MHA-AL é absorvida em todo o trato digestório e ceco. Vasquez-Anon et al. (2000) constataram maior quantidade de D-metionina na forma livre, em fígado de aves *in vivo* e mais L-metionina incorporada em proteína.

2.4. 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 necessitam desses grupos metil, estes devem ser atendidos via suplementação de metionina e colina na dieta

(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 adequado 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 para síntese de purina, para a excreção de nitrogênio. Para cada mol de nitrogênio a ser excretado, são necessários dois mols de metil. Assim, como consequência, em dietas com excesso de proteína, a exigência de grupo metil lábil aumenta (PESTI, 1981).

Em uma 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 (PESTI; HARPER; SUNDE, 1979). 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, segundo o mesmo autor.

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 proteica, a menos que a dieta contenha homocisteína (BERTECHINI, 2006).

2.5. Papel dos doadores de grupo metil lábil no metabolismo de lipídios

Os fosfolipídios são constituintes vitais dos tecidos estando presentes nas camadas lipídicas das membranas celulares e da cartilagem da matriz óssea e, por consequência, são importantes na prevenção da perose nas aves. 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 Jr., 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 duas fontes de metionina distintas e verificaram aumento na deposição de músculo do peito e diminuição da gordura abdominal, demonstrando o efeito positivo e a importância da adequada suplementação e atendimento das exigências deste aminoácido.

As reações de metilação são de elevada 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 ricas em colesterol, suplementadas com betaína (SUGIYAMA; AKAI; MURAMATSU, 1986). A suplementação com betaína na dieta das ratas preveniu de forma eficaz a síndrome do fígado gordo (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.

2.6. Utilização de isótopos estáveis como traçadores naturais

O termo isótopo foi criado pelo Sr. Frederick Soddy e vem do grego *ISO* (igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato de que são bioelementos que ocupam mesma posição na tabela periódica. São denominados estáveis por não emitirem radiação.

Os isótopos podem ser definidos como átomos variantes de um elemento químico particular, que apresentam mesmo número de prótons e elétrons, diferente número de nêutrons, portanto massas nucleares distintas (SUN et al., 2011). Sendo assim, pode-se dizer que possuem as mesmas propriedades químicas e diferentes propriedades físicas (DUCATTI et al., 2011). Os diferentes números de massas dos isótopos possibilitam a identificação e quantificação desses isótopos de um mesmo elemento químico (GROOT, 2004).

Como a eletrosfera do átomo é comum a todos os isótopos, 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 et al., 2011).

Os elementos naturais que constituem os isótopos estáveis, ocorrem naturalmente através da atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera. A maioria dos

elementos apresenta um isótopo estável leve dominante, e um ou dois isótopos estáveis pesados raros, com abundância ou concentração isotópica natural distintas, expressas em átomos % (PRESTON, 1992).

Naturalmente há ocorrência de dois isótopos estáveis de carbono: ^{12}C e ^{13}C , com abundâncias naturais de 98,89 e 1,11 átomos %, respectivamente (KENNEDY e KROUSE, 1990), que variam nos tecidos vegetais de acordo com a via fotossintética das plantas.

O ciclo fotossintético C_3 inclui a soja, arroz, trigo, cevada, algodão, leguminosas, hortaliças, frutíferas em geral, gramíneas temperadas, entre outros, e a via fotossintética C_4 é encontrada no milho, cana de açúcar, sorgo, gramíneas de origem tropical ou subtropical, entre outros. Durante a assimilação fotossintética, as plantas do ciclo fotossintético C_3 fixam o CO_2 através do ciclo *Calvin-Benson* e apresentam valores médios em $\delta^{13}\text{C}$ de -28‰, enquanto as plantas do ciclo fotossintético C_4 fixam o HCO_3^- através do ciclo *Hatch-Slack* e apresentam valores médios em $\delta^{13}\text{C}$ de -13‰ (SUN et al., 2011). O sinal negativo significa que a planta ou seu subproduto apresenta menor concentração em ^{13}C que o padrão internacional.

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 (DeNIRO e EPSTEIN, 1978; GANNES; DEL-RIO; KOCH, 1998).

Os isótopos de carbono, 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.

A técnica de isótopos estáveis é uma ferramenta poderosa para elucidar a origem e o destino de compostos, e são usados em uma variedade de campos (ROCK, 2012). Existem vantagens importantes para o uso de isótopos estáveis, que ocorrem

naturalmente como indicadores dietéticos, sobre as técnicas convencionais. 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). Segundo Vinci et al. (2012), a técnica de isótopos estáveis, se comparada a outras, tem como principal vantagem de ser praticamente impossível de ludibriar, devido à especificidade dupla dos átomos analisados e a localização desses átomos nas moléculas das amostras.

Em revisão sobre o uso potencial da variação natural dos isótopos estáveis, autores 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 (GANNES; DEL-RIO; KOCH, 1998). Dentre as diretrizes para futuras pesquisas com os isótopos estáveis destacadas por esses autores, receberam ênfase o balanço proteico, a alocação de nutrientes e o *turnover* tecidual.

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

Segundo Criss (1999) a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra é obtida em relação a um padrão internacional definido, *PeeDee Belemnite* (PDB). 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; SALATI; MATSUI, 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.: H₂, CO₂, N₂ e SO₂), em relação ao padrão internacional definido e com erro analítico de 0,2%.

2.7. Compostos enriquecidos isotopicamente

O método de marcação isotópica é uma técnica utilizada para rastrear um isótopo ou um átomo com variação por meio de uma reação, via metabólica ou a nível celular. Os átomos da molécula de interesse são substituídos por um átomo de mesmo elemento químico, mas de um diferente isótopo. Através da marcação isotópica, pode-se detectar a presença do isótopo marcado através de sua massa, modo vibracional ou decaimento radioativo (SHARMA e MISHRA, 2013).

Segundo Sharma e Mishra (2013), os traçadores isotópicos são normalmente subdivididos em duas categorias: traçadores isotópicos estáveis e traçadores isotópicos radioativos. Traçadores isótopos estáveis envolvem apenas isótopos não radiogênicos e, geralmente, são massa-dependente. Em teoria, qualquer elemento com dois isótopos estáveis podem ser utilizados como um marcador isotópico.

A tecnologia de síntese de compostos químicos marcados é restrita e não repassada pelos países que a detém, envolvendo interesses econômicos o que resulta na necessidade de importação desses produtos. Felizmente, essa realidade vem mudando devido aos estudos realizados no Brasil, envolvendo pesquisas de desenvolvimento de novas tecnologias para síntese desses compostos.

Assim como o uso de isótopos radioativos, pode ser realizado o enriquecimento da fonte em termos de seus isótopos estáveis (VASCONCELLOS, 2001). Por exemplo, plantas condicionadas em ambiente controlado, enriquecidas em ¹³CO₂, produzirão fotoassimilados enriquecidos em ¹³C, 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, porém sendo inócuos ao homem.

Com relação aos métodos utilizados para a separação dos isótopos estáveis de carbono (¹²C e ¹³C), pode-se destacar a cromatografia de troca iônica (TAKEDA; OBANAWA; MORITA, 1987) e a destilação (McINTEER, 1980). A existência dos isótopos raros mais pesados, como por exemplo do ¹³C, bem como de outros elementos, viabiliza a produção de compostos marcados ou enriquecidos nestes isótopos, e são

caracterizados por apresentarem abundâncias isotópicas acima da natural. A utilização desses compostos ricos em ^{13}C tem provado ser eficaz como uma ferramenta para o estudo de processos do ciclo de carbono (SUN et al., 2011). A utilização de ^{13}C como marcador biológico consiste em fornecer ao organismo a ser estudado um composto químico com razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) do composto considerado, diferente da natural e avaliar sua distribuição.

O equilíbrio entre compostos marcados naturais segue o fenômeno de troca, e 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.

A 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 o 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; CLIQUET; PRIOL, 1994).

Alguns trabalhos foram realizados para se avaliar processos metabólicos em estudos nutricionais animais com o uso de aminoácidos enriquecidos o que possibilita através dessa técnica, a obtenção de resultados promissores e maiores informações relacionadas à dinâmica dos nutrientes avaliados (MURAMATSU et al., 1987; BARNES et al., 2002; STRADIOTTI et al., 2013).

2.8. 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 (Trivelin et al., 1994) . A partir do balanço de massa

isotópico pode-se determinar, no produto final, a contribuição da fonte marcada e da fonte natural do isótopo estável em apreço.

A Figura 2 ilustra, esquematicamente, o processo de formação do produto final, a partir de duas fontes (marcada e natural), com abundâncias isotópicas distintas.

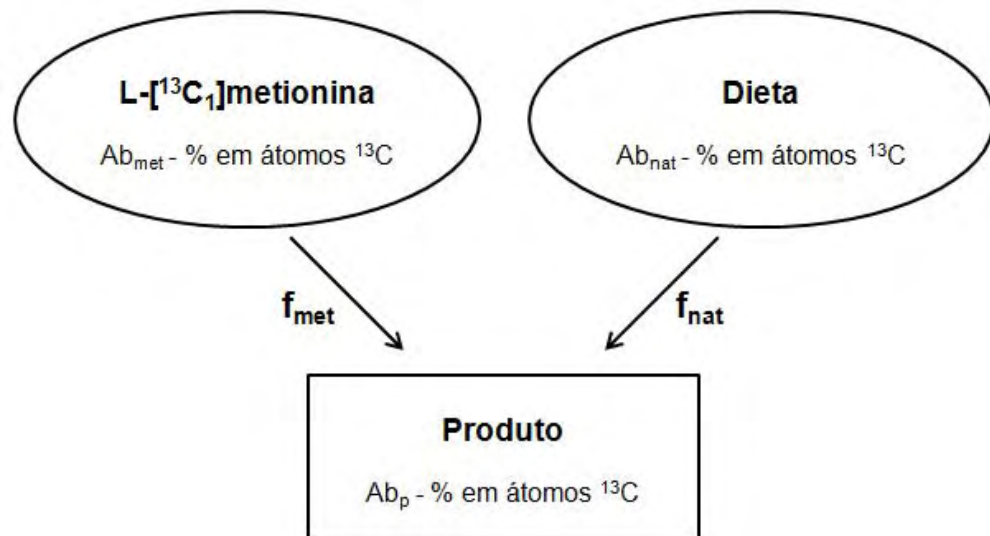


Figura 2. Diluição isotópica do carbono-13, proveniente da L-[¹³C₁]metionina nos tecidos de frangos de corte (Adaptado de SANT'ANA FILHO, 2011).

Neste esquema, exemplificado na Figura 2, f_{met} representa a fração de carbono proveniente da L-[¹³C₁]metionina (fonte marcada) nos tecidos (produto); f_{nat} , a fração de carbono proveniente da dieta fornecida (fonte natural) nos tecidos; e Ab_{met} , Ab_{nat} e Ab_p correspondem, respectivamente, à abundância isotópica de carbono-13 (% em átomos de ¹³C) na L-[¹³C₁]metionina, dieta e tecidos, em um tempo t , após administração de solução enriquecida em carbono-13.

O método de diluição isotópica consiste na adição de uma quantidade conhecida e exata (*spike*) do material enriquecido em um 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 marcada). 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).

2.9. *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 denominado *turnover*. Todas as substâncias do corpo, sejam metabólitos orgânicos ou inorgânicos, estão sujeitas ao *turnover* (HETENYI; PEREZ; VRANIC, 1983).

O *turnover* isotópico pode 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).

Dietas com assinaturas isotópicas contrastantes podem ser usadas para mensurar o *turnover* de componentes corporais e órgãos de animais (GANNES; DEL-RIO; KOCH, 1998). 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.

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; ARAUJO et al., 2011; PELÍCIA et al., 2011; SERNAGIOTTO et al., 2013). Do mesmo modo, ao se utilizar compostos enriquecidos ou marcados num elemento, estes podem atuar como traçadores biológicos, possibilitando determinar as taxas de *turnover* em tecidos animais, bem como a obtenção da rota e partição destes nos diferentes tecidos.

Os Capítulos 2 e 3, intitulados “**Taxa de incorporação do ^{13}C proveniente da L-metionina nos tecidos de frangos de corte em crescimento**” e “**Balanço de massa do ^{13}C proveniente da L-metionina nos tecidos de frangos de corte em crescimento**”, respectivamente, estão com redação provisória de acordo com as normas para publicação no *Journal of Animal Science*.

3. Referências bibliográficas

ARAÚJO, P. C. et al. Rastreabilidade de farinha de vísceras de aves por isótopos estáveis em penas de frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB**, Brasília, v. 46, p. 538-545, 2011.

BAKER, D. H. Utilization of precursors of L-amino-acids. In: Amino acids in farm animal nutrition. D'Mello J. P. F. (Ed.). **CAB International ISBN**, Wallingford, p. 37-61, 1994.

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, 1992. v. 17, p. 552-555.

BARBI, J. H. T.; DIBNER, J.; PEAK, S. Mais que uma fonte de metionina. **Revista Aveworld**, ago./set., 2004.

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

BARRIE, A.; PROSSER, S. J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T. W.; YAMSAHI, S. (Ed.). **Mass spectrometry of soils**, New York: Marcel Dekker, 1996. p. 1-46.

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

BOOMGARDT, J.; BAKER, D. H. Effect of dietary energy concentration on sulfur amino acid requirement and body composition of young chicks. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 36, n. 2, p. 307-311, 1973.

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, 2007. p. 289-307.

CRISS, R. E. **Principles of stable isotope distribution**. New York: Oxford University Press., 1999. 254 p.

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 of Plant Physiology**, 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**, v. 42, p. 495-506, 1978.

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

DIBNER, J. J. et al. Absorption of ^{14}C -2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid (Alimet) from the hindgut of the broiler chick. **Poultry Science**, Champaign, v. 67, p. 1314-1321, 1988.

DUCATTI, C. et al. Utilização de Isótopos Estáveis em Ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, suplemento especial, p. 68-75, 2011.

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.

ESTEVE-GARCIA, E.; AUSTIC, R. E. Digestibility of methionine hydroxy analogue (MHA) in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 67 (suppl.1), p. 14. (Abstr.), 1988.

ESTEVE-GARCIA, E.; AUSTIC, R. E. Intestinal absorption and renal excretion of dietary methionine sources by the growing chicken. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, p. 576-587, 1993.

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**, 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**, v. 119A, n. 3, p. 725-737, 1998.

GROOT, P. A. **Handbook of stable isotope analytical techniques**. Amsterdam: Elsevier, 2004. v. 1, 1234 p.

HETENYI, G. J. R.; PEREZ, G.; VRANIC, M. Turnover and precursor-product relationships of non lipid metabolites. **Physiological Reviews**, 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.

HRUBY, M. **The amino acid maintenance and growth requirements of male broilers**. 1998. Thesis (Ph.D.)-University of Minnesota, Minnesota, US, 1998.

JENSEN, L. S. Concepts of amino acid and protein nutrition in poultry. In: COLÉGIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 1990, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 1990. p. 99-108.

KALINOWSKI, A.; MORAN Jr., E. T.; WYATT. C. Methionine and cystine requirements of slow- and fast-feathering male broilers from zero to three weeks of age. **Poultry Science**, Champaign, v. 82. p. 1423-1427, 2003a.

KALINOWSKI, A.; MORAN Jr., E. T.; WYATT. C. Methionine and cystine requirements of slow- and fast-feathering male broilers from three to six weeks of age. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 1428-1437, 2003b.

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

LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Nutrition of the Chicken**. 4nd ed. Guelph: University Books, 2001. 591 p.

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

LEWIS A. J.; BAKER D. H. Bioavailability of D-amino acids and DL-hydroxy-methionine. In: Bioavailability of nutrients for farm animals, Amino acids, Minerals and Vitamins. **Academic Press**, San Diego, 1995.

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. **British Poultry Science**, v. 48, n. 2, p. 190-197, 2007.

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

MORAN Jr., E. T. Response of broiler strains differing in body fat to inadequate methionine: live performance and processing yields. **Poultry Science**, Champaign, v. 73, n. 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**, v. 87, n. 2, p. 227-232, 1987.

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

NASCIMENTO, D. C. N. et al. Exigência de metionina+cistina digestível para aves de corte ISA Label criadas em semi-confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 5, p. 869-878, 2009.

PELÍCIA, V. C. et al. Nucleotídeos na dieta de frangos de corte e seus efeitos sobre taxa de *turnover* da mucosa intestinal antes e após lesões causadas por coccidiose. **Ciência Rural**, UFSM, v. 41, p. 1652-1659, 2011.

PENZ Jr., A. M. Metionina e hidróxi análogos (MHA) em nutrição de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1994, Campinas, **Anais...** Campinas: FACTA, 1994. p. 85-94.

PESTI, G. M. The nutrition of labile methyl group donors in broiler chickens. **Georgia Nutrition Conference**, 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. **Poultry Science**, Champaign, v. 58, p. 1541-1547, 1979.

PRESTON, T. The measurement of stable isotope natural abundance variations. **Plant Cell and Environment**, v. 15, p. 1091-1097, 1992.

ROCK, L. The use of stable isotope techniques in egg authentication. **Trends in Food and Science Technology**, v. 28, p. 62-68, 2012.

SANT'ANA FILHO, C. R. **Síntese de uréia enriquecida com o isótopo ^{13}C e/ou ^{15}N** . 2011. 154 f. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente)-Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

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. **Poultry Science**, Champaign, v. 74, n. 3, p. 480-487, 1995.

SERNAGIOTTO, E. R. et al. The use of carbon and nitrogen stable isotopes for the detection of poultry offal meal in meat-type quail feeds. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 15, p. 65-70, 2013.

SHARMA, A.; MISHRA, P. A. Review; Isotope Labelling and its Applications. **International Journal of Pharmaceutical & Research Sciences**, v. 2, n. 5, p. 707-717, 2013.

STORCH, K. J. et al. [^{13}C ; methyl- $^2\text{H}_3$] methionine kinetics in humans: methionine conservation and cystine sparing. **American Journal the Physiology**, v. 258, n. 5, p. 790-798, 1990.

STRADIOTTI, A. C. et al. Methionine incorporation into the blood plasma of broiler chickens at the last week of age. In: 2013 POULTRY SCIENCE ASSOCIATION ANNUAL MEETING, **Proceedings...** San Diego. Poultry Science 92 (E-Suppl. 1). 2013. p. 112.

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**, v. 32, p. 537-549, 1986.

SUN Z. et al. Application of Stable Isotope Techniques in Studies of Carbon and Nitrogen Biogeochemical Cycles of Ecosystem. **Chinese Geographical Science**, v. 21, n. 2, p. 129-148, 2011.

TAKEDA, K.; OBANAWA, H.; MORITA, N. Equilibrium behavior in acid-base chromatography for carbon isotope separation. **Separation Science and Technology**, 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**, v. 57, p. 32-37, 1983.

TORRES, A. P. **Proteína e aminoácidos**. In: ALIMENTOS E NUTRIÇÃO DAS AVES DOMÉSTICAS, 2. ed. São Paulo: Nobel, 1989. cap. 8, p. 150-165.

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

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2013**, São Paulo, 2013. Disponível em: <www.abef.com.br>. Acesso em: 5 ago. 2013.

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

VASQUEZ-ANON et al. Metabolism of D and L methionine in young chickens. **XXI World's Poultry Congress**, Montreal, 2000.

VINCI, G. et al. Authenticity and quality of animal origin food investigated by stable-isotope ration analysis. **Journal of the Science Food Agriculture**, Wiley Online Library. 2012, DOI 10.1002/jsfa.5970.

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

WANG, S. et al. Uptake of DL-2-hydroxy-4-methylthio-butanoic acid (DL-HMB) in the broiler liver in vivo. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, p. 1619-1624, 2001.

CAPÍTULO 2

Taxa de incorporação do ^{13}C proveniente da L-metionina nos tecidos de frangos de corte em crescimento

RESUMO:

O presente trabalho teve como objetivo utilizar a técnica de isótopos estáveis para avaliar a taxa de incorporação do carbono-13, proveniente da L-metionina, nos tecidos de frangos de corte em crescimento. Foram alojados em galpão experimental 1000 pintos de corte machos da linhagem Cobb, sendo distribuídas 51 aves, após seleção por peso em cada um dos seis grupos (G) avaliados: período de 1 a 7 (G1), 8 a 14 (G2), 15 a 21 (G3), 22 a 28 (G4), 29 a 35 (G5) e 36 a 42 (G6) dias de idade. As aves foram submetidas à administração via oral de solução contendo L- $^{13}\text{C}_1$ metionina (abundância isotópica de 99 atm % em ^{13}C), na dosagem de 29 $\mu\text{mol/kg}$ peso vivo/h, durante 6 h. Nos tempos 0 h (controle); 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 48; 72 e 96 h após a primeira administração de solução enriquecida, foram abatidas 3 aves por tempo em cada período, para amostragem dos tecidos utilizados nas análises isotópicas em espectrômetro de massa. Foram coletadas amostras de mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE), penas (PN) e gordura abdominal (GA). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software estatístico Minitab 16 (2010). Nas condições experimentais não foi detectada incorporação na GA em nenhum período avaliado, bem como para os períodos G5 e G6 das PN. O tempo de máxima incorporação do carbono-13, proveniente da L-metionina, nos tecidos M, PL e F, ocorreu por volta de 9 horas e para os tecidos C, SC, PE e PN, ocorreu por volta de 17 horas, após a administração das dosagens. O tecido da M apresentou o menor valor de meia-vida encontrado quando comparado aos demais (1,9 a 3,7 horas), indicando maior rapidez na metabolização. A taxa de incorporação do carbono-13, proveniente da L-metionina, nos tecidos avaliados varia em cada período de crescimento das aves. A técnica dos isótopos estáveis demonstra-se eficiente na avaliação do comportamento da taxa de incorporação do composto enriquecido e permite evidenciar as distintas assimilações teciduais da mesma, de acordo com as exigências pelo aminoácido.

Palavras-chave: aminoácido marcado, traçador isotópico, *turnover*.

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, exigindo portanto, além de boas práticas de manejo, o fornecimento de dietas adequadamente balanceadas para que as aves possam expressar todo seu potencial genético visando crescimento e rendimento das partes de maior interesse.

A suplementação com aminoácidos essenciais sintéticos em dietas de frangos de corte é prática comum, pois os ingredientes base das rações, milho e farelo de soja, não fornecem a quantidade adequada exigida desses nutrientes, visto que as aves não são capazes de sintetizá-los. Aminoácidos são imprescindíveis para o crescimento tecidual, e sua suplementação na dieta pode diminuir custos, permite melhor ajuste nutricional visando atender as exigências nutricionais das aves e também possibilita redução do excesso de proteína bruta das rações (Bertechini, 2006).

A metionina que é o primeiro aminoácido limitante para aves, é importante doadora de grupos metil, os quais são essenciais à nutrição animal em diversas rotas metabólicas. Os grupos metil lábeis participam das sínteses de aminoácidos sulfurados, fosfolípidios, DNA e RNA (Saunderson e Mackinlay, 1990).

Nas três últimas décadas a utilização da técnica de isótopos estáveis nas pesquisas da área de nutrição animal vêm crescendo. Em revisão sobre o uso potencial da variação natural dos isótopos estáveis, autores destacaram a utilização desta ferramenta pelos pesquisadores para esclarecer questões fisiológicas e ecológicas (Gannes et al., 1998). Dentre as diretrizes para futuras pesquisas envolvendo os isótopos estáveis, recebem ênfase o balanço proteico, a alocação de nutrientes e o *turnover* tecidual. Investigações demonstraram que as composições isotópicas dos tecidos de animais dependem, principalmente da alimentação, água e gases inalados, e associado a isto, o efeito dos isótopos estarem ligados aos processos metabólicos (Kennedy e Krouse, 1990).

Estudos em nutrição de aves aplicando os isótopos estáveis como traçadores em suas dietas, dão estimativas de quão rapidamente os isótopos estáveis dos tecidos são substituídos por isótopos derivados das rações, processo denominado *turnover* (Denadai et al., 2007; Araujo et al., 2011; Pelícia et al., 2011; Sernagiotto et al., 2013).

A existência dos isótopos raros dos elementos, possibilita a síntese de compostos marcados ou enriquecidos nestes isótopos, caracterizados por apresentarem abundâncias isotópicas acima da natural. Assim como os isótopos estáveis de dietas contrastantes, os compostos enriquecidos também podem ser utilizados como traçadores para se avaliar processos metabólicos de seres vivos (Muramatsu et al., 1987; Barnes et al., 2002; Stradiotti et al., 2013).

Em função do exposto, o presente trabalho teve como objetivo utilizar a técnica de isótopos estáveis para avaliar a taxa de incorporação do carbono-13, proveniente da L-metionina, nos tecidos de frangos de corte em crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos utilizados neste experimento foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, protocolo nº 165/2010-CEUA, determinados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu.

Local, Animais e Manejo

O experimento foi realizado na região centro-sul do Estado de São Paulo, Brasil e conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, no Laboratório de Nutrição de Aves.

Foram alojados 1000 pintainhos machos de corte com um dia de idade, da linhagem Cobb, numa densidade de 2,5 aves/m², vacinados no incubatório contra as doenças de Gumboro, Marek e Bouda Aviária.

Água e a ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental. As rações experimentais foram formuladas e balanceadas, adaptando-as às recomendações de Rostagno et al. (2011), para frangos de corte machos, sendo o programa de arraçamento dividido em quatro fases de acordo com a idade: pré-inicial (1-7), inicial (8-21), crescimento (22-35) e final (36-42) dias de idade, como demonstrado na Tabela 1.

Por meio das diferentes inclusões de milho e farelo de soja nas rações ao longo das fases, para se atender as exigências animais, promove-se consequentemente

alteração no valor isotópico das mesmas. Para minimizar este efeito, utilizou-se quirera de arroz nas formulações das rações como ingrediente estratégico quando necessário, buscando a manutenção do valor isotópico entre as mesmas para que estas não promovessem enriquecimento tecidual, uma vez que a quirera de arroz e farelo de soja (plantas C₃, valores médios de -28‰ em $\delta^{13}\text{C}$) possuem valor isotópico diferente do milho (planta C₄, valores médios de -13‰ em $\delta^{13}\text{C}$) (SUN et al., 2011).

Tabela 1. Composição nutricional, calculada e isotópica analisada das rações experimentais

Item	Fase			
	Pré-inicial	Inicial	Crescimento	Final
Ingrediente, %				
Milho, moído	54,691	55,575	56,473	57,365
Soja, farelo	38,688	35,046	31,764	27,461
Soja, óleo	2,353	2,345	3,347	3,135
Arroz, quirera	0,000	3,300	5,050	9,150
Fosfato bicálcico	1,905	1,530	1,285	1,090
Calcário calcítico	0,914	0,910	0,860	0,765
DL-Metionina (99%)	0,220	0,179	0,165	0,154
L-Lisina HCl (78%)	0,218	0,165	0,148	0,180
L-Treonina (98%)	0,103	0,060	0,043	0,055
Sal comum	0,508	0,490	0,465	0,445
Suplemento vit/min ¹	0,400	0,400	0,400	0,200
Composição Nutricional Calculada²				
EM, kcal/kg	2.950	3.000	3.100	3.150
PB, %	22,200	20,800	19,500	18,000
Ca, %	0,920	0,819	0,732	0,638
P disp., %	0,470	0,391	0,342	0,298
Met, %	0,511	0,458	0,431	0,404
Met+Cys, %	0,944	0,846	0,787	0,737
Lys, %	1,310	1,174	1,078	1,010
Tre, %	0,852	0,763	0,701	0,656
K, %	0,590	0,585	0,580	0,580
Na, %	0,220	0,210	0,200	0,195
Cl, %	0,200	0,190	0,180	0,170
Valor Isotópico Médio Analisado³				
¹³ C, ‰	-19,73	-19,40	-19,19	-19,49

¹Fornecendo as seguintes quantidades/kg de ração (PX FC Vaccinar): **Pré-inicial** - ácido fólico 1,5 mg; ácido pantotênico 14 mg; biotina 0,075 mg; cobre 8 mg; colina 0,35 g; etoxiquim 4 mg; ferro 0,05 g; fitase 0,5 ftu; iodo 0,9 mg; manganês 0,075 g; niacina 0,045 g; nicarbazina 0,125 g; selênio 0,33 mg; virginiamicina 16,5 mg; vitamina A 10.000 UI; vitamina B1 2 mg; vitamina B12 17,5 mcg; vitamina B2 6 mg; vitamina B6 3 mg; vitamina D3 3.000 UI; vitamina E 35 UI; vitamina K3 3 mg; zinco 0,07 g. **Inicial** - ácido fólico 1,25 mg; ácido pantotênico 13 mg; biotina 0,07 mg; cobre 8 mg; colina 0,3 g; etoxiquim 4 mg; ferro 0,05 g; fitase 0,5 ftu; iodo 0,9 mg; manganês 0,075 g; niacina 0,04 g; nicarbazina 0,125 g; selênio 0,3 mg; virginiamicina 16,5 mg; vitamina A 10.000 UI; vitamina B1 1,5 mg; vitamina B12 15 mcg; vitamina B2 5 mg; vitamina B6 3 mg; vitamina D3 3.000 UI; vitamina E 30 UI; vitamina K3 3 mg; zinco 0,07 g. **Crescimento** - ácido fólico 0,8 mg; ácido pantotênico 11 mg; biotina 0,05 mg; cobre 8 mg; colina 0,25 g; etoxiquim 4 mg; ferro 0,05 g; fitase 0,5 ftu; iodo 0,9 mg; manganês 0,075 g; niacina 30 mg; salinomicina 0,066 g; selênio 0,3 mg; virginiamicina 16,5 mg; vitamina A 8.000 UI; vitamina B1 1,5 mg; vitamina B12 12 mcg; vitamina B2 4 mg; vitamina B6 2,5 mg; vitamina D3 2.500 UI; vitamina E 20 UI; vitamina K3 2 mg; zinco 0,07 g. **Final** - ácido fólico 0,3 mg; ácido pantotênico 6 mg; cobre 8 mg; colina 0,2 g; etoxiquim 1 mg; ferro 0,04 g; fitase 0,5 ftu; iodo 0,7 mg; manganês 0,06 g; niacina 0,02 g; salinomicina 0,066 g; selênio 0,25 mg; virginiamicina 10 mg; vitamina A 5.000 UI; vitamina B1 0,5 mg; vitamina B12 5 mcg; vitamina B2 2,5 mg; vitamina B6 0,7 mg; vitamina D3 1.000 UI; vitamina E 10 UI; vitamina K3 1,5 mg; zinco 0,06 g. ²Rostagno et al. (2011). ³Valor relativo ao padrão *PeeDee Belemnite* (PDB).

Pesagem dos Animais

Ao início de cada período experimental as aves foram selecionadas por peso com variação de $\pm 5\%$, sendo utilizadas 51 aves em cada um dos seis grupos (G) avaliados: período de 1 a 7 (G1), 8 a 14 (G2), 15 a 21 (G3), 22 a 28 (G4), 29 a 35 (G5) e 36 a 42 (G6) dias de idade. Os pesos médios das aves obtidos e utilizados como base para os cálculos da quantidade de metionina marcada preparada foram: 0,045; 0,165; 0,460; 0,960; 1,600 e 2,400 kg, para G1, G2, G3, G4, G5 e G6, respectivamente.

Dosagem e Administração de L-[¹³C₁]metionina

A fim de promover enriquecimento tecidual as aves de cada grupo receberam doses de 29 μmol de L-[¹³C₁]metionina/kg de peso vivo/hora, durante 6 h, através de administração via oral de solução enriquecida (L-[¹³C₁]metionina, abundância isotópica de 99 atm % em ¹³C, *Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*[®], Andover, MA, USA). O composto marcado foi diluído em solução fisiológica e administrado oralmente em 0,3 mL de solução enriquecida por dose aplicada, utilizando-se seringas de insulina de 1 mL.

A dosagem utilizada neste experimento foi cinco vezes superior a utilizada por Muramatsu et al. (1987) em estudo envolvendo poedeiras administrando metionina marcada em ¹⁵N. O aumento na dosagem se deve a grande diluição isotópica que o elemento carbono sofre no organismo, para compensar e favorecer o enriquecimento tecidual, uma vez que a maioria das moléculas orgânicas são formados por quantidade superior de carbono quando comparadas ao nitrogênio (18,5% de C e 3,2% de N) (Nepomoceno, 2006).

Os procedimentos de diluição e administração isotópica da metionina enriquecida foram realizados de acordo com a metodologia preconizada por Muramatsu et al. (1987) e Riedijk et al. (2007).

Para o cálculo da quantidade de metionina marcada a ser preparada e administrada, considerando-se um frango com 2,5 kg de peso vivo como exemplo para cálculo, tem-se: a) Para obtenção da quantidade aplicada de material enriquecido durante cada período avaliado, fez-se necessário realização do seguinte cálculo: 29 μmol de L-[¹³C₁]metionina, multiplicado por 2,5 kg e por 6 h, resulta em 435 μmol de L-[¹³C₁]metionina. O peso molecular da metionina corresponde a 150,19 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$,

portanto, 150,19 μg de metionina/1 μmol de L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina, multiplicado por 435 μmol de L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina, resulta em 65.333 μg ou 65,333 mg de metionina marcada. Este valor obtido, dividido pelo número de doses (no caso seis), corresponde a 10,889 mg de metionina marcada/dose aplicada; b) Para obtenção do valor da massa de ^{13}C aplicada por dose durante cada período avaliado, fez-se necessária realização do seguinte cálculo: Em 150,19 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de metionina (peso molecular da metionina) contém 12,87 μg de ^{13}C , em 10.889 μg de metionina marcada conterá 933,08 μg de ^{13}C /dose aplicada.

Levando-se em consideração os pesos médios das aves em cada período, cada dose fornecida continha: 0,1957; 0,7177; 2,0009; 4,1757; 6,9595 e 10,4393 mg de metionina marcada, ou 16,8606; 61,8222; 172,3528; 359,6928; 580,9280 e 871,3920 μg de ^{13}C , para G1, G2, G3, G4, G5 e G6, respectivamente.

Amostragem

Nos tempos 0 h (controle); 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 48; 72 e 96 h após a primeira administração de solução enriquecida, foram abatidas 3 aves por deslocamento da articulação crânio-cervical, e posteriormente realizada a sangria. Foram coletadas amostras de mucosa (M), plasma (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE), penas (PN) e gordura (GA), para posterior análise isotópica em espectrômetro de massas.

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 (Muramatsu et al., 1987; Hobson e Clark, 1992; Riedijk et al., 2007).

As amostras de fígado foram retiradas do terço central do órgão, as de mucosa foram obtidas por raspagem com lâmina de vidro na região da alça duodenal do intestino e as de sangue foram obtidas por punção da veia jugular sendo acondicionadas em tubos de ensaio contendo heparina. As amostras de sangue foram centrifugadas a 5000G por 4 minutos para separação do plasma. Plasma e mucosa foram devidamente acondicionados em microtubo graduado plástico de 1,5 mL com tampa e em seguida congelados a -20°C .

As amostras de peito foram obtidas a partir do terço médio longitudinal do músculo *Pectoralis major*, as de coxa do músculo gastrocnêmio (parte externa) e sobrecoxa do músculo iliotibial lateral, as de penas das rêmiges primárias e secundárias (asa), sendo todas as citadas colhidas do lado esquerdo da carcaça. A gordura foi coletada da região abdominal a partir do segundo período avaliado (G2 a G6), devido à inexistência ou escasso material no G1.

Os tecidos amostrados, sem considerar plasma, foram lavados com água destilada para retirada de qualquer contaminante, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e imediatamente congeladas a -20°C.

Preparo das Amostras

As amostras foram descongeladas por um período de 48 horas. Amostras de fígado passaram por processo de extração da gordura durante 4 horas (*Soxhlet*) e as de plasma e mucosa passaram pelo processo de liofilização durante 24 horas (*Thermo Fisher Scientific* micro modulo 115).

Todas as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 56°C, por um período de 48 horas, sem considerar plasma e mucosa. Após este procedimento, tecidos e dietas experimentais foram moídos em moinho criogênico (*SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder*), à -196°C por dez minutos, com rotação de 920 rpm e em alta frequência, para obtenção de material homogêneo de fina granulometria (menor que 60 µm), com aspecto de talco.

Após os referidos procedimentos cada amostra foi pesada, utilizando-se duplicatas, em cápsula de estanho (50 a 70 µg) por meio de microbalança (*Mettler Toledo XP6*) e submetida a análise isotópica.

Análise Isotópica

As análises isotópicas foram realizadas no Instituto de Biociências, UNESP – Univ Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, Centro de Isótopos Estáveis.

Foi utilizado espectrômetro de massa de razões isotópicas (*Delta V Advantage Isotope Ratio MS, Thermo Scientific*), acoplado ao Analisador Elementar (*Flash 2000 Organic Elemental Analyzer EA for IRMS*), no qual em presença de oxigênio (O₂) e óxido de cobre (CuO) a amostra foi queimada quantitativamente para obtenção de CO₂.

O gás formado foi separado em coluna cromatográfica gasosa e analisado no espectrômetro de massa. Os resultados obtidos foram expressos em notação $\delta^{13}\text{C}$, em relação ao padrão internacional *Peedee Belemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2 ‰ e calculado pela equação 1 (Criss, 1999):

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

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.

Análise Estatística

Os dados relativos à taxa de incorporação do carbono-13, proveniente da L-metionina, após análise isotópica, foram analisados utilizando-se o Minitab 16 Statistical Software (2010).

Aplicou-se o ajuste polinomial de segunda ordem, com o intuito de determinar o tempo de máxima incorporação do carbono-13, proveniente da metionina, que caracteriza o pico de enriquecimento. Para se mensurar a taxa de substituição do carbono nos tecidos das aves, após determinado intervalo de tempo, pelo carbono-13 marcado, foi realizado o ajuste exponencial de primeira ordem, expresso pela equação 2 (Ducatti et al., 2002). Para isso, considerou-se o ponto inicial, o tempo 0 h e o ponto final, como sendo o tempo de máxima incorporação da metionina marcada.

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

Onde:

$\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento isotópico relativo do tecido em qualquer tempo (t), expresso em ‰. Adimensional;

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

$\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento isotópico relativo do tecido na condição inicial, expresso em ‰. Adimensional;

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

t = tempo a partir da administração via oral de metionina marcada, expresso em horas.

A meia-vida do carbono-13 para os tecidos analisados foi mensurada pela equação 3:

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

Onde:

T = meia-vida, tempo expresso em horas;

\ln = logaritmo neperiano;

k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo, expresso em horas⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições experimentais, não foi detectada incorporação do elemento marcado no tecido adiposo em todos os períodos avaliados, o que era esperado, pois a sua detecção só se justificaria se houvesse um excesso de suplementação de metionina na dieta, que nessas condições seria clivada, desaminada e o grupo metil seria incorporado ao organismo na forma de reserva energética. No entanto, recebendo dieta adequadamente balanceada, seria normal não se detectar resquícios de átomos de ¹³C enriquecidos proveniente da L-metionina administrada via oral neste tecido.

Segundo Moran Jr. (1994), 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. Schutte e Pack (1995) observaram que níveis sub-ótimos de metionina+cistina produzem maior acúmulo de gordura abdominal e nos órgãos. Liu et al. (2007) suplementaram frangos de corte com duas fontes de metionina distintas e verificaram aumento na deposição de músculo do peito e diminuição da gordura abdominal, demonstrando o efeito positivo e a importância da adequada suplementação e atendimento das exigências deste aminoácido.

Em função do exposto, o referido tecido não foi incluído na análise da taxa de incorporação do carbono-13 marcado.

Os ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{m\acute{a}x}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}C_1$]metionina, nos tecidos avaliados para cada grupo (G) em função do tempo, encontram-se nas Tabelas 2 a 8.

Tabela 2. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{\text{máx}}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[^{13}C]metionina em mucosa duodenal de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo

1 Grupo	Ajuste polinomial		$t_{\text{máx}}$		Ajuste exponencial		T	
	Equação	r^2	h	h	Equação	r^2	h	h
G1	$\delta^{13}\text{C} = -0,19505(t)^2 + 2,91701(t) - 20,28788$	0,91	7,5	7,5	$\delta^{13}\text{C} = -8,94 - 10,92e^{-0,3637t}$	0,95	1,9	1,9
G2	$\delta^{13}\text{C} = -0,04828(t)^2 + 0,97762(t) - 21,08183$	0,94	10,1	10,1	$\delta^{13}\text{C} = -14,61 - 6,36e^{-0,2103t}$	0,97	3,3	3,3
G3	$\delta^{13}\text{C} = -0,07062(t)^2 + 1,21946(t) - 21,48753$	0,95	8,6	8,6	$\delta^{13}\text{C} = -15,26 - 6,40e^{-0,2396t}$	0,95	2,9	2,9
G4	$\delta^{13}\text{C} = -0,05017(t)^2 + 1,06938(t) - 21,40651$	0,94	10,7	10,7	$\delta^{13}\text{C} = -14,84 - 6,86e^{-0,2342t}$	0,95	3,0	3,0
G5	$\delta^{13}\text{C} = -0,11795(t)^2 + 1,87806(t) - 22,26807$	0,94	8,0	8,0	$\delta^{13}\text{C} = -12,62 - 10,07e^{-0,1878t}$	0,95	3,7	3,7
G6	$\delta^{13}\text{C} = -0,07039(t)^2 + 1,54273(t) - 21,44873$	0,95	11,0	11,0	$\delta^{13}\text{C} = -12,48 - 9,10e^{-0,2021t}$	0,95	3,4	3,4

1 G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

Tabela 3. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{\text{máx}}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina em plasma sanguíneo de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo

1 Grupo	Ajuste polinomial		$t_{\text{máx}}$		Ajuste exponencial		T	
	Equação	r^2	h	h	Equação	r^2	h	h
G1	$\delta^{13}\text{C} = -0,04597(t)^2 + 0,71202(t) - 18,83560$	0,93	7,7	7,7	$\delta^{13}\text{C} = -15,29 - 3,55e^{-0,2172t}$	0,93	3,2	3,2
G2	$\delta^{13}\text{C} = -0,05600(t)^2 + 0,98255(t) - 19,21165$	0,91	8,8	8,8	$\delta^{13}\text{C} = -13,95 - 5,26e^{-0,2062t}$	0,92	3,4	3,4
G3	$\delta^{13}\text{C} = -0,05513(t)^2 + 0,95791(t) - 18,55230$	0,96	8,7	8,7	$\delta^{13}\text{C} = -12,43 - 6,11e^{-0,1610t}$	0,96	4,3	4,3
G4	$\delta^{13}\text{C} = -0,06313(t)^2 + 1,11742(t) - 18,81343$	0,96	8,9	8,9	$\delta^{13}\text{C} = -10,16 - 8,54e^{-0,1182t}$	0,97	5,9	5,9
G5	$\delta^{13}\text{C} = -0,06151(t)^2 + 1,17863(t) - 19,20024$	0,96	9,6	9,6	$\delta^{13}\text{C} = -11,24 - 7,87e^{-0,1479t}$	0,95	4,7	4,7
G6	$\delta^{13}\text{C} = -0,05989(t)^2 + 1,18164(t) - 19,16614$	0,95	9,9	9,9	$\delta^{13}\text{C} = -11,31 - 7,79e^{-0,1529t}$	0,94	4,5	4,5

1 G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

Tabela 4. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{\text{máx}}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[^{13}C]metionina em fígado de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo

1 Grupo	Ajuste polinomial		Ajuste exponencial		T	
	Equação	r^2	Equação	r^2	$t_{\text{máx}}$ h	h
G1	$\delta^{13}\text{C} = -0,06152(t)^2 + 0,99071(t) - 19,21278$	0,91	$\delta^{13}\text{C} = -12,71 - 6,33e^{-0,1422t}$	0,94	8,1	4,9
G2	$\delta^{13}\text{C} = -0,04926(t)^2 + 0,82207(t) - 18,76168$	0,93	$\delta^{13}\text{C} = -15,27 - 3,68e^{-0,3323t}$	0,93	8,3	2,1
G3	$\delta^{13}\text{C} = -0,05282(t)^2 + 0,84152(t) - 18,29691$	0,89	$\delta^{13}\text{C} = -13,10 - 5,13e^{-0,1615t}$	0,93	8,0	4,3
G4	$\delta^{13}\text{C} = -0,05512(t)^2 + 0,92510(t) - 18,47805$	0,96	$\delta^{13}\text{C} = -13,89 - 4,63e^{-0,2328t}$	0,94	8,4	3,0
G5	$\delta^{13}\text{C} = -0,06847(t)^2 + 1,19976(t) - 18,85455$	0,94	$\delta^{13}\text{C} = -12,55 - 6,31e^{-0,2140t}$	0,92	8,8	3,2
G6	$\delta^{13}\text{C} = -0,08153(t)^2 + 1,37045(t) - 18,74604$	0,94	$\delta^{13}\text{C} = -11,20 - 7,44e^{-0,1919t}$	0,97	8,4	3,6

1 G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

Tabela 5. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{\text{máx}}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[^{13}C]metionina em coxa de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo

^{13}C Grupo	Ajuste polinomial		Ajuste exponencial		$t_{\text{máx}}$		T	
	Equação	r^2	Equação	r^2	h	h	r ²	h
G1	$\delta^{13}\text{C} = -0,03483(t)^2 + 0,53379(t) - 19,61445$	0,92	$\delta^{13}\text{C} = -16,22 - 3,33e^{-0,1484t}$	0,95	7,7	4,7		
G2	$\delta^{13}\text{C} = -0,00937(t)^2 + 0,26700(t) - 19,86394$	0,84	$\delta^{13}\text{C} = -17,59 - 2,29e^{-0,1323t}$	0,83	14,2	5,2		
G3	$\delta^{13}\text{C} = -0,01162(t)^2 + 0,31393(t) - 19,45335$	0,92	$\delta^{13}\text{C} = -17,25 - 2,31e^{-0,1975t}$	0,93	13,5	3,5		
G4	$\delta^{13}\text{C} = -0,00690(t)^2 + 0,20006(t) - 19,23983$	0,92	$\delta^{13}\text{C} = -17,81 - 1,53e^{-0,2086t}$	0,94	14,5	3,3		
G5	$\delta^{13}\text{C} = -0,01225(t)^2 + 0,29699(t) - 19,69662$	0,93	$\delta^{13}\text{C} = -17,68 - 2,07e^{-0,1846t}$	0,92	12,1	3,8		
G6	$\delta^{13}\text{C} = -0,01172(t)^2 + 0,30229(t) - 19,71248$	0,94	$\delta^{13}\text{C} = -17,23 - 2,49e^{-0,1348t}$	0,93	12,9	5,1		

^{13}C G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

Tabela 6. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{\text{máx}}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[^{13}C]metionina em sobrecoxa de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo

^{13}C Grupo	Ajuste polinomial		Ajuste exponencial		$t_{\text{máx}}$		T	
	Equação	r^2	Equação	r^2	h	h	h	h
G1	$\delta^{13}\text{C} = -0,02102(t)^2 + 0,39579(t) - 19,38949$	0,91	$\delta^{13}\text{C} = -16,79 - 2,57e^{-0,1525t}$	0,91	9,4	9,4	4,5	4,5
G2	$\delta^{13}\text{C} = -0,00745(t)^2 + 0,25794(t) - 19,54871$	0,91	$\delta^{13}\text{C} = -17,31 - 2,31e^{-0,1711t}$	0,92	17,3	17,3	4,1	4,1
G3	$\delta^{13}\text{C} = -0,00742(t)^2 + 0,24932(t) - 19,21824$	0,94	$\delta^{13}\text{C} = -17,20 - 2,19e^{-0,1976t}$	0,96	16,8	16,8	3,5	3,5
G4	$\delta^{13}\text{C} = -0,00621(t)^2 + 0,19980(t) - 19,18548$	0,93	$\delta^{13}\text{C} = -17,60 - 1,71e^{-0,1941t}$	0,95	16,1	16,1	3,6	3,6
G5	$\delta^{13}\text{C} = -0,00667(t)^2 + 0,21890(t) - 19,39831$	0,93	$\delta^{13}\text{C} = -17,63 - 1,91e^{-0,1895t}$	0,94	16,4	16,4	3,7	3,7
G6	$\delta^{13}\text{C} = -0,00655(t)^2 + 0,22857(t) - 19,59544$	0,95	$\delta^{13}\text{C} = -17,45 - 2,22e^{-0,1381t}$	0,95	17,4	17,4	5,0	5,0

^{13}C G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

Tabela 7. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{\text{máx}}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[^{13}C]metionina em peito de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo

^{13}C Grupo	Ajuste polinomial			Ajuste exponencial			T	
	Equação	r^2	$t_{\text{máx}}$ h	Equação	r^2	h		
G1	$\delta^{13}\text{C} = -0,00978(t)^2 + 0,24198(t) - 18,96871$	0,87	12,4	$\delta^{13}\text{C} = -17,50 - 1,58e^{-0,2532t}$	0,98	2,7		
G2	$\delta^{13}\text{C} = -0,01013(t)^2 + 0,34601(t) - 19,30637$	0,89	17,1	$\delta^{13}\text{C} = -16,61 - 3,02e^{-0,2299t}$	0,92	3,0		
G3	$\delta^{13}\text{C} = -0,00911(t)^2 + 0,31061(t) - 19,77693$	0,89	17,0	$\delta^{13}\text{C} = -17,44 - 2,62e^{-0,2335t}$	0,92	3,0		
G4	$\delta^{13}\text{C} = -0,00755(t)^2 + 0,24005(t) - 19,71756$	0,89	15,9	$\delta^{13}\text{C} = -17,78 - 2,07e^{-0,1798t}$	0,90	3,9		
G5	$\delta^{13}\text{C} = -0,00613(t)^2 + 0,21351(t) - 19,78160$	0,90	17,4	$\delta^{13}\text{C} = -17,94 - 1,98e^{-0,1691t}$	0,90	4,1		
G6	$\delta^{13}\text{C} = -0,00753(t)^2 + 0,25962(t) - 20,24877$	0,93	17,2	$\delta^{13}\text{C} = -18,07 - 2,37e^{-0,1801t}$	0,94	3,8		

^{13}C G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

Tabela 8. Ajustes polinomial e exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), tempo de máxima incorporação ($t_{\text{máx}}$) e meia-vida (T) do carbono-13, proveniente da L-[^{13}C]metionina em penas de frangos de corte nos grupos (G) avaliados em função do tempo

^{13}C Grupo	Ajuste polinomial		Ajuste exponencial		T	
	Equação	r^2	Equação	r^2	$t_{\text{máx}}$ h	h
G1	$\delta^{13}\text{C} = -0,00476(t)^2 + 0,15717(t) - 18,29700$	0,73	$\delta^{13}\text{C} = -17,09 - 1,36e^{-0,2220t}$	0,75	16,5	3,1
G2	$\delta^{13}\text{C} = -0,00359(t)^2 + 0,09682(t) - 18,75954$	0,71	$\delta^{13}\text{C} = -18,06 - 0,73e^{-0,1855t}$	0,73	13,5	3,7
G3	$\delta^{13}\text{C} = -0,00200(t)^2 + 0,06508(t) - 18,96428$	0,76	$\delta^{13}\text{C} = -18,47 - 0,52e^{-0,1810t}$	0,80	16,3	3,8
G4	$\delta^{13}\text{C} = -0,00215(t)^2 + 0,06282(t) - 19,28328$	0,79	$\delta^{13}\text{C} = -18,66 - 0,63e^{-0,1044t}$	0,83	14,6	6,6
G5	-	-	-	-	-	-
G6	-	-	-	-	-	-

^{13}C G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

Observa-se que o tempo de máxima incorporação da metionina marcada nos tecidos M, PL e F, ocorreu por volta de 9 horas após a administração das dosagens, sendo possível detectar incorporação após trinta minutos da administração, indicando rápida metabolização deste aminoácido.

Para os tecidos C, SC, PE e PN, o tempo de máxima incorporação do aminoácido enriquecido ocorreu por volta de 17 horas após a administração das dosagens, indicando maior lentidão na assimilação deste aminoácido.

Por empregar-se a constante da taxa de *turnover* (k) nos cálculos de meia-vida (T), os valores de T obtidos fornecem uma ideia de tempo no processo em que os isótopos estáveis de carbono dos tecidos foram substituídos pelo carbono-13 proveniente da L-metionina, além de refletir a taxa de crescimento dos componentes corporais. No tecido M a meia-vida variou de 1,9 a 3,7 horas; no PL de 3,2 a 5,9 horas e no F de 2,1 a 4,9 horas, indicando maior rapidez na taxa de metabolismo no primeiro tecido. Para a C, variou de 3,3 a 5,2 horas; na SC de 3,5 a 5,0 horas; no PE de 2,7 a 4,1 horas; e nas PN de 3,1 a 6,6.

Não foi detectada incorporação da metionina marcada no tecido das PN nos dois últimos grupos (G5 e G6), provavelmente em função do empenamento das aves já se encontrar formado. Acrescenta-se também o fato que este tecido tem uma menor taxa de metabolismo nesta fase de crescimento.

Os modelos exponenciais da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L- $^{13}\text{C}_1$ metionina, nos tecidos avaliados para cada grupo (G) em função do tempo, encontram-se nas Figuras 1 a 7.

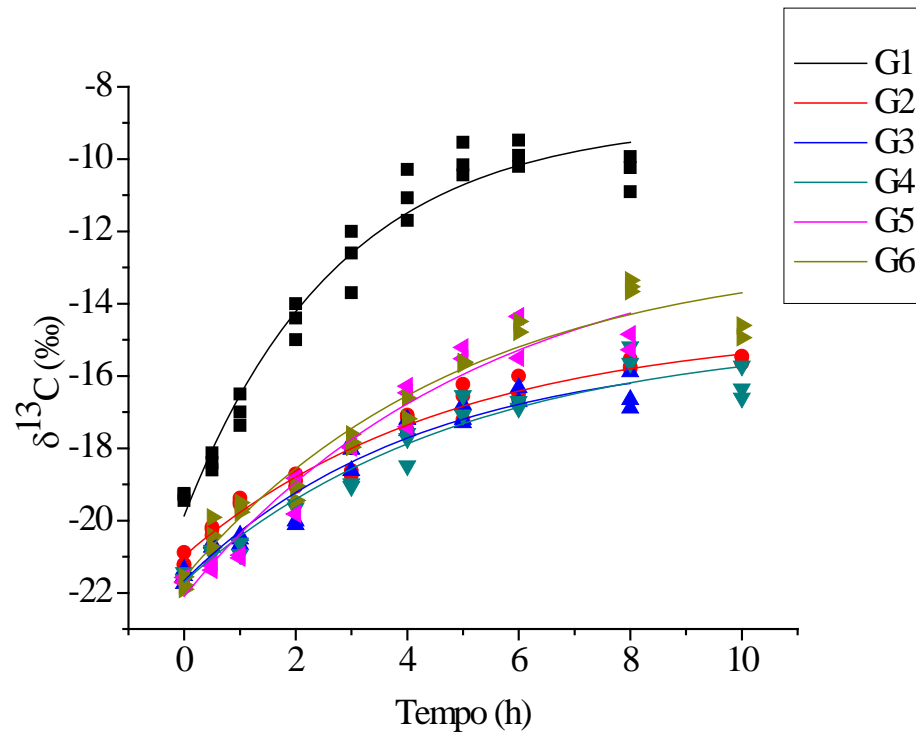


Figura 1. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina em mucosa duodenal de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

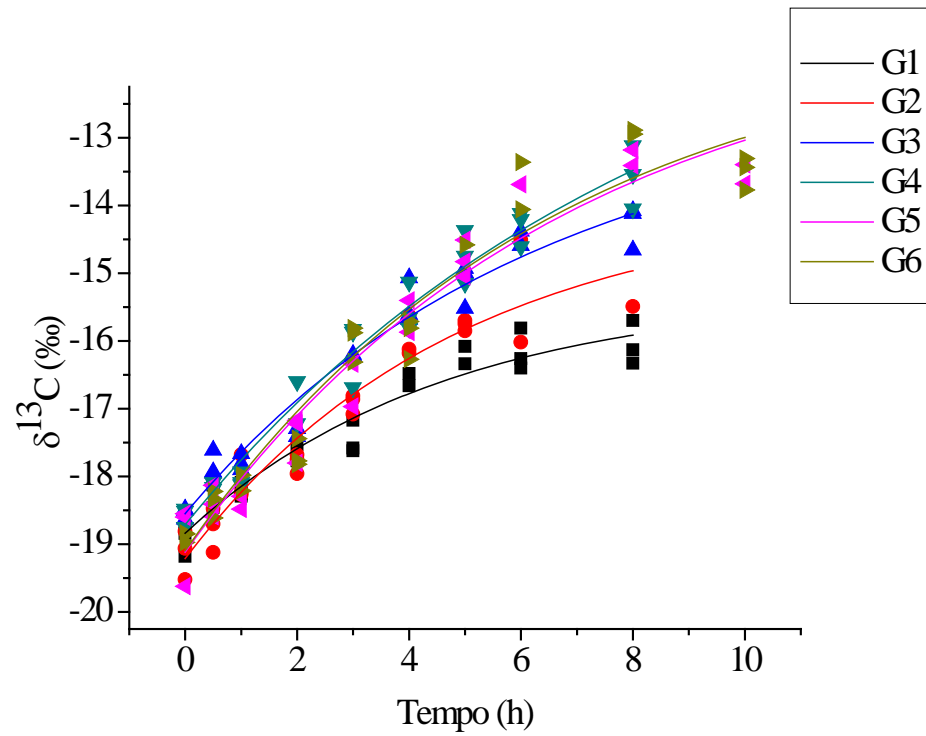


Figura 2. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina em plasma sanguíneo de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

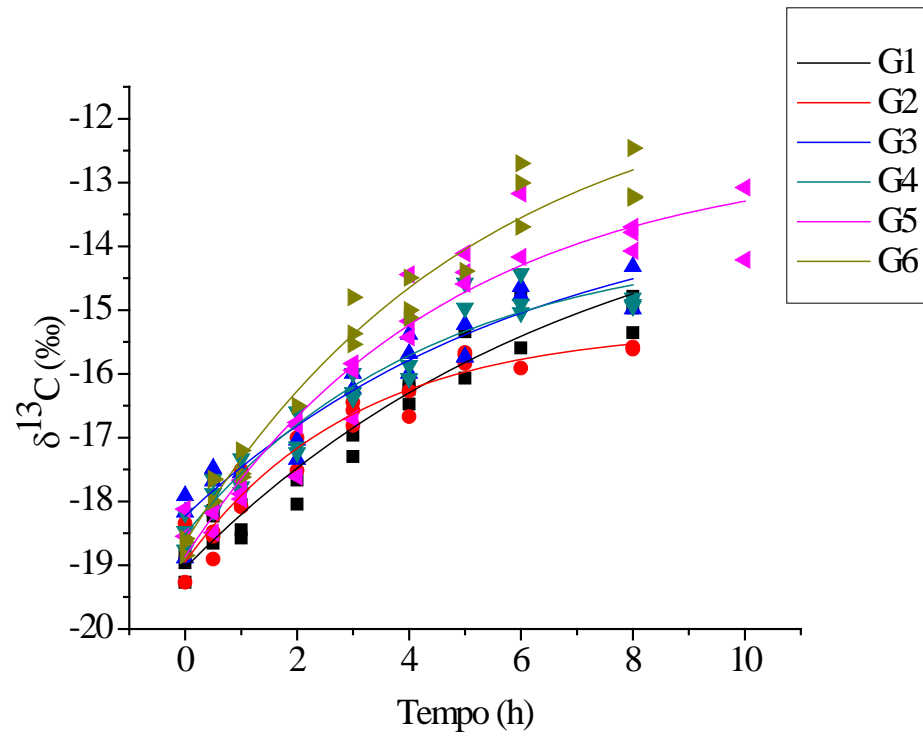


Figura 3. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina em fígado de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

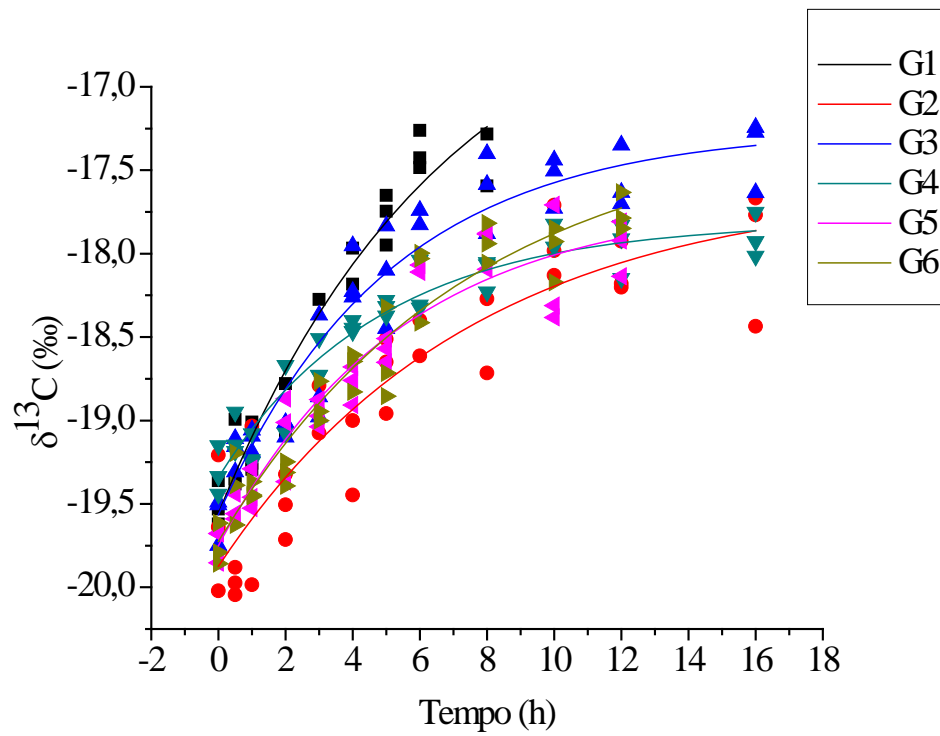


Figura 4. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[¹³C₁]metionina em coxa de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

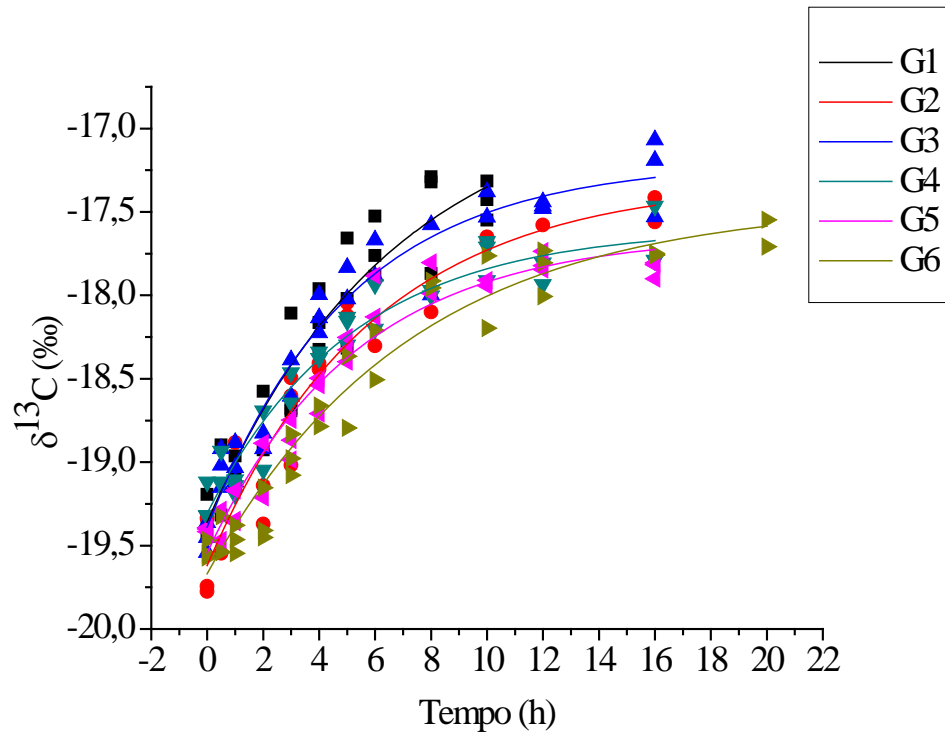


Figura 5. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina em sobrecoxa de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

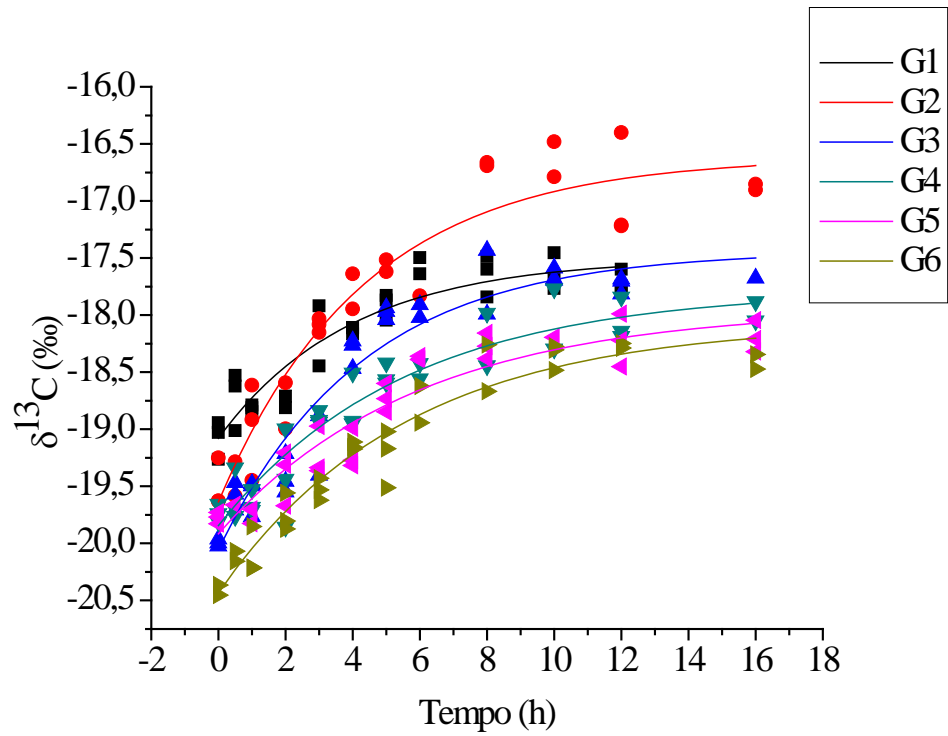


Figura 6. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[¹³C₁]metionina em peito de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

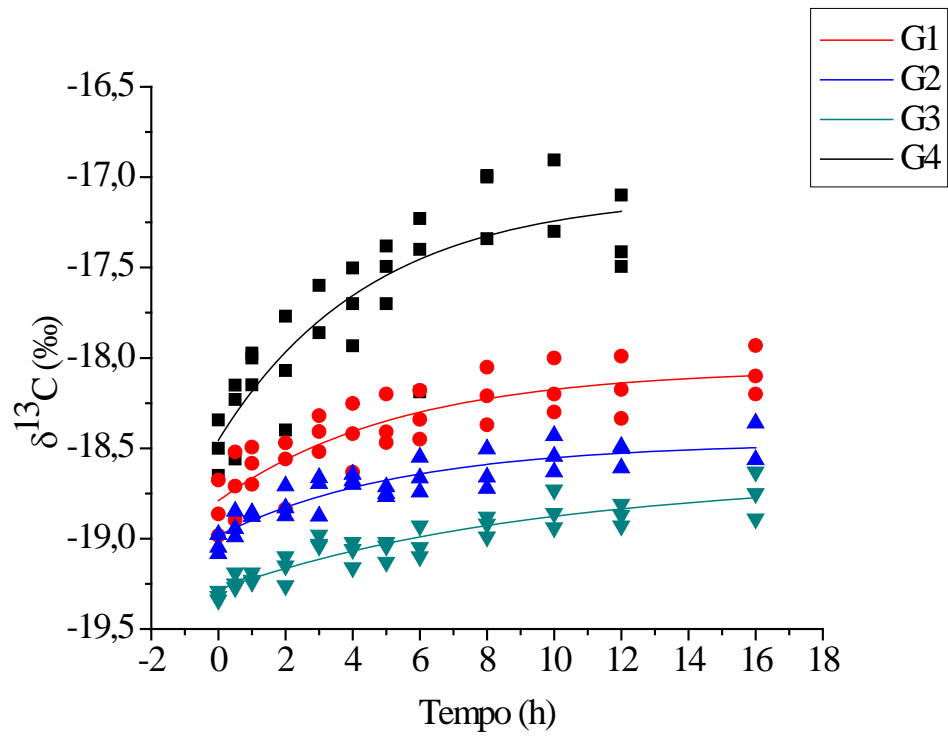


Figura 7. Modelo exponencial da taxa de troca isotópica do carbono-13, proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina em penas de frangos de corte nos grupos avaliados ao longo do tempo (h): G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21) e G4 (22-28) dias de idade.

A mudança nos valores de carbono-13 dos tecidos ao longo do tempo ocorreu gradativamente durante os períodos analisados, conforme pode ser observado nas Figuras 1 a 7.

O sangue é responsável pelo transporte de nutrientes para as demais regiões do corpo animal (Macari e Luquetti, 2002) e o fígado responsável pela síntese de todas as proteínas plasmáticas, com exceção das imunoglobulinas as quais são sintetizadas pelos linfócitos. A manutenção da concentração de proteínas circulantes exige um intenso trabalho de síntese proteica hepática (Henry, 1999). No presente experimento, observamos para plasma e fígado que há um aumento na taxa de carbono-13 incorporado nestes tecidos com o avanço das fases de crescimento. Esse resultado provavelmente pode estar associado ao aumento da demanda por este aminoácido para o desenvolvimento corporal do animal. Segundo Hobson e Clark (1992), o fígado e o plasma sanguíneo apresentam elevadas taxas de troca isotópica, respondendo rapidamente às alterações nutricionais, sendo um órgão essencial às alterações e necessidades metabólicas.

Na mucosa observa-se resultado semelhante ao plasma e fígado, exceto na primeira semana onde houve maior taxa na incorporação comparado com os demais períodos. Sabe-se que durante os primeiros 7 a 10 dias de idade o intestino do frango de corte encontra-se ainda em desenvolvimento (Maiorka et al., 2002) o que pode explicar a maior exigência deste aminoácido nesta primeira semana de vida da ave.

Segundo Maiorka et al. (2002), a mucosa do trato gastrointestinal se comparada aos demais tecidos de frangos de corte, possui o mais elevado *turnover*. Dentre as porções do intestino delgado, o duodeno, além de apresentar a maior altura de vilo, possui a maior taxa de renovação, o que pode estar relacionado ao fato de que essa é uma região muito importante para o processo digestivo, explicando o menor valor de meia-vida encontrado neste estudo.

Na porção do duodeno a hidrólise dos aminoácidos ainda é incompleta, portanto ocorre mínima absorção desses. Os L-aminoácidos são absorvidos mais rapidamente que os D-isômeros, sendo que o sítio de absorção da metionina é comum para os dois isômeros e são transportados ativamente, mas a forma L-isômero apresenta maior especificidade química e afinidade, sendo transportada mais rapidamente (Rutz, 2002),

o que pode explicar o fato de ocorrer maior taxa na incorporação do carbono-13, proveniente da L-metionina marcada.

Segundo Pophal (2004) e Viola (2007) quanto mais ativo for o metabolismo do tecido, maior a tendência deste em receber nutrientes para sua demanda adequada, sendo assim, a mucosa intestinal, fígado e plasma sanguíneo recebem os aminoácidos de forma prioritária, decorrendo em menores valores de meia-vida, quando comparados aos outros tecidos estudados.

A deposição e degradação dos tecidos corporais são diretamente influenciadas pela idade das aves. (Santos et al., 2005). O rápido desenvolvimento corporal e ganho de peso dos frangos são decorrentes da taxa de síntese proteica exceder a taxa de degradação, justamente na fase inicial e de crescimento das aves (Zuidhofs, 2005).

Em animais senis há um declínio na taxa de síntese e aumento na taxa de degradação, determinando menor deposição proteica, constatado pela redução do crescimento dos tecidos nestes animais (Gonzalez e Sartori, 2002).

O acréscimo de massa tecidual é o principal fator que determina a diluição isotópica do carbono tecidual em relação à taxa de troca isotópica de animais mais jovens (Zuanon, 2003), o que pode ser constatado ao se observar a maior taxa de troca nos períodos iniciais deste trabalho.

Constata-se que para o músculo peitoral há maior taxa de carbono-13 incorporado nas primeiras fases de crescimento onde o desenvolvimento muscular é mais acelerado (Gonzales e Sartori, 2002), podendo estar associado ao aumento da demanda por este aminoácido para o desenvolvimento deste tecido. As incorporações na coxa e sobrecoxa ocorreram de maneira semelhante ao peito, exceto na segunda semana de idade onde essa taxa foi menor que nas outras fases, podendo este fato estar associado à maior demanda deste aminoácido para formação de penas e músculo peitoral, disponibilizando-o em menores quantidades para os músculos das pernas.

As penas também apresentaram maior taxa de incorporação do carbono-13 nas primeiras semanas de vida, sendo explicado por ser a fase de formação das mesmas e por ser um tecido que tem grande exigência de aminoácidos sulfurados (Pophal, 2004), onde a metionina pode suprir os aminoácidos cistina e cisteína, que têm em comum a presença do elemento enxofre.

CONCLUSÃO

A taxa de incorporação do carbono-13, proveniente da L-metionina, nos tecidos avaliados, varia em cada período de crescimento das aves. A técnica dos isótopos estáveis demonstra-se eficiente na avaliação do comportamento da taxa de incorporação do composto enriquecido e permite evidenciar as distintas assimilações teciduais da mesma, de acordo com as exigências pelo aminoácido.

LITERATURA CITADA

- Araujo, P. C., J. R. Sartori, V. C. Cruz, C. Ducatti, A. C. Stradiotti, and V. C. Pelícia. 2011. Rastreabilidade de farinha de vísceras de aves por isótopos estáveis em penas de frangos de corte. *Pesq. Agropec. Bras.* (46)538–545.
- Barnes, D. M., Z. Songs, K. C. Klasing, and W. Botje. 2002. Protein metabolism during an acute phase response in chickens. *Amino Acids.* 22:15–26.
- Bertechini, A. G. 2006. *Nutrição de monogástricos*. ed. UFLA, Lavras, MG.
- Criss, R. E. 1999. *Principles of stable isotope distribution*. New York: Oxford University Press. p. 254.
- Denadai, J. C., C. Ducatti, A. C. Pezzato, A. S. Carrijo, F. R. Caldara, and R. P. Oliveira. 2007. Studies on carbono-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. *Braz. J. Poultry Sci.* 8:251–256.
- Ducatti, C., A. S. Carrijo, A. C. Pezzato, and P. F. A. Mancera. 2002. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Sci. Agr.* 59(1):29–33.
- Gannes, L. Z., C. M. Del-Rio, and P. Koch. 1998. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comp. Biochem. Phys. A.* 119(3):725–737.
- Gonzales, E., and J. R. Sartori. 2002. Crescimento e metabolismo muscular. In: Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzalez, *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de corte*. ed. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, SP. p. 279–297.
- Henry, J. B. 1999. *Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais*. 19th. ed. Manole, São Paulo.
- Hobson, K. A., and R. G. Clark. 1992. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ¹³C in tissues. *The Condor.* 94:181–188.

- Kennedy, B. V., and H. R. Krouse. 1990. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. *Can. J. Physiol. Pharm.* 68:960–972.
- Liu, Y. L., G. F. Yi, G. L. Song, Y. Q. Hou, J. W. Huang, M. Vázquez-Añón, and C. D. Knight. 2007. Impact of feeding 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid and DL-methionine supplemented maize-soybean-rapeseed meal diets on growth performance and carcass quality of broilers. *Brit. Poultry Sci.* 48(2):190–197.
- Macari, M., and B. C. Luquetti. 2002. Fisiologia cardiovascular. In: Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzalez, *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de corte*. ed. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, SP. p. 17–35.
- Maiorka, A., I. C. Boleli, and M. Macari. 2002. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzalez, *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de corte*. ed. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, SP. p. 113–123.
- Minitab 16 Statistical Software, 2010. [Computer software]. PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com).
- Moran Jr., E. T. 1994. Response of broiler strains differing in body fat to inadequate methionine: live performance and processing yields. *Poultry Sci.* 73(7):1116–26.
- Muramatsu, T., K. Hiramoto, I. Tasaki, and J. I. Okumura. 1987. Effect of protein starvation on protein turnover in liver, oviduct and whole body of laying hens. *Comp. Biochem. Phys.* 87(2):227–232.
- Nepomoceno, M. G. S. 2006. A fórmula do corpo humano. In: Levorato et al., *Livro Didático Público: Química/vários autores*. 2nd ed. SEED, Curitiba, PR. p. 72–81.
- Pelícia, V. C., K. C. Zavarize, C. Ducatti, A. C. Stradiotti, A. C. Pezzato, P. C. Araujo, M. A. O. Mituo, L. A. Madeira, and J. R. Sartori. 2011. Nucleotídeos na dieta de frangos de corte e seus efeitos sobre taxa de *turnover* da mucosa intestinal antes e após lesões causadas por coccidiose. *Ciência Rural*, UFSM, 41:1652–1659.
- Pophal, S. 2004. Características de crescimento de dois cruzamentos de frangos de corte recebendo dietas com diferentes níveis de lisina na primeira semana de vida. PhD Diss. Univ. Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
- Riedijk, M. A., B. Stoll, S. Chacko, H. Schierbeek, A. L. Sunehag, J. B. Van Goudoever, and D. G. Burrin. 2007. Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. *PNAS*. 104(9):3408–3413.

- Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, S. L. T. Barreto, and R. F. Euclides. 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos (composição de alimentos e exigências nutricionais). 3rd ed. UFV, Viçosa, MG.
- Rutz, F. 2002. Proteínas: Digestão e Absorção. In: Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzalez, *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de corte*. ed. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, SP. p. 135–141.
- Santos, A. L., N. K. Sakomura, E. D. Feitas, C. M. L. S. Fortes, E. N. V. M. Carrilho, and J. B. K. Fernandes. 2005. Estudo do crescimento, desempenho, rendimento de carcaça e qualidade de carne em 3 linhagens de frangos de corte. *Rev. Bras. Zootecn.* 34(5):15893–1598.
- Saunderson, C. L., and J. Mackinlay. 1990. Changes in body weight, composition and hepatic enzyme activities in response to dietary methionine, betaine and choline levels in growing chicks. *Brit. J. Nutr.* 63:339–349.
- Schutte, J. B., and M. Pack. 1995. Sulfur amino acid requirement of broiler chicks from fourteen to thirty-eight days of age. 1: performance and carcass yield. *Poultry Sci.* 74(3):480–487.
- Sernagiotto, E. R., C. Ducatti, J. R. Sartori, A. C. Stradiotti, M. K. Maruno, P. C. Araujo, F. B. Carvalho, and A. C. Pezzato. 2013. The use of carbon and nitrogen stable isotopes for the detection of poultry offal meal in meat-type quail feeds. *Braz. J. Poultry Sci.* 15:65–70.
- Stradiotti, A. C., C. Ducatti, J. A. Bendassolli, J. R. Sartori, V. C. Pelícia, P. C. Araujo, C. C. Miranda, L. V. C. Girão, F. G. Luiggi, I. M. G. P. de Souza, P. D. G. Pacheco, M. M. Aoyagi, J. C. Denadai, M. M. P. Sartori, and A. C. Pezzato. 2013. Methionine incorporation into the blood plasma of broiler chickens at the last week of age. In: 2013 Poultry Sci. Assoc. Annual Meet. Proc., San Diego, CA. *Poult. Sci.* 92(E-Suppl. 1). p. 112.
- Sun, Z., X. Mou, X. Li, L. Wang, H. Song, and H. Jiang. 2011. Application of Stable Isotope Techniques in Studies of Carbon and Nitrogen Biogeochemical Cycles of Ecosystem. *Chin. Geogra. Sci.* 21(2):129–148.

- Viola, T. H. 2007. Eficiência de deposição de lisina aos 26, 33 e 40 dias de idade em frangos 20 de corte. PhD Diss. Univ. Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
- Zuanon, J. A. S. 2003. *Turnover* de carbono em tecido muscular de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio dos isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). PhD Diss. São Paulo State Univ., São Paulo.
- Zuidhof, M. J. 2005. Mathematical characterization of broiler carcass yield dynamics. *Poultry Sci.* 84:1108–1122.

CAPÍTULO 3

Balço de massa do ^{13}C proveniente da L-metionina nos tecidos de frangos de corte em crescimento

RESUMO:

O presente trabalho teve como objetivo utilizar a técnica de isótopos estáveis para avaliar o balanço de massa do carbono-13, proveniente da L-metionina, nos tecidos de frangos de corte em crescimento. Foram alojados em galpão experimental 1000 pintos de corte machos da linhagem Cobb, sendo distribuídas 51 aves, após seleção por peso em cada um dos seis grupos (G) avaliados: período de 1 a 7 (G1), 8 a 14 (G2), 15 a 21 (G3), 22 a 28 (G4), 29 a 35 (G5) e 36 a 42 (G6) dias de idade. As aves foram submetidas à administração via oral de solução contendo L- $^{13}\text{C}_1$ metionina (abundância isotópica de 99 atm % em ^{13}C), na dosagem de 29 $\mu\text{mol/kg}$ peso vivo/h, durante 6 h. Nos tempos 0 h (controle); 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 48; 72 e 96 h após a primeira administração de solução enriquecida, foram abatidas 3 aves por tempo em cada período, para amostragem dos tecidos utilizados nas análises isotópicas em espectrômetro de massa. Foram coletadas amostras de mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE), penas (PN) e gordura abdominal (GA). Os dados obtidos do balanço de massa foram analisados utilizando o software estatístico Minitab 16 (2010). Nas condições experimentais, o tecido mais representativo na exigência pelo aminoácido foi o do PE, constatado pelos maiores percentuais recuperados (21,21% a 32,51%) de carbono-13 (G2 a G6), evidenciando a importância deste composto como constituinte plástico do referido músculo. Não foi detectado enriquecimento na GA para nenhum período avaliado. A porcentagem de recuperação nas PN diminuiu ao longo dos períodos avaliados (6,15 a 3,59 %), não sendo mais detectada no G5 e G6. O balanço de massa do carbono-13, proveniente da L-metionina, evidencia que sua recuperação nos tecidos avaliados, difere em cada período de crescimento de acordo com as exigências teciduais pelo aminoácido. A técnica dos isótopos estáveis demonstra-se eficiente na mensuração da quantidade recuperada do composto enriquecido nos tecidos, permitindo relacionar com a importância deste como aminoácido limitante na alimentação de aves.

Palavras-chave: aminoácido marcado, diluição isotópica, traçador isotópico.

INTRODUÇÃO

As exigências animais em aminoácidos essenciais são atendidas por meio da suplementação dos mesmos nas rações e permite que expressem seu potencial genético, com efeitos positivos nos parâmetros zootécnicos, econômicos e ambientais da produção (Bertechini, 2006).

Nas rações para frangos de corte que têm como base o milho e o farelo de soja, a metionina apresenta-se como o primeiro aminoácido limitante, seguido pela lisina e a treonina (Waldroup et al., 2005). A metionina, participa da síntese proteica, sendo precursora da cisteína e doadora de radicais metil, os quais são essenciais à nutrição animal. Esses grupos metil lábeis participam das sínteses de aminoácidos sulfurados, fosfolipídios, DNA e RNA (Saunderson e Mackinlay, 1990). Devido ao papel fundamental que esse aminoácido representa no crescimento e também sobre o sistema imune de frangos de corte, trabalhos são constantemente conduzidos para verificar sua exigência pelas aves.

Da mesma maneira que os isótopos estáveis dos elementos são utilizados em estudos de nutrição animal, pelo emprego de dietas contrastantes, compostos enriquecidos também podem ser utilizados como traçadores para avaliação dos processos metabólicos de seres vivos, fornecendo estimativas de quão rapidamente os isótopos estáveis naturais dos tecidos são substituídos por isótopos marcados administrados e o mapeamento no organismo (Muramatsu et al., 1987; Barnes et al., 2002; Stradiotti et al., 2013). Isso somente é possibilitado devido a existência de isótopos raros, sendo os compostos marcados ou enriquecidos caracterizados por apresentarem abundâncias isotópicas acima da natural.

A técnica de isótopos estáveis associada a de diluição isotópica é a base para os trabalhos envolvendo material marcado. Esse processo de diluição consiste no balanço entre os isótopos de um determinado elemento numa amostra, antes e depois da adição do material marcado em um dos isótopos.

Gannes et al. (1998) destacam em revisão a importância da aplicação dos isótopos estáveis para futuras pesquisas que enfatizem o balanço proteico, a alocação de nutrientes e o *turnover* tecidual.

Em função do exposto, o presente trabalho teve como objetivo utilizar a técnica de isótopos estáveis para avaliar o balanço de massa do carbono-13, proveniente de L-metionina, nos tecidos de frangos de corte em crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos utilizados neste experimento foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, protocolo nº 165/2010-CEUA, determinados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu.

Local, Animais e Manejo

O experimento foi realizado na região centro-sul do Estado de São Paulo, Brasil e conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, no Laboratório de Nutrição de Aves.

Foram alojados 1000 pintainhos machos de corte com um dia de idade, da linhagem Cobb, numa densidade de 2,5 aves/m², vacinados no incubatório contra as doenças de Gumboro, Marek e Bouda Aviária.

Água e a ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental. As rações experimentais foram formuladas e balanceadas, adaptando-as às recomendações de Rostagno et al. (2011), para frangos de corte machos, sendo o programa de arraçamento dividido em quatro fases de acordo com a idade: pré-inicial (1-7), inicial (8-21), crescimento (22-35) e final (36-42) dias de idade, como demonstrado na Tabela 1.

Por meio das diferentes inclusões de milho e farelo de soja nas rações ao longo das fases, para se atender as exigências animais, promove-se consequentemente alteração no valor isotópico das mesmas. Para minimizar este efeito, utilizou-se quirera de arroz nas formulações das rações como ingrediente estratégico quando necessário, buscando a manutenção do valor isotópico entre as mesmas para que estas não promovessem enriquecimento tecidual, uma vez que a quirera de arroz e farelo de soja (plantas C₃, valores médios de -28‰ em δ¹³C) possuem valor isotópico diferente do milho (planta C₄, valores médios de -13‰ em δ¹³C) (SUN et al., 2011).

Tabela 1. Composição nutricional, calculada e isotópica analisada das rações experimentais

Item	Fase			
	Pré-inicial	Inicial	Crescimento	Final
Ingrediente, %				
Milho, moído	54,691	55,575	56,473	57,365
Soja, farelo	38,688	35,046	31,764	27,461
Soja, óleo	2,353	2,345	3,347	3,135
Arroz, quirera	0,000	3,300	5,050	9,150
Fosfato bicálcico	1,905	1,530	1,285	1,090
Calcário calcítico	0,914	0,910	0,860	0,765
DL-Metionina (99%)	0,220	0,179	0,165	0,154
L-Lisina HCl (78%)	0,218	0,165	0,148	0,180
L-Treonina (98%)	0,103	0,060	0,043	0,055
Sal comum	0,508	0,490	0,465	0,445
Suplemento vit/min ¹	0,400	0,400	0,400	0,200
Composição Nutricional Calculada ²				
EM, kcal/kg	2.950	3.000	3.100	3.150
PB, %	22,200	20,800	19,500	18,000
Ca, %	0,920	0,819	0,732	0,638
P disp., %	0,470	0,391	0,342	0,298
Met, %	0,511	0,458	0,431	0,404
Met+Cys, %	0,944	0,846	0,787	0,737
Lys, %	1,310	1,174	1,078	1,010
Tre, %	0,852	0,763	0,701	0,656
K, %	0,590	0,585	0,580	0,580
Na, %	0,220	0,210	0,200	0,195
Cl, %	0,200	0,190	0,180	0,170
Valor Isotópico Médio Analisado ³				
¹³ C, δ‰	-19,73	-19,40	-19,19	-19,49

¹Fornecendo as seguintes quantidades/kg de ração (PX FC Vaccinar): Pré-inicial - ácido fólico 1,5 mg; ácido pantotênico 14 mg; biotina 0,075 mg; cobre 8 mg; colina 0,35 g; etoxiquim 4 mg; ferro 0,05 g; fitase 0,5 ftu; iodo 0,9 mg; manganês 0,075 g; niacina 0,045 g; nicarbazina 0,125 g; selênio 0,33 mg; virginiamicina 16,5 mg; vitamina A 10.000 UI; vitamina B1 2 mg; vitamina B12 17,5 mcg; vitamina B2 6 mg; vitamina B6 3 mg; vitamina D3 3.000 UI; vitamina E 35 UI; vitamina K3 3 mg; zinco 0,07 g. Inicial - ácido fólico 1,25 mg; ácido pantotênico 13 mg; biotina 0,07 mg; cobre 8 mg; colina 0,3 g; etoxiquim 4 mg; ferro 0,05 g; fitase 0,5 ftu; iodo 0,9 mg; manganês 0,075 g; niacina 0,04 g; nicarbazina 0,125 g; selênio 0,3 mg; virginiamicina 16,5 mg; vitamina A 10.000 UI; vitamina B1 1,5 mg; vitamina B12 15 mcg; vitamina B2 5 mg; vitamina B6 3 mg; vitamina D3 3.000 UI; vitamina E 30 UI; vitamina K3 3 mg; zinco 0,07 g. Crescimento - ácido fólico 0,8 mg; ácido pantotênico 11 mg; biotina 0,05 mg; cobre 8 mg; colina 0,25 g; etoxiquim 4 mg; ferro 0,05 g; fitase 0,5 ftu; iodo 0,9 mg; manganês 0,075 g; niacina 30 mg; salinomicina 0,066 g; selênio 0,3 mg; virginiamicina 16,5 mg; vitamina A 8.000 UI; vitamina B1 1,5 mg; vitamina B12 12 mcg; vitamina B2 4 mg; vitamina B6 2,5 mg; vitamina D3 2.500 UI; vitamina E 20 UI; vitamina K3 2 mg; zinco 0,07 g. Final - ácido fólico 0,3 mg; ácido pantotênico 6 mg; cobre 8 mg; colina 0,2 g; etoxiquim 1 mg; ferro 0,04 g; fitase 0,5 ftu; iodo 0,7 mg; manganês 0,06 g; niacina 0,02 g; salinomicina 0,066 g; selênio 0,25 mg; virginiamicina 10 mg; vitamina A 5.000 UI; vitamina B1 0,5 mg; vitamina B12 5 mcg; vitamina B2 2,5 mg; vitamina B6 0,7 mg; vitamina D3 1.000 UI; vitamina E 10 UI; vitamina K3 1,5 mg; zinco 0,06 g. ²Rostagno et al. (2011). ³Valor relativo ao padrão *PeeDee Belemnite* (PDB).

Pesagem dos Animais

Ao início de cada período experimental as aves foram selecionadas por peso com variação de $\pm 5\%$, sendo utilizadas 51 aves em cada um dos seis grupos (G) avaliados: período de 1 a 7 (G1), 8 a 14 (G2), 15 a 21 (G3), 22 a 28 (G4), 29 a 35 (G5) e 36 a 42 (G6) dias de idade. Os pesos médios das aves obtidos e utilizados como base para os cálculos da quantidade de metionina marcada preparada foram: 0,045; 0,165; 0,460; 0,960; 1,600 e 2,400 kg, para G1, G2, G3, G4, G5 e G6, respectivamente.

Dosagem e Administração de L-[¹³C₁]metionina

A fim de promover enriquecimento tecidual as aves de cada grupo receberam doses de 29 μmol de L-[¹³C₁]metionina/kg de peso vivo/hora, durante 6 h, através de administração via oral de solução enriquecida (L-[¹³C₁]metionina, abundância isotópica de 99 atm % em ¹³C, *Cambridge Isotope Laboratories, Inc.[®], Andover, MA, USA*). O composto marcado foi diluído em solução fisiológica e administrado oralmente em 0,3 mL de solução enriquecida por dose aplicada, utilizando-se seringas de insulina de 1 mL.

A dosagem utilizada neste experimento foi cinco vezes superior a utilizada por Muramatsu et al. (1987) em estudo envolvendo poedeiras administrando metionina marcada em ¹⁵N. O aumento na dosagem se deve a grande diluição isotópica que o elemento carbono sofre no organismo, para compensar e favorecer o enriquecimento tecidual, uma vez que a maioria das moléculas orgânicas são formados por quantidade superior de carbono quando comparadas ao nitrogênio (18,5% de C e 3,2% de N) (Nepomoceno, 2006).

Os procedimentos de diluição e administração isotópica da metionina enriquecida foram realizados de acordo com a metodologia preconizada por Muramatsu et al. (1987) e Riedijk et al. (2007).

Para o cálculo da quantidade de metionina marcada a ser preparada e administrada, considerando-se um frango com 2,5 kg de peso vivo como exemplo para cálculo, tem-se: a) Para obtenção da quantidade aplicada de material enriquecido durante cada período avaliado, fez-se necessário realização do seguinte cálculo: 29 μmol de L-[¹³C₁]metionina, multiplicado por 2,5 kg e por 6 h, resulta em 435 μmol de L-[¹³C₁]metionina. O peso molecular da metionina corresponde a 150,19 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$,

portanto, 150,19 μg de metionina/1 μmol de L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina, multiplicado por 435 μmol de L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina, resulta em 65.333 μg ou 65,333 mg de metionina marcada. Este valor obtido, dividido pelo número de doses (no caso seis), corresponde a 10,889 mg de metionina marcada/dose aplicada; b) Para obtenção do valor da massa de ^{13}C aplicada por dose durante cada período avaliado, fez-se necessária realização do seguinte cálculo: Em 150,19 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de metionina (peso molecular da metionina) contém 12,87 μg de ^{13}C , em 10.889 μg de metionina marcada conterá 933,08 μg de ^{13}C /dose aplicada.

Levando-se em consideração os pesos médios das aves em cada período, cada dose fornecida continha: 0,1957; 0,7177; 2,0009; 4,1757; 6,9595 e 10,4393 mg de metionina marcada, ou 16,8606; 61,8222; 172,3528; 359,6928; 580,9280 e 871,3920 μg de ^{13}C , para G1, G2, G3, G4, G5 e G6, respectivamente.

Amostragem

Nos tempos 0 h (controle); 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 48; 72 e 96 h após a primeira administração de solução enriquecida, foram abatidas 3 aves por deslocamento da articulação crânio-cervical, e posteriormente realizada a sangria. Foram coletadas amostras de mucosa (M), plasma (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE), penas (PN) e gordura (GA), para posterior análise isotópica em espectrômetro de massas.

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 (Muramatsu et al., 1987; Hobson e Clark, 1992; Riedijk et al., 2007).

As amostras de fígado foram retiradas do terço central do órgão, as de mucosa foram obtidas por raspagem com lâmina de vidro na região da alça duodenal do intestino e as de sangue foram obtidas por punção da veia jugular sendo acondicionadas em tubos de ensaio contendo heparina. As amostras de sangue foram centrifugadas a 5000G por 4 minutos para separação do plasma. Plasma e mucosa foram devidamente acondicionados em microtubo graduado plástico de 1,5 mL com tampa e em seguida congelados a -20°C .

As amostras de peito foram obtidas a partir do terço médio longitudinal do músculo *Pectoralis major*, as de coxa do músculo gastrocnêmio (parte externa) e sobrecoxa do músculo iliotibial lateral, as de penas das rêmiges primárias e secundárias (asa), sendo todas as citadas colhidas do lado esquerdo da carcaça. A gordura foi coletada da região abdominal a partir do segundo período avaliado (G2 a G6), devido à inexistência ou escasso material no G1.

Os tecidos amostrados, sem considerar plasma, foram lavados com água destilada para retirada de qualquer contaminante, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e imediatamente congeladas a -20°C.

Preparo das Amostras

As amostras foram descongeladas por um período de 48 horas. Amostras de fígado passaram por processo de extração da gordura durante 4 horas (*Soxhlet*) e as de plasma e mucosa passaram pelo processo de liofilização durante 24 horas (*Thermo Fisher Scientific* micro modulo 115).

Todas as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 56°C, por um período de 48 horas, sem considerar plasma e mucosa. Após este procedimento, tecidos e dietas experimentais foram moídos em moinho criogênico (*SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder*), à -196°C por dez minutos, com rotação de 920 rpm e em alta frequência, para obtenção de material homogêneo de fina granulometria (menor que 60 µm), com aspecto de talco.

Após os referidos procedimentos cada amostra foi pesada, utilizando-se duplicatas, em cápsula de estanho (50 a 70 µg) por meio de microbalança (*Mettler Toledo XP6*) e submetida a análise isotópica.

Análise Isotópica

As análises isotópicas foram realizadas no Instituto de Biociências, UNESP – Univ Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, Centro de Isótopos Estáveis.

Foi utilizado espectrômetro de massa de razões isotópicas (*Delta V Advantage Isotope Ratio MS, Thermo Scientific*), acoplado ao Analisador Elementar (*Flash 2000 Organic Elemental Analyzer EA for IRMS*), no qual em presença de oxigênio (O₂) e óxido de cobre (CuO) a amostra foi queimada quantitativamente para obtenção de CO₂.

O gás formado foi separado em coluna cromatográfica gasosa e analisado no espectrômetro de massa. Os resultados obtidos foram expressos em notação $\delta^{13}\text{C}$, em relação ao padrão internacional *Peedee Belemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2 ‰ e calculado pela equação 1 (Criss, 1999):

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

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.

Balanço de Massa

Os dados relativos ao balanço de massa do carbono-13, proveniente da L-metionina, após análise isotópica, foram gerados utilizando-se equações de Trivelin et al. (1994).

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 marcado em um dos isótopos. O princípio de diluição isotópica é a base para os trabalhos com material marcado. As equações 2 e 3 (Trivelin et al., 1994) evidenciam o balanço de massa isotópico, para as condições do trabalho proposto fazendo-se uso da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina.

$$f_{\text{met}} \times \text{Ab}_{\text{met}} + f_{\text{nat}} \times \text{Ab}_{\text{nat}} = (f_{\text{met}} + f_{\text{nat}}) \times \text{Ab}_{\text{p}} \quad (2)$$

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

Onde:

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

Ab_{met} , Ab_{nat} e Ab_{p} = abundância (% em átomos de ^{13}C) na fonte marcada (L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina), fonte natural (dieta) e produto (tecidos), respectivamente.

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

O método de diluição isotópica consiste na adição de uma quantidade conhecida e exata do material marcado 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).

A partir das equações 2 e 3, tem-se:

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

Em termos percentuais a equação 4 pode ser representada da seguinte maneira:

$$\% \text{CPP}_{\text{met}} = [(Ab_p - Ab_{\text{nat}}) / (Ab_{\text{met}} - Ab_{\text{nat}})] \times 100 \quad (5)$$

Onde:

% CPP_{met} = percentual de carbono no produto (tecidos) proveniente da fonte marcada (L-[¹³C₁]metionina).

A partir da massa total real (seca) do produto (M_p) avaliado, pode-se obter a quantidade de carbono-13 em cada um dos produtos (equação 6), sendo:

$$\text{CPP}_{\text{met}} = [(Ab_p - Ab_{\text{nat}}) / (Ab_{\text{met}} - Ab_{\text{nat}})] \times (\% \text{CT}_p) \times (M_p) \quad (6)$$

Onde:

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

M_p = massa total real (seca) do produto, em µg;

% CT_p = percentual de carbono total no produto.

Como foi salientado, deve-se considerar a massa total real dos produtos (tecidos), ou seja, valores em matéria seca. Devido a isso, foram selecionadas por peso e abatidas cinco aves em cada período avaliado (G1 a G6), para a coleta de M, F, C, SC, PE e GA a fim de se determinar os pesos secos dos mesmos.

Para os tecidos da C, SC e PE, foram descarnados e desconsiderados os ossos, para F foi coletado o órgão em sua totalidade, e de maneira similar ocorreu para GA, sendo retirado todo tecido adiposo encontrado na região abdominal. Para a M foi padronizado o corte da porção da alça duodenal, limitando-se à região que envolve o pâncreas, e esvaziado seu conteúdo com emprego de água destilada.

Posteriormente, esses tecidos foram secos em estufa de ventilação forçada por 72 h e pesados para obtenção dos pesos médios secos utilizados nos cálculos de balanço de massa. Para PL foi considerado que este representa 5 % do peso vivo das aves (Macari e Luquetti, 2002) e somente 10 % desse valor seria a fração seca. Já para o tecido das PN foi considerada a referência de que estas representam em média 6 % em relação ao peso vivo da ave (Martelli et al., 2006). Também foi considerado que o conteúdo de água existente no organismo do frango é da ordem de 70 %, ou seja, apenas 30 % é matéria seca (Macari e Luquetti, 2002), portanto dos pesos vivos de cada um dos frangos foram descontados essa porcentagem, para posterior utilização nos cálculos de balanço de massa.

Análise Estatística

As médias resultantes das massas recuperadas de carbono-13, proveniente da L-[¹³C₁]metionina, no pico de enriquecimento para cada tecido e grupo foram submetidos à análise de variância complementada pelo teste de Tukey (P < 0,05), utilizado-se o programa Minitab 16 Statistical Software (2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados relativos à massa de carbono-13 recuperada em relação à administrada, proveniente da L-[¹³C₁]metionina em tecidos de frangos de corte, para os grupos avaliados ao longo do tempo, estão representados nas Tabelas 2 a 7.

As médias e seus respectivos erros padrão, da massa de carbono-13 recuperada em relação à administrada proveniente da L-[¹³C₁]metionina, nos picos de enriquecimento para cada tecido de frangos de corte e grupos (G) avaliados, encontram-se na Tabela 8.

A fim de facilitar a visualização, as porcentagens de carbono-13 recuperadas (REC) em relação às administradas (ADM), proveniente da L-[¹³C₁]metionina, nos picos de enriquecimento para cada tecido de frangos de corte e total (TOT) nos grupos (G) avaliados, estão representadas em gráficos de setores (Figura 1). Nestes diagramas circulares, os valores de cada categoria estatística estão representadas proporcionais às respectivas frequências.

Não foi constatado enriquecimento na gordura abdominal em nenhum período, o que era esperado em aves alimentadas com dietas adequadamente balanceadas (não havendo excesso ou deficiência deste aminoácido), não sendo possível encontrar resquícios do elemento enriquecido proveniente da L-metionina administrada neste tecido.

Em condição de deficiência em metionina nas dietas há maior deposição de tecido adiposo, decorrente do aumento na atividade das enzimas responsáveis pela formação do ácido úrico, provocando maior catabolismo da proteína, o que contribuiria para que a energia se depositasse como gordura (Moran Jr., 1994). Schutte e Pack (1995) constataram que em níveis de deficiência de metionina+cistina houve 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 muscular no peito e diminuição na de gordura abdominal, representando efeito positivo e a importância da suplementação adequada deste aminoácido. Por isso os dados de gordura não foram incluídos nos cálculos de balanço de massa.

Tabela 2. Massa de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³C₁]metionina em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE) e penas (PN) de frangos de corte e total (TOT) no GI (1-7 dias de idade) avaliado ao longo do tempo (t)

t	ADM	REC																
		M	PL	F	C	SC	PE	PN	TOT	M	PL	F	C	SC	PE	PN	TOT	
h	$\mu\text{g }^{13}\text{C}$	$\mu\text{g }^{13}\text{C}$											$\% \text{ }^{13}\text{C}$					
0,5	16,86	0,72	0,76	1,38	0,33	1,19	0,75	0,78	5,90	4,29	4,51	8,17	1,94	7,05	4,45	4,60	35,01	
1	16,86	0,52	0,60	1,32	0,42	0,78	0,73	1,48	5,84	3,08	3,55	7,82	2,48	4,61	4,34	8,78	34,66	
2	33,72	0,56	1,31	2,47	0,52	1,29	0,91	1,74	8,81	1,67	3,87	7,33	1,56	3,82	2,70	5,17	26,12	
3	50,58	0,97	1,38	4,12	1,38	1,44	1,89	2,95	14,14	1,92	2,72	8,15	2,73	2,85	3,75	5,83	27,95	
4	67,44	2,23	2,37	7,42	1,76	2,26	2,20	2,38	20,62	3,31	3,51	11,00	2,61	3,35	3,26	3,53	30,58	
5	84,30	2,37	2,78	10,47	2,31	2,58	2,59	3,56	26,67	2,82	3,30	12,42	2,74	3,07	3,07	4,23	31,64	
6	101,16	2,79	2,75	12,12	2,32	3,15	2,98	0,60	26,71	2,75	2,72	11,98	2,29	3,11	2,95	0,60	26,40	
8	101,16	2,55	2,82	10,91	2,41	3,21	3,09	4,41	29,39	2,52	2,79	10,78	2,38	3,17	3,05	4,36	29,05	
10	101,16	2,23	2,35	10,13	2,29	3,80	3,27	6,22	30,30	2,21	2,33	10,02	2,27	3,75	3,23	6,15	29,95	
12	101,16	2,41	2,31	8,05	2,36	3,39	3,05	3,59	25,16	2,38	2,29	7,96	2,33	3,36	3,01	3,54	24,87	
16	101,16	1,34	2,05	7,75	2,91	3,32	3,46	5,70	26,54	1,33	2,03	7,66	2,88	3,28	3,42	5,64	26,24	
20	101,16	1,38	1,76	7,64	2,52	3,30	2,67	5,31	24,58	1,36	1,74	7,55	2,49	3,26	2,64	5,25	24,29	
24	101,16	1,42	1,15	6,46	1,74	2,31	2,01	4,59	19,68	1,41	1,14	6,38	1,72	2,29	1,99	4,54	19,46	
48	101,16	0,45	0,80	4,15	1,91	2,24	1,19	5,17	15,92	0,45	0,79	4,11	1,89	2,22	1,17	5,11	15,73	
72	101,16	0,02	0,66	3,97	1,61	1,49	0,44	4,99	13,18	0,01	0,65	3,92	1,59	1,47	0,44	4,93	13,03	
96	101,16	0,46	0,72	4,68	5,14	0,83	2,86	1,69	16,39	0,45	0,71	4,63	5,08	0,82	2,83	1,67	16,20	

Tabela 3. Massa de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³C₁]metionina em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE) e penas (PN) de frangos de corte e total (TOT) no G2 (8-14 dias de idade) avaliado ao longo do tempo (t)

t	ADM	REC															
		M	PL	F	C	SC	PE	PN	TOT	M	PL	F	C	SC	PE	PN	TOT
h	µg ¹³ C	µg ¹³ C															
0,5	61,82	0,83	0,33	0,81	0,43	1,32	0,76	0,52	4,99	1,33	0,53	1,30	0,70	2,14	1,23	0,83	8,07
1	61,82	0,94	2,03	5,70	0,19	2,91	15,67	6,04	33,47	1,52	3,28	9,22	0,30	4,70	25,35	9,76	54,14
2	123,64	1,16	3,29	6,83	2,17	3,74	15,24	0,50	32,92	0,93	2,66	5,52	1,76	3,03	12,33	0,40	26,63
3	185,47	2,63	7,74	13,50	5,06	10,43	36,04	7,71	83,10	1,42	4,17	7,28	2,73	5,62	19,43	4,15	44,81
4	247,29	3,47	9,52	13,79	4,32	11,54	43,57	9,35	95,57	1,40	3,85	5,58	1,75	4,67	17,62	3,78	38,65
5	309,11	3,07	12,56	20,52	5,88	15,29	50,23	8,46	116,01	0,99	4,06	6,64	1,90	4,95	16,25	2,74	37,53
6	370,93	4,00	9,72	15,38	11,21	11,69	40,55	21,09	113,64	1,08	2,62	4,15	3,02	3,15	10,93	5,68	30,64
8	370,93	4,70	8,89	20,76	8,35	16,81	65,31	11,87	136,67	1,27	2,40	5,60	2,25	4,53	17,61	3,20	36,84
10	370,93	6,63	13,76	23,41	9,05	15,11	57,50	14,58	140,05	1,79	3,71	6,31	2,44	4,07	15,50	3,93	37,76
12	370,93	4,41	12,51	17,25	10,33	15,12	53,79	11,73	125,14	1,19	3,37	4,65	2,78	4,08	14,50	3,16	33,74
16	370,93	4,31	11,51	18,20	8,34	12,93	48,90	11,43	115,62	1,16	3,10	4,91	2,25	3,49	13,18	3,08	31,17
20	370,93	3,60	10,13	19,68	10,51	22,51	78,66	9,28	154,36	0,97	2,73	5,31	2,83	6,07	21,21	2,50	41,62
24	370,93	3,75	9,09	16,55	13,92	21,73	78,54	4,92	148,51	1,01	2,45	4,46	3,75	5,86	21,17	1,33	40,04
48	370,93	2,34	5,98	15,21	14,60	22,71	66,71	10,59	138,14	0,63	1,61	4,10	3,94	6,12	17,98	2,85	37,24
72	370,93	1,83	5,70	10,70	11,02	16,33	53,44	12,55	111,58	0,49	1,54	2,89	2,97	4,40	14,41	3,38	30,08
96	370,93	0,00	3,66	4,06	14,77	23,31	67,24	5,67	118,71	0,00	0,99	1,10	3,98	6,28	18,13	1,53	32,00

Tabela 4. Massa de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³C₁]metionina em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE) e penas (PN) de frangos de corte e total (TOT) no G3 (15-21 dias de idade) avaliado ao longo do tempo (t)

t	ADM	REC																					
		M	PL	F	C	SC	PE	PN	TOT	M	PL	F	C	SC	PE	PN	TOT						
h	$\mu\text{g }^{13}\text{C}$	$\mu\text{g }^{13}\text{C}$											$\% \text{ }^{13}\text{C}$										
0,5	172,35	0,89	6,13	6,79	6,87	9,27	34,37	7,48	71,80	0,51	3,56	3,94	3,99	5,38	19,94	4,34	41,66						
1	172,35	0,92	6,68	6,37	7,77	9,28	44,37	8,31	83,69	0,53	3,87	3,70	4,51	5,38	25,74	4,82	48,56						
2	344,71	1,35	12,18	12,79	8,80	11,34	44,26	8,36	99,08	0,39	3,53	3,71	2,55	3,29	12,84	2,42	28,74						
3	517,06	2,58	23,94	30,83	10,23	25,14	70,36	16,26	179,33	0,50	4,63	5,96	1,98	4,86	13,61	3,15	34,68						
4	689,41	3,52	31,18	41,42	23,00	35,32	151,71	21,80	307,94	0,51	4,52	6,01	3,34	5,12	22,01	3,16	44,67						
5	861,76	3,73	37,27	42,71	21,93	40,51	176,71	14,54	337,40	0,43	4,33	4,96	2,54	4,70	20,51	1,69	39,15						
6	1034,12	4,55	43,72	59,54	32,18	44,19	181,67	17,02	382,87	0,44	4,23	5,76	3,11	4,27	17,57	1,65	37,02						
8	1034,12	4,20	48,65	57,69	32,45	42,82	230,67	20,94	437,42	0,41	4,70	5,58	3,14	4,14	22,31	2,03	42,30						
10	1034,12	4,38	40,46	40,25	38,30	51,38	210,96	26,55	412,28	0,42	3,91	3,89	3,70	4,97	20,40	2,57	39,87						
12	1034,12	4,12	42,19	44,22	35,04	53,00	199,95	18,36	396,88	0,40	4,08	4,28	3,39	5,13	19,34	1,78	38,38						
16	1034,12	3,85	35,85	36,73	43,41	60,85	205,51	51,05	437,25	0,37	3,47	3,55	4,20	5,88	19,87	4,94	42,28						
20	1034,12	3,52	33,59	32,24	46,69	66,93	258,61	32,03	473,61	0,34	3,25	3,12	4,52	6,47	25,01	3,10	45,80						
24	1034,12	2,67	25,97	25,94	36,37	55,96	239,91	22,06	408,88	0,26	2,51	2,51	3,52	5,41	23,20	2,13	39,54						
48	1034,12	2,21	17,61	9,80	34,16	47,36	275,13	34,90	421,17	0,21	1,70	0,95	3,30	4,58	26,61	3,38	40,73						
72	1034,12	2,13	14,70	1,47	42,21	64,58	316,44	36,21	477,74	0,21	1,42	0,14	4,08	6,24	30,60	3,50	46,20						
96	1034,12	1,29	7,44	4,95	45,79	63,15	296,27	21,89	440,78	0,12	0,72	0,48	4,43	6,11	28,65	2,12	42,62						

Tabela 5. Massa de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³C₁]metionina em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE) e penas (PN) de frangos de corte e total (TOT) no G4 (22-28 dias de idade) avaliado ao longo do tempo (t)

t	ADM	REC																					
		M	PL	F	C	SC	PE	PN	TOT	M	PL	F	C	SC	PE	PN	TOT						
h	μg ¹³ C	μg ¹³ C											% ¹³ C										
0,5	359,69	1,43	6,83	7,07	6,31	13,74	7,85	6,57	49,78	0,40	1,90	1,96	1,75	3,82	2,18	1,83	13,84						
1	359,69	1,54	7,96	14,66	3,38	9,36	8,33	11,28	56,51	0,43	2,21	4,08	0,94	2,60	2,31	3,14	15,71						
2	719,39	4,45	18,94	42,65	9,76	16,63	63,35	8,16	163,93	0,62	2,63	5,93	1,36	2,31	8,81	1,13	22,79						
3	1079,08	4,83	54,24	82,46	22,78	46,16	163,90	39,00	413,36	0,45	5,03	7,64	2,11	4,28	15,19	3,61	38,31						
4	1438,77	7,33	56,35	97,62	33,24	57,58	170,31	37,95	460,39	0,51	3,92	6,78	2,31	4,00	11,84	2,64	32,00						
5	1798,46	8,68	79,28	141,05	35,90	65,43	227,93	31,01	589,29	0,48	4,41	7,84	2,00	3,64	12,67	1,72	32,77						
6	2158,16	9,26	79,76	140,99	39,30	74,38	267,77	33,66	645,11	0,43	3,70	6,53	1,82	3,45	12,41	1,56	29,89						
8	2158,16	11,49	103,04	137,21	48,11	91,51	362,32	20,16	773,82	0,53	4,77	6,36	2,23	4,24	16,79	0,93	35,86						
10	2158,16	11,10	84,63	154,36	53,78	74,61	418,18	68,83	865,48	0,51	3,92	7,15	2,49	3,46	19,38	3,19	40,10						
12	2158,16	11,67	80,72	114,21	55,94	81,96	324,11	65,99	734,60	0,54	3,74	5,29	2,59	3,80	15,02	3,06	34,04						
16	2158,16	9,63	64,97	95,45	52,76	96,81	376,40	77,57	773,60	0,45	3,01	4,42	2,44	4,49	17,44	3,59	35,85						
20	2158,16	9,45	56,85	97,58	65,11	70,24	352,89	56,22	708,34	0,44	2,63	4,52	3,02	3,25	16,35	2,60	32,82						
24	2158,16	7,29	49,78	85,00	64,62	94,65	353,03	38,09	692,44	0,34	2,31	3,94	2,99	4,39	16,36	1,76	32,08						
48	2158,16	5,94	26,35	43,48	64,62	87,80	405,88	71,27	705,34	0,28	1,22	2,01	2,99	4,07	18,81	3,30	32,68						
72	2158,16	4,41	20,45	40,10	76,31	104,64	333,01	54,54	633,45	0,20	0,95	1,86	3,54	4,85	15,43	2,53	29,35						
96	2158,16	3,57	6,56	27,77	78,15	112,42	463,92	71,98	764,39	0,17	0,30	1,29	3,62	5,21	21,50	3,34	35,42						

Tabela 6. Massa de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³C₁]metionina em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC) e peito (PE) de frangos de corte e total (TOT) no G5 (29-35 dias de idade) avaliado ao longo do tempo (t)

t	ADM	REC																					
		M	PL	F	C	SC	PE	TOT	M	PL	F	C	SC	PE	TOT								
h	$\mu\text{g } ^{13}\text{C}$	$\mu\text{g } ^{13}\text{C}$											$\% ^{13}\text{C}$										
0,5	580,93	1,46	4,46	3,03	7,24	11,16	31,43	58,78	0,25	0,77	0,52	1,25	1,92	5,41	10,12								
1	580,93	2,21	5,99	37,16	12,90	4,97	19,40	82,63	0,38	1,03	6,40	2,22	0,86	3,34	14,22								
2	1161,86	7,05	45,89	98,75	50,29	34,33	125,56	361,86	0,61	3,95	8,50	4,33	2,95	10,81	31,14								
3	1742,78	11,52	76,07	143,88	45,43	59,27	124,21	460,38	0,66	4,37	8,26	2,61	3,40	7,13	26,42								
4	2323,71	16,68	102,25	188,23	57,28	89,13	149,56	603,14	0,72	4,40	8,10	2,46	3,84	6,44	25,96								
5	2904,64	20,06	142,05	249,43	76,56	104,28	336,96	929,33	0,69	4,89	8,59	2,64	3,59	11,60	31,99								
6	3485,57	23,15	189,42	280,43	109,25	145,28	446,95	1194,48	0,66	5,43	8,05	3,13	4,17	12,82	34,27								
8	3485,57	21,09	180,76	282,45	126,54	173,46	470,52	1254,83	0,60	5,19	8,10	3,63	4,98	13,50	36,00								
10	3485,57	19,61	175,29	275,97	117,65	153,72	892,23	1634,47	0,56	5,03	7,92	3,38	4,41	25,60	46,89								
12	3485,57	15,30	162,91	239,88	134,98	169,87	554,45	1277,39	0,44	4,67	6,88	3,87	4,87	15,91	36,65								
16	3485,57	16,63	148,89	206,66	125,37	160,54	527,45	1185,54	0,48	4,27	5,93	3,60	4,61	15,13	34,01								
20	3485,57	13,33	116,13	182,62	124,48	180,75	616,34	1233,66	0,38	3,33	5,24	3,57	5,19	17,68	35,39								
24	3485,57	13,23	99,61	152,40	111,89	177,24	572,35	1126,72	0,38	2,86	4,37	3,21	5,09	16,42	32,33								
48	3485,57	9,24	75,34	103,96	119,68	183,96	550,19	1042,37	0,27	2,16	2,98	3,43	5,28	15,78	29,91								
72	3485,57	6,32	47,65	97,07	126,39	181,32	834,63	1293,38	0,18	1,37	2,78	3,63	5,20	23,95	37,11								
96	3485,57	5,30	34,37	63,84	123,93	179,01	768,20	1174,65	0,15	0,99	1,83	3,56	5,14	22,04	33,70								

Tabela 7. Massa de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[¹³C₁]metionina em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC) e peito (PE) de frangos de corte e total (TOT) no G6 (36-42 dias de idade) avaliado ao longo do tempo (t)

t	ADM	REC																					
		M	PL	F	C	SC	PE	TOT	M	PL	F	C	SC	PE	TOT								
h	$\mu\text{g } ^{13}\text{C}$	$\mu\text{g } ^{13}\text{C}$											$\% ^{13}\text{C}$										
0,5	871,39	2,78	28,76	45,45	28,59	16,29	172,49	294,36	0,32	3,30	5,22	3,28	1,87	19,80	33,78								
1	871,39	5,34	35,43	49,64	35,19	16,83	94,33	236,75	0,61	4,07	5,70	4,04	1,93	10,82	27,17								
2	1742,78	7,03	50,30	65,69	54,58	15,97	393,37	586,94	0,40	2,89	3,77	3,13	0,92	22,57	33,68								
3	2614,18	9,67	149,45	143,42	85,50	68,55	455,49	912,08	0,37	5,72	5,49	3,27	2,62	17,42	34,89								
4	3485,57	11,86	152,88	178,12	106,25	108,96	682,42	1240,49	0,34	4,39	5,11	3,05	3,13	19,58	35,59								
5	4356,96	15,47	150,16	202,16	102,38	87,17	753,77	1311,11	0,36	3,45	4,64	2,35	2,00	17,30	30,09								
6	5228,35	20,65	221,43	282,92	185,86	195,31	1125,65	2031,82	0,39	4,24	5,41	3,55	3,74	21,53	38,86								
8	5228,35	21,71	272,61	258,60	210,06	218,10	1268,49	2249,57	0,42	5,21	4,95	4,02	4,17	24,26	43,03								
10	5228,35	18,10	274,19	217,79	220,26	247,38	1186,43	2164,15	0,35	5,24	4,17	4,21	4,73	22,69	41,39								
12	5228,35	20,16	284,61	209,44	221,43	215,47	1088,18	2039,28	0,39	5,44	4,01	4,24	4,12	20,81	39,00								
16	5228,35	18,80	256,72	210,98	200,17	225,90	1145,82	2058,39	0,36	4,91	4,04	3,83	4,32	21,92	39,37								
20	5228,35	15,59	236,31	187,07	220,51	251,69	1044,88	1956,04	0,30	4,52	3,58	4,22	4,81	19,98	37,41								
24	5228,35	15,16	173,70	156,31	230,80	230,83	1419,01	2225,82	0,29	3,32	2,99	4,41	4,42	27,14	42,57								
48	5228,35	11,46	141,67	108,91	216,97	288,54	1610,96	2378,51	0,22	2,71	2,08	4,15	5,52	30,81	45,49								
72	5228,35	8,40	84,68	90,36	269,52	284,78	1651,47	2389,21	0,16	1,62	1,73	5,15	5,45	31,59	45,70								
96	5228,35	6,14	69,65	77,57	271,95	267,05	1699,86	2392,23	0,12	1,33	1,48	5,20	5,11	32,51	45,75								

Tabela 8. Médias e seus respectivos erros padrão da massa de carbono-13 recuperada em relação à administrada, proveniente da L-[¹³C₁]metionina, nos picos de enriquecimento em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecoxa (SC), peito (PE) e penas (PN) de frangos de corte nos grupos (G) avaliados

¹ Grupo	M	PL	F	C	SC	PE	PN
G1	2,8±0,23 ^f	2,8±0,18 ^f	12,1±0,52 ^e	2,9±0,02 ^e	3,8±0,05 ^f	3,5±0,18 ^f	6,2±0,75 ^c
G2	6,6±0,48 ^d	13,8±0,03 ^e	23,4±4,16 ^d	14,8±0,26 ^e	23,3±0,02 ^e	78,7±2,64 ^e	21,1±0,02 ^c
G3	4,6±0,13 ^e	48,7±1,29 ^d	59,5±3,92 ^c	46,7±0,84 ^d	67,0±0,78 ^d	316,4±10,86 ^d	51,1±1,30 ^b
G4	11,7±0,15 ^c	103,0±0,04 ^c	154,4±2,26 ^b	78,1±0,97 ^c	112,4±6,43 ^c	463,9±14,15 ^c	77,6±20,74 ^a
G5	23,2±0,53 ^a	189,5±4,58 ^b	282,5±1,77 ^a	135,0±2,15 ^b	184,0±3,37 ^b	892,2±56,39 ^b	-
G6	21,7±0,35 ^b	284,7±4,22 ^a	283,0±5,31 ^a	272,0±10,84 ^a	288,5±10,64 ^a	1699,9±25,29 ^a	-

^{a-f}Letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey (P < 0,01).

¹G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

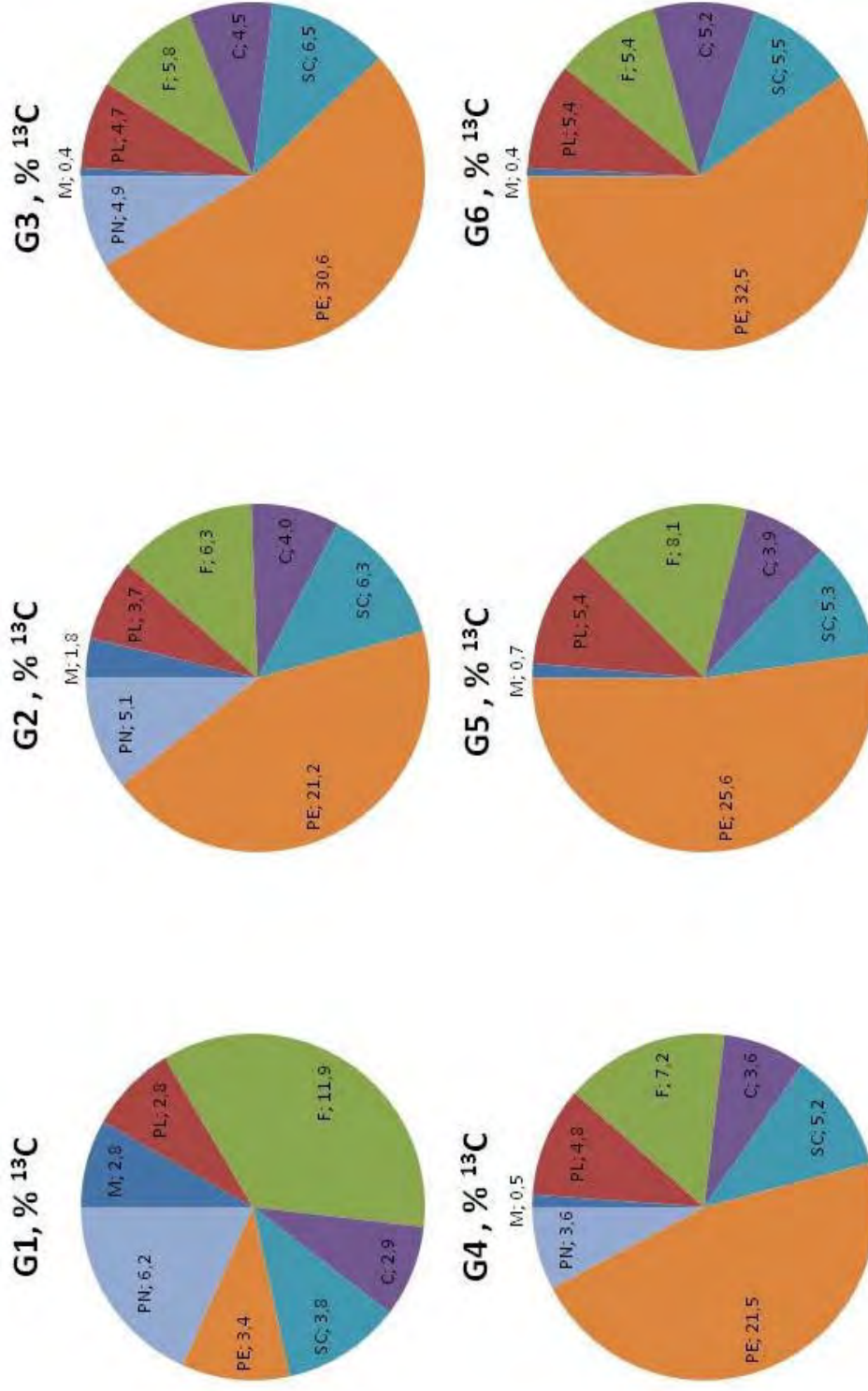


Figura 1. Porcentagem de carbono-13 recuperada (REC) em relação à administrada (ADM), proveniente da L-[^{13}C]metionina, nos picos de enriquecimento em mucosa duodenal (M), plasma sanguíneo (PL), fígado (F), coxa (C), sobrecosta (SC), peito (PE) e total (TOT) de frangos de corte nos grupos avaliados: G1 (1-7), G2 (8-14), G3 (15-21), G4 (22-28), G5 (29-35) e G6 (36-42) dias de idade.

Todos os períodos apresentaram diferença na quantidade de carbono-13 recuperada entre os tecidos e tempos avaliados, sendo que a recuperação aumenta gradativamente conforme o número de doses administradas ao longo do tempo, até atingir o pico de máxima recuperação, e a partir deste ponto a quantidade recuperada diminui, decorrente da interrupção na administração da solução enriquecida (ocorrida durante 6 h apenas).

Esse pico de enriquecimento varia diferentemente para cada tecido avaliado, pois cada tecido possui características intrínsecas de assimilação dos compostos, sendo alguns considerados de metabolismo rápido e outros de metabolismo lento. A quantidade recuperada do aminoácido marcado também difere, dependendo das exigências teciduais pelo aminoácido para síntese proteica em cada fase em apreço, conforme mostra a Tabela 8 ($P < 0,01$).

No primeiro grupo (G1) avaliado, constata-se que a massa de carbono-13 recuperada em relação à administrada, proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina no pico de enriquecimento foi de: 2,79; 2,82; 12,12; 2,91; 3,80; 3,46 e 6,22 μg para M, PL, F, C, SC, PE e PN, respectivamente. Essa recuperação em porcentagem, corresponde a: 2,75; 2,79; 11,98; 2,88; 3,75; 3,42 e 6,15 % para M, PL, F, C, SC, PE e PN, respectivamente (Tabela 2).

Já no segundo grupo (G2), a massa de carbono-13 recuperada em relação à administrada, proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina no pico de enriquecimento foi de: 6,63; 13,76; 23,41; 14,77; 23,31; 78,66 e 21,09 μg para M, PL, F, C, SC, PE e PN respectivamente. Essa recuperação em porcentagem, corresponde a: 1,79; 3,71; 6,31; 3,98; 6,28; 21,21 e 5,68 % para M, PL, F, C, SC, PE e PN, respectivamente (Tabela 3).

Quando considerado o terceiro grupo (G3), observa-se que a massa de carbono-13 recuperada em relação à administrada, proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina no pico de enriquecimento foi de: 4,55; 48,65; 59,54; 46,69; 66,93; 316,44 e 51,05 μg para M, PL, F, C, SC, PE e PN, respectivamente. Essa recuperação em porcentagem, corresponde a: 0,44; 4,70; 5,76; 4,52; 6,47; 30,60 e 4,94 % para M, PL, F, C, SC, PE e PN, respectivamente (Tabela 4).

Com relação ao quarto grupo (G4), encontra-se uma massa de carbono-13 recuperada em relação à administrada, proveniente da L-[$^{13}\text{C}_1$]metionina no pico de enriquecimento de: 11,67; 103,04; 154,36; 78,15; 112,42; 463,92 e 77,57 μg para M,

PL, F, C, SC, PE e PN, respectivamente. Essa recuperação em porcentagem, corresponde a: 0,54; 4,77; 7,15; 3,62; 5,21; 21,50 e 3,59 % para M, PL, F, C, SC, PE e PN, respectivamente (Tabela 5).

Avaliando o quinto grupo (G5), têm-se que a massa de carbono-13 recuperada em relação à administrada, proveniente da L-[¹³C₁]metionina no pico de enriquecimento foi de: 23,15; 189,42; 282,45; 134,98; 183,96 e 892,23 µg para M, PL, F, C, SC e PE, respectivamente. Essa recuperação em porcentagem, corresponde a: 0,66; 5,43; 8,10; 3,87; 5,28 e 25,60 % para M, PL, F, C, SC e PE, respectivamente (Tabela 6).

E finalmente no sexto período avaliado (G6), a massa de carbono-13 recuperada em relação à administrada, proveniente da L-[¹³C₁]metionina no pico de enriquecimento foi de: 21,71; 284,61; 282,92; 271,95; 288,54 e 1.699,86 µg para M, PL, F, C, SC e PE, respectivamente. Essa recuperação em porcentagem, corresponde a: 0,42; 5,44; 5,41; 5,20; 5,52 e 32,51 % para M, PL, F, C, SC e PE, respectivamente (Tabela 7).

Conforme observa-se há diferenças na exigência pelo aminoácido enriquecido explicitada pela elevada ou baixa recuperação do referido, no decorrer da idade do animal para todos os tecidos e períodos, fato ligado às exigências teciduais de cada fase em que a ave se encontra, apresentando maior rapidez na recuperação de carbono-13 em M, PL e F, tecidos considerados de metabolismo rápido. Para C, SC, PE e PN, caracterizados como tecidos metabolicamente lentos constata-se uma recuperação mais acelerada nos primeiros períodos avaliados (G1, G2 e G3), diminuindo com o avançar da idade do animal, ou até mesmo não observando recuperação, como é o caso das PN (G5 e G6).

A deposição e degradação dos tecidos corporais são diretamente influenciadas pela idade das aves. (Santos et al., 2005). O rápido desenvolvimento corporal e ganho de peso dos frangos são decorrentes da taxa de síntese proteica exceder a taxa de degradação, justamente na fase inicial e de crescimento das aves (Zuidhof, 2005). Já em animais senis o declínio da taxa de síntese é maior que a taxa de degradação, determinando menor deposição proteica, constatado pela redução do crescimento dos tecidos nestes animais (Gonzalez e Sartori, 2002).

O acréscimo de massa tecidual é o principal fator que determina a diluição isotópica do carbono tecidual em relação à taxa de troca isotópica de animais mais

jovens (Zuanon, 2003), o que pode ser constatado ao observar a acelerada recuperação nos períodos iniciais deste trabalho.

Na mucosa observa-se que a quantidade de metionina enriquecida incorporada aumenta em função da idade, porém a porcentagem diminui em relação ao total de massa recuperada (2,79 a 21,71 μg e 2,75 a 0,42 %). Durante os primeiros 7 a 10 dias de idade o intestino dos frangos encontra-se em desenvolvimento (Maiorka et al., 2002) podendo explicar a maior exigência pelo aminoácido nesse período de vida da ave, explicitado pela maior porcentagem recuperada nessa fase.

De acordo com os resultados, o fígado apresentou a maior quantidade e porcentagem de recuperação de L-metionina marcada (12,12 μg e 11,98 %) no primeiro período estudado (G1), em relação aos outros tecidos, sendo também observado aumento gradual em quantidade e diminuição em porcentagem (12,12 a 282,92 μg e 11,91 a 5,41 %).

O fígado é responsável por funções importantes no metabolismo proteico, como por exemplo, formação de proteína plasmática, remoção da amônia nos líquidos corporais, desaminação de aminoácidos e, interconversões entre diferentes aminoácidos e outros compostos importantes para o metabolismo do organismo, sendo responsável pela síntese de cerca de 90 % das proteínas plasmáticas (Tirapegui e Rogero, 2007). Este órgão também apresenta alta taxa de troca isotópica, explicada pela rápida resposta a alterações nutricionais e essencial às necessidades metabólicas (Hobson e Clark, 1992), podendo explicar a diminuição em termos percentuais da massa recuperada em decorrência da exigência pelo aminoácido pelos demais tecidos.

Nos demais períodos (G2 a G6), o peito apresentou a maior quantidade e porcentagem de recuperação do aminoácido (78,66 a 1.699,86 μg e 21,21 % a 32,51 %). Esse resultado demonstra a importância da metionina na formação desse tecido muscular, bem como aumento da exigência do mesmo no decorrer da idade, relacionado a maior síntese proteica deste tecido e, o qual demonstra apresentar grande taxa de crescimento (Gonzales e Sartori, 2002).

As incorporações nos tecidos da coxa e sobrecoxa ocorreram de maneira semelhante ao peito aumentando a quantidade e porcentagem incorporada no decorrer dos períodos avaliados, porém em termos percentuais ocorreu um ligeiro decréscimo no

período de G4 a G5. Também observa-se que o tecido da sobrecoxa é mais exigente se comparado ao da coxa, considerando-se os valores percentuais recuperados.

Para o período que compreende de 28 a 45 dias de idade, Gous et al. (1999), Ivey (1999) e Kessler e Brugalli (1999) observaram maior taxa de crescimento das aves e, foi verificado desenvolvimento mais rápido dos músculos da perna nas fases iniciais e após os 28 dias de idade, para o músculo do peito, fato observado para os valores percentuais recuperados neste experimento.

Também é verificado que as aves alcançam idade para ganho máximo de peso vivo e para ganho de proteína ao redor de 35 a 43 dias de idade (Hancock et al., 1995; Gous et al., 1999; Longo, 2000; Goliomytis et al., 2003; Scheuermann et al., 2003; Santos et al., 2005), explicando os elevados valores percentuais de massa recuperada para os tecidos C, SC e PE (G6).

A quantidade de metionina enriquecida incorporada nas PN aumenta em função da idade, porém a porcentagem incorporada diminui em relação ao total de massa recuperada (6,22 a 77,57 μg e 6,15 a 3,59 %). Este fato pode ser explicado devido ao processo de muda que ocorre na fase inicial, trocando as penugens pelas penas “definitivas”, o que aumentaria sua exigência por aminoácidos sulfurados, como é o caso da metionina (Pophal, 2004). Segundo Baker (1991) a importância dos aminoácidos sulfurados na manutenção é enfatizada pela participação da queratina na formação da pele e penas.

O mesmo comportamento não foi observado para os dois últimos períodos das PN avaliados (G5 e G6). Isso não significa que não há uma demanda expressiva pelo aminoácido em questão nesses períodos. O que pode ter ocorrido é que, em função da menor taxa de incorporação, relacionada à menor taxa de metabolismo devido a idade, não foi possível detectar a incorporação durante as 96 h avaliadas.

CONCLUSÃO

O balanço de massa da L-metionina, evidencia que a recuperação de carbono-13 marcado nos tecidos avaliados, difere em cada período de crescimento de acordo com as exigências teciduais pelo aminoácido em função da idade. Nas condições experimentais, o tecido mais representativo na exigência por este aminoácido é o do peito, evidenciando a importância deste composto como constituinte plástico do referido

músculo. Também não se detecta enriquecimento no tecido adiposo, bem como nos dois últimos períodos avaliados para as penas. A técnica dos isótopos estáveis demonstra-se eficiente na mensuração da quantidade recuperada do composto enriquecido nos tecidos, permitindo relacionar com a importância deste como aminoácido limitante na alimentação de aves.

LITERATURA CITADA

- Baker, D. H. 1991. Partitioning of nutrients for growth and other metabolic functions. *Poultry Sci.* 70:1797–1805.
- Barnes, D. M., Z. Songs, K. C. Klasing, and W. Botje. 2002. Protein metabolism during an acute phase response in chickens. *Amino Acids.* 22:15–26.
- Bertechini, A. G. 2006. Nutrição de monogástricos. ed. UFLA, Lavras, MG.
- Criss, R. E. 1999. Principles of stable isotope distribution. New York: Oxford University Press. p. 254.
- Goliomytis, E., E. Panopoulou, and E. Rogdakis. 2003. Growth curves for body weight and major components parts, feed consumption, and mortality of male broiler chickens raised to maturity. *Poultry Sci.* 82:1061–1068.
- Gannes, L. Z., C. M. Del-Rio, and P. Koch. 1998. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comp. Biochem. Phys. A.* 119(3):725–737.
- Gonzales, E., and J. R. Sartori. 2002. Crescimento e metabolismo muscular. In: Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzalez, *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de corte.* ed. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, SP. p. 279–297.
- Gous, R. M., J. R. E. T. Moran, R. H. Stilborn, G. D. Bradford, and G. R. Emmans. 1999. *Poultry Sci.* 78:812–821.
- Hancock, C. E., G. D. Bradford, G. C. Emmans, and R. M. Gous. 1995. The evaluations of the growth parameters of six strains of commercial broiler chickens. *Brit. Poultry Sci.* 36:247–268.
- Hobson, K. A., and R. G. Clark. 1992. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ^{13}C in tissues. *The Condor.* 94:181–188.
- Ivey, F. J. 1999. Desenvolvimento e aplicação de modelos de crescimento para frangos de corte. In: I Simpósio Internacional ACAV – Embrapa nutrição de aves. p. 14.

- Kessler, A. M., and I. Brugalli. 1999. Recentes avanços do efeito na nutrição no crescimento específico de componentes da carcaça de frangos de corte. In: Simpósio internacional sobre tecnologia de processamento e qualidade de carne. p. 19.
- Liu, Y. L., G. F. Yi, G. L. Song, Y. Q. Hou, J. W. Huang, M. Vázquez-Añón, and C. D. Knight. 2007. 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. *Brit. Poultry Sci.* 48(2):190–197.
- Longo, F. A. 2000. Estudo do metabolismo energético e do crescimento em frangos de corte. MS Diss. São Paulo State Univ., SP.
- Macari, M., and B. C. Luquetti. 2002. Fisiologia cardiovascular. In: Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzalez, *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de corte*. ed. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, SP. p. 17–35.
- Maiorka, A., I. C. Boleli, and M. Macari. 2002. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzalez, *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de corte*. ed. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, SP. p. 113–123.
- Martelli, S. M., G. Moore, S. S. Paes, C. Gandolfo, and J. B. Laurindo. 2006. Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films. *LWT - Food Sci. Technol.* 39:292–301.
- Minitab 16 Statistical Software, 2010. [Computer software]. PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com).
- Moran Jr., E. T. 1994. Response of broiler strains differing in body fat to inadequate methionine: live performance and processing yields. *J. Poultry Sci.* 73(7):1116–26.
- Muramatsu, T., K. Hiramoto, I. Tasaki, and J. I. Okumura. 1987. Effect of protein starvation on protein turnover in liver, oviduct and whole body of laying hens. *Comp. Biochem. Phys.* 87(2):227–232.
- Nepomoceno, M. G. S. 2006. A fórmula do corpo humano. In: Levorato et al., *Livro Didático Público: Química/vários autores*. 2nd ed. SEED, Curitiba, PR. p. 72–81.
- Pophal, S. 2004. Características de crescimento de dois cruzamentos de frangos de corte recebendo dietas com diferentes níveis de lisina na primeira semana de vida. PhD Diss. Univ. Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

- Riedijk, M. A., B. Stoll, S. Chacko, H. Schierbeek, A. L. Sunehag, J. B. Van Goudoever, and D. G. Burrin. 2007. Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. *PNAS*. 104(9):3408–3413.
- Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, S. L. T. Barreto, and R. F. Euclides. 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos (composição de alimentos e exigências nutricionais). 3rd ed. UFV, Viçosa, MG.
- Santos, A. L., N. K. Sakomura, E. D. Feitas, C. M. L. S. Fortes, E. N. V. M. Carrilho, and J. B. K. Fernandes. 2005. Estudo do crescimento, desempenho, rendimento de carcaça e qualidade de carne em 3 linhagens de frangos de corte. *Rev. Bras. Zootecn.* 34(5):15893–1598.
- Saunderson, C. L., and J. Mackinlay. 1990. Changes in body weight, composition and hepatic enzyme activities in response to dietary methionine, betaine and choline levels in growing chicks. *Brit. J. Nutr.* 63:339–349.
- Scheuermann, G. N., S. F. Bilgili, J. B. Hess, and D. R. Muivaney. 2003. Breast muscle development in commercial broiler chickens. *Poultry Sci.* 82:1648–1658.
- Schutte, J. B., and M. Pack. 1995. Sulfur amino acid requirement of broiler chicks from fourteen to thirty-eight days of age. 1: performance and carcass yield. *J. Poultry Sci.* 74(3):480–487.
- Stradiotti, A. C., C. Ducatti, J. A. Bendassolli, J. R. Sartori, V. C. Pelícia, P. C. Araujo, C. C. Miranda, L. V. C. Girão, F. G. Luiggi, I. M. G. P. de Souza, P. D. G. Pacheco, M. M. Aoyagi, J. C. Denadai, M. M. P. Sartori, and A. C. Pezzato. 2013. Methionine incorporation into the blood plasma of broiler chickens at the last week of age. In: 2013 Poultry Sci. Assoc. Annual Meet. Proc., San Diego, CA. *Poult. Sci.* 92(E-Suppl. 1). p. 112.
- Sun, Z., X. Mou, X. Li, L. Wang, H. Song, and H. Jiang. 2011. Application of Stable Isotope Techniques in Studies of Carbon and Nitrogen Biogeochemical Cycles of Ecosystem. *Chin. Geogra. Sci.* 21(2)129–148.
- Tirapegui, J., and M. M. Rogero. 2007. Metabolismo de proteínas. In: R. C. Angelis, and J. Tirapegui, *Fisiologia da nutrição humana. Aspectos básicos, aplicados e funcionais*. 2nd ed. Atheneu, São Paulo, SP. p. 69–109.

- Trivelin, P. C. O., W. A. R. Lara Cabezas, R. L. Victória, and K. Reichardt. 1994. Evaluation of a ^{15}N plot design for estimating plant recovery of fertilizer nitrogen applied to sugar cane. *Sci. Agr.* 51:226–234.
- Waldroup, P. W., Q. Jiang, and C. A. Fritts. 2005. Effects of supplementing broiler diets low in crude protein with essential and nonessential amino acids. *Poultry Sci.* 4:425–431.
- Zuanon, J. A. S. 2003. *Turnover de carbono em tecido muscular de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio dos isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)*. PhD Diss. São Paulo State Univ., São Paulo.
- Zuidhofs, M. J. 2005. Mathematical characterization of broiler carcass yield dynamics. *Poultry Sci.* 84:1108–1122.

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

A utilização de isótopos estáveis marcados em pesquisas nas áreas de ciências da vida vem crescendo, principalmente devido às suas inúmeras aplicabilidades, por ser uma ferramenta com alta precisão, exatidão e sensibilidade, fornecendo confiabilidade nos dados gerados e por não emitirem radiação, ao contrário dos radioisótopos.

A técnica de traçador isotópico associada a de diluição isotópica, permite a identificação do isótopo no curso de uma reação, podendo auxiliar e fornecer maior entendimento para uma série de mecanismos fisiológicos na área de nutrição animal.

O presente trabalho que faz uso do aminoácido L-[¹³C₁]metionina, como traçador isotópico nos estudos de nutrição de frangos de corte, apresentou resultados satisfatórios e pôde corroborar com ideias e conceitos já consagrados em literatura.

Todavia, são necessárias futuras pesquisas, que avaliem o processo de incorporação do referido aminoácido e de outros compostos enriquecidos, em situações fisiológicas distintas, como em condições de estresse por calor ou frio, excesso ou deficiência dos mesmos, ou até mesmo utilizando animais desafiados, observando o comportamento e aproveitamento destes compostos, pois sabe-se que a dinâmica dos nutrientes é afetada em condições adversas.

Deve-se ressaltar que pesquisas nessa área têm elevados custos, principalmente relacionados à aquisição dos compostos enriquecidos (importação) e das respectivas análises isotópicas (alto custo dos equipamentos, sua manutenção e operação). Esses fatores podem dificultar ou inviabilizar outras pesquisas, principalmente quando se levar em consideração a grande quantidade de compostos a ser estudada, elevado número de repetições exigidos, além de diferentes fases de desenvolvimento dos organismos e os inúmeros tecidos que deveriam ser investigados. Por esse motivo, também são imprescindíveis pesquisas visando a síntese dos isótopos estáveis enriquecidos no país, como as que vêm sendo desenvolvidas no CENA/USP, o que tornará a prática de utilização menos onerosa e mais acessível.

Mesmo considerando os prós e contras na utilização destes compostos marcados, este trabalho inédito abre uma promissora linha de pesquisa básica na área de nutrição animal, e principalmente, pela ausência de estudos com este enfoque aplicando estas técnicas.