

## ESTUDO DA LIPOGÊNESE E FRACIONAMENTO DOS LIPÍDEOS TOTAIS DO SIRI AZUL, *CALLINECTES SAPIDUS*, ACLIMADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS

JOÃO EDMUNDO LUNETTA

Departamento de Fisiologia Geral do Instituto de Biociências e Instituto de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo — Belle W. Baruch Coastal Research Institute, Universidade da Carolina do Sul, Estados Unidos da América do Norte.

1. INTRODUÇÃO .....	167
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	170
a — Cromatografia em coluna .....	172
b — Cromatografia em camada delgada .....	173
c — Raspagem do adsorvente das placas cromatográficas .....	179
3. RESULTADOS .....	180
4. DISCUSSÃO .....	184
5. CONCLUSÕES .....	186
6. BIBLIOGRAFIA .....	186

RESUMO — A lipogênese “in vitro”, estudada pela utilização de substância marcada como a glicose  $^{14}\text{C}$ , nos tecidos muscular, branquial e da glândula do intestino médio dos siris (*Callinectes sapidus*) aclimados a  $10^{\circ}\text{C}$  e a  $25^{\circ}\text{C}$ , se manifestou mais no sentido da elaboração dos fosfolipídeos do que lipídeos neutros. Destes últimos, apenas os monoglicerídeos foram sintetizados a partir do precursor radioativo, nos animais aclimados a  $10^{\circ}\text{C}$ . A temperatura de aclimação parece não ter influenciado a síntese preferencial de certos tipos de fosfolipídeos. Nos três tipos de tecidos estudados e nas duas temperaturas de aclimação, os fosfolipídeos neo-formados, durante o intervalo de incubação com a glicose marcada, foram: fosfatidil-etanol-amina, fosfatidil-serina, lecitina e esfingomiolina.

## LIPOGENESIS STUDIES AND SEPARATION OF THE TOTAL LIPIDS OF THE BLUE CRAB, *CALLINECTES SAPIDUS*, ACCLIMATED AT DIFFERENT TEMPERATURES

ABSTRACT — Lipogenesis studied “in vitro” using tracer substances like glucose  $^{14}\text{C}$  in muscle, gill and hepatopancreas tissues of the crab (*Callinectes sapidus*) acclimated to 10°C and 25°C has shown more production of phospholipids than neutral lipids.

Between neutral lipids only the monoglycerides were synthesized from the radioactive glucose by those animals acclimated to 10°C. The acclimation temperature may not have any influence upon the preference synthesis of certain types of phospholipids. In the three types of tissues studied at two different acclimation temperatures the neo-formation phospholipids during the incubation intervals with glucose  $^{14}\text{C}$  were phosphatidil-ethanolamine, phosphatidil-serine, lecithin and sphingomyelin.

### CONCLUSIONS:

1. In both acclimated animals to 10°C and 25°C, more than 50% of the total lipids from muscle, gills and hepatopancreas tissues is formed by neutral lipids.
2. In muscle and gills tissues there is a tendency to occur phospholipids in higher quantity.
3. The main neutral lipids found were: monoglycerides, triglycerides, free fatty acids and methyl esters of fatty acids.
4. The only neo-formation neutral lipid in the three types of tissues from animal acclimate to 10°C was the monoglyceride.
5. The main phospholipids were: phosphatidyl-coline, phosphatidyl-ethanolamine, phosphatidyl-serine and sphingomyelin.
6. The “in vitro” lipogenesis, with the use of labeled glucose, in both acclimation temperature, shown a tendency to the elaboration of phospholipids than the neutral lipids.

## 1.

## INTRODUÇÃO

Na natureza, a vida animal ocorre em uma relativa faixa térmica, diferindo muito as respostas dos animais às variações de temperatura.

Como se sabe, organismos que suportam grandes variações são denominados “euritêrmicos”, enquanto que os restritos a “habitats” com pequenas flutuações de temperatura designam-se por “estenotêrmicos”. Em ambos os extremos de variação da temperatura, alcança-se um ponto letal para o animal; entre estes dois extremos, denominado de zona térmica de compatibilidade, as espécies sobrevivem com variáveis graus de êxito.

É bem conhecido o fato de certas funções metabólicas nos poiquilotêrmicos serem alteradas em resposta a uma modificação da temperatura do meio ambiente. Entretanto, ainda se está longe de um entendimento adequado dos mecanismos que envolvem tais modificações.

Entre outros fatores, a temperatura pode determinar os limites letais para os animais e condicioná-los na natureza, através da aclimação, a suportarem certos níveis de variação térmica que seriam de outra forma, intoleráveis. A temperatura governa a velocidade de desenvolvimento e determina também os limites das funções metabólicas dentro dos quais o animal pode viver (BRETT, 1956).

Para HEILBRUN (1924), a coagulação do protoplasma difere da coagulação das proteínas, pelo fato de ser reversível. Isto está associado, aparentemente, com alguma mudança no estado dos ácidos graxos da célula. O mesmo autor (1952), assinala ser fato notável que animais e plantas que vivem em temperaturas mais baixas têm gorduras com menor ponto de fusão do que os que vivem em ambientes de temperatura mais elevada. Assim, os lipídeos de peixes são fluidos à temperatura ambiente enquanto que os de aves e mamíferos são sólidos. Isto é verdadeiro não só para as gorduras de reserva como também para os constituintes lipídicos do protoplasma.

Sob a denominação de lipídeos, incluem-se aqui, todas as substâncias insolúveis na água e solúveis nos solventes orgânicos (DEUEL, 1951). Por esta definição, os lipídeos são operacionalmente, porém não estruturalmente, homogêneos.

Como se pode observar pela recente bibliografia especializada, a elucidação de muitos aspectos da bioquímica dos lipídeos recebeu grande estímulo pelo desenvolvimento de modernas técnicas de estudo desses compostos tais como: cromatografia em fase gasosa, cromatografia em camada delgada, substâncias traçadoras e espectrofotometria no infra-vermelho.

Estas técnicas foram aplicadas, como é compreensível, principalmente no estudo da bioquímica dos lipídeos do homem, animais comuns de laboratório e animais de importância econômica. A bioquímica dos lipídeos dos invertebrados vem recebendo atenção muito menor, embora a diversidade química dos lipídeos dos invertebrados tenha, ultimamente, provido estímulo para muitas investigações bioquímicas.

Estudos dos lipídeos de uma série de invertebrados conduz à bioquímica comparada. Por exemplo, relações taxonômicas entre os Porifera têm sido correlacionadas com a ocorrência de esteróides específicos (BERGMANN, 1962). Este autor (1962) propõe que a ocorrência de substâncias lipídicas nos animais pode ser uma consequência da dieta e ou de mecanismos de biossíntese. Presumivelmente, os lipídeos produzidos biossinteticamente evidenciam mais as relações taxonômicas desde que sua síntese dependa da posse comum de enzimas específicos. Isto leva a um problema adicional, que é o de determinar se as substâncias lipídicas que mostram específica distribuição de acordo com a taxonomia são sintetizadas *de novo*. Demonstração direta da síntese de lipídeos, por exemplo, usando isótopos radioativos, foi verificada em uma série de invertebrados.

BERGMANN (1.c.) reviu a literatura da bioquímica comparada dos esteróides e forneceu uma série de dados em relação à química dessas substâncias. Os filos inferiores, como por exemplo, Porifera e Celenterata, são caracterizados por uma diversidade dos principais tipos de esteróides.

Numa seqüência progressiva evolucionária, o colesterol torna-se o esterol dominante nos Mollusca, Echinodermata e Arthropoda, e finalmente, o principal, nos Chordata.

A distribuição dos esteróides mostrou uma correlação particularmente interessante nos Porifera, Mollusca e Echinodermata.

A modificação da temperatura pode conduzir a uma variação das *principais classes de lipídeos*. HOAR e COTTLE (1952) mos-

traram em peixes *Carassius auratus* que a relação colesterol — ácidos graxos varia diretamente e a colesterol — fosfolipídeos varia inversamente com a temperatura de aclimação. MUSACCHIA e CLARK (1957) verificaram em peixes *Myoxocephalus quadricornis*, da região ártica, mantidos em temperaturas elevadas, que nestes animais, havia um aumento de colesterol do fígado e um decréscimo de fosfolipídeos no músculo.

Nos tecidos com alto metabolismo, os fosfolipídeos constituem a maior parte dos lipídeos totais, enquanto que os triglicerídeos são encontrados predominantemente nos tecidos modificados para a reserva de gorduras. Nos animais em jejum, os triglicerídeos são utilizados antes dos fosfolipídeos, ocorrendo a morte na época em que estas últimas substâncias começam a ser utilizadas (DEUEL, 1955). Este fato conduziu os cientistas a diferenciarem entre compostos constantes e variáveis dentre os lipídeos. Os constantes dizem respeito aos fosfolipídeos, os quais, no organismo, servem a uma função essencial (TERROINE, 1936).

Os fosfolipídeos são os principais componentes lipídicos das membranas celulares, do núcleo, mitocôndrias e ribossomas. Em adição à sua função estrutural, evidências indicam uma possível função dos fosfolipídeos na absorção das gorduras, no transporte de íons, secreção das proteínas e coagulação do sangue (ROSSITER e CLELAND, 1960).

Depreende-se da grande literatura existente, que face ao grande valor comercial, a maior parte das pesquisas referentes aos lipídeos foi efetuada em peixes. Nos demais poiquilotérmicos, há uma tentativa de se correlacionar os lipídeos e ácidos graxos de animais de filos diversos, sem se levar em conta as variações individuais próprias de cada espécie.

Com relação aos crustáceos, decápodes em particular, são muito escassos os trabalhos que visam a um bom entendimento sobre a influência da temperatura na bioquímica dos lipídeos. Diante desses fatos, no presente trabalho procurou-se investigar a influência da temperatura sobre os lipídeos em geral e sobre os de neo-formação, ou seja, na lipogênese, utilizando como animal experimental o siri azul, *Callinectes sapidus*. O objetivo principal no estudo da lipogênese foi verificar, utilizando substâncias traçadoras, como a glicose marcada com  $^{14}\text{C}$ , se tecidos isolados, músculo, glândula do intestino médio e

brânquias, de animais aclimados a 10°C e 25°C, tinham a capacidade de sintetizar lipídeos de neo-formação e, em caso afirmativo, se diferiam nesta capacidade em função da temperatura.

Obviamente, um trabalho desta natureza conduziu a uma investigação preliminar, ou seja, se havia realmente utilização "in vitro" da glicose marcada com  $^{14}\text{C}$ .

A verificação deste aspecto possibilitou, a seguir, o estudo da incorporação da glicose radioativa nos lipídeos totais, e, depois, o fracionamento dos lipídeos totais com o emprego da cromatografia em coluna e em camada delgada, a fim de se determinar, pela radioatividade exibida pelas diversas frações, quais eram realmente os lipídeos de neo-formação.

A lipogênese pode ser detectada e estimada por uma série de procedimentos. Provavelmente, o método mais direto é a demonstração da deposição dos lipídeos em animais alimentados com uma dieta isenta de gorduras. DEUEL (1955) relata a conversão de hidratos de carbono e proteínas da dieta em lipídeos. HAYES (1938) encontrou um aumento no conteúdo de gorduras durante uma fase do desenvolvimento embriológico do ouriço do mar, *Arbacia*. Como isto ocorre antes do desenvolvimento de um intestino funcional, admitiu o autor que essa síntese de lipídeos processava-se às expensas de outras substâncias.

Estudos "in vivo" e "in vitro" do quociente respiratório constitui um segundo meio de se verificar a ocorrência da lipogênese. A conversão de substâncias, tais como, açúcares e amino-ácidos em ácidos graxos de longas cadeias processa-se com um Q.R. que excede consideravelmente de 1. DEUEL (1.c.) verificou um Q.R. de 8 na conversão da glicose em ácido palmítico.

Uma terceira técnica aplicável ao estudo da lipogênese é a utilização de substâncias marcadas. A incorporação de isótopos radioativos nos lipídeos é uma evidência direta da lipogênese.

Os estudos da lipogênese "in vitro" fornecem informações a respeito da capacidade lipogênica de cada órgão.

## 2.

### MATERIAL E MÉTODOS

Na realização deste estudo, utilizaram-se músculo, glândula do intestino médio e brânquias do siri azul, *Callinectes sapidus*.

O passo inicial na execução desta pesquisa consistiu na aclimação do siri azul. Após a coleta, cada animal era colocado em uma caixa plástica com água do mar a 30‰, convenientemente arejados e separados em dois lotes, mantidos em câmaras de aclimação a 10°C e a 25°C, durante três semanas, no mínimo. Eram alimentados com pedaços de fígado (O'CONNOR *et. al.*, 1969) duas vezes por semana e submetidos a um fotoperíodo de 12 horas. A fim de uniformizar as condições experimentais, somente animais machos, na fase de intermuda, foram utilizados, pois é sabido (DAMBOVICEANU, 1932, O'CONNOR *et al.*, 1968) que durante a muda e nas fases finais da pré-muda há um decréscimo de certos constituintes bioquímicos da glândula do intestino médio e do líquido do meio interior.

A incubação dos tecidos com o material radioativo foi executada pela adição de 2,5 uCi de glicose uniformemente marcada com  $^{14}\text{C}$ , cuja atividade específica era de 492 mc/mM, procedendo-se posteriormente a homogeneização dos tecidos.

Cada tecido foi incubado, durante três horas, com a glicose radioativa, em face dos resultados obtidos em experiências prévias, as quais evidenciaram ser esse tempo o mais adequado. A incubação foi feita à temperatura de 25°C. Findo esse intervalo de tempo, extraíram-se os lipídeos totais dos homogeneizados, utilizando-se a técnica de Folch *et. al.* (1957).

A fim de remover os contaminantes não lipídicos e o material radioativo não metabolizado, durante o intervalo de tempo assinalado, fez-se uma seqüência de três lavagens dos extratos, conforme prescrição de Folch *et. al.* (1.c.).

Todas as etapas referentes a estes experimentos foram realizadas em uma atmosfera de  $\text{N}_2$ , impedindo desta forma a oxidação das gorduras, que é muito comum neste tipo de experiência, falseando os resultados da pesquisa.

A separação dos lipídeos totais obedeceu a seguinte ordem:

- a. Fracionamento dos lipídeos totais em suas diferentes classes pelo emprego da cromatografia em coluna;
- b. Separação de cada classe lipídica em seus lipídeos individuais, através da cromatografia em camada delgada;
- c. Raspagem do adsorvente das placas cromatográficas, nas regiões correspondentes aos diferentes lipídeos, eluição dos mesmos e

dissolução no líquido cintilador para contagem da radioatividade do aparelho de cintilação líquida.

#### a) Cromatografia em coluna

Na maioria dos casos, a escolha de um adsorvente adequado é o primeiro problema a ser resolvido, dado que um requerimento óbvio é que o adsorvente seja capaz de adsorver os solutos fortemente, porém não excessivamente, que se torne difícil do mesmo se deslocar. Preferencialmente, o adsorvente deve ter uma afinidade diferencial pelos constituintes do soluto. No presente caso, para o fracionamento dos lipídeos totais foi escolhido o ácido silícico, o qual é um excelente adsorvente para separação dos lipídeos (GREECH, 1961), misturado com celite (NELSON *et al.*, 1959), na proporção de 2:1, respectivamente, sendo que este último tem por finalidade facilitar o fluxo do eluente.

A mistura ácido silícico-celite, umidecida em dicloro-metano foi colocada na coluna e compactada com uma fraca pressão de N<sub>2</sub>. Durante a compactação do adsorvente, executou-se a vibração da coluna, batendo-se na mesma gentilmente com um bastão de vidro, a fim de se evitar a formação de pequenos canais no adsorvente.

Preparada a coluna, a mesma foi lavada com 20 ml de di-cloro-metano.

O extrato lipídico, cujo teor de lipídeos totais já havia sido previamente determinado, foi colocado na coluna, dissolvido em 2 ml de di-cloro-metano, evitando-se o distúrbio da superfície do adsorvente. Em seguida, acrescentou-se à coluna mais 3 ml de di-cloro-metano para completar a adsorção dos lipídeos na coluna cromatográfica, impedindo neste e em qualquer momento do fracionamento dos lipídeos que o nível do líquido ficasse abaixo do nível do adsorvente.

Adicionado os lipídeos totais à coluna, a eluição dos mesmos processou-se de acordo com a seqüência assinalada na Tabela I. Isto nos permitiu, primeiramente, separar os lipídeos neutros dos lipídeos polares.

No primeiro grupo, dos lipídeos neutros, enquadram-se os ésteres do colesterol, os mono-, di e triglicerídeos, colesterol e ácidos graxos livres, enquanto que o grupo polar é constituído essencialmente pelos fosfolipídeos.

É óbvio que os ácidos graxos livres não são compostos neutros, mas eles são enquadrados neste grupo devido a sua não polaridade em relação aos fosfolipídeos.

Os diversos eluentes foram coletados em balões de fundo redondo, sob um fluxo de  $N_2$ . O extrato lipídico de cada fração foi concentrado, por evaporação do solvente, sob pressão, em um evaporador rotatório. Concentrados os extratos, estes foram transferidos para cápsulas de Teflon, previamente pesadas, e o resto do solvente evaporado com  $N_2$ . As cápsulas de Teflon foram então repesadas numa eletro-balança Cahn e a quantidade de lipídeo devidamente anotada.

Num experimento de tal natureza é importante fazer-se a verificação da quantidade de lipídeos recuperados após a passagem dos mesmos pela coluna cromatográfica. O material adsorvido à coluna, não eluído, falsearia o resultado completamente. Desta forma, em cada experiência anotou-se sempre o peso dos lipídeos colocados na coluna e o peso obtido na fração dos lipídeos neutros e fosfolipídeos, conforme a Tabela II. Na Tabela III encontramos as percentagens de lipídeos neutros e fosfolipídeos, recuperados do músculo, glândula do intestino médio e brânquias, respectivamente.

#### b) Cromatografia em camada delgada

Os diversos lipídeos eluídos das colunas cromatográficas, conforme indicados na Tabela II, foram então purificados pela cromatografia em camada delgada. Esta etapa foi realizada com o objetivo de, através da radioatividade medida em cada constituinte lipídico, conhecer-se quais os corpos graxos de neoformação, ou seja, quais lipídeos se formaram durante o período de incubação, às expensas do substrato radioativo empregado, que em síntese significa a lipogênese ocorrida nesse intervalo de tempo.

As placas cromatográficas, já devidamente preparadas, revestidas com sílica gel G, o adsorvente mais freqüentemente usado para a separação dos lipídeos neutros e ácidos (MANGOLD, 1961), foram adquiridas da firma Brinkman Instruments.

Os lipídeos neutros contidos nas capsulas de Teflon, foram dissolvidos em hexano redistilado (MANGOLD, 1.c.), enquanto que os polares foram dissolvidos em clorofórmio-metanol (2:1), (SKIPSKI *et al.*, 1967), a fim de serem aplicados nas placas de cromatogra-

fia. A aplicação de amostras seguiu a técnica proposta por MANGOLD (1.c.), com a única modificação de que, para evitar a oxidação dos lipídeos, as placas cromatográficas foram colocadas em uma caixa plástica, com uma fenda regulável, que permitia o contato da micropipeta com a placa cromatográfica, em cada ponto de aplicação dos lipídeos. Através de um orifício lateral da caixa plástica fazia-se passar um fluxo constante de  $N_2$ , durante todo o processo de aplicação dos lipídeos.

Na identificação dos lipídeos não polares ou neutros, utilizaram-se como padrões os seguintes compostos:

ácido capróico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, oleico, esteárico, linoleico, linolênico, dipalmitina, tripalmitina, dioleina, trioleina, mono-oleina, monopalmitina, metil-miristato, metil-palmitoleato, colesteril miristato, colesteril-oleato, colesteril-palmitato.

TABELA I  
 SEQÜÊNCIA DOS ELUENTES EMPREGADOS NO FRACIONAMENTO DOS LIPÍDEOS TOTAIS.

Coluna: 4g de ácido silícico-celite (na proporção de 2:1 peso por peso).

Fração	SOLVENTE	Volume ml	COMPONENTES ELUIDOS
I	Di-cloro-metano	200	LIPÍDEOS NEUTROS: ésteres do colesterol, triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, colesterol, ácidos graxos livres.
II	Acetona	40	TRAÇOS DE FOSFOLIPÍDEOS
III	Metanol 35% + Dicloro-metano 65%	20	Fosfatidil etanolamina + Fosfatidil serina
IV	Metanol 35% + Dicloro-metano 65%	50	Lecitinas
V	Metanol 95% + água 5%	100	Lecitinas, Esfingomielina

TABELA II  
PESO DOS LÍPIDEOS RECUPERADOS DAS COLUNAS CROMATOGRAFICAS

	TEMPERATURA DE ACLIMAÇÃO 10°C								
	T E C I D O								
	M <sub>1</sub>	GL <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	GL <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	GL <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>
mg de lípideos aplicados à coluna	6,23	50,8	5,9	7,18	74,2	9,2	7,98	63,2	8,0
Lípideos neutros mg	3,96	30,2	3,2	4,08	58,6	6,1	4,18	45,9	6,0
Fosfolípideos mg	2,25	19,0	2,4	3,0	14,8	2,9	3,7	17,3	1,8
Recuperação dos lípideos mg	6,21	49,2	5,6	7,08	73,4	9,0	7,88	63,2	7,8
% recuperação	99,6	96,8	94,9	98,6	98,9	97,8	98,7	100,0	97,5
	TEMPERATURA DE ACLIMAÇÃO 25°C								
	T E C I D O								
	M <sub>1</sub>	GL <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	GL <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	GL <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>
mg de lípideos aplicados à coluna	3,6	35,4	6,7	2,6	60,2	7,5	3,8	63,1	6,4
Lípideos neutros mg	2,5	28,6	4,3	1,5	42,0	4,7	2,6	38,0	4,0
Fosfolípideos mg	1,0	5,9	1,9	1,0	18,0	2,0	1,0	25,0	1,9
Recuperação dos lípideos mg	3,5	34,5	6,2	2,5	60,0	7,1	3,6	63,0	5,9
% recuperação	97,2	97,4	92,5	96,1	99,6	94,6	94,7	99,8	92,2

M = Músculo

GL = Glândula do Intestino médio

B = Brânquias

Número do animal = 1,2,3

TABELA III  
 PERCENTAGEM DE LIPÍDEOS NEUTROS E FOSFOLIPÍDEOS

T°C	MÚSCULO		GL. DO INTEST. MÉDIO		BRANQUIAS	
	Neutros	Fosfolip.	Neutros	Fosfolip.	Neutros	Fosfolip.
10	58,6	41,3	69,6	30,3	66,0	34,0
25	64,6	35,3	69,3	30,6	62,6	37,0

Cada número representa a média de três animais.

Os seguintes lipídeos polares foram usados como referência na identificação dos lipídeos ácidos: fosfatidil-etanol-amina, fosfatidil-serina, fosfatidil-colina (lecitina), esfingomiéline, fosfatidil-inositol e liso fosfatidil-colina.

Para a aplicação dos lipídeos de referência, bem como das amostras extraídas dos tecidos, utilizaram-se micropipetas fabricadas e calibradas no próprio laboratório.

A concentração da solução dos lipídeos padrões adsorvidos às placas cromatográficas foi de 100  $\mu\text{g}$ , enquanto que a dos lipídeos extraídos era em maior quantidade, cerca de 300  $\mu\text{g}$ .

Uma vez evaporado o solvente das placas cromatográficas nos pontos de aplicação dos lipídeos, estas foram transferidas para tanques nos quais se havia colocado previamente os solventes desejados para a separação dos lipídeos. Como este processo realizou-se num ambiente anaeróbico, os referidos tanques possuíam tampas especiais com torneiras que permitiam o controle da atmosfera interior dos mesmos.

Dois tipos de mistura de solventes foram empregados na separação dos lipídeos neutros, comparando-se os resultados obtidos com ambas as misturas. A primeira, consistiu de um sistema bifásico éter de petróleo (p.e. 60-70°) e éter dietílico na proporção de 95:5; a segunda mistura era um sistema tri-fásico, com as seguintes substâncias: éter de petróleo, éter dietílico e ácido acético na proporção 90:10:1. Embora com ambas as misturas de solventes os resultados fossem comparáveis, preferiu-se a segunda, uma vez que com esta havia uma nítida diminuição da "cauda" deixada pelos ácidos graxos, na trajetória ascendente na placa cromatográfica.

Para fracionamento dos fosfolipídeos foram empregados os sistemas tri-fásicos, clorofórmio-metanol e água na proporção 65:25:4 e os sistemas bi-fásicos, n-propanol-água (7:3) e n-propanol-amônia a 12%, na proporção 7:3. Com os 3 sistemas empregados pudemos identificar os mesmos tipos de fosfolipídeos, através dos padrões utilizados, porém com o primeiro sistema, trifásico, não havia praticamente formação de "cauda".

Quando o solvente atingia uma distância previamente fixada nas placas cromatográficas, estas eram retiradas dos tanques, e o solvente evaporado das mesmas com fluxo de  $\text{N}_2$ .

Na visualização e identificação dos lipídeos, foram empregados os seguintes indicadores, vaporizados sobre as placas cromatográficas: 2',7'-di-cloro-fluoresceína a 0,2% em etanol a 96%, Rodamina B, 0,05% em etanol a 96%, azul de Bromotimol, 0,04 mg em 100 ml de NaOH, 0,01N e iodo a 1% em metanol. O primeiro corante desta série mostrou-se bastante satisfatório na visualização dos lipídeos neutros, com o auxílio de uma lâmpada ultra-violeta. Rodamina B e azul de Bromotimol foram bons indicadores para a visualização dos lipídeos polares.

### c. Raspagem do adsorvente das placas cromatográficas

Uma vez visualizados e identificados os diversos lipídeos por comparação com os padrões, procedeu-se à raspagem cautelosa da sílica gel das placas cromatográficas, nas áreas correspondentes à zona de localização dos lipídeos e subsequente eluição dos mesmos do adsorvente. As partículas do adsorvente foram coletadas com toda precaução, utilizando-se um aspirador de vidro conectado a uma trompa de vácuo, o qual continha um filtro com poros de dimensões 20 a 25  $\mu$ , segundo a técnica indicada por GOLDRICK e HIRSCH (1963). Aspiradas as partículas, o aspirador era então invertido e os solventes necessários na eluição dos lipídeos eram introduzidos no seu interior por meio de uma seringa de injeção. 30 cc de hexano redistilado e clorofórmio metanol (2:1) foram usados na eluição dos lipídeos, o primeiro solvente para os lipídeos neutros e o segundo para os polares. A eluição procedeu-se em 3 etapas, aplicando-se 10 cc do solvente de cada vez, deixando-se em contato com a sílica gel no mínimo 5 minutos. O eluente, filtrado no próprio aspirador de vidro por pressão de  $N_2$ , era coletado em balões de fundo redondo e o solvente evaporado sob pressão em evaporadores rotatórios. Os lipídeos que permaneciam nos balões de vidro foram então dissolvidos diretamente no líquido cintilador e levados ao aparelho de cintilação líquida para contagem da radioatividade, nas quais se utilizou um aparelho Packard de cintilação líquida, com trocador automático de amostras e eficiência para contagem do  $^{14}C$  igual a 85%.

## 3.

## RESULTADOS

Pode-se observar pela Tabela III, que no músculo, na glândula do intestino médio e nas brânquias, tanto de animais aclimados a 10°C e a 25°C, mais de 50% dos lipídeos são constituídos pelos lipídeos neutros.

Há no entanto, em relação ao músculo e brânquias, maior tendência a uma percentagem mais elevada de fosfolipídeos do que na glândula do intestino médio.

Os diversos tipos de lipídeos, bem como os de neo-formação, separados pela cromatografia em camada delgada, estão assinalados nas tabelas IV, V e VI. A lipogênese nesta tabela está expressa em desintegração por minuto (D.P.M.).

Os principais lipídeos neutros encontrados foram: monoglicéridos, triglicéridos, ácidos graxos livres e ésteres metílicos dos ácidos graxos. Dentre estes lipídeos, os únicos que apresentam radioatividade, e que portanto são de neo-formação, são os monoglicéridos, os quais foram sintetizados somente nos animais aclimados a 10°C.

É interessante ressaltar que, ainda dentro desta categoria de lipídeos, ou seja neutros, só foi possível identificar cromatograficamente ésteres metílicos dos ácidos graxos nos animais aclimados a 10°C.

Quanto aos fosfolipídeos, foram identificados os seguintes nas placas cromatográficas: fosfatidil-colina (lecitina), fosfatidil-etanol-amina, fosfatidil-serina e esfingomiéline.

Tanto nos animais aclimados a 10°C como a 25°C, a lipogênese manifestou-se indiscutivelmente no sentido da formação dos lipídeos ácidos. A principal diferença a assinalar entre animais aclimados a 10°C e 25°C relativamente a esta categoria de lipídeos, é que nos últimos, embora ocorra fosfatidil-etanol-amina, esta não é de neo-formação, uma vez que nenhuma amostra de tecido do animal aclimado a 25°C, exibiu radioatividade. Nos demais lipídeos pertencentes à categoria dos lipídeos polares, a temperatura de aclimação parece não ter exercido nenhum efeito, determinando a síntese preferencial de certos tipos de fosfolipídeos uma vez que os resultados da medida da radioatividade em DPM, se recobrem nos vários tipos de tecidos estudados, em ambas as temperaturas de aclimação.

TABELA IV

LIPOGÊNESE EXPRESSA EM DPM (DESINTEGRAÇÃO POR MINUTO) NO MÚSCULO DO SIRI AZUL,  
*Callinectes sapidus*, ACLIMADOS a 10°C e 25°C

	M Ú S C U L O											
	10°C						25°C					
	NÚMERO DO ANIMAL		NÚMERO DO ANIMAL		NÚMERO DO ANIMAL		NÚMERO DO ANIMAL		NÚMERO DO ANIMAL		NÚMERO DO ANIMAL	
LIPÍDEOS NEUTROS	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Monoglicéridos	331 ± 20	195 ± 12	245 ± 30	50 ± 30	50 ± 2	28 ± 15	50 ± 5	28 ± 5	60 ± 15	—	—	—
Triglicéridos	19 ± 5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ácidos graxos livres	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Metil-ésteres de ácidos graxos	—	—	—	—	—	—	*	*	*	*	*	*
FOSFOLIPÍDEOS												
Fosfatidil-etanol amina	1013 ± 115	802 ± 30	605 ± 42	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fosfatidil-serina	908 ± 72	313 ± 45	189 ± 37	3298 ± 37	3298 ± 157	920 ± 30	350 ± 25	920 ± 30	350 ± 25	628 ± 15	632 ± 12	428 ± 32
Lecitina	450 ± 15	315 ± 60	220 ± 12	494 ± 12	494 ± 40	628 ± 15	632 ± 12	628 ± 15	632 ± 12	306 ± 21	428 ± 32	—
Esfingomielina	21 ± 31	490 ± 48	119 ± 27	484 ± 27	484 ± 30	306 ± 21	428 ± 32	306 ± 21	428 ± 32	—	—	—

Radiação de Fundo (Back Ground) = 42 ± 18

— = Não existe atividade

\* = Não ocorre este tipo

TABELA V  
 LIPOGÊNESE EXPRESSA EM DPM (DESINTEGRAÇÃO POR MINUTO) NA GLÂNDULA DO  
 INTESTINO MÉDIO DO SIRI AZUL, *Callinectes sapidus*, ACLIMADOS A 10°C E 25°C

	GLÂNDULA DO INTESTINO MÉDIO											
	10°C						25°C					
	1		2		3		1		2		3	
	NÚMERO DO ANIMAL		NÚMERO DO ANIMAL		NÚMERO DO ANIMAL		NÚMERO DO ANIMAL		NÚMERO DO ANIMAL		NÚMERO DO ANIMAL	
<b>LÍPÍDEOS NEUTROS</b>												
Monoglicérides	261 ± 32	268 ± 35	251 ± 30	35 ± 12	27 ± 13	30 ± 8						
Triglicérides	19 ± 8	10 ± 4	—	—	—	—						
Ácidos graxos livres	—	—	—	—	—	—						
Metil-ésteres de ácidos graxos	—	—	—	*	*	*						
<b>FOSFOLÍPÍDEOS</b>												
Fosfatidil-etanol amina	1126 ± 32	605 ± 12	1012 ± 39	—	—	—						
Fosfatidil-serina	833 ± 16	2248 ± 300	724 ± 62	2167 ± 132	965 ± 35	362 ± 28						
Lecitina	380 ± 20	3539 ± 502	153 ± 28	2505 ± 183	736 ± 12	502 ± 62						
Esfingomielina	385 ± 34	1518 ± 120	165 ± 18	1156 ± 41	428 ± 39	631 ± 39						

Radiação de Fundo (Back Ground) = 42 ± 18

— = Não exibe atividade

\* = Não ocorre este tipo

TABELA VI

LIPOGÊNESE EXPRESSA EM DPM (DESINTEGRAÇÃO POR MINUTO) NAS BRÂNCUIAS DO SIRI AZUL, *Callinectes sapidus*, ACLIMADOS A 10°C e 25°C

	B R Â N Q U I A S					
	10°C			25°C		
	NÚMERO DO ANIMAL		NÚMERO DO ANIMAL	NÚMERO DO ANIMAL		
LÍPÍDEOS NEUTROS	1	2	3	1	2	3
Monoglicérides	364 ± 12	384 ± 20	248 ± 16	28 ± 12	38 ± 15	50 ± 6
Triglicérides	*	*	*	—	—	—
Ácidos graxos livres	—	—	—	—	—	—
Metil-ésteres de ácidos graxos	—	—	—	*	*	*
FOSFOLÍPÍDEOS						
Fosfatidil-etanol amina	1526 ± 67	1839 ± 41	1902 ± 65	—	—	—
Fosfatidil-serina	2636 ± 63	2725 ± 28	2325 ± 62	3287 ± 48	3220 ± 102	378 ± 32
Lectina	1138 ± 28	1520 ± 42	1384 ± 71	1781 ± 63	1458 ± 67	425 ± 60
Estingomielina	689 ± 37	568 ± 30	727 ± 41	1365 ± 72	1208 ± 37	501 ± 39

Radiação de Fundo (Back Ground) = 42 ± 18

— = Não existe atividade

\* = Não ocorre este tipo

## 4.

## DISCUSSÃO

O fracionamento dos lipídeos totais, dos tecidos do siri azul, pela cromatografia em coluna e camada delgada permitiu investigar o aspecto qualitativo da influência da temperatura de aclimação sobre esses compostos, conforme resultados contidos na Tabela III. Vê-se por essa Tabela, que mais de 50% desses lipídeos são constituídos pelos lipídeos neutros, havendo uma tendência a ocorrer maior percentagem de fosfolipídeos nos músculos e brânquias. Estes dados concordam com os de KONING e McMULLAN (1966), que encontraram na glândula do intestino médio da lagosta *Jasus lalandii*, cerca de 67% de lipídeos neutros. GRUGER, JR. (1967) assinala que, nos órgãos de reserva, os lipídeos estão constituídos principalmente de triglicerídeos, enquanto que nos demais órgãos, como músculo por exemplo, os fosfolipídeos ocorrem em maior percentagem. Sendo a glândula do intestino médio também um órgão de reserva de gorduras nos crustáceos, é lógico que seja mais rica em lipídeos neutros.

Dado que, tanto nos animais aclimados a 10°C e a 25°C, as quantidades de lipídeos neutros e fosfolipídeos se recobrem pelo menos nos estudos "in vitro" (aqui realizados) parece que a temperatura de aclimação não teve uma influência nas percentagens de lipídeos de ambas as classes.

Pelos resultados dos experimentos resultantes do fracionamento dos lipídeos totais pela cromatografia em camada delgada, assinalados nas Tabelas IV, V e VI, pode-se verificar que a lipogênese às expensas do substrato radioativo, tanto nos tecidos dos animais aclimados a 10°C, como a 25°C, se manifestou mais no sentido da elaboração dos fosfolipídeos do que lipídeos neutros. Destes últimos, os únicos formados a partir do precursor radioativo, foram os monoglicérides, nos animais aclimados a 10°C.

Experiências "in vitro", realizadas por O'CONNOR e GILBERT (1968), demonstraram que a glândula do intestino médio do crustáceo de água doce, *Orconectes virilis*, quando incubada com glicose marcada, apresenta uma atividade lipogênica diminuída, após a extirpação do pedúnculo ocular do animal. A conversão da glicose em li-

pídeos dar-se-ia, segundo esses autores, através da oxidação desta substância a acetato, o qual seria sintetizado em ácidos graxos ou então a glicose seria convertida em lipídeos pela via  $\alpha$ -glicero-fosfato. Infelizmente, o autor não faz menção aos tipos de fosfolipídeos encontrados, e os dados relativos à lipogênese em animais marinhos, particularmente em crustáceos, são muito escassos (SHIEH, 1969).

Os resultados dos experimentos indicados nas Tabelas IV, V e VI concordam em linhas gerais com os de outros autores, no sentido de que a temperatura de aclimação não ter tido uma influência acentuada na lipogênese, mesmo em relação aos fosfolipídeos. Assim, os estudos de MUSACCHIA e CLARK (1957), nos peixes árticos *Myoxocephalus quadricornis*, mantidos a 2°C, 5°C e a 20°C, mostraram que a temperatura elevada não tinha efeito sobre a composição química dos fosfolipídeos; SHIEH (1.c.) verificou, após injeção de vários ácidos graxos, na lagosta *Homarus americanus*, que os fosfolipídeos eram intensamente radioativos e ANDERSON (1970), estudando a influência da temperatura de aclimação nos fosfolipídeos das membranas celulares do peixinho dourado *Carassius auratus*, não encontrou também diferenças nas concentrações relativas dos vários fosfolipídeos, nos animais aclimados a 5°C e a 25°C.

Sabe-se (SMITH, 1964) que os fosfolipídeos têm funções especiais nos processos de secreção, no transporte de íons, na coagulação do sangue e na permeabilidade seletiva das células.

Dada a grande importância desses compostos químicos para os organismos, talvez a lipogênese mais acentuada dos fosfolipídeos do que a dos lipídeos neutros, que são substâncias de reserva, esteja relacionada com necessidades mais imediatas dos animais, tais como a manutenção de uma "fluidez" específica das membranas e permeabilidade, propriedades estas necessárias para o eficiente funcionamento celular (ROOTS, 1968),

Seria desejável uma comparação dos resultados obtidos nos experimentos "in vitro" (Tabelas IV, V e VI), com os obtidos "in vivo", a fim de que conclusões mais objetivas pudessem ser tiradas com relação à síntese preferencial dos fosfolipídeos em ambos os grupos de animais.

## 5.

## CONCLUSÕES

1. Tanto em animais aclimados a 10°C como a 25°C, mais de 50% dos lipídeos totais dos músculos, glândula do intestino médio e brânquias, são constituídos pelos lipídeos neutros.
2. No tecido muscular e branquial há uma tendência a ocorrer maior quantidade de fosfolipídeos.
3. Os principais lipídeos neutros encontrados foram: monoglicérides, triglicérides, ácidos graxos livres e ésteres metílicos dos ácidos graxos.
4. Os únicos lipídeos neutros, de neo-formação, nos três tipos de tecidos estudados, em animais aclimados a 10°C, foram os monoglicérides.
5. Dos fosfolipídeos, os principais encontrados foram: fosfatidil-colina, fosfatidil-etanol-amina, fosfatidil-serina e esfingomiéline.
6. A lipogênese "in vitro", à expensa da glicose marcada, em ambas as temperaturas de aclimação, manifestou-se mais no sentido da elaboração dos fosfolipídeos do que dos lipídeos neutros.

## BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, T.R. — 1970 — Temperature adaptation and the phospholipids of membranes in Goldfish (*Carassius auratus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 33: 663-687.
- BERGMAN, W. — 1962 — Sterols: Their structure and distribution. In: Florkin, M. & Mason, H.S. — *Comparative Biochemistry*, 3: 103-162. Academic Press, New York.
- BRETT, J.R. — 1956 — Some principles in the thermal requirements of fishes. *Quart. Rev. Biol.*, 31: 75-87.
- DAMBOVICEANU, A. — 1932 — Composition chimique et physico-chimique du liquide cavitaire chez les crustacés décapodes (physiologie de la calcification). *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, 2: 239-309.
- DEUEL, H.J.Jr. — 1951 — The lipids, their chemistry and biochemistry. *Chemistry 1*: 982 p. Interscience Publishers, Inc. N.Y.
- DEUEL, H.J.Jr. — 1955 — The lipids, their chemistry and biochemistry 2: 919 p. Interscience Publishers, Inc. N.Y.
- FOLCH, J., Lees, M. & Stanley, G.H.S. — 1957 — A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.
- GOLDRICK, B. & Hirsch, J. — 1963 — A technique for quantitative recovery of lipids from chromatoplates. *J. Lipid res.*, 4: 482-483.

- GREECH, B.G. — 1961 — Colum chromatography — Introduction and general considerations. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 38: 538-540.
- GRUGER, E.H., Jr. — 1967 — Fatty acid composition of fish-oils. In: Stansby, M.E. — *Fish oils*, Circ. 276, 30 p. Washington, D.C.
- HAYES, F.R. — 1938 — The relation of fat changes to the general chemical embriology of the sea urchin. *Biol. Bull.*, 74: 267-277.
- HEILBRUMM, L.V. — 1924 — The colloid chemistry of protoplasm. IV. The heat coagulation of protoplasm. *Amer. J. Physiol.*, 69: 190-199.
- HEILBRUMM, L.V. — 1952 — An outline of general physiology, 3 rd. 478-502 p. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- HOAR, W.S. & Cottle, M.K. — 1952 — Some effects of temperature acclimatization on the chemical constitution of goldfish tissues. *Canad. J. Zool.*, 30: 49-54.
- KONING, A.J. & McMullan, K.B. — 1966 — Phospholipids of marine origin. II. The rock lobster (*Jasus lalandii*). *J. Sci. Fd. Agric.*, 17: 117-120.
- MANGOLD, H.K. — 1961 — Thin-layer chromatography of lipids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 38: 708-727.
- MUSACCHIA, X.J. & CLARK, M.R. — 1957 — Effects of elevated temperatures on tissue chemistry of the Arctic sculpin, *Myoxocephalus quadricornis*. *Physiol. Zool.*, 30 (1): 12-17.
- NELSON, S.J. & FREEMAM, L.K. — 1959 — Serum phospholipids analysis of chromatography and infrared spectrophotometry. *J. Biol. Chem.*, 234: 1375-1380.
- O'CONNOR, J.D. & GILBERT, L.I. — 1968 — Aspects of lipids metabolism in crustaceans. *Amer. Zool.*, 8: 529-539.
- O'CONNOR, J.D. & GILBERT, L.I. — 1969 — Alterations in lipid metabolism associated with premolt activity in a land crab and freshwater crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 29: 889-904.
- ROOTS, B.I. — 1968 — Phospholipids of goldfish (*Carassius auratus* L.) brain: The influence of environmental temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 25: 457-466.
- ROSSITER, R.J. & CLELAND, K.W. — 1960 — The metabolism and function of phosphatides. In: Bloch, K. ed. *Lipids metabolism*, 69-127, John Wiley & Sons, Inc., N.Y.
- SHIEH, H.S. — 1969 — The biosynthesis of phospholipids in the lobster, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 30: 679-684.
- SKIPSKI, V.P. et al. — 1967 — Separation of acidic phospholipids by one dimensional thin-layer chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, 137: 80-89.
- SMITH, W.H. — 1964 — Principles of biochemistry international student edition, 1106 p., Kogakusha Co. Ltd. Tokyo.
- TERROINE, E.F. — 1936 — Fat metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, 5: 227-246.

