

Actas do Seminário sobre Aquacultura (in press)
(Porto 9-11 Abril 1987)

CONTEÚDO E COMPOSIÇÃO LIPÍDICAS DE ALGUMAS ESPÉCIES UTILIZADAS
COMO DIETAS NATURAIS EM ESTUDOS SOBRE REPRODUÇÃO DE PEIXES E
CRUSTÁCEOS MARINHOS

Orlando J. Luis *

*Departamento de Zoologia, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa
Laboratório Marítimo da Guia, Estrada do Guincho. 2750 Cascais.

ABSTRACT

Luis, O.J., 1987. Lipid content and composition of some species used as natural feed in reproduction studies of marine fishes and crustaceans.

The lipid content and composition of *Nereis diversicolor*, *Diopatra neapolitana* and *Marphysa sanguinea* (Annelida, Polichaeta), *Mytilus galloprovincialis*, *Cerastoderma edule* and *Spisula solida* (Mollusca, Bivalvia), were examined by lipid extraction, thin-layer chromatography and capillary gas-liquid chromatography. The results showed that the main fatty acids of Polichaetes were C16:0, C18:1 ω 9, C18:2 ω 6 and C20:5 ω 3. The major fatty acids of Bivalves were C16:0, C20:5 ω 3 and C22:6 ω 3. A discussion about the probable importance of these two animal groups as nutritive stimulators on growth, maturation and spawning of marine fishes and crustaceans with interest in aquaculture is presented in this study.

RESUMO

O conteúdo e a composição lipídicas de *Nereis diversicolor*, *Diopatra neapolitana* e *Marphysa sanguinea* (Annelida, Polichaeta), *Mytilus galloprovincialis*, *Cerastoderma edule* e *Spisula solida* (Mollusca, Bivalvia), foram analisados por extracção de lípidos totais, cromatografia em camada fina e cromatografia capilar gás-líquido. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que nos Poliquetas os principais ácidos gordos são C16:0, C18:1 ω 9, C18:2 ω 6 e C20:5 ω 3. Nos Bivalves estudados os ácidos gordos mais importantes são C16:0, C20:5 ω 3 e C22:6 ω 3. Apresenta-se neste trabalho uma discussão sobre a importância destes dois grupos animais como prováveis estimuladores nutritivos sobre o crescimento e sobre a maturação e postura de peixes e crustáceos marinhos com interesse em aquacultura.

INTRODUÇÃO

A última década tem testemunhado avanços significativos no cultivo de peixes e crustáceos marinhos. Paralelamente tem-se desenvolvido um crescente interesse pela bioquímica dos animais cultivados, particularmente o efeito das dietas na sua composição e a identificação das suas necessidades nutritivas essenciais (New, 1976).

Dado o importante papel que os lípidos parecem desempenhar, particularmente no crescimento e na reprodução de muitas espécies de vertebrados e de invertebrados marinhos, (Giese, 1966; Martin, 1978; Middleditch *et al*, 1979), pretende o presente trabalho contribuir para uma melhor definição do conteúdo e, mais precisamente da composição, em lípidos de algumas das espécies de invertebrados marinhos correntemente utilizadas, em Portugal, como alimentos naturais em estudos sobre reprodução controlada de peixes e crustáceos marinhos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

A escolha das espécies estudadas obedeceu aos critérios de utilização experimental, acessibilidade e preço.

Todas as espécies foram adquiridas no mercado nacional, simulando pois a situação real do modo como as dietas naturais são obtidas para os estudos experimentais sobre reprodução controlada quer de peixes quer de crustáceos marinhos.

As três espécies de moluscos bivalves, *Mytilus galloprovincialis* (me-xilhão), *Cerastoderma edule* (berbigão) e *Spisula solida* (crica), foram periodicamente adquiridas no mercado sendo a sua origem conhecida, a primeira da Ria de Aveiro e as duas últimas da Ria de Faro-Olhão.

As três espécies de anelídeos poliquetas, *Nereis diversicolor* (minho-ca), *Diopatra neapolitana* (casulo) e *Marphysa sanguinea* (minhocão), foram também adquiridas periodicamente no mercado, sendo as duas primeiras provenientes do Estuário do Tejo e a última da Ria de Faro-Olhão.

2. Técnicas preparativas

Todas as amostras foram mantidas em congelador a -25°C , (Morris e Culkin, 1976), sendo os bivalves previamente descorticados.

Antes das extracções lipídicas foi determinado, por liofilização durante 12 horas, o peso seco de cada uma das amostras.

As amostras de cada uma das espécies foram pesadas congeladas e os lípidos totais imediatamente extraídos, num homogenizador tipo Potter com banho de gelo, em metanol-clorofórmio-água (2:1:0.8), seguida de lavagem do solvente com água destilada (2:2:1.8) (Bligh & Dyer, 1959). Para evitar a variabilidade individual, a amostra total de cada espécie foi congelada de modo a constituir um rolo, sendo cortados e pesados cinco pedaços independentes. Destes, dois destinaram-se à determinação da percentagem de lípidos totais após secagem a peso constante em excicador do balão previamente tarado, um à determinação das classes de lípidos em TLC e os dois últimos à determinação, em percentagem, da composição em ácidos gordos.

3. Procedimento analítico

a) Composição em classes de lípidos

Os extractos lipídicos foram examinados quanto à composição em classes de lípidos por cromatografia em camada fina (TLC) sobre placas de 20x20 cm, de sílica gel 60 (Merck) com 0.25 mm de espessura e sem indicador, usando como solvente de migração uma mistura de éter de petróleo: éter dietílico : ácido acético (85:15:1 v/v/v). As classes de lípidos foram quantificadas após revelação com ácido fosfomolibdico a 10% em etanol a 120°C , por densitometria de varrimento (Hoefer GS-300, 6.5 cm/min). As áreas dos picos foram medidas por um integrador electrónico, VARIAN 4290 e o instrumento calibrado com uma mistura de padrões constituída por concentrações conhecidas de colesterol, ácido oleico, trioleína, éster metílico de ácido oleico e oleato de colesterol (Sigma 178-1).

b) Composição em ácidos gordos

As composições em ácidos gordos foram determinadas por cromatografia capilar gás-líquido. Os extractos lipídicos foram saponificados 40 min a

100°C com hidróxido de potássio 0.5 M em metanol, os ácidos gordos resultantes recuperados e metilados com uma solução a 14% de $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (Metcalf e Schmitz, 1961) e, os ésteres metílicos de ácidos gordos finalmente recuperados em 2 ml de isooctano. Estes foram posteriormente injectados num cromatógrafo gás-líquido, VARIAN 3300, com uma razão de split de 12:1 e separados numa coluna capilar SP1000 WCOT em sílica fundida com 30 m e 0.32 mm Ø, utilizando He como gás de arraste à razão de 1 ml/min. O forno da coluna foi mantido a 180°C durante 7 min. e depois programado a 4°C/min para 200°C. Quer o injector quer o detector FID foram mantidos a 250°C.

As áreas dos picos foram medidas por um integrador electrónico VARIAN 4290 e expressas em % do total da resposta não corrigida do detector. As identificações dos picos são provisionais e foram baseadas em dados de retenção, em co-injecções com padrões e em dados bibliográficos de cromatogramas de óleo de fígado de bacalhau (Ackman, Sipos e Jangaard, 1967).

RESULTADOS

Conteúdo em lípidos totais e composição em classes de lípidos

1. Bivalves

Três amostras independentes de cada uma das espécies estudadas foram analisadas e os seus conteúdos em lípidos totais e composição em classes de lípidos apresentados na Tabela I.

TABELA I

Conteúdo em lípidos totais e composição em classes de lípidos
Bivalves: *Mytilus galloprovincialis*, *Cerastoderma edule* e *Spisula solida*
Conteúdo em lípidos totais expresso em % em peso seco descorticado,
Composição por classes de lípidos expressa em % dos lípidos totais,

	<i>Mytilus galloprovincialis</i>		<i>Cerastoderma edule</i>		<i>Spisula solida</i>	
	Junho	Dezembro	Julho	Dezembro	Junho	Dezembro
Lípidos totais	8,70	7,40	6,50	6,60	11,60	6,90
%Classes lípidos						
Fosfolípidos	37,50	72,90	72,80	80,90	33,70	37,90
Esterol livre	14,50	12,30	16,90	16,00	8,50	9,80
Ac. Gordos livres	1,30	3,10	10,40	,40	1,10	1,70
Triacilglicerol	46,70	11,00	,00	2,40	56,70	46,50
Alkildiacilglicerol	,00	,00	,00	,00	,00	,00
Éster de Esterol	,00	,80	,00	,40	,20	4,10

Os resultados obtidos para os lípidos totais determinados nos dois meses estudados constituem valores normais para invertebrados marinhos bentônicos, 6.50% a 11.60% em peso seco descorticado. Embora o presente estudo não abranja um ciclo anual, os resultados apontam para que em *Mytilus galloprovincialis* e *Cerastoderma edule* as variações sazonais do conteúdo lipídico sejam negligenciáveis, sugerindo que os seus lípidos não sejam importantes como reservas energéticas (Morris e Culkin, 1976), embora *M. galloprovincialis* apresente uma nítida depleção do triacilglicerol durante o inverno, quando esta espécie se encontra em repouso sexual (Costa e Machado, 1987). *Spisula solida* apresenta variações sazonais significativas, com um aumento durante a fase de crescimento estival comum a outros bivalves marinhos (Beninger e Lucas, 1984), sem contudo se verificar uma depleção do triacilglicerol durante os meses de inverno. De notar a quase ausência de triacilglicerol em *Cerastoderma edule*, sendo no Verão a maioria dos seus lípidos constituídos por fosfolípidos (72.8%), esterol livre (16.9%) e ácidos gordos livres (10.4%) que estão ausentes no Inverno, sugerindo um possível papel destes como reservas de energia (Pocock *et al*, 1971).

2. Poliquetas

Três amostras independentes de cada uma das espécies estudadas foram analisadas e os seus conteúdos em lípidos totais e composição em classes de lípidos apresentados na Tabela II.

TABELA II
Conteúdo em lípidos totais e composição em classes de lípidos,
Poliquetas - *Nereis diversicolor*, *Diopatra neapolitana* e *Marphysa sanguinea*,
Conteúdo em lípidos totais expresso em % em peso seco descorticado,
Composição por classes de lípidos expressa em % dos lípidos totais,

	<i>Nereis diversicolor</i>		<i>Diopatra neapolitana</i>		<i>Marphysa sanguinea</i>
	Julho	Janeiro	Junho	Fevereiro	Dezembro
Lípidos totais	11,10	15,10	8,90	10,00	11,70
%Classes lípidos					
Fosfolípidos	30,50	25,53	32,56	37,49	27,10
Esterol livre	14,69	11,38	19,54	23,68	16,10
Ac. Gordos livres	23,52	6,24	14,56	21,51	13,00
Triacilglicerol	22,68	38,62	13,76	7,98	18,90
Alkildiacilglicerol	2,29	6,00	5,66	,15	12,50
Ester de Esterol	6,27	12,19	13,52	9,08	12,50

Os resultados obtidos para os lípidos totais determinados nos dois meses estudados apresentam em geral valores superiores aos obtidos para os bivalves, variando entre 8.9% e 15.1% em peso seco. Contrariamente aos bivalves estudados, os poliquetas parecem aumentar o seu conteúdo lipídico durante os meses de Inverno sugerindo que estas espécies acumulam reservas de lípidos durante os períodos de imaturidade sexual, que são consumidas durante a maturação e/ou o jejum associado (Giese, 1966).

Os lípidos mais abundantes são os fosfolípidos e os esteróis livres que aparentemente não sofrem variações sazonais apreciáveis, os triglicéridos que desempenham um papel de lípidos de reserva tendo *Nereis diversicolor* e *Diopatra neapolitana* perfis de depleção inversos, os ácidos gordos livres que apresentam também variações sazonais bem evidentes e, tal como em outros poliquetas alkildiacilglicerol e alkenildiacilglicerol (Pocock *et al*, 1971).

Composição em ácidos gordos

1. Bivalves

As análises de fracções purificadas das três espécies estudadas em coluna capilar revelaram uma composição (Tabela III), que em termos gerais se assemelha a outros dados, embora raros, reportados para outras espécies de moluscos (Hayashi, 1986). Os ácidos gordos preponderantes para qualquer das espécies foram C16:0, C20:5 ω 3 e C22:6 ω 3; existiam menores quantidades de C14:0, C16:1 ω 7, C16:3 ω 3, C18:0 e C18:1 ω 9, e muitos outros ácidos gordos foram detectados ao nível de traços (<1%).

2. Poliquetas

Os resultados analíticos obtidos (Tabela IV), mostraram diferenças significativas quanto à composição em ácidos gordos entre as três espécies estudadas, bem como pequenas diferenças sazonais dentro de cada uma delas. Independentemente da espécie considerada, os ácidos gordos preponderantes foram C16:0, C18:1 ω 9, C18:2 ω 6 (*Nereis diversicolor*) e C20:5 ω 3; menores quantidades de C18:0, C20:1 ω 11 (*Marphysa sanguinea*), C20:1 ω 9 e C20:4 ω 6, C22:2, C22:4 ω 6 (*Marphysa sanguinea*), foram também detectados para além de muitos outros ao nível de traços (<1%).

TABELA III

Composição centesimal em ácidos gordos de :

Bivalves: *Mytilus galloprovincialis*, *Cerastoderma edule* e *Spisula solida*
 Todos os valores são a média, de duas análises separadas, expressa em %
 do total da resposta não corrigida do integrador. Apenas figuram os valores superiores ou iguais a 1 % .

	M. galloprovincialis		C. edule		S. solida	
	Junho	Dezembro	Julho	Dezembro	Junho	Dezembro
C14:0	6.07	2.24	3.33	4.81	6.25	3.85
C15:2	1.00	.43	1.22	1.39	.33	.99
C16:0	13.29	16.53	14.12	15.67	13.40	16.71
C16:1w7	8.05	6.27	2.21	3.25	10.80	5.45
C16:3w3	4.06	4.85	5.95	4.88	2.88	1.72
C18:0	3.29	2.97	8.13	6.11	4.18	5.59
C18:1w9	.91	1.76	1.61	1.21	1.38	3.39
w7	2.48	2.60	2.58	1.97	3.79	5.18
C18:2w6	.68	1.34	1.08	.85	.36	1.13
C18:3w3	.53	.96	.34	.64	.33	.96
C18:4w3	1.33	1.20	.52	1.43	1.72	2.47
C20:1w11	1.41	1.53	1.28	.73	.37	.74
w9	1.24	.88	.81	.64	.85	1.82
w7	.97	2.21	1.85	.64	1.21	1.46
C20:4w6	2.53	3.69	3.84	2.99	1.57	1.68
C20:5w3	23.24	13.88	9.30	11.70	22.17	14.02
C21:5w2	.55	1.03	2.93	3.37	.19	.00
C22:2	2.55	4.70	4.93	3.28	1.53	1.90
C22:6w3	11.64	11.35	16.43	12.13	10.06	12.24
Razão w3:w6	8.4:1	5.2:1	4.2:1	5.0:1	7.6:1	4.7:1

TABELA IV

Composição centesimal em ácidos gordos de:

Poliquetas: *Nereis diversicolor*, *Diopatra neapolitana* e *Marphysa sanguinea*

	N. diversicolor		D. neapolitana		M. sanguinea
	Julho	Janeiro	Junho	Fevereiro	Dezembro
C14:0	.93	1.28	2.69	3.07	2.20
C16:0	17.72	14.32	9.41	18.83	11.06
C16:1w7	1.06	1.40	1.79	6.04	1.80
C16:3w3	2.77	1.87	2.89	7.45	1.78
C18:0	5.60	4.35	5.55	8.12	3.50
C18:1w11	3.37	2.72	.11	1.25	.64
w9	9.76	12.97	1.08	3.27	3.96
w7	2.71	2.64	3.47	4.09	4.11
C18:2w6	13.58	19.41	.77	2.19	1.50
C18:3w3	1.47	2.05	4.20	.79	1.20
C20:1w11	2.19	1.81	2.33	1.61	5.34
w9	1.60	1.15	1.13	1.43	2.77
C20:2w6	6.58	4.50	5.30	.33	2.88
C20:4w6	4.32	2.00	1.44	1.44	7.18
C20:5w3	8.97	9.62	9.49	8.35	8.35
C22:2	1.23	1.15	5.80	7.45	7.31
C22:4w6	1.32	.41	2.22	.00	9.32
C22:6w3	1.04	.88	.59	3.17	.71
C23:2	.00	.00	4.32	.43	4.29
Razão w3:w6	1:1.8	1:1.8	1.9:1	5.4:1	1:1.7

É de notar em *Nereis diversicolor* a elevada percentagem de ácido linoleico (C18:2 ω 6) - 13.58% em Julho e 19.41% em Janeiro.

CONCLUSÕES

Em face dos resultados analíticos obtidos pode-se sugerir que os bivalves estudados constituem boas fontes de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (C20:4 ω 6, C20:5 ω 3 e C22:6 ω 3), especialmente importantes na nutrição de crustáceos marinhos em maturação (Middleditch *et al*, 1979). Possuem valores da razão ω 3: ω 6 elevados que beneficiam o crescimento de penaeídeos e carídeos (New, 1976). São contudo pobres em ácido linoleico, C18:2 ω 6 e especialmente em ácido linolénico, C18:3 ω 3 que é considerado essencial na dieta de penaeídeos (Kanazawa *et al*, 1979). Parecem ainda apresentar um máximo de acumulação de lípidos nas épocas coincidentes com a maturação e postura de camarões penaeídeos.

Os poliquetas estudados, pelo contrário, são menos ricos em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, estando C22:6 ω 3 praticamente representado ao nível de traço, mas por outro lado apresentam boas concentrações em C18:2 ω 6 e C18:3 ω 3, baixos valores para a razão ω 3: ω 6 e elevadas concentrações em lípidos nos meses mais frios, o que os tornam dietas particularmente favoráveis para peixes marinhos em maturação.

Dada a estreita associação trófica entre os Soleidae do Estuário do Tejo e *Nereis diversicolor* (Costa, 1982), pode-se sugerir que estas espécies apresentem necessidades nutritivas ao nível de conteúdo e composição lipídicas semelhantes à composição lipídica de *N. diversicolor*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no âmbito do Contrato de Investigação com o Instituto Nacional de Investigação Científica, INIC 83/CA/9.

REFERÊNCIAS

- Ackman, R.G., J.C. Sipos and P.M. Jangaard (1967) A quantitation problem in the open tubular gas chromatography of fatty acid esters from cod liver lipids. *Lipids* 2(3), 251- 257.

- Beninger, P.G. and A. Lucas (1984) Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* and *Tapes philippinarum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **79**, 19-37.
- Bligh, E.G. and W.J. Dyer (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
- Costa, M.J.R. (1982) Contribution à l'étude de l'écologie des poissons de l'estuaire du Tage (Portugal). *Thèse de doctorat ès-sciences, Université Paris VII*.
- Costa, A.M. e M.M. Machado (1987) Aspectos do ciclo reprodutivo em *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Seminário sobre Aquacultura*. Porto 9-11 de Abril 1987.
- Giese, A.C. (1966) Lipids in the economy of marine invertebrates. *Physiol. Rev.* **46**, 244-298.
- Hayashi, K. (1986) Seasonal changes in eicosapentaenoic acid content of hepatopancreas of scallop *Patinopecten yessoensis*. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish.* **52**(9), 1559-1563.
- Kanazawa, A., S. Teshima, S. Tokiwa and H.J. Ceccaldi (1979) Effects of dietary linoleic and linolenic acids on growth of prawn. *Oceanologica Acta* **2**(1), 41-47.
- Martin, B.J. (1978) Teneur en lipides et composition en acides gras des oeufs de *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda) au cours de l'embryogenèse. *C. R. Soc. Biol.* **172**(6), 1168-1172.
- Metcalfe, L.D. and A.A. Schmitz (1961) The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* **33**(3), 363.
- Middleditch, B.S., S.R. Missler, D.G. Ward, J.B. Mcvey, A. Brown and A. L. Lawrence (1979) Maturation of penaeid shrimp: dietary fatty acids. *Proc. World Maricul. Soc.* **10**, 472-476.
- Morris, R.J. and F. Culkin (1976) Marine lipids: analytical techniques fatty acid ester analyses. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **14**, 391-433.
- New, M.B. (1976) A review of dietary studies with shrimp and prawns. *Aquaculture* **9**, 101-144.
- Pocock, D.M.-E., J.R. Marsden and J.G. Hamilton (1971) Lipids in an intertidal polychaete and their relation to maturation of the worm. *Comp. Biochem. Physiol.* **39A**, 683-697.