



VALQUÍRIA APARECIDA ALVES BASTOS

**COMPARAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO E DA
LIPOGÊNESE HEPÁTICA ENTRE OS PEIXES
TROGLÓBIOS *Ancistrus cryptophthalmus* E
EPÍGEOS *Ancistrus* sp.**

LAVRAS - MG

2012

VALQUÍRIA APARECIDA ALVES BASTOS

**COMPARAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO E DA LIPOGÊNESE
HEPÁTICA ENTRE OS PEIXES TROGLÓBIOS *Ancistrus
cryptophthalmus* E EPÍGEOS *Ancistrus* sp.**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agroquímica, para a
obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Luciana de Matos Alves Pinto

Coorientador

Dr. Rodrigo Lopes Ferreira

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Bastos, Valquíria Aparecida Alves.

Comparação do perfil lipídico e da lipogênese hepática entre os peixes troglóbios *Ancistrus cryptophthalmus* e epígeos *Ancistrus* sp. / Valquíria Aparecida Alves Bastos. – Lavras : UFLA, 2012.
95 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.
Orientador: Luciana de Matos Alves Pinto.
Bibliografia.

1. Peixe cavernícola. 2. Enzima málica. 3. Enzima glicose-6-fosfato desidrogenase. 4. Ácido graxo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.77

VALQUÍRIA APARECIDA ALVES BASTOS

**COMPARAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO E DA LIPOGÊNESE
HEPÁTICA ENTRE OS PEIXES TROGLÓBIOS *Ancistrus
cryptophthalmus* E EPÍGEOS *Ancistrus* sp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de fevereiro de 2012.

Dra. Adelar Aparecida Saczk UFLA

Dr. Paulo Afonso Granjeiro UFSJ

Dra. Luciana de Matos Alves Pinto
Orientadora

Dr. Rodrigo Lopes Ferreira
Coorientador

LAVRAS - MG

2012

Aos meus pais Francisco e Marluce, com todo amor, carinho e gratidão

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À Secretaria do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos do estado de Goiás (Semarh – GO) e ao IBAMA, pela outorgação da licença que disponibilizou os animais utilizados nesse estudo.

À Profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto pelos ensinamentos transmitidos, orientação, disponibilidade, dedicação e valiosa contribuição para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Lopes Ferreira pela orientação, dedicação e pelos ótimos momentos vividos no período de coleta dos peixes.

À Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk pelos ensinamentos transmitidos e pelas valiosas contribuições a este trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Química da UFLA, em especial a Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa, a Profa. Dra. Celeste Maria Patto de Abreu, ao Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos, ao Prof. Dr. Márcio Pozzobon Pedroso ao Prof. Dr. Mário César Guerreiro, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Silva de Oliveira pelo auxílio com a análise estatística.

Aos Laboratoristas Xulita e Joalis pela amizade e grande ajuda prestada.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica, pela ajuda prestada e pelas alegrias compartilhadas.

Aos funcionários do Parque Estadual Terra Ronca pela hospitalidade.

Aos amigos Aline Monteiro e Daniel Okamura pela disponibilidade, presteza e inúmeras contribuições relevantes para este estudo.

Aos colegas Alexandre Sampaio, Matheus e aos funcionários da Semarh Fernando e Bruno pelo grande apoio durante a coleta dos peixes.

À Cris, pela paciência e prontidão apresentadas durante as análises cromatográficas.

Aos meus grandes amores Francisco, Marluce e Felipe por tornarem meu mundo melhor.

Aos meus lindos avós Chico (*in memoriam*) e Nilza pelas orações.

À Deus por tudo!

RESUMO

O conjunto de características apresentadas pelos ambientes subterrâneos, além de provocar mudanças físicas nos organismos que vivem nesse meio, pode interferir no metabolismo desses animais. O presente teve como objetivo realizar uma comparação entre o perfil lipídico e lipogênese hepática de duas espécies de peixes: a espécie troglóbia *Ancistrus cryptophthalmus* e a epígea *Ancistrus* sp.. Foram coletados para este estudo 10 peixes troglóbios na caverna Lapa do Angélica, localizada no Parque Estadual do Terra Ronca no estado de Goiás, e 10 peixes não cavernícolas do mesmo gênero (*Ancistrus* sp.) na parte epígea do Rio Angélica. Os resultados obtidos para a caracterização do ambiente cavernícola, indicaram temperatura superior (25,2° C) a do ambiente epígeo (24,8° C) e menor disponibilidade de matéria orgânica (1,84 e 0,38g/cm² respectivamente). Quanto aos teores de lipídios totais, verificou-se maior acúmulo nos peixes da espécie cavernícola (18,36 g/100g de tecido), que pode ser atribuído a adaptação desses peixes à ambientes com disponibilidade limitada de recursos alimentares. O perfil de ácidos graxos muscular também variou entre as duas espécies. Merecem destaque o ácido araquidônico, que foi identificado somente nos peixes de origem epígea e o ácido docosahexaenóico que predominou nos peixes cavernícolas. No perfil lipídico do *Ancistrus cryptophthalmus* foi verificada maior proporção de ácidos graxos saturados, seguidos dos monoinsaturados e poliinsaturados; já o *Ancistrus* sp. apresentou predominância de ácidos graxos monoinsaturados. Diferenças significativas também foram observadas na atividade das enzimas hepáticas, málica e glicose-6-fosfato desidrogenase. A atividade das duas enzimas foi maior nos animais epígeos. Esses resultados também podem ser relacionados com a disponibilidade de alimentos nos dois ambientes distintos. Observou-se ainda a existência de uma zona de ecótono localizada próxima a entrada da caverna Angélica, onde os peixes apresentam características intermediárias entre as espécies hipógea e epígea. Conclui-se, dessa forma, que as características próprias ao meio cavernícola influenciam de maneira significativa a composição muscular de ácidos graxos e a lipogênese nos peixes da espécie troglóbia *Ancistrus cryptophthalmus*.

Palavras-chave: *Ancistrus cryptophthalmus*. *Ancistrus* sp. Ácidos graxos (fatty acids). Enzima málica (malic enzyme). Glicose-6-fosfato desidrogenase (glucose-6-phosphate dehydrogenase).

ABSTRACT

The set of characteristics presented by underground environments, besides causing physical changes in the organisms that live in that environment, can interfere in the metabolism of these animals. The present work had the aim of evaluating the influence of the underground environment on the lipid composition and hepatic lipogenesis of troglobitic fish *Ancistrus cryptophthalmus*. Ten troglobitic fish were collected in the cave Lapa do Angélica, located in Parque Estadual do Terra Ronca, and ten non-cave fish of the same gender (*Ancistrus* sp.) in the epigeal part of Rio Angélica. The results obtained for the characterization of the cave environment indicated a superior temperature (25.2°C), compared to the epigeal environment (24.8°C) and a lower availability of organic matter (1.84 e 0.38g/cm² respectively). Regarding the total lipids content, there was greater accumulation in the cave fish (18.36 g/100g tissue), that can be attributed to the adaptation of the fish to environments with limited food resources. The muscle fatty acid profile also varied between the two species. It is worth mentioning the arachidonic acid, that was identified only in the epigeal fish, and the docosahexaenoic acid, that prevailed in the cave fish. In the lipid profile of *Ancistrus cryptophthalmus* there was a bigger proportion of saturated fatty acids, followed by monounsaturated and polyunsaturated ones; *Ancistrus* sp. showed a predominance of monounsaturated fatty acids. Significant differences were also observed in the hepatic enzymes activity, as well as in the malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase. The activity of the two enzymes was greater in the epigeal animals. These results can be related to the availability of food in the distinct environments. It was also observed the existence of an ecotone zone, located next to the entrance of the cave Lapa do Angélica, where the fish present intermediate characteristics between the hypogeal and epigeal species. Thus, the conclusion is that the characteristics of the cave significantly influence the muscle composition of fatty acids and lipogenesis of troglobitic fish *Ancistrus cryptophthalmus*.

Keywords: *Ancistrus cryptophthalmus*. *Ancistrus* sp. Fatty acids. Malic enzyme. Glucose 6-phosphate dehydrogenase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do ácido palmítico (a) e do ácido oléico (b)	25
Figura 2	Estrutura do ácido linolênico (a) e ácido linoléico (b)	26
Figura 3	Produção do acetil-CoA citossólico	28
Figura 4	As quatro etapas da biossíntese de ácidos graxos	30
Figura 5	Formação de ácidos graxos a partir de excedentes da dieta	31
Figura 6	Fase oxidativa da via das pentoses fosfato	33
Figura 7	Produção de NADPH catalisada pela enzima málica.....	33
Figura 8	Biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados em peixes.....	36
Figura 9	Entrada da Lapa do Angélica	41
Figura 10	Localização do município de São Domingos, no estado de Goiás..	42
Figura 11	<i>Ancistrus cryptophthalmus</i>	43
Figura 12	<i>Ancistrus sp.</i>	43
Figura 13	Mapa da caverna Angélica com destaque nos dois pontos de coleta	45
Figura 14	Dissecação do <i>Ancistrus sp.</i> com destaque para o tecido hepático .	46
Figura 15	Fluxograma das análises realizadas.....	46
Figura 16	Substrato epígeo	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Peso e extrato etéreo dos peixes epígeos e troglóbios.....	57
Gráfico 2	Varição dos ácidos graxos entre os peixes epígeos e hipógeos....	63
Gráfico 3	Composição de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI) nas espécies epígea e hipógea.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais ácidos graxos de ocorrência natural.....	25
Tabela 2	Características físico-químicas dos pontos de coleta.....	53
Tabela 3	Peso e extrato etéreo das amostras	55
Tabela 4	Perfil de ácidos graxos das espécies <i>Ancistrus cryptophthalmus</i> e <i>Ancistrus</i> sp.	60
Tabela 5	Atividade específica das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e málica nos peixes de origem epígea e hipógea.	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	Cavernas	16
3.2	Fauna cavernícola	18
3.2.1	Peixes cavernícolas	20
3.3	Lipídios	23
3.3.1	Ácidos graxos	24
3.3.2	Lipogênese	27
3.3.3	Composição de ácidos graxos em peixes	34
3.4	Identificação e detecção de lipídios por cromatografia gasosa	37
3.4.1	Métodos para a extração lipídica	38
3.4.2	Métodos para a esterificação de ácidos graxos	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Descrição da área de coleta	41
4.2	Descrição das espécies	42
4.3	Descrição da coleta e tratamento das amostras	44
4.3.1	Análise de extrato etéreo	47
4.3.2	Extração de lipídios	47
4.3.3	Esterificação	48
4.3.4	Caracterização dos ésteres de ácidos graxos	48
4.3.5	Determinação da atividade da enzima málica	49
4.3.6	Determinação da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase	51
4.3.7	Determinação da matéria orgânica nos substratos	52
4.4	Análise estatística	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	Características físico-químicas dos locais de coleta	53
5.2	Extrato etéreo	55
5.3	Perfil lipídico muscular	58
5.4	Atividade enzimática	69
6	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O ambiente subterrâneo sempre exerceu fascínio sobre a humanidade devido ao conjunto de características peculiares como a ausência de luz natural, estabilidade climática e, principalmente, pela sua fauna, uma vez que, muito se questiona sobre as formas de sobrevivência destes seres num ambiente aparentemente inóspito onde o alimento é escasso.

No Brasil, as primeiras citações de animais cavernícolas remontam à relatos da presença de pegadas de onças e morcegos. O primeiro animal exclusivamente cavernícola descrito foi o bagre cego de Iporanga, *Pinlelodella kronei*, em 1907.

A fauna cavernícola pode ser dividida em três componentes básicos: troglóxenos, troglófilos, e troglóbios. As espécies troglóxenas podem ser encontradas em cavernas, mas, necessariamente, saem delas para completar seu ciclo de vida. Os organismos troglófilos podem formar populações tanto no ambiente epígeo (externo) quanto no ambiente hipógeo (interno). Já os organismos troglóbios são exclusivamente cavernícolas. Acredita-se que o ambiente diferenciado encontrado nas cavernas possa favorecer o aparecimento de algumas modificações adaptativas nos animais troglóbios como redução dos olhos e da pigmentação corporal.

O Brasil se destaca no cenário mundial por possuir grande número de espécies de peixes troglóbios altamente especializados ao modo de vida subterrâneo, dentre as quais se destaca a espécie *Ancistrus cryptophthalmus* por apresentar uma população expressivamente numerosa quando comparada a outras populações cavernícolas.

Nos peixes, os lipídios são responsáveis por desempenhar uma ampla variedade de funções. Eles atuam como componentes estruturais de grande importância nas membranas biológicas, desempenham os papéis de fornecedores

e armazenadores de energia e ainda apresentam funções como co-fatores enzimáticos, pigmentos, hormônios e mensageiros intracelulares. Assim, a capacidade de sintetizar uma grande variedade de lipídios é essencial.

A composição lipídica de peixes, assim como atividades de enzimas relacionadas com a lipogênese como a enzima málica e a glicose-6-fosfato desidrogenase, são alvos de diversas pesquisas e podem ser relacionadas com características biológicas, fisiológicas e ecológicas das espécies.

Com relação aos peixes cavernícolas, muitos trabalhos têm sido realizados sobre o grau de troglomorfismo e evolução, por outro lado, estudos acerca do seu metabolismo raramente são encontrados.

Os estudos sobre o metabolismo fornecem elementos para que se possa compreender as necessidades básicas dos animais e, portanto, são primordiais para o entendimento dos hábitos dos peixes troglóbios.

Dessa forma, buscou-se com este trabalho, contribuir para a compreensão da evolução dos grupos estritamente cavernícolas e para a proteção das espécies e das cavernas às quais se associam.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar uma comparação entre o perfil lipídico e lipogênese hepática de duas espécies de peixes: a espécie troglóbia *Ancistrus cryptophthalmus* e a epígea *Ancistrus* sp. Buscou-se, dessa forma, evidenciar as similaridades e diferenças entre indivíduos do mesmo gênero submetidos a ambientes distintos.

2.2 Objetivos específicos

- a) determinar o perfil de ácidos graxos do tecido muscular de peixes das espécies *Ancistrus cryptophthalmus* e *Ancistrus* sp.;
- b) avaliar a atividade da enzima hepática málica nos peixes das espécies *Ancistrus cryptophthalmus* e *Ancistrus* sp.;
- c) avaliar a atividade da enzima hepática glicose-6-fosfato desidrogenase nos peixes das espécies *Ancistrus cryptophthalmus* e *Ancistrus* sp.;
- d) investigar a presença de uma zona de ecótono, entre os meios cavernícola e epígeo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cavernas

As cavernas podem ser definidas como todo e qualquer espaço subterrâneo acessível pelo ser humano, incluindo seu ambiente, conteúdo mineral e hídrico e o corpo rochoso onde os mesmos se inserem desde que tenham sido formados por processos naturais, independentemente de suas dimensões ou tipo de rocha encaixante (BRASIL, 2008).

Estima-se que o potencial espeleológico brasileiro possa exceder 100.000 cavernas, contudo, somente cerca de 7.000 encontram-se cadastradas (AULER et al., 2009).

O ambiente subterrâneo contém um universo de inigualável riqueza natural e social. No entanto, sua fauna singular, flora escassa e os importantes recursos minerais fazem desse ecossistema um dos mais frágeis e vulneráveis que existe na Terra (FERREIRA et al., 2010).

De acordo com Auler et al. (2009), são três os processos responsáveis pela formação de uma caverna: acúmulo de sedimentos, remoção de sedimentos e a sedimentação por reações químicas. Todos esses processos estão intimamente ligados a condições climáticas e hidrodinâmicas que atuam sobre a rocha encaixante ao longo dos anos.

Dessa forma, as cavernas, geralmente, são encontradas em terrenos onde a ação mecânica dos rios apresenta força significativa. Seu ambiente de entorno apresenta, como principal característica, a elevada solubilidade das rochas, sendo composto, muitas vezes, por rochas carbonáticas como a dolomita, a calcita e o calcário (LEÓN, 2004; ROLDAN; WAHNFRIED; KLEIN, 2004).

Verifica-se, portanto, que a ação da água é de extrema importância na gênese das cavernas uma vez que participa ativamente na formação, na

moldagem e na deposição de inúmeras de suas feições além de ser responsável pela sua dinamicidade geológica e biológica.

O ambiente cavernícola apresenta algumas propriedades peculiares e, de maneira geral, pode ser caracterizado como um sistema labiríntico de espaços mantidos na ausência de luz com elevada umidade relativa do ar e temperaturas constantes (HOENEN, 2010). De acordo com Trajano (2010) estas características são determinadas pela topografia da caverna (forma geral, tamanho, número e posição das entradas).

No biótopo subterrâneo, fica impossibilitada a vida de organismos que dependam da luz como fonte de energia, como as plantas fotossintetizantes. Esses organismos constituem a principal fonte de energia e matéria orgânica para os organismos heterotróficos (FERREIRA; MARTINS, 1998; FERREIRA; MARTINS; YANEGA, 2000).

Assim, na maioria das cavernas, o que se observa são comunidades animais mantidas principalmente por fontes alóctones de energia. A matéria orgânica necessária para a manutenção da vida nas cavernas, então, é importada do meio externo pela ação da água, do ar ou, ainda, pelos animais troglóxenos. Configura-se, assim, uma situação de escassez alimentar no meio subterrâneo (RIZZATO et al., 2009).

Muitas vezes, regiões próximas às entradas das cavernas, demonstram gradientes de modificações estruturais, biológicas e físicas, criando uma zona de transição entre os sistemas epígeo e hipógeo. A entrada de uma caverna pode ser considerada, então, um ecótono, ou seja, uma zona diferenciada pelo equilíbrio entre a disponibilidade de recursos (característica epígea) e pela estabilidade ambiental (característica hipógea) (PROUS; FERREIRA; MARTINS, 2004).

Devido à peculiaridade desse ecossistema, as cavernas foram consideradas como um ambiente depauperado em termos de biodiversidade durante muitos anos (ROMERO, 2009). No entanto, sabe-se hoje que as

cavernas representam recursos de grande valor cultural, econômico e, principalmente, ecológico-científico (FERREIRA et al., 2010). Motivos pelos quais as cavernas vêm atraindo cada vez mais atenção da comunidade científica.

3.2 Fauna cavernícola

Em bioespeleologia é comum que o mundo seja dividido em dois ambientes: o ambiente epígeo e o hipógeo. O primeiro corresponde ao ambiente externo. Já o segundo é representado por toda parte da biosfera que fica localizada abaixo da terra (ROMERO, 2009).

Como descrito anteriormente, o ambiente hipógeo apresenta características peculiares. Estas características representam um fator limitante ao estabelecimento de inúmeras espécies nos ecossistemas subterrâneos (TRAJANO; DUARTE; MENNA-BARRETO, 2005). Assim, para que um grupo de indivíduos consiga sobreviver à colonização do meio hipógeo é necessário que ele seja capaz de desenvolver adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, geralmente ligadas às limitações físicas e à baixa disponibilidade de alimentos (MATHIEU; HERVANT, 2006).

Segundo Andrade (2010), são considerados cavernícolas os organismos que passam pelo menos uma parte do seu ciclo de vida no ambiente subterrâneo.

Esses organismos, no entanto, podem apresentar diferentes graus de modificações relacionadas à vida cavernícola. Em função disso, foi proposta uma classificação conhecida por classificação de Schiner-Racovitza. Esse modelo é aceito até hoje com algumas modificações e agrupa os animais cavernícolas em três categorias: troglóxenos, troglófilos e troglóbios. Atualmente, acrescentou-se às três primeiras uma quarta categoria para os animais acidentais, que podem ser encontrados em cavernas de forma isolada, ou

seja, não formam populações hipógeas (RIZZATO et al., 2011; ROMERO; PAULSON, 2001).

A população troglóxena é formada por indivíduos que são normalmente encontrados nos ambientes subterrâneos, porém, saem regularmente do mesmo para completar o seu ciclo de vida (FELICE; VISCONTI; TRAJANO, 2008) como, por exemplo, os morcegos e corujas que necessitam sair periodicamente da caverna para se alimentarem.

Os troglófilos são organismos capazes de completar seu ciclo de vida no meio hipógeo e/ou epígeo (HOENEN, 2010).

A distinção entre animais troglófilos e troglógenos é complexa, uma vez que, a mesma espécie pode formar uma população troglóxena em uma caverna e população troglófila em outra, em função da disponibilidade de alimento (BICHUETTE; TRAJANO, 2003).

Já os organismos troglóbios são exclusivamente subterrâneos e, usualmente, exibem apomorfias relacionadas à evolução em isolamento no ambiente cavernícola (FELICE; VISCONTI; TRAJANO, 2008). Muitas vezes, os troglóbios apresentam alto grau de diferenciação quando comparados a animais de espécies semelhantes, que habitam o meio epígeo, como, por exemplo, a redução ou a perda das estruturas oculares e da pigmentação (BICHUETTE; TRAJANO, 2003), elevada capacidade de armazenamento de nutrientes e de passar longos períodos em jejum, regressão da capacidade locomotora e diminuição do ritmo cardíaco (DUMNICKA, 2002). Cada uma dessas adaptações, ou o conjunto das mesmas, recebem o nome de troglomorfismo (FELICE; VISCONTI; TRAJANO, 2008).

Atualmente, o número de espécies troglomórficas identificadas está entre 50.000 e 100.000. Este número é bastante elevado, principalmente se for levado em consideração que estes animais são encontrados em espaços limitados e pobres em recursos alimentares (SKET, 2006).

Cabe ainda destacar que existem cavernas em diversas regiões do planeta e que estas apresentam condições diferenciadas de temperatura, umidade, tamanho e suprimento de água. O único fator comum a todos os tipos de cavernas é a ausência de luminosidade no seu interior (MATHIEU; HERVANT, 2006). Sendo assim, verifica-se que duas das principais adaptações apresentadas por animais cavernícolas estão associadas à ausência do fotoperíodo: redução das estruturas oculares e da pigmentação corporal.

Os mecanismos envolvidos nessa “evolução regressiva” ainda são pouco conhecidos. Sabe-se, no entanto, que a regressão favorece a manutenção da vida no meio cavernícola (JEFFERY, 2001).

As características ecológicas mais marcantes apresentadas pela maior parte das populações cavernícolas são o seu pequeno tamanho e sua distribuição geográfica restrita. Esses animais, normalmente, são demasiadamente vulneráveis a perturbações ambientais, apresentam sensibilidade ao estresse e procriação lenta (BICHUETTE; TRAJANO, 2008). Visto a fragilidade destas populações, verifica-se a importância de trabalhos que favoreçam sua preservação.

3.2.1 Peixes cavernícolas

Além das salamandras, os peixes são os únicos vertebrados que até o momento apresentaram habilidade para colonizar ambientes caracterizados pela contínua falta de luminosidade (WILKENS, 2005).

Cerca de 28.000 espécies de peixes são conhecidas ao redor do mundo. Dentre estas, 299 já foram reportadas no ambiente hipógeo, sendo pelo menos 86 as que apresentam algum grau de troglomorfofismo (ROMERO, 2009; ROMERO; PAULSON, 2001).

Algumas regiões do planeta, concentradas principalmente em áreas tropicais como China, Brasil, México e sudoeste da Ásia, são ricas em espécies cavernícolas (SECUTTI; TRAJANO, 2009). Já em regiões temperadas como a Europa são raros os relatos acerca de peixes troglóbios (ROMERO, 2009).

O Brasil destaca-se mundialmente pela riqueza em peixes subterrâneos e também pelo número de espécies troglomórficas (FELICE; VISCONTI; TRAJANO, 2008). Mattox et al. (2008) destacam que existem relatos de que mais de 20 espécies de peixes subterrâneos habitam cavernas brasileiras, e apresentam troglomorfa clássica, ou seja, apresentam algum grau de regressão quando comparados a espécies epígeas.

Porém, deve-se salientar que o conhecimento a respeito dos ambientes subterrâneos é limitado e assim o número de espécies hipógeas pode ser maior do que o estipulado pelas pesquisas realizadas até o presente momento, principalmente em cavernas tropicais, que contém fauna abundante e diversificada (RENNO et al., 2007).

As condições características a um ambiente subterrâneo como a ausência do fotoperíodo, disponibilidade limitada de alimento e espaço restrito, não favorecem o desenvolvimento de populações. Alguns fatores, então, são primordiais para que espécies de peixes possam povoar as áreas cársticas como a adoção de uma dieta essencialmente detritiva associada a hábitos noturnos e fotofobia (REIS; TRAJANO; HINGST-ZAHER, 2006).

Todas as espécies de peixes troglomórficos encontradas ao redor do mundo pertencem a um total de 18 famílias, normalmente com pré-adaptações as condições subterrâneas (WILKENS, 2005).

A grande maioria dos peixes encontrados em cavernas pertence ao grupo dos *Siluriformes* (bagres e cascudos) e dos *Gymnotiformes* (peixes elétricos). Esses peixes são, geralmente, noturnos ou de águas turvas e se orientam pela

gustação, olfato, percepção de vibrações e, no caso dos últimos, também pelo campo eletromagnético (TRAJANO, 2010).

Dentre os peixes troglóbios encontrados no Brasil, destacam-se os cascudos da família *Ancistrus*, sendo que duas espécies desse gênero se encontram descritas: o *Ancistrus cryptophthalmus* encontrada no estado de Goiás e a espécie *Ancistrus formoso* identificada em um sistema cárstico do estado do Mato Grosso do Sul (REIS; TRAJANO; HINGST-ZAHER, 2006). Essas espécies apresentam diferenças quanto à morfologia, fisiologia, grau de troglomorfose e, também, quanto a características ecológicas (TRAJANO; BICHUETTE, 2007).

Embora os exemplares mais notáveis da fauna cavernícola sejam totalmente despigmentados e cegos, o que ocorre na maioria dos casos é uma grande variação no grau de regressão apresentado pelos peixes, mesmo dentro de uma mesma espécie (ROMERO; PAULSON, 2001).

O tamanho corporal dos peixes cavernícolas é outro assunto ainda a ser explorado. Aparentemente, a redução do tamanho deveria resultar em uma vantagem competitiva num ecossistema de dimensões reduzidas. Porém, sabe-se que algumas populações hipógeas apresentam corpo maior que seu correspondente epígeo (ROMERO, 2009).

Um assunto adicional a ser discutido é que a falta de produção primária, ocasionada pela ausência de iluminação natural, provoca uma limitação na disponibilidade de alimento. Dessa forma, os peixes cavernícolas tendem a desenvolver um mecanismo elaborado de busca por comida e também uma melhor capacidade de armazenamento de energia (WILKENS, 2005).

Sobre o metabolismo dos peixes cavernícolas, poucas informações estão disponíveis. Todavia, acredita-se que esses animais apresentem hipometabolismo e capacidade de resistir e se recuperar com maior facilidade de longos períodos de jejum do que um animal epígeo (SALIN et al., 2010).

Com poucas exceções, as populações hipógeas de peixes se apresentam completamente isoladas e com um pequeno número de indivíduos. Por este motivo estes animais podem ser considerados únicos do ponto de vista ecológico e são um excelente material para estudos sobre a evolução e adaptação das espécies (ROMERO, 2009).

3.3 Lipídios

O grupo dos lipídios é composto por um conjunto de substâncias que apresentam estrutura química diferenciada e cuja característica em comum que os define, é sua insolubilidade em água (NELSON; COX, 2010).

Esta classe de biomolécula é responsável por desempenhar diversas funções nos organismos, dentre as quais se podem citar: função energética, sendo armazenados nos organismos como triacilgliceróis até sua utilização; função estrutural, pois são os principais componentes de membranas celulares e responsáveis por manter a integridade, forma e permeabilidade celular; atuação em processos fisiológicos, uma vez que os lipídios da dieta são decisivos para o funcionamento de cada órgão e tecido por estarem diretamente relacionados com a produção de eicosanóides; transporte de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) ajudando na sua absorção; entre outros (VOET; VOET; PRATT, 2000).

Em animais ectotérmicos, como os peixes, os lipídios polares atuam como componentes estruturais responsáveis pela manutenção da fluidez da membrana plasmática; já os lipídios neutros, como os triacilgliceróis, atuam como fornecedores e armazenadores da energia, podendo ser utilizados para a realização das funções fisiológicas básicas (BROWN; MURPHY, 1995).

3.3.1 Ácidos graxos

Os ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos que podem ser representados pela fórmula RCO_2H onde R, geralmente, é uma cadeia carbônica não ramificada composta por um número par de átomos de carbono, podendo ser saturada ou conter uma ou mais insaturações (Tabela 1) (NELSON; COX, 2010). Eles podem existir nos organismos na forma livre (não esterificados) ou, também como ésteres de acila em moléculas mais complexas, tais como os triacilgliceróis, fosfolipídios e glicolipídios (CHAMP; HARVEY, 1997).

Todos os ácidos graxos apresentam um nome usual e, também, uma nomenclatura simplificada que especifica o número de átomos de carbono da cadeia, separado por dois pontos do número de insaturações e, por fim, a posição das duplas ligações, sendo os átomos de carbono numerados a partir do grupo carboxila (CONN; STUMPF, 1980). O ácido palmítico (Figura 1 a), por exemplo, é um ácido saturado com 16 átomos de carbono, sendo abreviado por 16:0, já o ácido oléico (Figura 1 b) que apresenta 18 átomos de carbono e uma insaturação localizada entre os carbonos 9 e 10 é abreviado 18:1 Δ^9 .

Tabela 1 Principais ácidos graxos de ocorrência natural

Esqueleto carbônico	Nome sistemático	Nome Comum
12:0	Ácido <i>n</i> -dodecanóico	Ácido láurico
14:0	Ácido <i>n</i> -tetradecanóico	Ácido mirístico
16:0	Ácido <i>n</i> -hexadecanóico	Ácido palmítico
18:0	Ácido <i>n</i> -octadecanóico	Ácido esteárico
20:0	Ácido <i>n</i> -eicosanóico	Ácido araquídico
24:0	Ácido <i>n</i> -tetracosanóico	Ácido lignocérico
16:1 (Δ^9)	Ácido <i>cis</i> -9-hexadecenóico	Ácido palmitoléico
18:1 (Δ^9)	Ácido <i>cis</i> -9-octadecenóico	Ácido oléico
18:2 ($\Delta^{9,12}$)	Ácido <i>cis, cis</i> -9-12-octadecadienóico	Ácido linoléico
18:3 ($\Delta^{9,12,15}$)	Ácido <i>cis, cis, cis</i> -9,12,15-octadecatrienóico	Ácido α -linolênico
20:4 ($\Delta^{5,8,11,14}$)	Ácido <i>cis, cis, cis, cis</i> -5,8,11,14-icosatetraenóico	Ácido araquidônico

Adaptado de Nelson e Cox (2010)

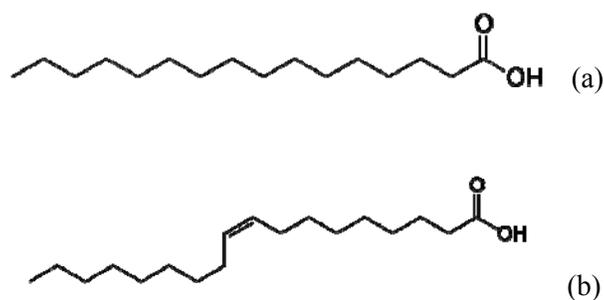


Figura 1 Estrutura do ácido palmítico (a) e do ácido oléico (b)

Do ponto de vista metabólico e fisiológico tem sido importante precisar a posição da última dupla ligação dos ácidos graxos insaturados em relação ao grupo metil terminal da cadeia carbônica. A informação fornecida está associada à famílias de ácidos graxos, como ômega-3, ômega-6 e ômega-9, as quais podem apresentar atividades biológicas diferenciadas (VISENTAINER; FRANCO, 2006).

Os ácidos graxos ω -3, ou n-3, são compostos poliinsaturados, que possuem a primeira ligação dupla localizada entre os carbonos 3 e 4 da cadeia alifática. Os principais ácidos graxos ω -3 são o ácido linolênico 18:3 (Figura 2 a), o ácido eicosapentaenóico 20:5 (EPA) e o ácido docosahexaenóico 22:6 (DHA).

Os ácidos graxos da série ω -6 (n-6), por sua vez, apresentam a primeira insaturação entre os carbonos 6 e 7 e seus principais representantes são o ácido linoléico 18:2 (Figura 2 b) e o ácido araquidônico 20:4 (ARA). Já os ácidos graxos ω -9 tem a primeira insaturação localizada entre os carbonos 9 e 10 da cadeia alifática (CAMPBELL, 2000).

Segundo Visentainer e Franco (2006) um ácido graxo de uma determinada família ômega pode ser considerado “nobre” para os animais, pois não pode ser convertido em um ácido graxo de outra família.

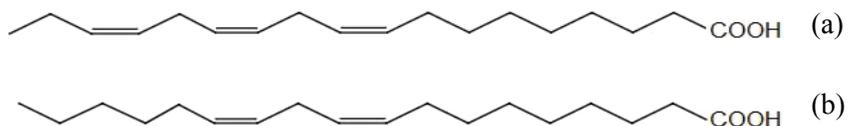


Figura 2 Estrutura do ácido linolênico (a) e ácido linoléico (b)

As famílias ω -3 e ω -6 têm diferentes funções fisiológicas uma vez que suas propriedades físicas e químicas são determinadas pelo número e posição das duplas ligações. Porém, atuam em conjunto para regular os processos biológicos (NEWTON, 1996).

Os tecidos animais têm capacidade limitada na síntese de determinados ácidos graxos como o ácido linoléico (ω -6) e linolênico (ω -3) que devem ser obtidos através da alimentação. Eles são então classificados como ácidos nutricionalmente “essenciais” (NELSON; COX, 2010).

Na família dos ω -3 destacam-se os ácidos graxos EPA e o DHA que apresentam efeitos marcantes na função leucocitária, afetando as respostas inflamatórias e imunitárias (CAMPBELL, 2000). O EPA também tem importante papel na produção de prostaglandina trombótica e tromboxano além de apresentar ações vasculares e hemostáticas. Já o DHA é o maior constituinte da porção fosfolipídica das células receptoras e está presente em diversos tecidos corporais (VISENTAINER et al., 2000).

Estudos demonstram que os ácidos graxos essenciais ω -3 poliinsaturados de cadeia longa, como EPA e DHA, agem no organismo reduzindo os níveis de colesterol LDL e de triacilgliceróis no sangue, e promovendo aumento nos níveis de colesterol HDL atuando assim na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (UGOALA; NDUKWE; AUDU, 2009).

3.3.2 Lipogênese

Os lipídios, como citado anteriormente, são as biomoléculas responsáveis por fornecer, além de energia, os ácidos graxos essenciais para o desenvolvimento e funcionamento normal do metabolismo do animal. Assim, a

capacidade de sintetizar uma grande variedade de ácidos graxos é essencial para todos os organismos vivos.

A lipogênese se inicia a partir de uma molécula de acetil-CoA proveniente da oxidação do piruvato nas mitocôndrias e do catabolismo dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos. Como a membrana mitocondrial interna é impermeável ao acetil-CoA, é necessária a ação de um transportador indireto para que os equivalentes do grupo acetil possam chegar ao citosol. O acetil-CoA intramitocondrial reage com oxaloacetato para formar citrato em uma reação catalisada pela citrato sintase. O citrato então passa para o citosol através do transportador de citrato. No citosol, a clivagem do citrato pela citrato liase regenera o acetil-CoA (Figura 3).

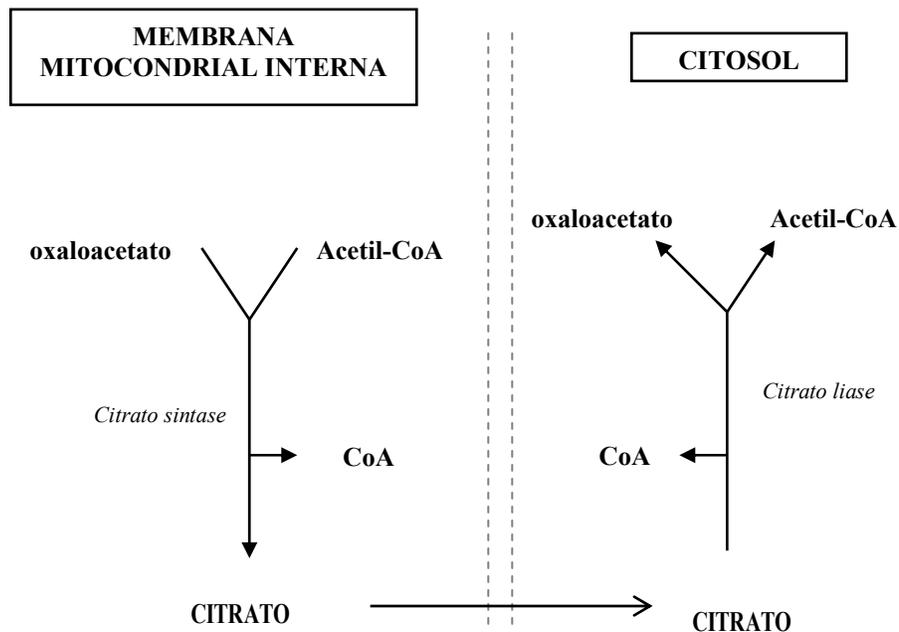


Figura 3 Produção do acetil-CoA citossólico

No citosol, a acetil-CoA é carboxilada e produz a malonil-CoA pela ação da acetil-CoA carboxilase. A malonil-CoA é o ponto de partida para a formação das longas cadeias carbônicas dos ácidos graxos em uma sequência repetitiva de quatro etapas (Figura 4) catalisadas por um complexo multienzimático denominado ácido graxo sintase e dependentes da força redutora do NADPH (CONN; STUMPF, 1980).

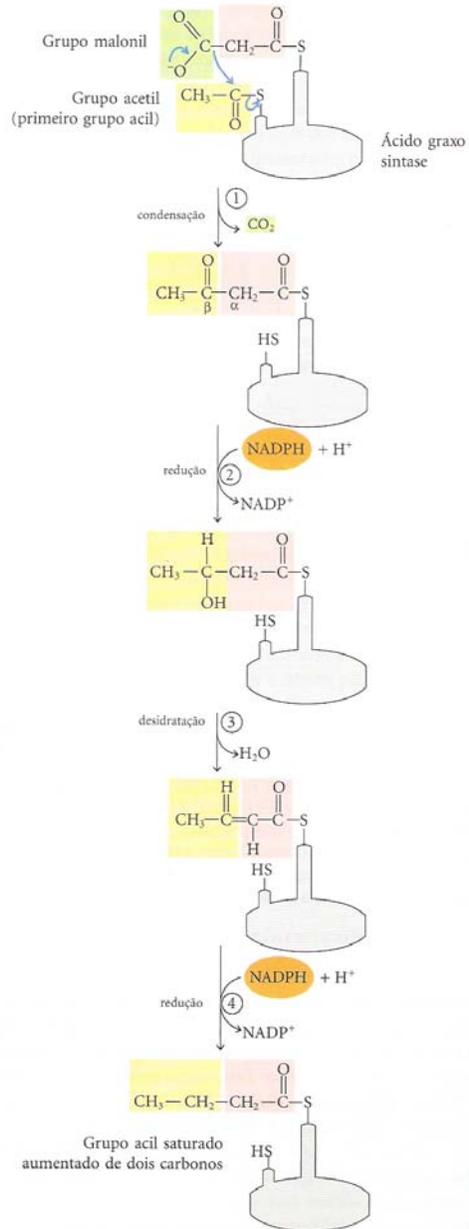


Figura 4 As quatro etapas da biossíntese de ácidos graxos
 Fonte: Nelson e Cox (2010)

A biossíntese de ácidos graxos envolve a adição sucessiva de duas unidades de carbono, provenientes do grupo malonil, à cadeia lipídica crescente. Para a maioria dos animais, o produto habitual dessa síntese é o palmitato. Os ácidos graxos mais longos são produzidos então, pela modificação dos ácidos graxos formados pela ácido graxo sintase (CAMPBELL, 2000).

As vias lipogênicas, nos animais, se encontram mais ativas no período absorptivo, isto é, quando a quantidade de energia fornecida pela dieta excede o gasto energético do organismo, conforme o representado pela Figura 5 (WANG et al., 2005).

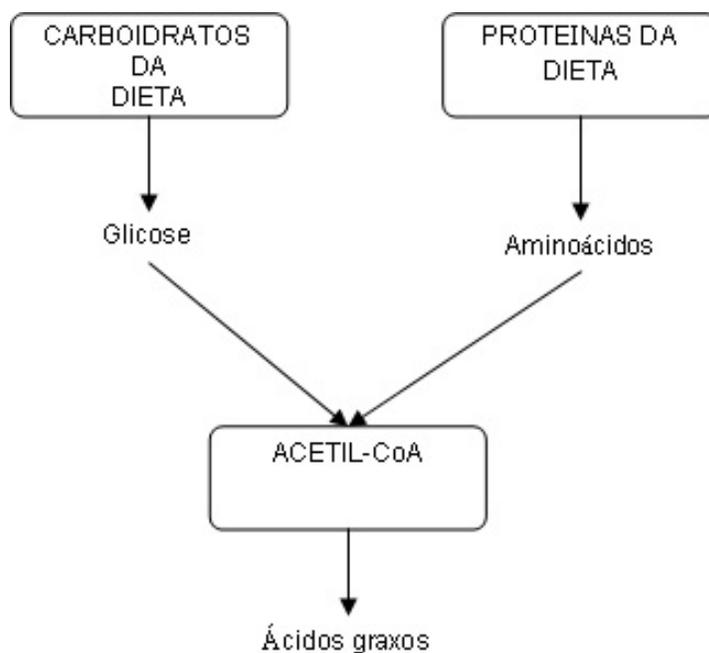


Figura 5 Formação de ácidos graxos a partir de excedentes da dieta

Nos organismos dos vertebrados a lipogênese possui dois sítios importantes de regulação: as atividades das enzimas citrato liase e acetil-CoA carboxilase (GRANNER; PILKIS, 1990).

O excesso de glicose na dieta estimula a secreção do hormônio insulina pelo pâncreas. A insulina estimula a lipogênese de três formas principais: estimulando a ação da enzima acetil-CoA carboxilase responsável pela formação do malonil-CoA a partir do acetil-CoA; favorecendo a desfosforilação da enzima piruvato desidrogenase e provocando aumento na atividade da enzima acetil-CoA carboxilase (GRANNER; PILKIS, 1990). Por outro lado, os hormônios glucagon e epinefrina são responsáveis por provocar modificações covalentes na enzima acetil-CoA carboxilase causando sua inativação e desacelerando a síntese de ácidos graxos (NELSON; COX, 2010).

A síntese orgânica dos ácidos graxos saturados acontece no citoplasma, onde a relação $[NADPH]/[NADP^+]$ é muito alta, fornecendo assim um ambiente fortemente redutor (NELSON; COX, 2010).

Nos peixes a síntese de ácidos graxos ocorre, preferencialmente, nos tecidos hepáticos (WANG et al., 2005), e assim como para a maioria das espécies animais, a principal fonte metabólica de NADPH é a via das pentoses fosfatadas. Trata-se de um processo bioquímico composto por duas fases: uma fase oxidativa irreversível e uma fase não-oxidativa reversível (NELSON; COX, 2010). O suprimento de NADPH, na fase oxidativa irreversível, ocorre pela ação da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (Figura 6). Outra fonte com capacidade de providenciar NADPH para a síntese de ácidos graxos é o ciclo do piruvato/malato, pela ação direta da enzima málica (Figura 7) (CAMPBELL, 2000).

A atividade destas duas enzimas pode ser afetada pela temperatura, por fatores hormonais e, principalmente, pela composição da dieta e pela frequência de alimentação (RIBEIRO et al., 2008). Dessa forma, as mesmas podem ser utilizadas como indicador do perfil nutricional de algumas espécies.

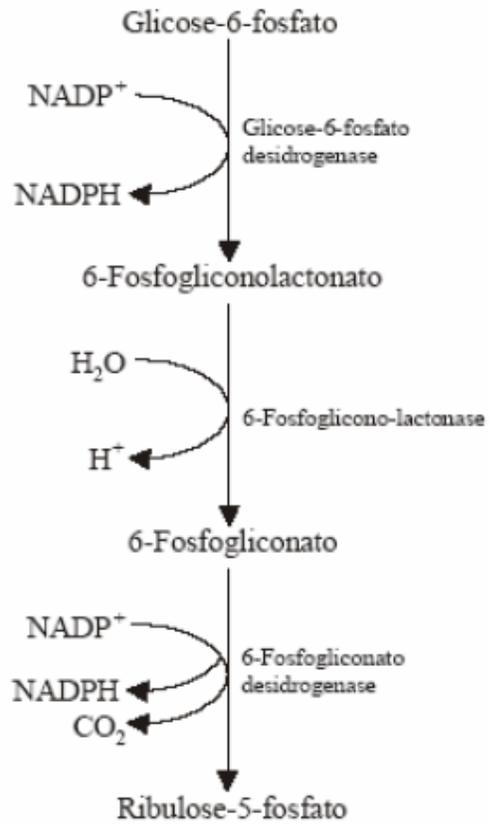


Figura 6 Fase oxidativa da via das pentoses fosfato
Fonte: Nelson e Cox (2010)

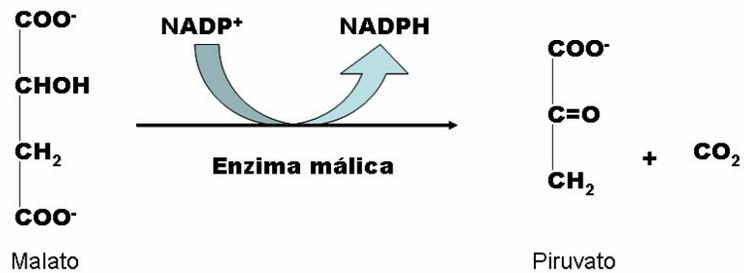


Figura 7 Produção de NADPH catalisada pela enzima málica
Fonte: Nelson e Cox (2010)

3.3.3 Composição de ácidos graxos em peixes

Os lipídios são capazes de fornecer ao animal, de maneira eficiente, energia e ácidos graxos essenciais. No entanto, dietas com excessivo conteúdo lipídico podem influenciar negativamente o metabolismo animal e acarretar no acúmulo indesejável de gordura. Para os peixes, os lipídios são importantes componentes da dieta, pois assim como outras espécies de animais monogástricos, eles apresentam a composição lipídica tecidual como um reflexo da sua alimentação (RIBEIRO et al., 2008).

Porém, deve-se salientar que o perfil lipídico de um peixe não depende somente da sua dieta. Fatores como a espécie, sexo e idade do animal, temperatura da água onde ele habita, sazonalidade, entre outros, também podem influenciar na sua composição corporal (VISENTAINER et al., 2007).

Os peixes, assim como os mamíferos, são incapazes de produzir endogenamente as famílias ω -6 e ω -3, portanto, os ácidos graxos linoléico e linolênico, precursores destas famílias, devem estar presentes na dieta (NELSON; COX, 2010).

Os ácidos graxos docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA) são fisiologicamente importantes para o desenvolvimento do animal, uma vez que atuam no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso, e reprodutivo (MARTINO, 2003; RAMOS FILHO et al., 2008). Estudos indicam, ainda, que o DHA também apresenta papel fundamental para o bom desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina (SHARMA et al., 2010).

Esses ácidos graxos são tipicamente encontrados em peixes de *habitat* marinho. Eles são provenientes do fitoplâncton e das algas que normalmente fazem parte da dieta desses animais (VISENTAINER et al., 2007).

Já os peixes de água doce, que não desfrutam de uma dieta rica em ácidos graxos de cadeia longa da série ω -3, possuem uma série de enzimas específicas capazes de modificar os componentes da dieta transformando um determinado ácido graxo em seu correspondente de cadeia mais longa (RIBEIRO et al., 2008). Dessa forma, o ácido α -linolênico, pode ser convertido em EPA e este ainda pode originar o DHA (Figura 8).

A capacidade para alongar e dessaturar ácidos graxos é de extrema importância no desenvolvimento animal, pois dá origem a compostos fisiologicamente essenciais (MARTINO, 2003).

O ambiente subterrâneo tem a escassez de alimento como uma característica marcante. Os animais troglóbios são constantemente submetidos a essa escassez e utilizam, como estratégia de sobrevivência, o armazenamento de calorías (MONTEIRO, 2010).

Diversos trabalhos foram realizados caracterizando a composição de ácidos graxos de peixes de água doce (INHAMUNS; FRANCO; BATISTA, 2009; RAMOS FILHO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2011; UGOALA; NDUKWE; AUDU, 2009) e água salgada (VISENTAINER et al., 2000).

Quatro espécies brasileiras da região pantaneira apresentaram predominantemente o ácido oléico (20,25 a 37,25%), seguido do ácido palmítico (19,96 a 21,37%) e esteárico (7,39 a 9,82%) (RAMOS FILHO et al., 2008). Por outro lado, peixes da costa brasileira como a Sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*), Tainha (*mugil Liza*) e a Cavalinha (*Scomber colias*) apresentaram elevados teores de DHA (31–84%) (VISENTAINER et al., 2007). Porém, até o momento, pouco se sabe sobre a composição lipídica e de ácidos graxos de espécies cavernícolas.

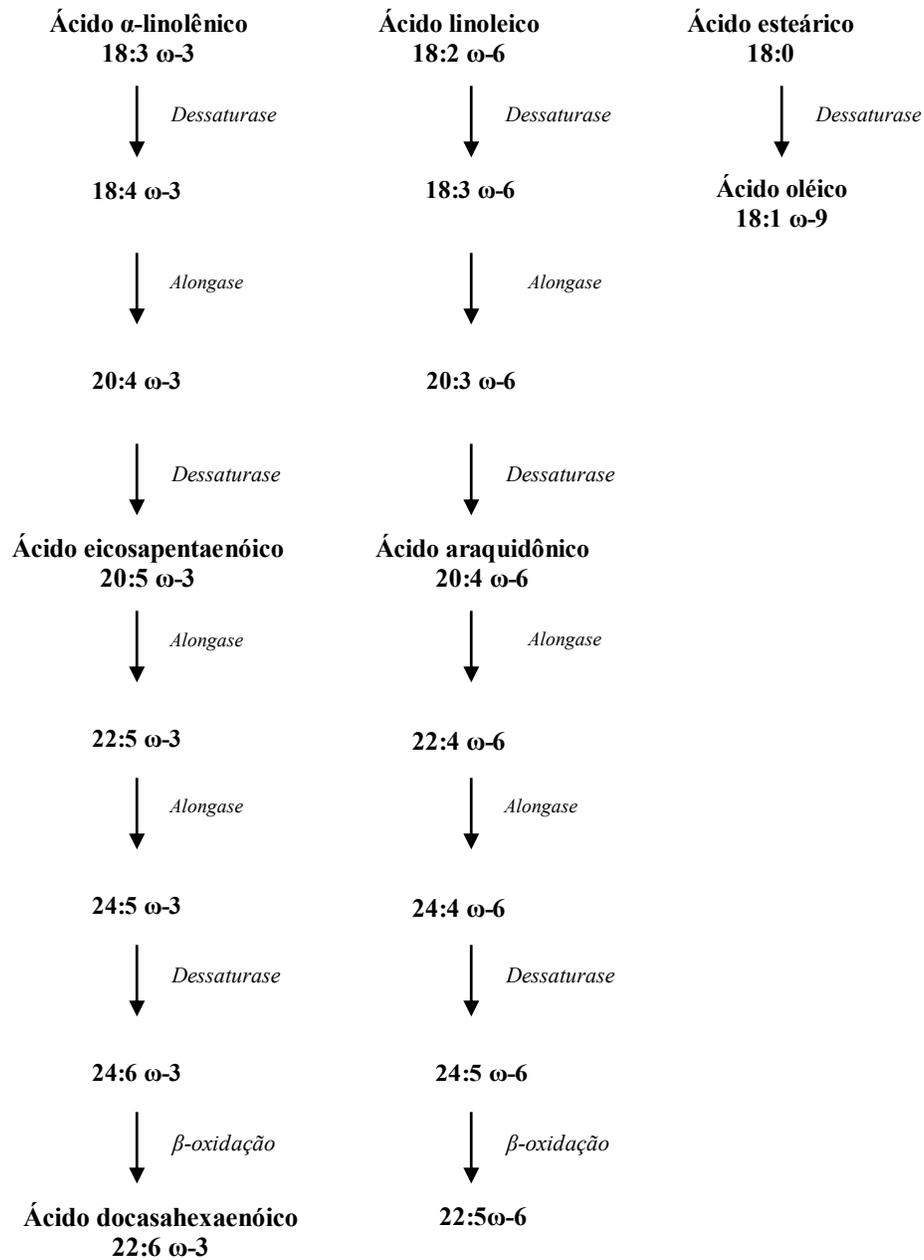


Figura 8 Biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados em peixes

3.4 Identificação e detecção de lipídios por cromatografia gasosa

Nos últimos anos, houve um grande desenvolvimento das técnicas de análises envolvendo processos de separação e identificação de compostos químicos. Hoje, com o uso da cromatografia gasosa com colunas capilares de sílica fundida, é possível identificar um número muito grande de ácidos graxos presentes em diversos tipos de amostra (VISENTAINER; FRANCO, 2006).

A cromatografia é um método físico-químico de separação fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna esta técnica extremamente versátil e de grande aplicação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

A cromatografia gasosa é uma das técnicas analíticas mais utilizadas atualmente. Ela é baseada na separação dos componentes da amostra pela sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida. Além de possuir um alto poder de resolução, é uma técnica muito atrativa devido à possibilidade de detecção em escala de nano a picogramas, simplicidade de uso, aplicabilidade a um grande número de situações e substratos e uma notável capacidade de separação, particularmente útil na abordagem de misturas complexas (PIMENTEL et al., 2010).

A grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou estável termicamente, embora amostras não voláteis ou instáveis possam ser derivadas quimicamente (VISENTAINER; FRANCO, 2006).

A cromatografia gasosa pode ser considerada a principal responsável pelo conhecimento atual acerca da composição tecidual em ácidos graxos nas mais diversas espécies de peixes de água doce (GUTIERREZ; SILVA, 1993; KALYONCU; KISSAL; AKTUMSEK, 2009; RAMOS FILHO et al., 2008;

UGOALA; NDUKWE; ANDU, 2009), salgada (GUTIERREZ; SILVA, 1993; INHAMUNS; FRANCO; BATISTA, 2009; VISENTAINER et al., 2007) e cultivados em cativeiro (RIBEIRO et al., 2008; VALENTE et al., 2007; VISENTAINER et al., 2005).

A maior parte dos ácidos graxos que compõem os tecidos animais são substâncias não voláteis e, portanto necessitam passar por um processo de derivação antes de serem submetidos à cromatografia gasosa. Normalmente, são convertidos aos metil ésteres correspondentes, que são mais voláteis (JUÁREZ et al., 2008).

3.4.1 Métodos para a extração lipídica

A extração dos lipídios é uma etapa importante para sua análise. Alguns cuidados devem ser tomados para evitar fatores como co-extração dos componentes não-lipídicos e a oxidação que podem influenciar a qualidade final da fração lipídica.

Segundo Brum, Arruda e Regitano-d'Arce (2009) o uso de um único solvente não é recomendável para a extração dos lipídios de tecidos animais, uma vez que lipídios neutros estão ligados covalentemente e podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares, enquanto lipídios polares estão ligados por forças eletrostáticas e ligações de hidrogênio, e requerem solventes polares capazes de quebrar tais ligações e liberá-los. Assim, a mistura de solventes ideal para extração da matéria graxa de tecidos deve ser suficientemente polar para removê-la das associações com as membranas celulares ou com lipoproteínas, sem que ocorra reação química.

Com vistas a contornar as dificuldades oriundas do uso de um único solvente, foram desenvolvidos métodos baseados na mistura de solventes. A grande vantagem apresentada por esses métodos é a capacidade de extrair

tanto os lipídios neutros e os lipídios polares eficientemente (PÉREZ-PALACIOS et al., 2008).

Visto as características intrínsecas da extração de lipídios, foram criados métodos que utilizam uma mistura de clorofórmio, metanol e água (BLIGH; DYER, 1959; FOLCH; LEES; STANLEY, 1957). Apesar de algumas desvantagens, como a toxicidade dos solventes usados e a indesejável extração dos contaminantes não-lipídicos da fase orgânica, esses métodos são largamente utilizados, tanto como propostos originalmente, quanto modificados.

3.4.2 Métodos para a esterificação de ácidos graxos

O processo de esterificação, que é essencial para a análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa, pode ocasionar inúmeros problemas como: conversão incompleta dos lipídios em metil ésteres de ácidos graxos, alteração da composição dos ácidos graxos, formação de subprodutos que podem ser erroneamente identificados como ácidos graxos, contaminação ou danos à coluna cromatográfica (JUÁREZ et al., 2008).

Os métodos de esterificação normalmente são subdivididos em duas categorias: catálise ácida, sendo os reagentes mais usados o ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄) e trifluoreto de boro (BF₃) em metanol; e catálise básica, onde são utilizados hidróxido de sódio (NaOH) ou potássio (KOH) em metanol e metóxido de sódio (NaOCH₃) em metanol (BANNON et al., 1982; HARTMAN; LAGO, 1973).

O reagente trifluoreto de boro em metanol (BF₃/CH₃OH) tem sido o mais aplicado a todas as classes lipídicas para esterificação de ácidos graxos. No entanto, este é um reagente tóxico, caro e sensível à umidade.

Já a metodologia de esterificação proposta por Hartman e Lago (1973), constituída por duas etapas (saponificação – esterificação), utiliza reagentes de

baixo custo, menor toxicidade e de maior disponibilidade quando comparado aos métodos que empregam BF_3 . Estudos com amostras de origem animal e vegetal demonstraram que este método apresentou resultados semelhantes aos obtido para o uso de BF_3 (MILINSK et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição da área de coleta

A Lapa do Angélica (Figura 9) está localizada na Serra do Calcário, município de São Domingos, no estado de Goiás (S 13° 31' 22.2"/ W 046° 22' 55,5"). Sua localização está representada na Figura 10 (REIS; TRAJANO; HINGST-ZAHER, 2006).

O rio Angélica penetra no maciço calcário para um percurso subterrâneo de mais de 7Km. Isso faz da caverna Angélica a quarta maior caverna brasileira, em extensão, seu percurso conta com 14.100m (AULER; RUBBIOLI; BRANDI, 2001).

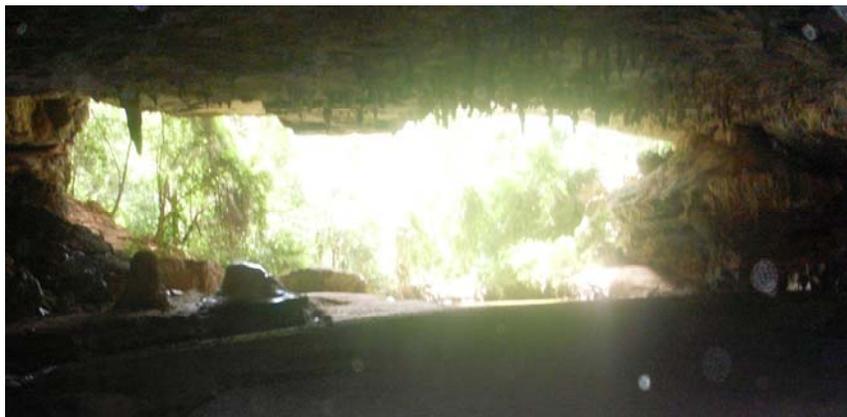


Figura 9 Entrada da Lapa do Angélica

Atualmente, esta caverna está inserida no Parque Estadual do Terra Ronca, o que garante sua preservação legal.

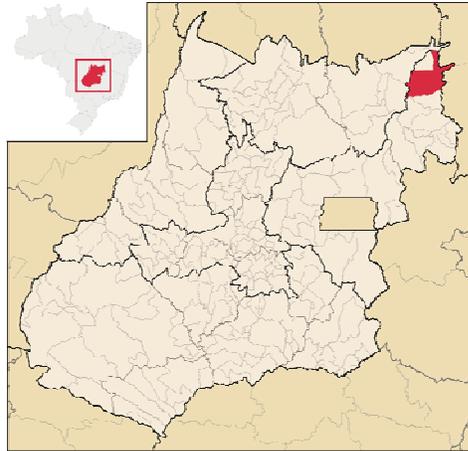


Figura 10 Localização do município de São Domingos, no estado de Goiás

4.2 Descrição das espécies

A espécie troglóbia *Ancistrus cryptophthalmus* (Figura 11) pode ser encontrada em quatro cavernas na área cárstica de São Domingos (Angélica, Bezerra, São Vicente e Passa Três). Esses animais apresentam troglomorfismos como a redução dos olhos e da pigmentação corporal (SECUTTI; TRAJANO, 2009).

Os indivíduos desta espécie apresentam hábitos alimentares detritivos, estilo de vida precoce, baixa taxa de desenvolvimento e elevada longevidade (8 a 10 anos). Estas características podem ser interpretadas como um tipo de adaptação a ambientes com quantidade limitada de alimentos (SECUTTI; TRAJANO, 2009).



Figura 11 *Ancistrus cryptophthalmus*

A característica ecológica mais marcante desta espécie de peixe é o grande tamanho da sua população. Na caverna Angélica, foram estimados aproximadamente 20.000 indivíduos (TRAJANO; BICHUETTE, 2007).

Além dos animais hipógeos a mesma região abriga o exemplar epígeo *Ancistrus* sp (Figura 12). Estes animais são pigmentados e apresentam estrutura ocular mais desenvolvida (REIS; TRAJANO; HINGST-ZAHER, 2006).



Figura 12 *Ancistrus* sp.

Por constituírem populações relativamente abundantes, e contar com animais do mesmo gênero habitando os meios hipógeos e epígeos da mesma região, os *Ancistrus* representam um excelente material para estudos acerca da evolução adaptativa de grupos cavernícolas.

4.3 Descrição da coleta e tratamento das amostras

Foram coletados dez indivíduos de cada uma das espécies: *Ancistrus cryptophtalmus* e *Ancistrus* sp. de acordo com o estabelecido pelas autorizações concedidas pelo SISBIO número: 23907-1 (Figura 1B - ANEXO) e pela Secretaria do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos de Goiás, número: 010/2011 (Figura 2B – ANEXO).

Os peixes troglóbios foram coletados pelo método do puçá manual, pela equipe do Professor Doutor Rodrigo Lopes Ferreira, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, no mês de maio de 2011. Não foram levados em consideração fatores fisiológicos, idade, tamanho, peso, estágio de maturação e diferenças anatômicas.

Esta coleta foi realizada em dois pontos da caverna da Lapa do Angélica, cinco peixes foram coletados na proximidade da entrada da caverna e os demais em um ponto mais distante da entrada (Figura 13), possibilitando assim a investigação acerca de uma possível zona de ecótono.

A espécie não troglóbia foi coletada pelo mesmo método, na parte epígea do rio, localizado na caverna Angélica.

Durante a coleta das espécies foram analisados *in situ*, o pH e temperatura da água utilizando o equipamento multiprobe - YSI. Também foram coletadas amostras de sedimentos encontrados no interior da caverna para posterior análise de matéria orgânica.

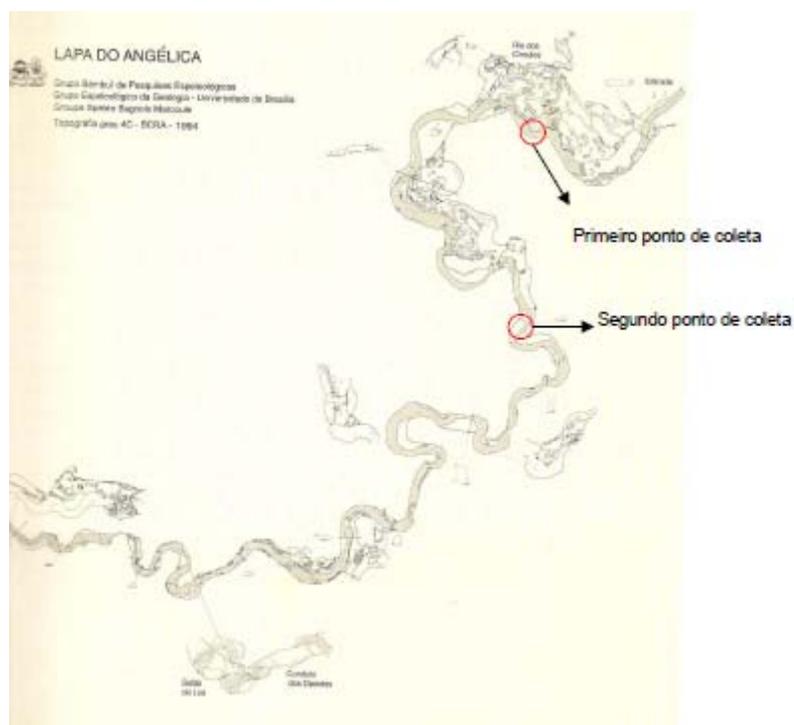


Figura 13 Mapa da caverna Angélica com destaque nos dois pontos de coleta

Os animais foram transportados para a Universidade Federal de Lavras em galões plásticos com capacidade para cinco litros aerados e mantidos à temperatura ambiente, de acordo com o certificado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (NINTEC/PRP-Ufla) (Figura 3B – ANEXO).

No laboratório de Bioquímica os peixes foram sacrificados e dissecados. Os tecidos hepáticos (Figura 14) foram retirados e armazenados individualmente em tubos *ependorf* e mantidos em freezer até o início das análises enzimáticas. Os tecidos musculares foram filetados e acondicionados em sacos plásticos, também individualmente, e congelados.

Todas as análises foram realizadas em triplicata. O fluxograma das análises realizadas encontra-se na Figura 15.



Figura 14 Dissecação do *Ancistrus* sp. com destaque para o tecido hepático

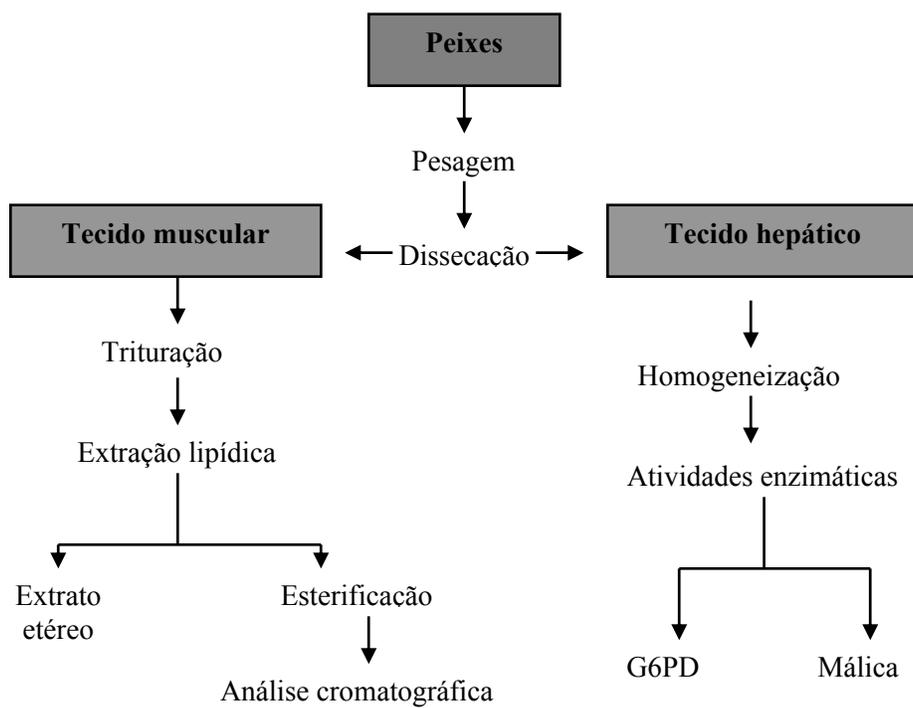


Figura 15 Fluxograma das análises realizadas

4.3.1 Análise de extrato etéreo

A análise de extrato etéreo foi realizada segundo a Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1990): 0,5g do tecido muscular foram colocados em um pacote, confeccionado manualmente, de papel de filtro seco e levadas à estufa, a 105°C, por cerca de 12 horas. Depois de seco, o pacote com a amostra foi colocado dentro de um funil de Soxhlet. O éter foi aquecido e volatilizado, em seguida condensado e circulado através da amostra, carregando consigo o material solúvel em éter. Este processo foi repetido várias vezes, até que não restasse mais material a ser extraído. A amostra foi deixada novamente em estufa para a volatilização de todo o éter e, depois de totalmente fria, foi pesada.

Foram efetuados cálculos para se obter a percentagem de extrato etéreo na matéria seca, utilizando a fórmula descrita a seguir:

$$MS\% = \frac{(G - T) \times 100}{g}$$

Em que MS é a matéria seca, G representa o peso da amostra com o saco antes da extração da gordura, T representa o peso da amostra com o saco depois da extração da gordura e g é a massa da amostra seca.

4.3.2 Extração de lipídios

Na extração dos lipídios que foram utilizados na análise cromatográfica dos ácidos graxos, utilizou-se a metodologia descrita por Folch, Lees e Stanley (1957).

Os peixes foram filetados e pesados aproximadamente 0,25g de cada um. A essas amostras foram adicionados 1,5mL de clorofórmio, 2,0mL de

metanol e 1,2mL de água destilada. A solução resultante foi agitada e, posteriormente, mantida sob aquecimento a 40°C por 15 minutos. Após esse procedimento, a solução foi centrifugada, a 680g, por 15 minutos. As fases foram separadas, sendo a parte metanólica descartada e a fase clorofórmica acondicionada para evaporação do solvente, utilizando nitrogênio gasoso.

4.3.3 Esterificação

Após a evaporação do resíduo, foi realizada a esterificação da amostra, utilizando a metodologia de Hartman e Lago (1973).

Ao óleo proveniente da etapa anterior, foram adicionados 2mL de NaOH 0, mol L⁻¹ em metanol e levados ao banho fervente, por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2,5mL de reagente esterificante (Cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico) e a solução resultante foi aquecida em ebulição por 5 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 2,0mL de solução saturada de NaCl e 2,5mL de hexano. Depois de agitada, a solução foi levada à centrifugação, a 500g por 10 minutos. As fases foram separadas, sendo a parte inferior descartada e a superior acondicionada para evaporação do solvente, utilizando nitrogênio gasoso.

As amostras foram estocadas sob refrigeração (-20°C) até a realização das análises.

4.3.4 Caracterização dos ésteres de ácidos graxos

A composição dos ácidos graxos foi determinada na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química (DQI), da Universidade Federal de Lavras por cromatografia gasosa.

Foi utilizado o cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida com 100m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno, contendo polietilenoglicol como fase estacionária líquida.

Os seguintes parâmetros operacionais foram utilizados: modo de injeção “splitless”; volume injetado de 1 μ L; temperatura do detector de 260°C; temperatura do injetor de 260°C; programa de temperatura: 4°C min⁻¹ até atingir 140°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, mantendo a rampa de aquecimento de 4°C min⁻¹ até atingir 240°C, permanecendo por 30 minutos nesta temperatura.

A identificação dos picos foi realizada por método comparativo com os tempos de retenção corrigidos do padrão. O padrão utilizado foi uma mistura de 37 ésteres metílicos considerados mais importantes para o metabolismo de peixe (SupelcoTM 37 Component FAME Mix - Sigma-Aldrich).

A quantificação dos ácidos graxos foi realizada pela normalização de área expressando-se o resultado em percentual de área de cada ácido sobre a área total de ácidos graxos (%). A transformação da porcentagem de área para g/100g de tecido muscular foi feita multiplicando pelo teor da fração lipídica total e pelo fator de conversão para peixe gordo (0,9), segundo Holland et al. (1994) (ANEXO C).

4.3.5 Determinação da atividade da enzima málica

Foi realizado o teste de atividade enzimática utilizando a enzima málica (EM, E.C.1.1.1.40) segundo a metodologia descrita por Spina, Bright e Rosenbloom (1966), e adaptada por Monteiro (2010). O princípio de ação da enzima málica está representado pela equação 1.



As amostras do tecido hepático dos peixes foram pesadas em tubo *eppendorf*, homogeneizadas em tampão HEPES-KOH, com pH 7,2 na proporção 1:5 (peso/volume), colocadas em banho ultrassônico por 10 minutos e, posteriormente, centrifugadas, a 5.600g, a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado no final. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra.

O sobrenadante recolhido foi mantido sob refrigeração até o início do ensaio cinético.

A cinética enzimática foi realizada, por meio do método de espectrofotometria ultravioleta, a 340nm e por 5 minutos, utilizando um espectrofotômetro de UV-visível Shimadzu modelo UV-1800, com leituras realizadas de 2 em 2 segundos. A unidade de atividade enzimática (UI), definida como μmol de substrato convertido em seu respectivo produto (NADPH) por minuto, foi expressa em mg de proteína solúvel hepática (atividade específica).

Os cálculos efetuados estão descritos nas equações 2 e 3:

$$AV = \frac{1000 \times VT \times D \times dA/dt}{\epsilon \times V} \quad (2)$$

Onde:

AV = atividade volumétrica (U/L)

VT = volume total da cubeta (1000 μL)

D = diluição utilizada para o extrato de células

dA/dt = coeficiente de partição

ϵ = coeficiente de extinção molar do NADPH, a 340nm (ϵ = 6,22L/mmol)

V = volume do extrato de células utilizado no ensaio

$$AE = \frac{AV}{CP} \quad (3)$$

Onde:

AE = atividade específica (U/mg de proteína)

AV = atividade volumétrica (U/L)

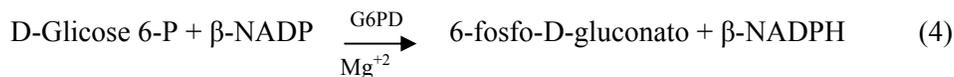
CP = concentração de proteína do extrato de células que continha a enzima (mg/mL)

O conteúdo total de proteína no hepatopâncreas foi determinado pela metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.3.6 Determinação da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase

As amostras de tecido hepático foram preparadas conforme o descrito para o ensaio com a enzima málica (item 4.3.5).

O teste para determinação da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase foi realizado de acordo com o protocolo proposto por Graeve (1994), no qual o NADPH, na presença de glicose-6-fosfato (G6P), é formado a partir de nicotinamidaadenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP⁺) (equação 4) e o aumento da absorbância foi medido em 340nm em um ensaio de 5 minutos.



Foram realizados os mesmos cálculos descritos para a determinação da atividade da enzima málica.

4.3.7 Determinação da matéria orgânica nos substratos

Durante a coleta dos animais, foram recolhidas pedras no interior e exterior da caverna Angélica. Essas pedras tiveram uma área de 25cm² delimitadas e raspadas com uma espátula para a retirada do material que a envolvia. O material retirado das pedras foi submetido a análise de matéria orgânica segundo o protocolo proposto por Davies (1974) e descrito abaixo.

O material raspado das pedras foi colocado para secar em estufa a 100°C por 24 horas. Depois de secos, foram levados a mufla a 550°C por 4 horas. A porcentagem de matéria orgânica foi dada pela diferença entre peso seco antes e depois da incineração.

4.4 Análise estatística

Os valores de extrato etéreo e da composição de ácidos graxos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi aplicado para as variâncias desiguais entre os valores médios das amostras. Utilizou-se o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), mantendo-se o nível de significância de 5% em todas as análises.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características físico-químicas dos locais de coleta

Os valores apresentados no momento da coleta para temperatura, porcentagem de oxigênio dissolvido, pH e matéria orgânica nos diferentes pontos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 Características físico-químicas dos pontos de coleta

Parâmetro	Pontos de coleta		
	Epígeo	Hipógeo *	Hipógeo **
Temperatura (°C)	24,87 ± 0,04	25,28 ± 0,02	25,33 ± 0,00
Oxigênio dissolvido (%)	94,76 ± 0,40	93,33 ± 1,18	90,00 ± 1,12
pH	6,27 ± 0,20	6,71 ± 0,02	6,65 ± 0,01
Matéria orgânica (g/cm ²)	1,84 ± 0,91	0,38 ± 0,16	-

* Ponto próximo à entrada da caverna

** Ponto localizado no interior da caverna

Nos peixes, os ácidos graxos são os componentes estruturais responsáveis pela manutenção da fluidez da membrana plasmática (BROWN; MURPHY, 1995). Sua composição é afetada por diversos fatores, entre os quais está a temperatura do meio (VISENTAINER et al., 2007).

A temperatura registrada no ponto epígeo foi aproximadamente, 0,5°C inferior às temperaturas hipógeas. A redução na temperatura representa um fator de estresse para os peixes e pode provocar alterações metabólicas no organismo do animal. Essas alterações direcionam os processos metabólicos no sentido de manter a permeabilidade das membranas celulares, condição esta determinada pela proporção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) (RIBEIRO et al., 2011). Dessa forma, em ambientes com baixas temperaturas, os animais tendem

a apresentar elevados níveis de ácidos graxos poliinsaturados (HAMA, 1999; RIBEIRO et al., 2011; VISENTAINER et al., 2007).

Já os níveis de oxigênio dissolvido e o pH refletem a tendência dos ecossistemas de serem colonizados e a taxa de sobrevivência das populações que ali se estabelecem (KRAMER; RANGELEY; CHAPMAN, 1997).

Em todos os pontos de coleta observa-se valores de pH adequados (6,27; 6,71 e 6,65). Por outro lado, a concentração de oxigênio dissolvido diminui à medida que se adentra na caverna (94,76%; 93,33% e 90,0%), sendo este um fator limitante à colonização do seu interior.

Quanto à disponibilidade de matéria orgânica verifica-se que, no meio epígeo (1,84g/cm²), ela é superior à encontrada no meio hipógeo (0,38g/cm²). A escassez de recursos alimentares no ambiente cavernícola constitui outro fator limitante a sua colonização (ROMERO, 2009).

Além das diferenças encontradas na disponibilidade de alimentos entre os meios epígeo e hipógeo, pôde-se verificar também, diferenças quanto a sua composição. Enquanto no meio epígeo encontram-se substratos recobertos por material vegetal e larvas de insetos (Figura 16), no meio cavernícola, onde não há produção primária, observa-se apenas algumas larvas.



Figura 16 Substrato epígeo

A menor disponibilidade e diversidade de recursos alimentares observada no meio cavernícola, pode influenciar no metabolismo dos peixes troglóbios e provocar modificações no seu perfil lipídico, uma vez que, esses animais apresentam a composição de ácidos graxos corporais como um reflexo da dieta adotada (CYRINO; PORTZ; MARTINO, 2000; EL-HUSSEINY et al., 2010; RIBEIRO et al., 2008; SALIN et al., 2010; VISENTAINER et al., 2005).

5.2 Extrato etéreo

O peso médio e o conteúdo lipídico total (extrato etéreo) dos animais coletados no ambiente epígeo e nos dois pontos hipógeos são apresentados na Tabela 3 e no Gráfico 1.

Tabela 3 Peso e extrato etéreo das amostras

Parâmetro	Amostras		
	<i>Ancistrus sp.</i>	<i>Ancistrus cryptophthalmus*</i>	<i>Ancistrus cryptophthalmus**</i>
Peso Corporal (g)	1,21 ± 0,41b	2,17 ± 0,67a	2,09 ± 0,41a
Lipídios totais (g/100g de tecido)	14,09 ± 2,52b	17,6 ± 0,69a	18,36 ± 1,27a

Valores médios ± desvio padrão; Valores na mesma linha, seguidos de letras iguais, não diferem entre si ($p < 0,05$) [Análise de variância – ANOVA e teste de Tukey]

* Coletados próximo à entrada da caverna

** Coletados no interior da caverna

A análise de variância indica que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas espécies. A espécie troglóbia apresenta peso corporal e teor de lipídios totais superiores aos exibidos pelos animais epígeos.

Os resultados obtidos, de 14,0g/100g para a espécie *Ancistrus sp.* e de 17,6 e 18,36g/100g para indivíduos da espécie *Ancistrus cryptophthalmus*, confirmam os resultados de Monteiro (2010) onde peixes da espécie *Ancistrus*

cryptophthalmus apresentaram 18,14g/100g de tecido e os peixes *Ancistrus* sp. 14,52g/100g.

De acordo com Ackman (1989), os pescados podem ser classificados com relação ao teor de gordura muscular. Os peixes magros são aqueles que apresentam menos de 2% de gordura corporal; Os peixes que apresentam lipídios totais com valores entre 2 e 4% do peso corporal são classificados como médio teor de gordura e os peixes gordos são aqueles que contêm mais de 8% de gordura corporal.

Segundo esta classificação, as duas espécies foco desse estudo são consideradas como peixes gordos.

Outras espécies de peixes não-cavernícolas também contêm elevados teores lipídicos em seu tecido muscular. Dentre as espécies brasileiras, a Cavala (*Scomberomorus cavala*) apresenta o teor de 10,79% de lipídios totais, a Capeba-listrada (*Diapterus rhombeus*) 12,20% (MENEZES et al., 2008), a Tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) 14,26% (RIBEIRO et al., 2011) e o Pacu (*Piaractus brachypomus*) se destaca com 19,83g de lipídios totais a cada 100g de tecido muscular (RAMOS FILHO et al., 2008).

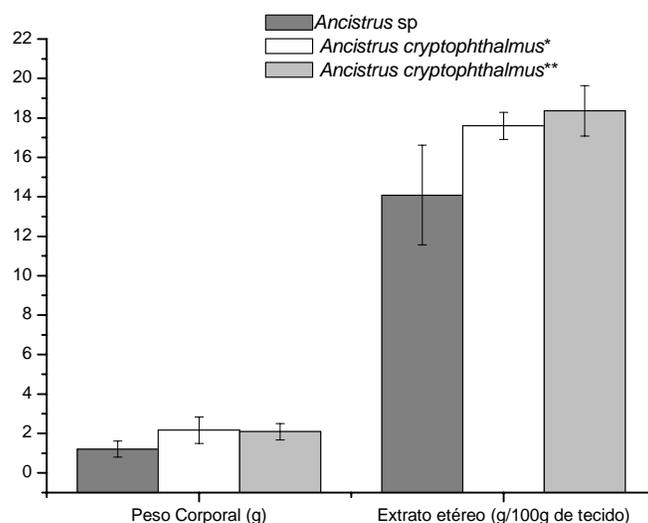


Gráfico 1 Peso e extrato etéreo dos peixes epígeos e troglóbios

* Coletados próximo à entrada da caverna

** Coletados no interior da caverna

De acordo com Romero (2009), a redução no tamanho corporal constituiria uma vantagem competitiva para os animais troglóbios, uma vez que estes habitam locais de dimensões reduzidas. No entanto, assim como ocorre entre as espécies foco desse estudo, diversas espécies cavernícolas apresentam tamanho corporal maior que seus correspondentes epígeos.

Um estudo com peixes da espécie epígea *Micropterus salmoides* demonstrou que, quando submetidos à alimentação escassa, estes animais desenvolveram a capacidade de armazenar proteínas e lipídios como forma de garantir um suprimento de energia (CYRINO; PORTZ; MARTINO, 2000).

Esta capacidade, de armazenar nutrientes em períodos de jejum, desenvolvida por algumas espécies de peixes (SALIN et al., 2010), fundamenta os resultados obtidos neste trabalho em que a espécie cavernícola (*Ancistrus cryptophthalmus*), submetida a um ambiente com disponibilidade limitada de

recursos alimentares, apresentou maior deposição lipídica no tecido muscular que a espécie *Ancistrus* sp., espécie esta que conta com alimentação abundante e diversificada.

A Tabela 3 indica ainda, que não houve diferenças significativas quanto ao peso e conteúdo lipídico dos indivíduos da espécie *Ancistrus cryptophthalmus* coletados nos dois diferentes pontos da caverna (próximo e distante da entrada). Dessa forma, esses parâmetros (peso e teor de lipídios totais) não contribuem para a determinação de uma zona de ecótono, ou seja, uma zona de transição entre os meios subterrâneo e externo onde os indivíduos apresentam características intermediárias entre as populações hipógeas e epígeas (PROUS; FERREIRA; MARTINS, 2004).

5.3 Perfil lipídico muscular

Foram identificados, por comparação com os tempos de retenção corrigidos do padrão FAME (Figura 1A – ANEXO), 19 ácidos graxos na espécie *Ancistrus* sp. (Figura 2A – ANEXO e Tabela 4), 14 nos indivíduos da espécie *Ancistrus cryptophthalmus* coletados próximos à entrada da caverna Angélica (Figura 3A – ANEXO e Tabela 4) e 10 ácidos graxos nos indivíduos da mesma espécie coletados no ponto mais interno da caverna (Figura 4A – ANEXO e Tabela 4).

Uma variedade de ácidos graxos superior as obtidas nesse estudo foi identificada por Monteiro (2010) para a espécie troglóbia *Ancistrus cryptophthalmus* (23 ácidos graxos) e para espécie epígea *Ancistrus* sp. (24 ácidos graxos).

Por outro lado, diversos peixes brasileiros não cavernícolas de água doce, apresentam a variedade de ácidos graxos no tecido muscular semelhante à encontrada neste trabalho para os indivíduos da espécie epígea *Ancistrus* sp.. A

piranha (*Serrasalmus rhombeus*), o mandi amarelo (*Pimelodus maculatus*), o mandi pintado (*Pimelodus spp.*) e o jaú (*Paulicea lutkeni*) apresentaram 20 ácidos graxos em seu perfil lipídico (FERREIRA, 2010; RAMOS FILHO et al., 2008). Já no Tucunaré (*Cichla spp.*) foram identificados 60 diferentes ácidos graxos (INHAMUNS; FRANCO; BATISTA, 2009).

Estudos indicam que os ácidos graxos presentes nos tecidos musculares dos peixes refletem a variabilidade destes na dieta dos animais (RIBEIRO et al., 2008; VIERA et al., 2011; VISENTAINER et al., 2005). No Pacu (*Piaractus brachypomus*), por exemplo, verifica-se que o fornecimento de ácido linoléico conjugado na dieta afeta diretamente a composição muscular de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, devido aos processos de alongação e dessaturação (SANTOS et al., 2009).

Esses estudos explicam os resultados obtidos no presente trabalho, onde os peixes de origem cavernícola (*Ancistrus cryptophthalmus*), submetidos a uma dieta restrita (pobre em matéria orgânica), apresentam menor variedade de ácidos graxos no tecido muscular do que os de origem epígea (*Ancistrus sp.*).

A Tabela 4 indica, ainda, que os animais troglóbios coletados próximos a entrada da caverna apresentam a variedade de ácidos graxos no tecido muscular intermediária entre os indivíduos epígeos e os coletados no interior da caverna.

Tabela 4 Perfil de ácidos graxos das espécies *Ancistrus cryptophthalmus* e *Ancistrus* sp.

Ácido graxo	<i>Ancistrus</i> sp.		<i>Ancistrus</i> Cryp.*		<i>Ancistrus</i> Cryp.**	
	%	g/100g	%	g/100g	%	g/100g
C14:0	0,81 ± 0,10b	0,10 ± 0,01β	5,01 ± 0,61a	0,85 ± 0,10α	5,93 ± 1,59a	0,96 ± 0,25α
C14:1	13,78 ± 1,73a	1,79 ± 0,22α	nd	nd	14,22 ± 3,06a	2,27 ± 0,50α
C15:0	0,80 ± 0,08c	0,10 ± 0,01 □	4,58 ± 0,70a	0,77 ± 0,11α	3,35 ± 0,25b	0,53 ± 0,04b
C 15:1	0,94 ± 0,15b	0,12 ± 0,01β	4,89 ± 0,56a	0,82 ± 0,09α	nd	nd
C16:0	25,67 ± 1,66b	3,30 ± 0,21β	48,82 ± 1,01a	8,18 ± 0,19α	49,54 ± 5,69a	7,78 ± 0,88α
C16:1	11,36 ± 0,40a	1,45 ± 0,05α	1,88 ± 0,91b	0,31 ± 0,15β	10,54 ± 2,60a	1,64 ± 0,40α
C17:0	0,46 ± 0,10c	0,06 ± 0,01□	3,50 ± 0,61a	0,58 ± 0,10α	1,55 ± 0,35b	0,24 ± 0,05β
C17:1	0,81 ± 0,15b	0,10 ± 0,01β	2,41 ± 0,45a	0,39 ± 0,07α	nd	nd
C18:0	8,06 ± 0,52	1,01 ± 0,06	nd	nd	nd	nd
C18:1ω9c	19,40 ± 0,56a	2,43 ± 0,07α	11,42 ± 0,65b	1,86 ± 0,10β	nd	nd
C18:2ω6t	1,69 ± 0,34	0,21 ± 0,04	nd	nd	nd	nd
C18:2ω6c	7,07 ± 0,60a	0,88 ± 0,07α	5,61 ± 1,155 a	0,91 ± 0,18α	7,01 ± 1,48a	1,06 ± 0,22α
C20:0	2,77 ± 0,21a	0,34 ± 0,02α	0,95 ± 0,24b	0,15 ± 0,03β	2,35 ± 0,31a	0,35 ± 0,04α
C18:3ω6	0,51 ± 0,36b	0,19 ± 0,04α	0,95 ± 0,41a	0,21 ± 0,06α	1,09 ± 0,34a	0,16 ± 0,05α
C20:1	0,51 ± 0,004	0,06 ± 0,004	nd	nd	nd	nd
C22:0	0,63 ± 0,13	0,07 ± 0,01	nd	nd	nd	nd
C20:3ω6	1,98 ± 0,32	0,24 ± 0,03	nd	nd	nd	nd
C20:4ω6	0,38 ± 0,007	0,04 ± 0,008	nd	nd	nd	nd
C22:2	nd	nd	0,78 ± 0,11	0,13 ± 0,09	nd	nd

Tabela 4, continuação

C24:1	nd	nd	3,92 ± 0,75	0,56 ± 0,10	nd	nd
C22:6 ω 3	1,18 ± 0,20b	0,14 ± 0,02 β	4,85 ± 0,66a	0,74 ± 0,10 α	4,36 ± 0,95a	0,63 ± 0,13 α
Σ Saturados	39,22 ± 1,98b	5,00 ± 0,25 β	62,88 ± 1,07a	10,55 ± 0,18 α	62,75 ± 6,54a	9,86 ± 1,02a
Σ Monoinsaturados	46,83 ± 1,47a	5,96 ± 0,19 α	24,54 ± 1,24b	3,96 ± 0,20 β	24,76 ± 5,06b	3,90 ± 0,81 β
Σ Poliinsaturados	13,94 ± 1,10a	1,71 ± 0,13 α	12,56 ± 0,48a	2,00 ± 0,07 α	12,47 ± 2,14a	1,86 ± 0,31 α
Σ ω 3	1,18 ± 0,20b	0,14 ± 0,02 β	4,85 ± 0,66a	0,74 ± 0,10 α	4,36 ± 0,95a	0,63 ± 0,13 α
Σ ω 6	12,75 ± 1,14 a	1,57 ± 0,14 α	6,94 ± 1,12b	1,12 ± 0,18 β	8,10 ± 1,80b	1,22 ± 0,26 β

Valores médios ± desvio padrão; Valores expressos em % na mesma linha, seguidos de letras iguais, não diferem entre si ($p > 0,05$); Valores expressos em g/100g na mesma linha, seguidos de letras gregas iguais, não diferem entre si ($p > 0,05$) [Análise de variância – ANOVA e teste de Tukey]

nd = Não determinado

* Coletados próximo à entrada da caverna

** Coletados no interior da caverna

Esta variação encontrada entre os organismos hipógeos coletados nos dois diferentes pontos indica a existência de uma zona de ecótono. Assim, a entrada da caverna Angélica funciona como uma área de transição entre o meio cavernícola e o meio externo. Dessa forma, os indivíduos que colonizam esta área apresentam características intermediárias entre as espécies epígeas e hipógeas (PROUS; FERREIRA; MARTINS, 2004).

No perfil lipídico (Tabela 4) das espécies *Ancistrus cryptophthalmus* e *Ancistrus* sp. alguns ácidos graxos foram predominantes. Dentre estes merecem destaque os ácidos miristoléico (C14:1), 13,78% e 14,22%; palmítico (C16:0), 25,67%, 48,82% e 49,54%; palmitoléico (C16:1), 11,36%, 1,88% e 10,54%; oléico (C18:1 ω 9c), 19,40% e 11,42% e linoléico (C18:2 ω 6c), 7,07%, 5,61% e 7,01%.

Os elevados níveis dos ácidos palmítico (C16:0) e palmitoléico (C16:1) apresentados pelas duas espécies foco desse estudo, assim como níveis mais baixos de ácidos graxos de cadeia longa (C20 e C22), têm sido descritos como características comuns a maioria dos peixes de água doce (ÇELIK; DILER; KÜÇÜKGÜLMEZ, 2005; INHAMUNS; FRANCO; BATISTA, 2000).

Com exceção do ácido miristoléico, os ácidos graxos predominantes em ambas as espécies foram os mesmos identificados por Monteiro (2010) para as espécies cavernícolas *Ancistrus cryptophthalmus*, *Ituglanis passensis*, *Trichomycterus itacarambiensis* e *Stygichthys typhlops*.

Já para as espécies não cavernícolas de água doce, Cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), Pacu (*Piaractus brachypomus*) e Dourado (*Salminus brasiliensis*), Ramos Filho et al. (2008) verificaram a predominância do ácido graxo oléico (20,25 a 37,25%), seguido de palmítico (19,96 a 21,37%) e esteárico (7,39 a 9,82).

Os resultados da análise de variância entre os ácidos graxos presentes nos animais epígeos e hipógeos mostram efeito significativo ($p < 0,05$) para os

ácidos graxos mirístico (C14:0), pentadecanóico (C15:0), pentadecaenóico (C15:1) palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1), heptadecanóico (C17:0), heptadecaenóico (C17:1), araquídico (C20:0), oléico (C18:1 ω 9) e docosahexaenóico (C22:6 ω 3), como mostra o Gráfico 2.

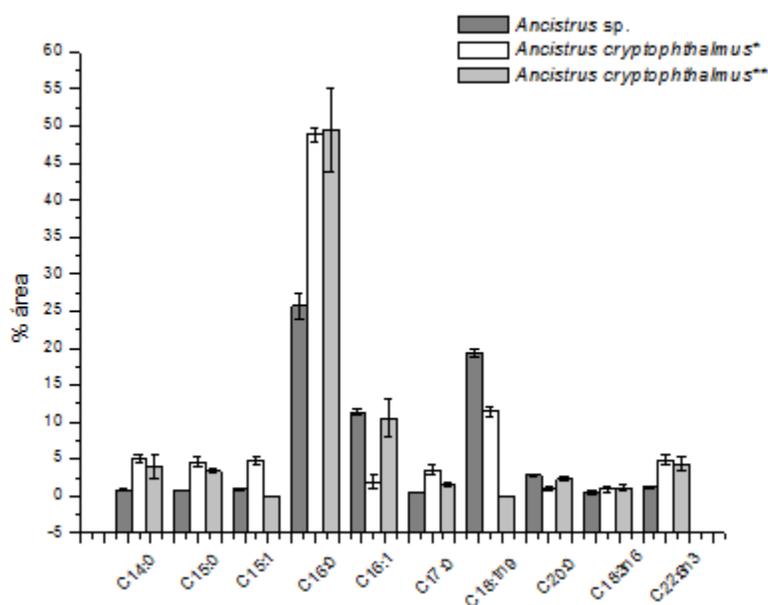


Gráfico 2 Variação dos ácidos graxos entre os peixes epígeos e hipógeos

* Coletados próximo à entrada da caverna

** Coletados no interior da caverna

Assim como o observado para grande parte dos peixes de água doce, os peixes não cavernícolas *Ancistrus sp.* apresentam elevado teor de ácido esteárico (8,06%) no perfil lipídico (INHAMUNS; FRANCO; BATISTA, 2009; RAMOS FILHO et al., 2008). No entanto, esse ácido graxo não foi identificado nos peixes troglóbios *Ancistrus cryptophthalmus*. Pode-se inferir, então que a alimentação dos animais cavernícolas seja pobre no referido ácido graxo, uma vez que, a composição em ácidos graxos reflete a dieta do animal (VIERA et al., 2011).

Comportamento semelhante ao do ácido esteárico foi também observado para os ácidos eicosenóico (C20:1), beênico (C22:0), eicosatrienóico (C20:3 ω 3) e araquidônico (C20:4 ω 6), um ácido graxo nutricionalmente e fisiologicamente importante para os peixes.

Outras espécies de peixes cavernícolas como *Trichomycterus itacarambiensis* e *Stygichthys typhlops* apresentam ácido araquidônico em seu tecido muscular (MONTEIRO, 2010), porém, os valores encontrados (2,37% e 2,40%), são considerados muito baixos para peixes de água doce (OLIVEIRA, 2006).

O ácido graxo araquidônico (C20:4 ω 6) é sintetizado a partir do ácido essencial linoléico, que está presente em abundância nos peixes cavernícolas estudados (MARTINO, 2003). Dessa forma, a ausência desse composto nos indivíduos da espécie *Ancistrus cryptophthalmus* sugere alguma deficiência nas dessaturases e elongases específicas, responsáveis por catalisar o processo de conversão do ácido linoléico em seus correspondentes de cadeia mais longa (ácido araquidônico) (RIBEIRO et al., 2011).

Diferentemente dos resultados obtidos nesse estudo, Monteiro (2010) verificou, para os peixes das espécies *Ancistrus cryptophthalmus* e *Ancistrus* sp. valores de ácido araquidônico iguais a 9,06% e 8,69% do total de ácidos graxos, valores estes muito superiores aos encontrados nesse estudo.

As diferenças observadas podem ser atribuídas, entre outros fatores, à diferenças sazonais. Durante as estações secas, período no qual foram coletados os peixes utilizados no presente estudo, a disponibilidade de alimentos no ambiente aquático é menor e os animais tendem a ter um gasto maior de energia na sua busca (ALMEIDA, 2004).

De acordo com Inhamuns, Franco e Batista (2009) os ácidos graxos poliinsaturados, em especial o araquidônico, são abundantes no tecido muscular do Tucunaré (*Cichla spp*) durante o período da cheia (7%), quando há maior

disponibilidade de alimentos, mas diminuem drasticamente durante as estações secas. O mesmo foi observado nos peixes *Vimba* da Turquia (KALYONCU; KISSAL; AKTUMSEK, 2009).

Cabe ainda destacar que condições de estresse, de qualquer natureza, predispõem os peixes a enfermidades diversas (RIBEIRO et al., 2011). Assim, em um ambiente com condições adversas, como o meio cavernícola, parte dos ácidos graxos poliinsaturados sintetizados é direcionada para o sistema imunológico como forma de manter ativas suas propriedades o que explica a baixa disponibilidade dos mesmos no tecido muscular dos peixes *Ancistrus cryptophthalmus* (SARGENT et al., 1999).

A predominância do ácido palmítico (C16:0) entre os ácidos graxos saturados, do palmitoléico (C16:1) e oléico (C18:1 ω 9c) entre os monoinsaturados e do linoléico (C18:2 ω 6c) entre os poliinsaturados, verificadas nas duas espécies em estudo corrobora com os resultados obtidos por Monteiro (2010) para quatro espécies de peixes cavernícolas e condiz, ainda, com o verificado na maioria dos peixes de água doce (RIBEIRO et al., 2011).

A análise da composição de ácidos graxos dos peixes Cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), Pacu (*Piaractus brachypomus*) e Dourado (*Salminus brasiliensis*), naturais da região pantaneira, evidenciou que o ácido oléico (C18:1 ω 9), palmítico (C16:0) e linoléico (C18:2 ω 6) foram os mais abundantes, dentro de suas classes, nas quatro espécies, com teores variando respectivamente de 20,25 a 37,25%, 19,96 a 21,27% e 2,64 a 5,98% do total de ácidos graxos (RAMOS FILHO et al., 2008). O mesmo padrão foi observado em Piranhas (*Serrasalmus nattereri*), em Tambaquis (*Colossoma macropomum*) da Amazônia central e em Tilápias (*Oreochromis niloticus*) (ALMEIDA, 2004; FERREIRA, 2010; STEVANATO, 2006). Por outro lado, as espécies brasileiras Tucunaré (*Cichla spp.*), Lambari (*Astyanax spp.*), Mandi (*Pimelodus spp.*) e Traíra (*Hoplias malabaricus*)

apresentaram o ácido docosahexaenóico (C22:6 ω 3) como principal ácido graxo poliinsaturado (GUTIERREZ; SILVA, 1993; INHAMUNS; FRANCO; BATISTA, 2009).

De acordo com a análise de variância (Tabela 4), observa-se diferenças significativas quanto as proporções de ácidos graxos saturados e monoinsaturados entre as espécies epígea e hipógea.

Os peixes da espécie troglóbia *Ancistrus cryptophthalmus* coletados nos dois pontos da caverna Angélica se destacam por apresentar elevados teores de ácidos graxos saturados (62,88 e 62,75%) e proporções menores de ácidos graxos monoinsaturados (24,54 e 24,76%) quando comparados aos exemplares epígeos (*Ancistrus* sp.) que apresentaram no seu conteúdo lipídico, maior concentração em ácidos graxos monoinsaturados (46,86%) e menores valores para os saturados (39,22%) como mostra o Gráfico 3.

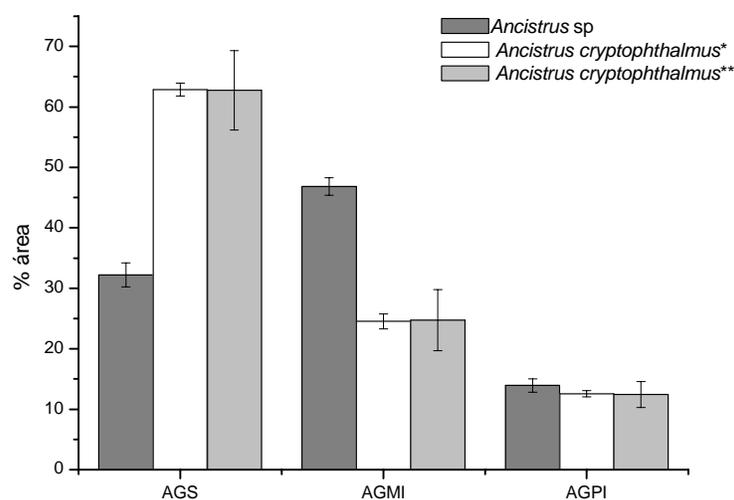


Gráfico 3 Composição de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI) nas espécies epígea e hipógea

* Coletados próximo à entrada da caverna

** Coletados no interior da caverna

A composição de ácidos graxos nos peixes está intimamente relacionada com a manutenção da fluidez das membranas celulares (RIBEIRO et al., 2011). Verifica-se frequentemente, que em ambientes aquáticos com temperatura elevada há predominância de ácidos graxos saturados no perfil lipídico desses animais (VISENTAINER et al., 2007).

Dessa forma, a maior proporção de ácidos graxos saturados nos animais cavernícolas (submetidos a temperatura mais elevada) e de ácidos graxos monoinsaturados nos peixes não cavernícolas (*habitat* mais frio) podem ser os fatores responsáveis pela manutenção da fluidez e funcionamento adequados de suas membranas (RIBEIRO et al., 2011).

Assim como o verificado para os *Ancistrus cryptophthalmus*, diversos estudos, com peixes de água doce demonstram que, quando há predominância de ácidos graxos saturados no tecido muscular do animal, quanto maior é a sua proporção, menor é o teor de ácidos graxos poliinsaturados (GUTIERREZ; SILVA, 1993; INHAMUNS; FRANCO; BATISTA, 2009; MONTEIRO, 2010).

Outros peixes não cavernícolas, como o Cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), Pacu (*Piaractus brachypomus*) e Dourado (*Salminus brasiliensis*) por outro lado, apresentaram em seu tecido muscular maiores concentrações de ácidos graxos monoinsaturados (RAMOS FILHO et al., 2008; SHARMA et al., 2010) assim como os *Ancistrus* sp.

Quanto ao conteúdo total de ácidos graxos poliinsaturados não houve diferenças significativas entre os animais de origem epígea e hipógea (13,9%; 12,56%; e 12,47%).

Pode-se observar ainda, em ambas as espécies, a predominância dos ácidos graxos poliinsaturados da série ômega-6 sobre os da série ômega-3, o que, aparentemente, é um padrão para peixes de água doce (GUTIERREZ;

SILVA, 1993; INHAMUNS; FRANCO; BATISTA, 2009; MONTEIRO, 2010; RAMOS FILHO et al., 2008; SHARMA et al., 2010).

Segundo Gutierrez e Silva (1993), a grande maioria dos pescados de água doce encontrados no Brasil são deficientes em ácidos graxos da série ômega-3 como os ácidos graxos eicosapentaenóico (C20:5 ω 3) e docosahexaenóico (C22:6 ω 3). Esses dois ácidos graxos são produzidos endogenamente a partir do ácido graxo α -linolênico, o qual é encontrado em grandes quantidades em plantas marinhas (especialmente em algas unicelulares) (MENEZES et al., 2008).

Nos peixes cavernícolas (*Ancistrus cryptophthalmus*), assim como nos epígeos (*Ancistrus* sp.) não foi identificado o ácido eicosapentaenóico (C20:5 ω 3). Já o ácido docosahexaenóico (C22:6 ω 3) apareceu em maior concentração nos peixes troglóbios, assim como o observado por Monteiro (2010).

Sargent et al. (1999) afirmam que o ácido graxo docosahexaenóico (C22:6 ω 3) é de grande importância para o desenvolvimento animal e pode ser encontrado em grandes proporções no tecido neural e na estrutura ocular dos peixes. A espécie *Ancistrus cryptophthalmus*, no entanto, apresenta estrutura ocular menos desenvolvida do que a apresentada pelos *Ancistrus* sp. e, portanto, apresenta maior disponibilidade desse ácido graxo no seu tecido muscular.

Entre os indivíduos troglóbios coletados nos diferentes pontos da caverna não houve diferenças significativas entre os teores de ácidos graxos poliinsaturados, monoinsaturados e saturados o que indica que a alimentação disponível nesses dois pontos é bioquimicamente semelhante.

5.4 Atividade enzimática

Entre as espécies *Ancistrus cryptophthalmus* e *Ancistrus* sp. observa-se diferenças significativas ($P < 0,05$) quanto a atividade específica das enzimas hepáticas avaliadas, glicose-6-fosfato desidrogenase e enzima málica.

A Tabela 5 apresenta os valores médios das atividades específicas destas enzimas, expressos em U/mg de proteína.

O tecido hepático dos peixes é onde ocorre a maior parte da síntese lipídica (NELSON; COX, 2010). As rotas metabólicas responsáveis por esse processo necessitam de energia reduzida sob a forma de NADPH para produzir os diferentes ácidos graxos (CAMPBELL, 2000).

Na maioria dos animais, a via das pentoses fosfatadas, catalisada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase é a principal fonte de NADPH (até 60%) para a síntese de ácidos graxos. A enzima málica, atuante no ciclo do piruvato/malato, também contribui para o suprimento de NADPH, porém, em menores proporções (SALWAY, 1994).

Tabela 5 Atividade específica das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e málica nos peixes de origem epígea e hipógea.

Enzima	<i>Ancistrus</i> sp. (U/mg de ptn)	<i>Acistrus cryp.</i>* (U/mg de ptn)	<i>Acistrus cryp.</i>** (U/mg de ptn)
Glicose-6-fosfato desidrogenase	0,633 ± 0,116a	0,271 ± 0,097b	0,189 ± 0,098b
Málica	0,048 ± 0,011a	0,034 ± 0,006a	0,013 ± 0,011b

Valores médios ± desvio padrão; Valores na mesma linha, seguidos de letras iguais, não diferem entre si ($p < 0,05$) [Análise de variância – ANOVA e teste de Tukey]

* Ponto próximo à entrada da caverna

** Ponto localizado no interior da caverna

A contribuição de cada uma dessas enzimas depende, entre outros fatores, da espécie e das condições às quais os peixes são submetidos (SALWAY, 1994; WANG et al., 2005).

As espécies *Ancistrus* sp. e *Ancistrus cryptophthalmus* apresentam maior atividade específica para a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (Tabela 5). O mesmo padrão foi observado em diversas espécies de peixes como Cobia (*Rachycentron canadum*), Bagre amarelo (*Cathorops spixii*) e Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (RIBEIRO et al., 2011; TAN et al., 2009; WANG et al., 2005). Já para a Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foram encontrados valores de atividade específica próximos para as enzimas málica e glicose-6-fosfato desidrogenase, com médias de 0,100 e 0,110 U/mg de proteína respectivamente (FIGUEIREDO-SILVA, 2005).

Os valores obtidos nesse estudo para ambas as espécies e enzimas estão de acordo com os dados da literatura segundo os quais a atividade específica destas enzimas para peixes encontra-se numa faixa de 0,109 a 0,920 U/mg de proteína para a glicose-6-fosfato desidrogenase e 0,013 a 0,082 U/mg de proteína para a enzima málica (BORBA et al., 2003; DIAS et al., 1998, 2004; VALENTE et al., 2007). Esta variação ocorre em função da diversidade das espécies estudadas e também nas diferentes condições em que os ensaios enzimáticos são realizados.

Tem sido reportado que as atividades das enzimas que participam dos processos de lipogênese e armazenamento lipídico nos peixes, como a glicose-6-fosfato desidrogenase e a enzima málica são afetadas pelo conteúdo da dieta à qual o animal é submetido.

Diversos estudos mostram que para muitas espécies de peixes a lipogênese é estimulada por dietas ricas em carboidratos (CATACUTAN; COLOSO, 1997; DIAS et al., 2004).

Quanto aos lipídios, são relatados casos em que as enzimas málica e glicose-6-fosfato desidrogenase foram suprimidas por dietas com elevado conteúdo lipídico (CATACUTAN; COLOSO, 1997; WANG et al., 2005). Por outro lado, estudos mostram que dietas contendo elevadas proporções de ácidos graxos poliinsaturados da série ômega-6 promovem o aumento na atividade destas mesmas enzimas no Bagre amarelo (*Cathorops spixii*) e na Tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) (RIBEIRO et al., 2011; TAN et al., 2009). Já na Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e nos peixes da espécie *Dicentrarchus labrax* não foram verificadas alterações na atividade destas enzimas após o enriquecimento da dieta com ácido linoléico conjugado (FIGUEIREDO-SILVA et al., 2005; VALENTE et al., 2007).

Verifica-se, dessa forma, que a atividade das enzimas envolvidas na lipogênese não depende somente da composição da dieta e frequência da alimentação. Segundo Sanden, Frøyland e Hemre (2003), a atividade das enzimas hepáticas também é afetada pela espécie, por fatores hormonais e fisiológicos.

No presente estudo determinou-se que a atividade específica da enzima glicose-6-fosfato é maior nos peixes não cavernícolas da espécie *Ancistrus* sp. (0,63U/mg de proteína) e não varia significativamente entre os peixes troglóbios, coletados nos dois diferentes pontos da caverna Angélica (0,27 e 0,18U/mg de proteína).

Quanto à enzima málica, os *Ancistrus cryptophthalmus* coletados nas proximidades da entrada da caverna apresentam atividade específica mais próxima à apresentada pela espécie epígea (0,034 e 0,048U/mg de proteína) do que a apresentada pelos animais hipógeos coletados no interior da caverna (0,013U/mg de proteína).

Os peixes troglóbios (*Ancistrus cryptophthalmus*) apresentaram atividades específicas menores para as duas enzimas estudadas. Este resultado

pode ser relacionado com a alimentação pobre (baixa disponibilidade de matéria orgânica) a qual ele são submetidos. Por outro lado, os peixes de origem epígea, que possuem alimentação abundante em nutrientes, apresentaram maior atividade específica para as enzimas da lipogênese, uma vez que esta é estimulada pelos carboidratos da dieta (CATACUTAN; COLOSO, 1997; DIAS et al., 2004).

Os resultados obtidos estão de acordo com esperado, visto o perfil lipídico das duas espécies. Os peixes da espécie *Ancistrus cryptophthalmus*, que apresentaram a menor variedade de ácidos graxos no seu perfil lipídico, foram os mesmos que apresentaram a menor atividade específica para as enzimas hepáticas estudadas.

Ao analisar as atividades enzimáticas específicas obtidas para os peixes cavernícolas coletados próximo a entrada da caverna Angélica, verifica-se que elas apresentam valores intermediários entre as determinadas para os peixes epígeos e hipógeos, corroborando, então, para a existência de uma zona de ecótono nas proximidades da entrada da caverna.

Assim como o perfil lipídico, a atividade das enzimas hepáticas dos peixes também podem ser afetadas por fatores sazonais (RIBEIRO et al., 2011; SANDEN; FRØYLAND; HEMRE, 2003). Cabe então, ressaltar a importância da continuidade deste estudo englobando um período maior de coleta.

6 CONCLUSÃO

Nas condições em que foi realizado o experimento verificou-se que o perfil lipídico dos peixes da espécie *Ancistrus cryptophthalmus* apresenta diferenças em relação ao dos animais da espécie *Ancistrus* sp.

As variações encontradas entre os ácidos graxos presentes nos animais hipógeos e epígeos são atribuídas, principalmente, às diferenças observadas na quantidade e qualidade do alimento disponível nesses dois ambientes distintos e, também, a alterações no metabolismo desses peixes.

A atividade das enzimas envolvidas na lipogênese, málica e glicose-6-fosfato desidrogenase também é diferente entre os peixes cavernícolas e não cavernícolas.

Os animais da espécie *Ancistrus cryptophthalmus* apresentam menor atividade para ambas as enzimas. Resultado este que condiz com sua composição lipídica muscular, com menor variedade de ácidos graxos.

Observou-se ainda a existência de uma zona de ecótono localizada próxima a entrada da caverna Angélica, onde os peixes apresentam características intermediárias entre as espécies hipógeas e epígeas.

Conclui-se, portanto, que as características próprias ao meio cavernícola influenciam de maneira significativa a composição muscular de ácidos graxos e a lipogênese nos peixes da espécie troglóbia *Ancistrus cryptophthalmus*, contribuindo para que estes animais se diferenciem dos peixes não cavernícolas da espécie *Ancistrus* sp.

REFERÊNCIAS

ACKMAN, R. G. Nutritional composition of fats in seafoods. **Progress in Food and Nutrition Science**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 161-241, Apr. 1989.

ALMEIDA, N. M. **Composição de ácidos graxos e quantificação de EPA e DHA de matrinxã (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) cultivados e capturados na Amazônia Central**. 2004. 237 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ANDRADE, R. **Conservação do ecossistema cavernícola**. Disponível em: <<http://www.redeespeleo.org/artigos.php?ID=30>>. Acesso em: 27 mar. 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17th ed. Gaithersburg, 2000. v. 1, 937 p.

AULER, A. et al. Cyclic sedimentation in Brazilian caves: mechanisms and palaeoenvironmental significance. **Geomorphology**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 142-153, 2009.

AULER, A.; RUBBIOLI, E.; BRANDI, R. **As grandes cavernas do Brasil**. Belo Horizonte: Grupo Bambuí, 2001. 228 p.

BANNON, C. D. et al. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reability: II., methylation of fats and oils with boron trifluoride-metanol. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 247, n. 1, p. 63-69, 1982.

BICHUETTE, M. E.; TRAJANO, E. Epigeian and subterranean ichthyofauna from the São Domingos karst area, Upper Tocantins River basin, Central Brazil. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, n. 5, p. 1100-1121, Nov. 2003.

_____. *Ituglanis mambai*, a new subterranean catfish from a karst área of Central Brazil, rio Tocantins basin (Siluriformes: Trichomycteridae). **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 6, n. 1, p. 9-15, 2008.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BORBA, M. R. et al. Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein lipid concentrations. **Aquatic Living Resources**, Montouge, v. 16, n. 4, p. 362-369, Sept. 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. **Decreto nº 6640**, de 07 de novembro de 2008. Dá nova redação aos arts. 1º, 2º, 3º, 4º e 5º e acrescenta os arts. 5-A e 5-B ao Decreto nº 99.556, de 1º de outubro de 1990, que dispõe sobre a proteção das cavidades naturais subterrâneas existentes no território nacional. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Decreto/D6640.htm>. Acesso em: 20 dez. 2011.

BROWN, M. L.; MURPHY, B. R. Effects of season, maturity, and sex on lipid lass dynamics in largemouth bass (*Micropterus salmoides* Lacepede). **Ecology of Freshwater Fish**, Copenhagen, v. 4, n. 3, p. 124-130, Sept. 1995.

BRUM, A. A.; ARRUDA, L. F.; REGINATO-D'ARCE, M. A. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 849-854, jul./ago. 2009.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752 p.

CATACUTAN, M. R.; COLOSO, R. M. Growth of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*, fed varying carbohydrate and lipid levels. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 149, n. 1, p. 137-144, Jan. 1997.

ÇELIK, M.; DILER, A.; KÜÇÜKGÜLMEZ, A. A comparison of the proximate compositions and fatty acid profiles of zander (*Sander lucoperca*) from two different regions and climatic conditions. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 4, p. 637-641, Oct. 2005.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. Porto Alegre: Artes médicas, 1997. 446 p.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: UNICAMP, 1997. 280 p.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Santos, 1980. 317 p.

CYRINO, J. E. P.; PORTZ, L.; MARTINO, R. C. Retenção de proteína e energia em juvenis de “black bass” *Micropterus salmoides*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 609-616, dez. 2000.

DAVIES, B. E. Loss-on-ignition as an estimate of soil organic matter. **Soil Science Society of America**, Madison, v. 38, p. 347-353, 1974.

DIAS, J. et al. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 12, p. 1122-1130, Oct. 2004.

_____. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 161, p. 169-186, Feb. 1998.

DUMNICKA, E. Adaptation of troglobites to life in caves. **Materiały XXI Szkoły Speleologicznej**, Katowice, v. 13, n. 7, p. 42-44, Feb. 2002.

EL-HUSSEINY, O. et al. Effect of altering linoleic acid and linolenic acid dietary levels and ratios on the performance and tissue fatty acid profiles of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fry. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 1105-1119, Feb. 2010.

FELICE, V.; VISCONTI, M. A.; TRAJANO, E. Mechanisms of pigmentation loss in subterranean fishes. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 6, n. 4, p. 657-662, 2008.

FERREIRA, A. A. **Peixe piranha (*Pygocentrus nattereri*) do pantanal: composição em ácidos graxos e mudanças com o processamento e estocagem**. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

FERREIRA, R. L. et al. Fauna subterrânea do estado do Rio Grande do Norte: caracterização e impactos. **Revista Brasileira de Espeleologia**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 25-51, 2010.

FERREIRA, R. L.; MARTINS, R. P. Diversity and distribution of spiders associated with bat guano piles in Morrinho cave: Bahia State, Brazil. **Diversity & Distributions**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 235-241, Nov. 1998.

FERREIRA, R. L.; MARTINS, R. P.; YANEGA, D. Ecology of bat guano arthropod communities in a Brazilian dry cave. **Ecotropica**, Bonn, v. 6, n. 2, p. 105-116, Apr. 2000.

FIGUEIREDO-SILVA, A. C. et al. Effects of dietary conjugated linoleic acid on growth, nutrient utilization, body composition, and hepatic lipogenesis in rainbow trout juveniles (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 248, n. 1, p. 163-172, Jan. 2005.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 226, p. 497-509, 1957.

GRAEVE, K. Purification, characterization and cDNA sequence of glucose -6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum L.*). **Plant Journal**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 353-361, June 1994.

GRANNER, D.; PILKIS, S. The genes of hepatic glucose metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 265, n. 18, p. 10173-10176, June 1990.

GUTIERREZ, L. E.; SILVA, R. C. M. Fatty acid composition of commercially important fish from Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n. 3, p. 478-483, out./dez. 1993.

HAMA, T. Fatty acid composition of particulate matter and photosynthetic products in subarctic and subtropical Pacific. **Journal of Plankton Research**, London, v. 21, n. 7, p. 1355-1372, July 1999.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, London, v. 22, p. 475-477, 1973.

HOENEN, S. **Adaptação temporal e o ambiente cavernícola**. Disponível em: <<http://www.redeespeleo.org/artigos.php?ID=34>>. Acesso em: 27 mar. 2010.

HOLLAND, B. et al. **McCance and Widdowson's: the composition of foods**. 6th ed. Cambridge: RSC, 1994. 462 p.

INHAMUNS, A. J.; FRANCO, M. R. B.; BATISTA, W. S. Seasonal variations in total fatty acid composition of muscles and eye sockets of tucunaré (*Cichla* sp.) from the Brazilian Amazon area. **Food Chemistry**, Barking, v. 117, n. 2, p. 272-275, Feb. 2009.

JEFFERY, W. R. Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. **Developmental Biology**, Orlando, v. 231, n. 1, p. 1-12, Feb. 2001.

JUÁREZ, M. et al. Comparison of tour extraction/methylation analytical methods to measure fatty acid composition by gas chromatography in meat. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1190, n. 2, p. 327-332, May 2008.

KALYONCU, L.; KISSAL, S.; AKTUMSEK, A. Seasonal changes in the total fatty acid composition of Vimba, *Vimba vimba tenella* (Nordmann, 1840) in Egirdir Lake, Turkey. **Food Chemistry**, Barking, v. 116, n. 3, p. 728-730, Oct. 2009.

KRAMER, D. L.; RANGELEY, R. W.; CHAPMAN, L. Habitat selection: patterns of spatial distribution from behavioural decisions. In: GODIN, J. G. J. (Ed.). **Behavioural ecology of Teleost fishes**. New York: Oxford University, 1997. p. 37-80.

LEÓN, L. F. M. **El mundo subterráneo**. Madrid: Academia, 2004. 32 p.

MARTINO, R. C. Exigências e cuidados da adição de lipídios em rações para peixes e a sua importância para o homem: parte 2. **Revista Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 75, p. 58-60, 2003.

MATHIEU, J.; HERVANT, F. Adaptation: physiological. In: GUNN, J. (Ed.). **Encyclopedia of caves and karst science**. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 23-25.

MATTOX, G. M. T. et al. Surface and subterranean ichthyofauna in the Serra do Ramalho karst area, northeastern Brazil, with updated lists of Brazilian troglobitic and troglophilic fishes. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 8, n. 4, p. 145-152, Oct./Dec. 2008.

MENEZES, M. E. S. et al. Composição centesimal, colesterol e perfil de ácidos graxos dos peixes tainha (*Mugil cephalus*) e camurim (*Centropomus undecimalis*) da lagoa Mundaú, AL/Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 89-95, 2008.

MILINSK, M. C. et al. Comparative analysis of eight esterification methods in the quantitative determination of vegetable oil fatty acid methyl esters (FAME). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 19, n. 8, p. 1475-1483, Aug. 2008.

MONTEIRO, A. G. D. P. **Avaliação da composição de metais e do perfil lipídico de algumas espécies de peixes cavernícolas e não cavernícolas**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 2010. 1304 p.

NEWTON, I. S. Food enrichment with long-chain n-3 PUFA. **Food Technology**, Chicago, v. 7, n. 1, p. 169-177, Mar. 1996.

OLIVEIRA, E. R. N. **Composição química geral e de ácidos graxos da fração lipídica de peixes do reservatório de Itaipu, Paraná, Brasil: relação com variáveis biológicas e período de coleta**. 2000. 92 f. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

PÉRES-PALACIOS, T. et al. Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. **Food Chemistry**, Barking, v. 110, n. 4, p. 1025-1029, Oct. 2008.

PIMENTEL, S. A. et al. Comparison of gas chromatographic and gravimetric methods for quantization of total fat and fatty acids in foodstuffs. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 76-84, jan. 2010.

PROUS, X.; FERREIRA, R. L.; MARTINS, R. P. Delimitation of epigean-hypogean ecotone zone in two limestone caves in southeastern Brazil. **Australian Ecology**, Carlton, v. 29, n. 4, p. 374-382, Aug. 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 dez. 2011.

RAMOS FILHO, M. M. et al. Perfil lipídico de quatro espécies de peixes da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 361-365, abr./jun. 2008.

REIS, R. E.; TRAJANO, E.; HINGST-ZAHER, E. Shape variation in surface and cave populations of the armoured catfishes *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the São Domingos karst area, upper Tocantins River, Brazil. **Journal of Fish Biology**, London, v. 68, n. 2, p. 414-429, Aug. 2006.

RENNO, J. F. et al. Delimiting species by reproductive isolation: the genetic structure of epigeal and hypogean *Trichomycterus* spp. (Teleostei, Siluriformes) in the restricted area of Torotoro, Upper Amazon, Bolivia. **Genetics**, The Hague, v. 131, n. 3, p. 325-336, Nov. 2007.

RIBEIRO, P. A. P. et al. Efeito do uso de óleo na dieta sobre a lipogênese e o perfil lipídico de tilápias-do-nylo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, n. 8, p. 1331-1337, out. 2008.

_____. Perfil lipídico e composição química de tilápias nilóticas em diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, Salvador, v. 12, n. 1, p. 199-208, jan./mar. 2011.

RIZZATO, P. P. et al. Análise da estrutura de comunidades cavernícolas e de seus ambientes de entorno diferentemente impactados. In: JORNADA CIENTÍFICA DA UFSCAR, 8., 2009, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2009. v. 5, p. 192.

_____. *Trichomycterus dali*: a new highly troglomorphic catfish (Siluriformes: Trichomycteridae) from Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 9, n. 3, p. 477-491, June 2011.

ROLDAN, L. F.; WAHNFRIED, I. D.; KLEIN, D. A. **Breve abordagem geológica das províncias espeleológicas do Brasil**. Disponível em: <http://www.redespeleo.org/espeleologia_geologia_provincias.php>. Acesso em: 28 mar. 2010.

ROMERO, A. **Cave biology: life in darkness**. New York: Cambridge University, 2009. 215 p.

ROMERO, A.; PAULSON, K. M. It's a wonderful hypogean life: a guide to the troglomorphic fishes of the world. **Environmental Biology of Fishes**, The Hague, v. 62, n. 1, p. 13-41, Jan. 2001.

SALIN, K. et al. Cave colonization without fasting capacities: an example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, New York, v. 156, n. 4, p. 451-457, Aug. 2010.

SALWAY, J. G. **Metabolism at a glance**. London: Balckwell Science, 1994. 95 p.

SANDEN, M.; FRØYLAND, L.; HEMRE, G. I. Modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and malic enzyme activity by glucose and alanine in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. hepatocytes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 221, n. 3, p. 469-480, May 2003.

SANTOS, L. D. et al. Ácido linoléico conjugado em dietas para pacu: tempo de deposição, desempenho e perfil de ácidos graxos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 6, p. 980-988, nov./dez. 2009.

SARGENT, J. et al. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, n. 1, p. 191-199, Feb. 1999.

SECUTTI, S.; TRAJANO, E. Reproductive behavior, development and eye regression in the cave armored catfish, *Ancistrus cryptophthalmus* Reis, 1987 (Siluriformes: Loricariidae), breed in laboratory. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 7, n. 3, p. 479-490, 2009.

SHARMA, P. et al. Comparative fatty acid profiles of wild and farmed tropical freshwater fish rohu (*Labeo rohita*). **Fish Physiology Biochemistry**, Amsterdam, v. 36, n. 3, p. 411-417, Sept. 2010.

SKET, B. Biodiversity in hypogean waters. In: GUNN, J. (Ed.). **Encyclopedia of caves and karst science**. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 291-294.

SPINA, J.; BRIGHT, H. J.; ROSENBLOOM, J. Purification and properties of L-malic enzyme from *Escherichia coli*. **Biochemistry**, Easton, v. 9, p. 29-39, 1966.

STEVANATO, F. B. **Aproveitamento de cabeças de tilápias de cativeiro na forma de farinha como alimento para merenda escolar**. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do Maringá, Maringá, 2006.

TAN, X. Y. et al. Effect of dietary linolenic acid/linoleic acid ratio on growth performance, hepatic fatty acid Profiles and intermediary metabolism of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 296, n. 1, p. 96-101, Feb. 2009.

TRAJANO, E. **Os peixes das cavernas brasileiras: bagres, cascudos e cia.** Disponível em: <<http://www.redeespeleo.org/artigos.php?ID=43>>. Acesso em: 27 mar. 2010.

TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E. Population ecology of cave armoured catfish, *Ancistrus cryptophthalmus* Reis 1987, from central Brazil (Siluriformes: Loricariidae). **Ecology of Freshwater Fish**, Copenhagen, v. 16, n. 1, p. 105-115, Apr. 2007.

TRAJANO, E.; DUARTE, L.; MENNA-BARRETO, L. Locomotor activity rhythms in cave fishes from Chapada Diamantina, northeastern Brazil (Teleostei: Siluriformes). **Biological Rhythm Research**, Abingdon, v. 36, n. 3, p. 229-236, July 2005.

UGOALA, C.; NDUKWE, G. I.; AUDU, T. O. **Fatty acids composition and nutritional quality of some freshwater fishes.** New Bussa: National Institute For Freshwater Fisheries Research, 2009. 10 p.

VALENTE, L. M. P. et al. Influence of conjugated linoleic acid on growth, lipid composition and hepatic lipogenesis in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 267, n. 2, p. 225-235, July 2007.

VIERA, M. P. et al. Comparative performances of juvenile abalone (*Haliotis tuberculata coccinea* Reeve) fed enriched vs non-enriched macroalgae: effect on growth and body composition. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 319, n. 3, p. 423-429, Oct. 2011.

VISENTAINER, J. V. et al. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 90-93, 2000.

_____. Influence of diets enriched with flaxseed oil on the α -linoleic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 4, p. 557-560, Apr. 2005.

_____. Lipid content and fatty acid composition of 15 marine fish species from the southeast coast of Brazil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 84, p. 543-547, May 2007.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos graxos em óleos e gorduras**: identificação e quantificação. São Paulo: Varela, 2006. 120 p.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 931 p.

WANG, J. T. et al. Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition, hepatic lipogenesis in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 249, n. 3, p. 439-447, Sept. 2005.

WILKENS, H. Fish. In: CULVER, D. C.; WHITE, W. B. (Ed.). **Encyclopedia of caves**. London: Elsevier Academic, 2005. p. 241-251.

ANEXOS

ANEXO A Cromatogramas

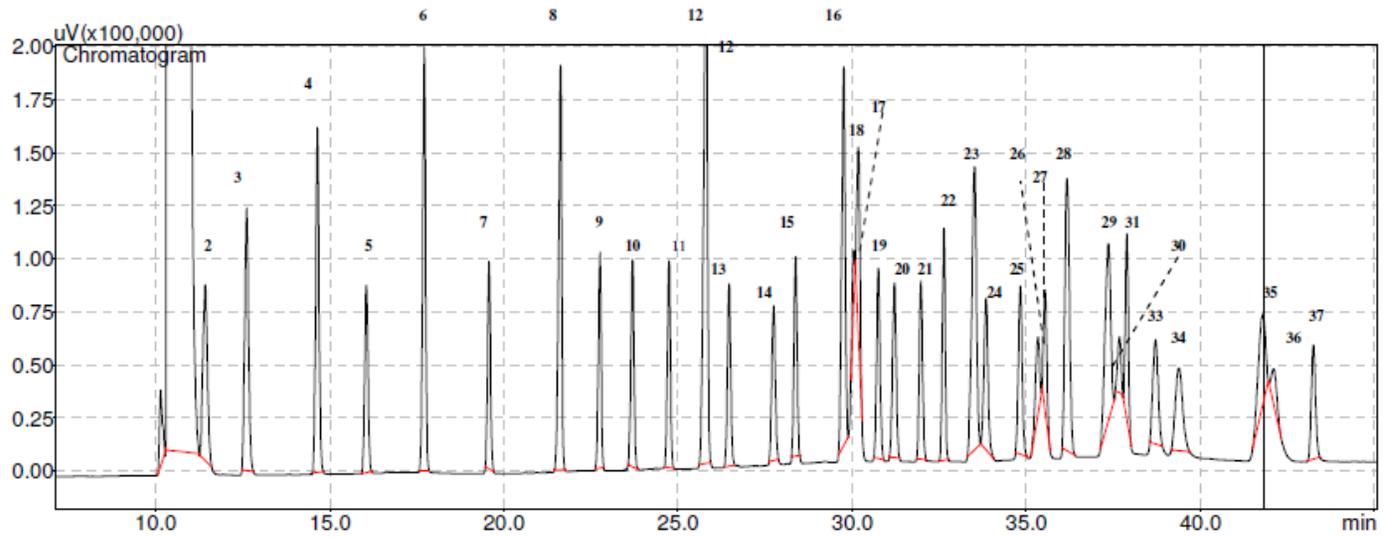


Figura 1A Cromatograma do padrão de ácidos graxos FAME

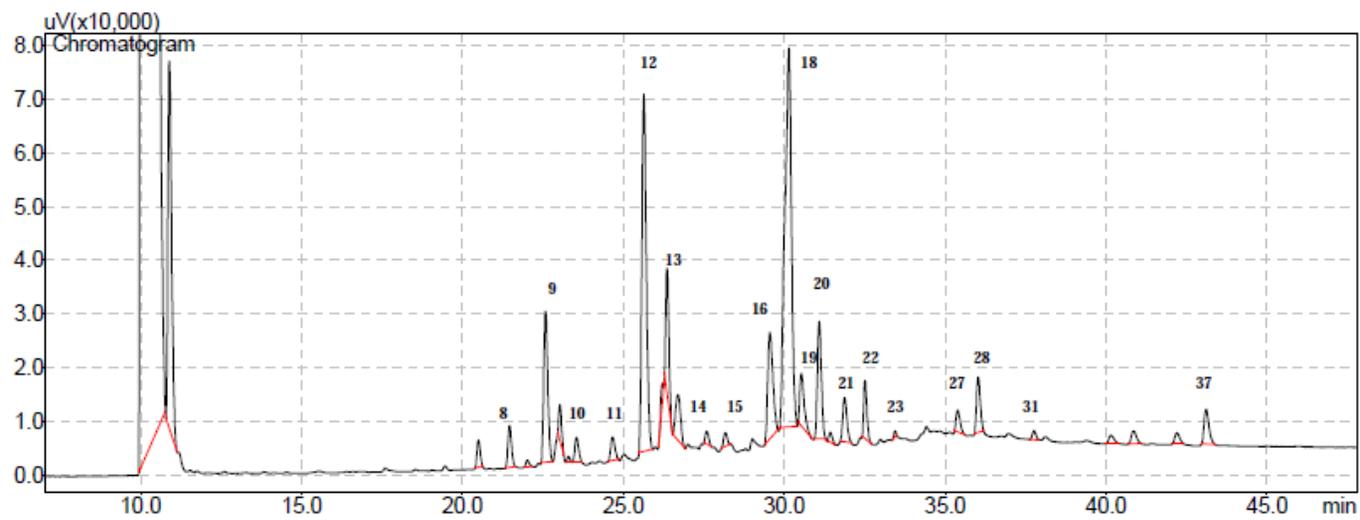


Figura 2A Cromatograma do perfil lipídico da espécie não cavernícola *Ancistrus* sp.

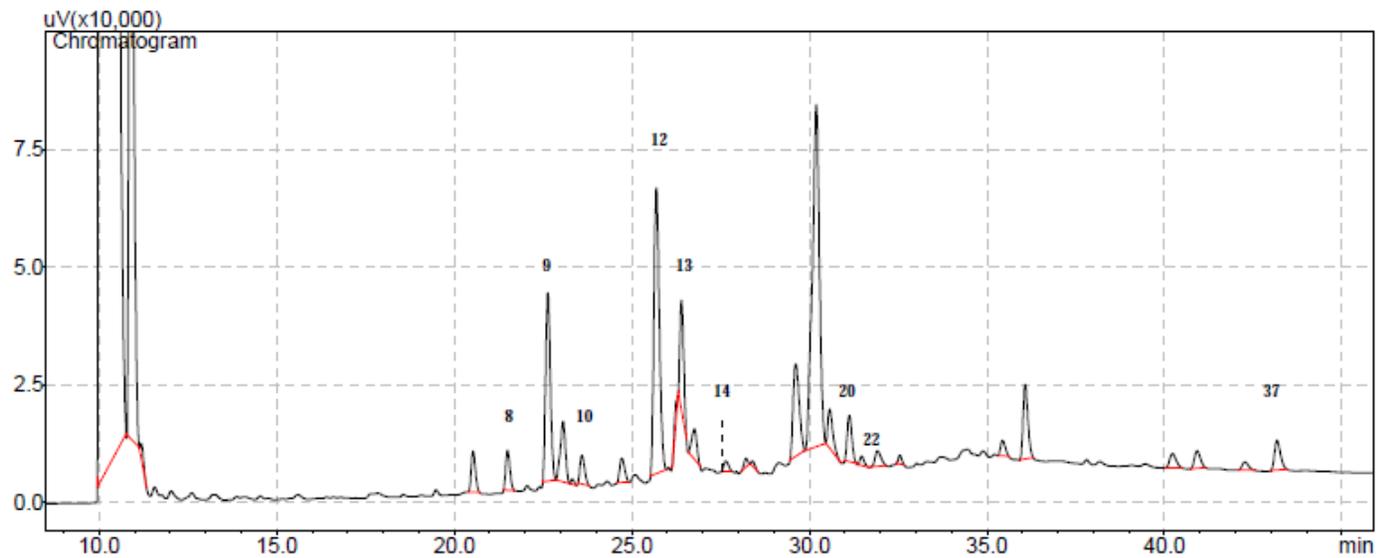


Figura 3A Cromatograma do perfil lipídico da espécie *Ancistrus cryptophthalmus* coletada próximo a entrada da caverna Angélica

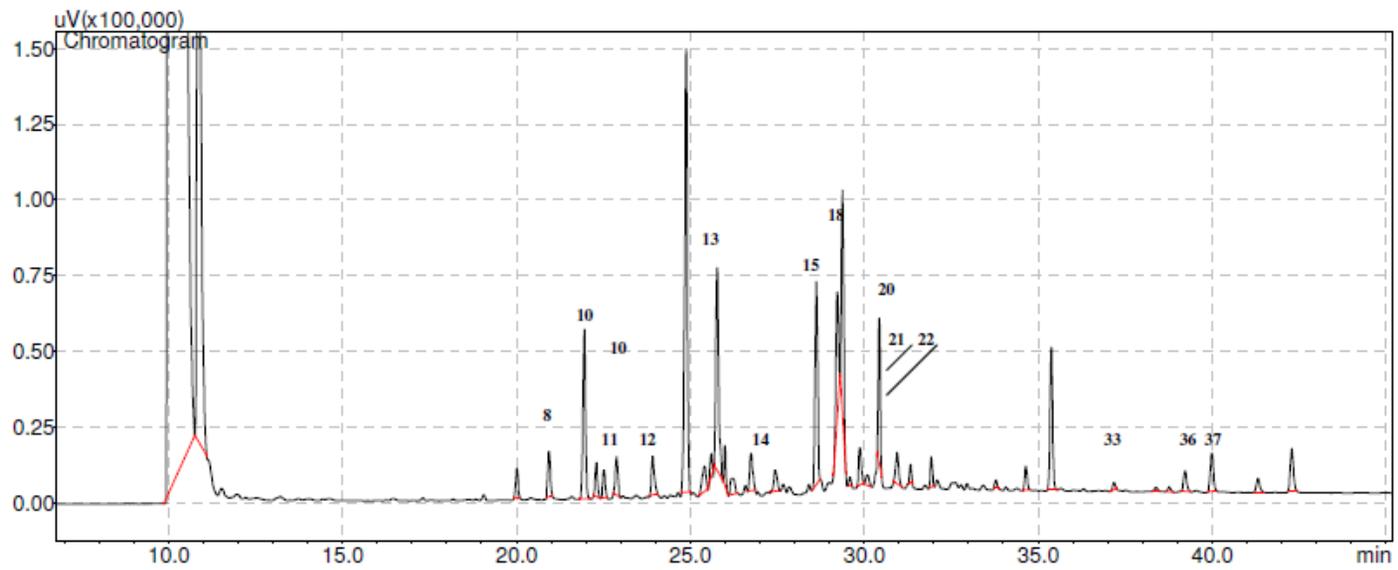


Figura 4A Cromatograma do perfil lipídico da espécie *Ancistrus cryptophthalmus* coletada no interior da caverna Angélica

LEGENDA:

1-	Ácido butírico	C4:0
2-	Ácido capríco	C6:0
3-	Ácido capílico	C8:0
4-	Ácido cáprico	C10:0
5-	Ácido undecanóico	C11:0
6-	Ácido láurico	C12:0
7-	Ácido tridecanóico	C13:0
8-	Ácido mirístico	C14:0
9-	Ácido miristoléico	C14:1
10-	Ácido pentadecanóico	C15:0
11-	Ácido pentadecaenóico	C15:1
12-	Ácido palmítico	C16:0
13-	Ácido palmitoléico	C16:1
14-	Ácido heptadecanóico	C17:0
15-	Ácido heptadecaenóico	C17:1
16-	Ácido esteárico	C18:0
17-	Ácido eláidico	C18:1 ω 9t
18-	Ácido oléico	C18:1 ω 9c
19-	Ácido linoleádico	C18:2 ω 6t
20-	Ácido linoléico	C18:2 ω 6c
21-	Ácido araquídico	C20:0
22-	Ácido α -linolênico	C18:3 ω 6
23-	Ácido eicosenóico	C20:1
24-	Ácido linolênico	C13:3 ω 3
25-	Ácido heneicosanóico	C21:0
26-	Ácido eicosadienóico	C20:2
27-	Ácido beênico	C22:0
28-	Ácido eicosatrienóico	C20:3 ω 6
29-	Ácido erúcico	C22:1 ω 9
30-	Ácido eicosatrienóico	C20:3 ω 3
31-	Ácido araquidônico	C20:4 ω 6
33-	Ácido docosadienóico	C22:2
34-	Ácido lignocérico	C24:0
35-	Ácido eicosapentaenóico	C20:5 ω 3
36-	Ácido nervônico	C24:1
37-	Ácido docosahexaenóico	C22:6 ω 3

ANEXO B Licenças obtidas para a realização da pesquisa



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28807-2	Data da Emissão: 26/01/2011 16:38
Dados do titular	
Nome: RODRIGO LOPES FERREIRA	CPF: 025.075.756-70
Título do Projeto: Comparação entre os teores lipídicos e atividades enzimáticas das espécies <i>Ancistrua cryptophthalmus</i> e <i>Ancistrua</i> sp.	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Lavras	CNPJ: 22.078.679/0001-74

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e preparo das espécies	06/2010	06/2011
2	Extração dos lipídios	06/2010	10/2011
3	Caracterização dos ácidos graxos	10/2010	11/2011
4	Determinação da atividade da enzima málica	11/2010	01/2012
5	Determinação da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase	02/2011	05/2012

De acordo com o art. 10 da IN 154/2007, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo realizadas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, serão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO isena o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro das linhas de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para Importação ou Exportação de fora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contatar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DADAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso de infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreesplotadas ou ameaçadas de sobreesplotação.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SÃO DOMINGOS	GO	Parque Estadual Turístico de Torre Ronca	Fora de UC

Atividades X Taxons

#	Atividade	Taxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Ancistrua spp., <i>Ancistrua cryptophthalmus</i>
2	Coleta/transporte de espécimes de fauna silvestre in situ	Ancistrua spp. (Cód. 10), <i>Ancistrua cryptophthalmus</i> (Cód. 10)
3	Mantuação temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Ancistrua spp., <i>Ancistrua cryptophthalmus</i>

* Cód. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Pérvia)	Captura manual, Pupa, Coleta manual
---	-----------------------------------	-------------------------------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio de página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 28743411



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 23807-2	Data de Emissão: 26/01/2011 16:38	
Dados do titular		
Nome: RODRIGO LOPES FERRERA	CPF: 025.075.756-70	
Título do Projeto: Comparação entre os teores lipídicos e atividades enzimáticas das espécies <i>Ancylistus cryptophthalmus</i> e <i>Ancylistus</i> sp.		
Nome da Instituição: Universidade Federal de Lavras	CNPJ: 22.078.679/0001-74	
Destino do material biológico coletado		
#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Federal de Lavras	coleta

Figura 1B Licença concedida pelo SISBIO



ESTADO DE GOIÁS
SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS HÍDRICOS

AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA CIENTÍFICA EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO

PROCESSO Nº. 1949/2011

AUTORIZAÇÃO Nº. 010/2011

A SECRETARIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS, no uso de suas atribuições que lhe foram conferidas pela Lei Federal nº. 9.985/2000 regulamentada pelo Decreto Federal nº. 4.340/2002, Lei Estadual nº. 14.241/2002 regulamentada pelo Decreto Estadual nº. 5.899 de 09/02/2004 e Resolução CEMAm nº 029/2003 concede a presente **AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA CIENTÍFICA**, nas condições especificadas abaixo.

1. REQUERENTE: RODRIGO LOPES FERREIRA

- 1.1. **RG:** 5380340 **CPF:** 025.075.756-70
 1.2. **Endereço:** Rua Alberto de Abreu, nº. 230, Bairro Olaria, Lavras, Minas Gerais.
 1.3. **Telefone:** (35) 9953-3853 (35) 3829-1884 **Fax:** (35) 3829-1341
 1.4. **Endereço Eletrônico:** drops@dpi.ufla.br e valzinhabastos@yahoo.com.br

2. PROJETO DE PESQUISA: Comparação entre os perfis lipídicos e atividades enzimáticas das espécies *Ancistrus cryptophthalmus* e *Ancistrus sp.*

- 2.1. **Localização da área:** Parque Estadual de Terra Ronca
 2.2. **Descrição das atividades:** Coleta e preparo das espécies, extração dos lipídios, caracterização dos ácidos graxos, determinação da atividade da enzima málica e glicose-6-fosfato desidrogenase.
 2.3. **Responsável Técnico:** Rodrigo Lopes Ferreira, Coorientador (CRBio nº 013978/04-D)
 2.4. **Equipe Técnica:**
 • Luciana Matos Alves Pinto, Orientadora;
 • Valquíria Aparecida Alves Bastos, Aluna/Pesquisadora.

2.5. Cronograma:

Atividades	Início	Término
Coleta e preparo das amostras	Abril/2011	Maior/2011
Extração dos lipídios e esterificação	Junho/2011	Junho/2011
Caracterização dos ácidos graxos	Junho/2011	Agosto/2011
Determinação da atividade da enzima málica	Agosto/2011	Outubro/2011
Determinação da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase	Setembro/2011	Novembro/2011

2.6. Coletas a serem realizadas:

Espécie	Família	Nome Comum da Espécie	Número de exemplares
<i>Ancistrus cryptophthalmus</i>	Loricariidae	Cascudo	10 (dez) animais
<i>Ancistrus sp</i>	Loricariidae	Cascudo	10 (dez) animais

3. EXIGÊNCIAS TÉCNICAS – OBSERVAÇÕES:

- 3.1. A presente Autorização para Pesquisa Científica em Unidade de Conservação está sendo concedida, com base nas informações constantes do processo e não dispensa e nem substitui, outros alvarás ou certidões exigidas pela Legislação Federal, Estadual ou Municipal;
 3.2. Os procedimentos de execução do projeto devem respeitar a Resolução CEMAm nº. 029/2003;
 3.3. Antes do início dos trabalhos de campo o coordenador deve entrar em contato com o Supervisor da Unidade de Conservação para acertar os detalhes da execução (datas e

Rua 82, Palácio Pedro Ludovico Teixeira – Centro
 Fone: (62) 3201-5150 – Fax: (62)3201-5178
 CEP: 74.015-908 - Goiânia - Go

11ª Avenida nº 1272 – Setor Leste Universitário
 Fone: (62) 3265-1300 – Fax: (62) 3201.6971
 CEP: 74.605-060 - Goiânia – Go

www.semarh.goias.gov.br



ESTADO DE GOIÁS
SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS HÍDRICOS

- horários de entrada e saída das expedições de campo), para que as atividades possam ser acompanhadas por servidores da SEMARH;
- 3.4. A SEMARH deverá ser comunicada imediatamente, em caso de acidentes que envolvam o Meio Ambiente;
 - 3.5. A presente Autorização para Pesquisa Científica em Unidade de Conservação refere-se tão somente aos locais das atividades previstas neste documento;
 - 3.6. A SEMARH reserva-se no direito de revogar a presente Autorização no caso de descumprimento de suas condicionantes ou de qualquer dispositivo que fira a legislação ambiental vigente, assim como a omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiem a sua expedição, ou superveniência de graves riscos ambientais e de saúde;
 - 3.7. Qualquer ato que venha infringir a legislação ambiental vigente e que não esteja de acordo com as exigências técnicas será de inteira responsabilidade da equipe técnica responsável por este projeto;
 - 3.8. Qualquer alteração nos métodos e/ou cronograma apresentados no projeto de pesquisa deverão ser previamente comunicadas à SEMARH, com antecedência mínima de 30 (trinta) dias;
 - 3.9. O coordenador do projeto deverá apresentar o relatório parcial das atividades a cada seis meses, nos termos do art. 8º. da Resolução CEMAm nº. 029/2003. O relatório final das atividades de pesquisa deverá ser entregue à SEMARH em até 3 (três) meses após a sua conclusão. Após a publicação dos resultados do trabalho deverão ser enviadas, no prazo de 30 (trinta) dias contados da data de publicação, duas cópias de todo o material escrito (relatório técnico, tese, dissertação, artigo ou resumo publicado);
 - 3.10. É expressamente proibido qualquer ato lesivo contra a fauna de acordo com a Lei 9.605 de 12 de fevereiro de 1998;
 - 3.11. O envio de material coletado para fora da Unidade de Conservação fica autorizado, devendo-se observar as normas e legislações vigentes;
 - 3.12. Esta autorização poderá ser renovada conforme a Resolução CEMAm nº. 029/2003;
 - 3.13. A SEMARH reserva-se no direito de fazer novas exigências caso seja necessário.

4. ANALISTA DO PROCESSO: Eric Rezende Kolailat – Analista Ambiental/GAP/SEMARH

5. VALIDADE DA AUTORIZAÇÃO: 30/11/2011

Goiânia, 11 de março de 2011.

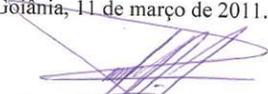

Cláudio Adriano Costa
Gerente de Áreas Protegidas

Figura 2B Licença concedida pela SEMARH-GO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 002/11**, relativo ao projeto intitulado "**COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS LIPÍDICOS E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DAS ESPÉCIES *Ancistrus cryptophthalmus* E *Ancistrus sp*** que tem como responsável **Luciana Matos Alves Pinto**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, tendo sido aprovado na reunião de 29/03/2011.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 002/11**, related to the project entitled "**COMPARISON BETWEEN THE LIPID PROFILES AND ENZIMATIC ACTIVITIES OF THE SPECIES *Ancistrus cryptophthalmus* E *Ancistrus sp***", under the supervision of **Luciana Matos Alves Pinto**, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Bioethic Committee in Utilization of Animals (NINTEC/PRP-Ufla)**, and was approved in **March 29, 2011**.

Lavras, 29 de março de 2011.

Prof. Luis David Sufis Murgas
 Presidente da Comissão de Bioética na Utilização de Animais

Universidade Federal de Lavras
 Pró-Reitoria de Pesquisa / Comissões Permanentes
 Campus Universitário -
 Caixa Postal 3037 / CEP 37200-000 - Lavras, MG - Brasil
 Tel.: +55 (35) 3829 5182
 cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br

Figura 3B Certificado da Comissão de Bioética na Utilização de Animais

ANEXO C Cálculos para quantificação dos ácidos graxos por normalização de área

Cálculo teórico para determinar o fator de correção para o detector FID:

$$KAGi = \frac{MAGi}{(NAGi - 1) \times AC}$$

Onde:

KAGi – Fator de resposta para o ácido graxo “i”

MAGi – Massa molecular do ácido graxo “i”

NAGi - Número de carbonos do ácido graxo “i”

AC- Massa atômica do carbono

Fator de resposta do detector com relação a um ácido graxo de referência

$$K'AGi = \frac{KAGi}{KAGr}$$

Onde:

K'AGi – Fator de resposta para o ácido graxo “i” com relação ao ácido graxo referência.

KAGi – Fator de resposta para o ácido graxo “i”.

KAGr – Fator de resposta para o ácido graxo de referência.

Conversão da porcentagem de área de cada ácido graxo para gramas por 100 gramas de tecido muscular

$$Conc \cdot AG_i = FC \times L \times \frac{(K' AG_i \times \% AG_i)}{\sum K' AG \times \% AG}$$

Onde:

Conc. AG_i – Concentração do ácido graxo “i” por 100g de amostra.

FC – Fator de conversão de gordura para ácido graxo (peixes = 0,9).

K' AG_i – Fator de resposta para o ácido graxo “i” com relação ao ácido graxo referência.

%AG_i – Porcentagem em área do ácido graxo “i” no cromatograma da amostra.