

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE METAIS  
E DO PERFIL LIPÍDICO DE ALGUMAS  
ESPÉCIES DE PEIXES CAVERNÍCOLAS E  
NÃO CAVERNÍCOLAS**

**ALINE GOMES DIAS PINTO MONTEIRO**

**2010**

**ALINE GOMES DIAS PINTO MONTEIRO**

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE METAIS E DO PERFIL  
LIPÍDICO DE ALGUMAS ESPÉCIES DE PEIXES CAVERNÍCOLAS E  
NÃO CAVERNÍCOLAS**

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

Profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

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

Monteiro, Aline Gomes Dias Pinto.

Avaliação da composição de metais e do perfil lipídico de algumas espécies de peixes cavernícolas e não cavernícolas / Aline Gomes Dias Pinto Monteiro. – Lavras : UFLA, 2010.

98 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Luciana de Matos Alves Pinto.

Bibliografia.

1. Caverna. 2. Troglóbio. 3. Ácido graxo. 4. Enzima málica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 574.19293

**ALINE GOMES DIAS PINTO MONTEIRO**

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE METAIS E DO PERFIL  
LIPÍDICO DE ALGUMAS ESPÉCIES DE PEIXES CAVERNÍCOLAS E  
NÃO CAVERNÍCOLAS**

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 23 de fevereiro de 2010

Profa. Dra. Celeste Maria Patto de Abreu                      UFLA

Prof. Dr. Jonas Leal Neto    UFLA

Profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus; aos meus pais, Aladir e Lourdes; à minha filha, Marina e ao meu marido, Bruno, responsáveis por mais uma Vitória em minha vida.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus pais, Aladir e Lourdes, responsáveis pela minha formação.

Em especial, ao meu grande amigo, parceiro e eterno amor, meu marido, Bruno, por todo apoio, carinho, paciência e FORÇA.

A minha filha, Marina, por seu amor, carinho e compreensão nos momentos em que estive ausente durante a realização deste projeto.

A minha tia Sô, meu irmão Thiago e a toda minha família, que sempre torce pelo meu sucesso.

À amiga Mirlaine, pela grande ajuda no início do processo de seleção para o mestrado.

À professora Celeste, pela confiança e amizade.

À professora Luciana Matos, pela orientação e pela amizade.

Ao professor Mário Guerreiro, pela confiança, por toda ajuda, pela paciência, pelos ensinamentos, por toda contribuição e pela amizade.

Ao professor Rodrigo Lopes, por toda ajuda, orientação e amizade.

À professora Paula Perez, pela grande contribuição a este trabalho.

Aos amigos Claiton, Daniel Okamura e Alexandre (Lelê), por toda a ajuda durante a execução do experimento.

Aos novos amigos conquistados durante todo o período do mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Química, Joalis, Xulita, Miriam, Wilson e Dedé, por toda ajuda durante a parte experimental.

À Fapemig, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

***MUITO OBRIGADA!***

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS .....	i
RESUMO GERAL .....	iii
GENERAL ABSTRACT .....	v
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução Geral .....	1
2 Objetivo .....	4
2.1 Objetivo geral .....	4
2.2 Objetivos específicos .....	4
3 Referencial Teórico.....	5
3.1 Sistema cárstico .....	5
3.2 Caverna .....	7
3.2.1 A importância de alguns fatores ecológicos .....	8
3.3 Fauna cavernícola .....	9
3.3.1 Troglóxenos .....	9
3.3.2 Troglófilos .....	10
3.3.3 Troglóbios.....	10
3.4 Modificações no animal troglóbio .....	11
3.5 Lipídeos .....	12
3.5.1 Ácidos graxos .....	14
3.5.2 Síntese dos ácidos graxos .....	16
3.5.3 Função dos ácidos graxos no peixe.....	18
3.6 Síntese dos ácidos graxos .....	19
4 Referências Bibliográficas.....	23

CAPÍTULO 2: Avaliação de metais pesados e perfil lipídico de três espécies de peixes troglóbios ( <i>Ituglanis passensis</i> , <i>Trichomycterus itacarambiensis</i> e <i>Stygichthys typhlops</i> ) e uma troglófila ( <i>Ituglanis</i> spn.).....	27
1 Resumo .....	27
2 Abstract.....	28
3 Introdução .....	29
4 Materiais e Métodos.....	31
4.1 Descrição das amostras de peixes estudadas .....	31
4.2 Determinação da umidade .....	35
4.2.1 Amostras .....	36
4.3 Análise de metais .....	36
4.3.1 Amostras .....	36
4.4 Avaliação do perfil lipídico .....	37
4.4.1 Amostras .....	37
4.4.2 Extração de lipídeos.....	38
4.4.3 Esterificação.....	38
4.4.4 Caracterização dos ésteres de ácidos graxos.....	39
4.5 Análise estatística - PCA .....	39
5 Resultados e Discussão .....	41
5.1 Composição química – umidade, metais e ácidos graxos.....	41
5.2 Composição de ácidos graxos da fração lipídica .....	44
6 Conclusões.....	54
7 Referências Bibliográficas.....	55
CAPÍTULO 3: Avaliação comparativa do perfil lipídico entre a espécie troglóbia <i>Ancistrus cryptophtalmus</i> e a não troglóbia <i>Ancistrus</i> sp.....	59
(O capítulo 3 será transcrito em forma de artigo e posteriormente submetido ao <i>Journal of Cave and Karst Studies</i> ).....	59
1 Resumo .....	59

2 Abstract.....	61
3 Introdução.....	62
4 Materiais e Métodos.....	64
4.1 Descrição das amostras de peixes estudadas.....	64
4.2 Amostras.....	65
4.3 Determinação da umidade.....	66
4.4 Análises de extrato etéreo.....	66
4.4.1 Procedimento de análise.....	67
4.4.2 Cálculo do extrato etéreo.....	67
4.5 Análise de minerais.....	68
4.6 Análise de proteína.....	68
4.7 Extração de lipídeos.....	69
4.7.1 Esterificação.....	69
4.7.2 Caracterização dos ésteres de ácidos graxos.....	70
4.8 Análise estatística - PCA.....	70
5 Resultados e Discussão.....	72
5.1 Composição química.....	72
0,6 %.....	73
5.2 Composição de ácidos graxos da fração lipídica.....	74
6 Conclusões.....	81
7 Referências Bibliográficas.....	82
Estudo de caso – Atividade específica da enzima málica.....	85
1 Introdução.....	85
1.1 Papel da enzima málica no metabolismo de peixes.....	85
2 Objetivo.....	86
3 Dissecção e descrição dos peixes <i>Ancistrus cryptoptalmus</i> e <i>Ancistrus</i> sp.....	86
4 Determinação da atividade enzimática.....	88
4.1 Resultados obtidos, discussão e considerações.....	89

5 Referências bibliográficas.....	92
ANEXOS .....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Ácido graxo
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
C12:0	Ácido láurico
C13:0	Ácido tridecanoico
C14:0	ácido mirístico
C14:1	Ácido miristoleico
C15:0	Ácido pentadecanoico
C16:0	Ácido palmítico
C16:1	Ácido palmitoleico
C17:0	Ácido heptadecanoico
C17:1	Ácido heptadecanoico - cis -10
C18:0	Ácido esteárico
C18:1 $\omega$ 9t	Ácido elaídico
C18:1 $\omega$ 9c	ácido oleico
C18:2 $\omega$ 6c	Ácido linoleico
C20:0	Ácido araquídico
C18:3 $\omega$ 6	Ácido linolênico
C20:1	Ácido eicosenoico cis-11
C18:3 $\omega$ 3	Ácido linolênico
C21:0	Ácido heneicosanoico
C20:2	Ácido eicosadienoico cis-11,14
C22:0	Ácido beênico
C20:3 $\omega$ 6	Ácido eicosatrienoico cis-8, 11,14

C22:1 $\omega$ 9	Ácido erúcico
C20:3 $\omega$ 3	Ácido eicosatrienoico cis-11,14,17
C20:4 $\omega$ 6	Ácido araquidônico
C23:0	Ácido tricosanoico
C22:2	Ácido docosadienoico cis-13,16
C24:0	Ácido lignocérico
C20:5 $\omega$ 3	Ácido eicosapentaenoico cis-5,8,11,15,17 (EPA)
C24:1	Ácido nervônico
C22:6 $\omega$ 3	Ácido docosahexaenoico cis-4, 7, 10, 13, 16, 19 (DHA)
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PCA	Análise de componentes principais
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
sp.	Espécie
spn.	Espécie nova

## RESUMO GERAL

MONTEIRO, Aline Gomes Dias Pinto. **Avaliação da composição de metais e do perfil lipídico de algumas espécies de peixes cavernícolas e não cavernícolas**. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras<sup>1</sup>.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar possíveis contaminações por metais pesados e a influência do meio subterrâneo na composição lipídica dos peixes. Foram utilizados neste estudo peixes das espécies *Ituglanis* spn., *Ituglanis passensis*, *Stygichthys typhlops*, *Trichomycterus itacarambiensis*, *Ancistrus* sp. e *Ancistrus cryptoptalnus*, capturados em rios ou lençóis d'água subterrâneos localizados nos estados de Goiás, Bahia e Minas Gerais. O estudo foi dividido em três capítulos, além de um estudo de caso e as sugestões para trabalhos futuros. No primeiro capítulo apresentam-se os objetivos geral e específico deste trabalho; o referencial teórico, abordando definições sobre caverna e seu processo de formação, a fauna cavernícola, os lipídeos e suas funções no metabolismo dos peixes e a enzima hepática analisada. No segundo capítulo, foi avaliada a composição de metais e do perfil lipídico de três espécies de peixes troglóbios, *Ituglanis passensis*, *Stygichthys typhlops* e *Trichomycterus itacarambiensis*, e uma troglófila, *Ituglanis* spn. Por meio dos resultados, constatou-se que todas as espécies analisadas apresentaram quantidades de alguns dos metais avaliados acima do permitido pela legislação brasileira e que a composição lipídica foi influenciada pelas condições do hábitat, principalmente pelo efeito da alimentação. No terceiro capítulo, foi avaliada a composição de metais, o teor de extrato etéreo e de proteína e a composição do perfil lipídico de uma espécie de peixe troglóbia, *Ancistrus cryptoptalnus* e uma não troglóbia, *Ancistrus* sp., sendo estes pertencentes ao mesmo gênero e capturados em um mesmo rio, em Goiás. Os resultados do perfil lipídico foram utilizados para a comparação entre as duas espécies, a fim de se verificar as possíveis diferenças entre os peixes de hábitat epígeo e hipógeo. Segundo os resultados encontrados, ambas as espécies apresentaram valores superiores ao permitido pela legislação brasileira dos metais Cu, Fe e Zn. A espécie troglóbia, em comparação com a não troglóbia, apresentou quantidades superiores de gordura total e proteína, além de diferenças na composição lipídica, que foi influenciada pelas condições do hábitat, principalmente pelo efeito da alimentação, da temperatura e do sexo do

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Luciana de Matos Alves Pinto - UFLA (Orientadora); Mario César Guerreiro – UFLA e Rodrigo Lopes Ferreira – UFLA

animal. No estudo de caso, foram abordadas as dificuldades encontradas durante a realização da avaliação da atividade específica da enzima málica para as espécies *Ancystrus cryptophthalmus* e *Ancystrus* sp. Além disso, são apresentadas sugestões para a realização de trabalhos futuros.

## GENERAL ABSTRACT

MONTEIRO, Aline Gomes Dias Pinto Monteiro. **Evaluation of the composition of Metals and Lipid Profile of some species of Cave fish and not.** 2010. 98 p. Dissertation (Masters in Agricultural Chemistry) - Universidade Federal de Lavras, Lavras<sup>2</sup>.

This study was conducted to evaluate the metabolism of some cave fishes and the influence that the underground exert on them. The animals used in this study were fishes from the species *Ituglanis* spn, *Ituglanis Passensis*, *Stygichthys*, *Trichomycterus itacarambiensis*, *Ancystrus* sp and *Ancystrus cryptophtalnus* collected from caves and rivers located in the states of Goiás, Bahia and Minas Gerais. The subject was divided into 3 chapters, the case study and final considerations. In the first chapter, the general and specific objectives of this study were presented; the theoretical framework, addressing definitions of the cave and its formation process, cave fauna, lipids and their roles in the fish metabolism; and liver enzyme analyzed in this study. In the second chapter, the composition of the lipid profile of three species of troglobius fishes: *Ituglanis passensis*, *Stygichthys typhlops* and *Trichomycterus itacarambiensis*, and a troglophilic fish: *Ituglanis* spn, were reviewed. In the third chapter the composition of the lipid profile, the level of lipids and some minerals of species of troglobius fish, the *Ancystrus cryptophtalnus*, and a not troglobius fish, the *Ancystrus* sp, were reviewed. Both of them are from the same family, captured in the same river at Goiás. The results of lipid profile, were used to compare the two species, in order to verify the possible differences between the fish from the surface and the hypogeal. It has been reported as a case study the specific activity of the malic enzyme for the species *Ancystrus cryptophtalnus* and *Ancystrus* sp, highlighting the difficulties in implementing this part of the experiment. In closing remarks it was addressed the difficulties encountered during this work. Suggestions have also been developed to carry out future work.

---

<sup>2</sup> Guidance Committee: Luciana de Matos Alves Pinto - UFLA (Adviser); Mario César Guerreiro – UFLA and Rodrigo Lopes Ferreira – UFLA

## **CAPÍTULO 1**

### **1 INTRODUÇÃO GERAL**

A relação entre o homem e a caverna já existe desde o início da sua história, porém, somente a partir da segunda metade do século XIX é que ela passou a ser objeto de estudos científicos. A espeleologia surgiu como uma ciência interdisciplinar que estuda aspectos de geologia, química, hidrologia, biologia, paleontologia e arqueologia, associada à exploração técnica e esportiva desses ambientes (Auler, 1997).

No Brasil, os estudos científicos em cavernas iniciaram-se em 1838, realizados pelo dinamarquês Peter Lund e, desde então, vêm surgindo e crescendo grupos nacionais que se dedicam, especificamente, a estudos em caverna (Bicalho, 2003).

Atualmente, o país possui aproximadamente 7.000 cavernas cadastradas, segundo consulta realizada, em novembro de 2009, ao Cadastro Nacional de Cavernas do Brasil (CNC) e ao Centro Nacional de Estudo, Proteção e Manejo de Cavernas/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (CECAV/IBAMA). Esse quantitativo representa aproximadamente 5% do potencial existente em todo o território brasileiro e, nesse contexto, pode-se afirmar que o país ainda tem potencial promissor no sentido da descoberta de novas cavernas e, conseqüentemente, de novas espécies.

Um dado importante, que deve ser levado em consideração, é o fato de que muitas cavernas estão localizadas em áreas de propriedades particulares e que, além disso, não existe a menor preocupação em preservá-las, até por não se conhecer o seu verdadeiro potencial, em termos de fauna e flora subterrânea.

Nesses ambientes escuros e com pouco alimento vão sendo geradas espécies com características muito diferentes das demais existentes fora desses habitats, ao longo de muitas gerações. Tais características estão frequentemente relacionadas ao aumento de especialização ao modo de vida subterrâneo. Com isso, inúmeras novas espécies de animais surgiram e vêm sendo descobertas.

Os organismos cavernícolas podem ser classificados em três categorias (Holsinger & Culver, 1998): os troglóxenos, os troglófilos e os troglóbios, estes últimos restritos ao meio subterrâneo. Além desses existem os “acidentais”, que compreendem em animais epígeos que penetram (acidentalmente ou não) no ambiente subterrâneo.

Os animais troglóxenos são regularmente encontrados no ambiente subterrâneo, porém, saem do mesmo para completar seu ciclo de vida. Muitos desses indivíduos são responsáveis pela importação de recursos alimentares provenientes do meio externo ao da caverna.

Os troglófilos são animais encontrados em cavernas, que são capazes de completar seu ciclo de vida tanto no meio hipógeo quanto no epígeo.

Os troglóbios vivem em isolamento, sob regime seletivo particular e sua população é relativamente pequena. Possuem, frequentemente, alto grau de diferenciação, quando comparados a organismos aparentados e que vivem fora das cavernas.

Muitos estudos vêm sendo realizados para descobrir a origem e os fatores que caracterizam essas mudanças; aqueles sobre a composição dos ácidos graxos em peixes vêm sendo feitos com animais marinhos e de água doce. No entanto, no Brasil, não há nenhum relato de estudos desta natureza em espécies de peixes cavernícolas.

Nos peixes, os lipídeos são responsáveis por desempenhar uma variedade de funções no organismo. Eles atuam como componentes estruturais, responsáveis pela manutenção da fluidez da membrana plasmática (lipídeos

polares, principalmente fosfolipídeos) e também são fornecedores e armazenadores de energia, que serão utilizados como combustível para a realização de funções fisiológicas básicas, tais como metabolismo, locomoção, crescimento e gametogênese.

A concentração e os tipos de ácidos graxos variam amplamente pelas diferenças existentes nas condições do hábitat e nas dietas de cada espécie e, em menor grau, à bioquímica do metabolismo dos ácidos graxos.

Como forma de preservação das cavernas, assim como das espécies a elas associadas, é importante a realização de um levantamento químico desses ambientes, com a finalidade de monitorar algum tipo de contaminação, como, por exemplo, por metais.

Muitas cavernas estão localizadas em propriedades particulares, próximas de áreas rurais e urbanas, portanto, mais susceptíveis à contaminação por diferentes agentes químicos, o que pode acarretar inúmeros problemas ambientais. Além disso, o conhecimento químico e bioquímico poderá auxiliar no entendimento evolutivo dessas espécies submetidas ao ambiente subterrâneo, o qual é bastante restrito, e também como as adaptações favoreceram sua sobrevivência.

Por se tratarem de animais protegidos por lei, todas as coletas realizadas com as espécies troglóbias foram feitas respeitando-se a quantidade máxima de indivíduos por espécie, permitidas pelas leis voltadas à preservação das cavernas.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Este trabalho foi realizado com o objetivo geral de avaliar a composição dos lipídeos dos peixes cavernícolas *Ancistrus cryptophthalmus*, *Ituglanis* spn., *Ituglanis passensis*, *Stygichthys typhlops* e *Trichomycterus itacarambiensis* e não cavernícola *Ancistrus* sp., além da determinação da composição de metais, enzimática, extrato etéreo e de minerais para algumas dessas espécies.

### 2.2 Objetivos específicos

Especificamente, buscou-se:

- avaliar a composição de metais pesados e de ácidos graxos presentes nas espécies *Ituglanis* spn., *Ituglanis passensis*, *Stygichthys typhlops* e *Trichomycterus itacarambiensis*, correlacionando esses resultados com as diferentes espécies de peixes de água doce, não cavernícolas;

- avaliar a composição química e o perfil de ácidos graxos presentes nas espécies *Ancistrus* sp. e *Ancistrus cryptophthalmus* e comparar esses resultados, evidenciando as similaridades entre os indivíduos dessa espécie de peixe de origem epígea e hipógea;

- avaliar a alteração na lipogênese hepática das espécies *Ancistrus* sp. e *Ancistrus cryptophthalmus*, pela atividade hepática da enzima málica.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Sistema cárstico

Segundo Bicalho (2003), o sistema cárstico, ou relevo cárstico, é um tipo de relevo formado pelo desgaste de rochas, dando origem a diversas outras feições que variam de acordo com as condições climáticas de cada região.

Os sistemas cársticos, do ponto de vista hidrológico e geomorfológico, apresentam três componentes interdependentes: o sistema de cavernas, os aquíferos de conduto e o relevo cárstico.

O carste é, portanto, a unidade funcional de um emaranhado de aquíferos, em bacia de drenagem, com entrada e saída de água fluvial ou pluvial. A gênese e a evolução de uma paisagem cárstica dependem do padrão estrutural, do grau de solubilidade da rocha e da ação de fluxos de água, associados às características ambientais que determinam o funcionamento geológico e biológico de ambientes subterrâneos (Gilbert et al., 1994). Então, feições cársticas são todas as formas de relevos ativos elaborados, sobretudo pelos processos de corrosão química e de abatimento (Kohler, 2001).

Esse sistema pode ser dividido em exocarste, que é o relevo superficial do carste, como dolinas, drenagem descontínua e seca e bocas de cavernas; o endocarste, que são as formas subterrâneas, como as cavernas e o epicarste, que é a zona da interface rocha-solo em área cárstica.

Estima-se que o potencial espeleológico brasileiro possa superar mais de 100.000 cavernas, contudo, cerca de 7.000 encontram-se cadastradas (Auler, 2006). Minas Gerais abriga boa parte da maior província espeleológica brasileira (Grupo Carbonático Bambuí), o que torna este estado o que possui o maior número de cavernas. Grande parte delas localiza-se em áreas calcárias que sofrem

grande pressão por parte de empresas mineradoras, em função da utilização do carbonato de cálcio para a fabricação de cimento (Machado & Ferreira, 2005).

Além de cavernas calcárias, em Minas também é encontrada formação de cavidades naturais em rochas, como quartzito, minério de ferro, arenito, granito e gnaisse, dentre outras, também ameaçadas, principalmente, por atividades de mineração e turismo.

A água das chuvas absorve uma parcela de CO<sub>2</sub> da atmosfera, aumentando a sua acidez. Ao alcançar o solo, esta água se combina novamente com o CO<sub>2</sub> existente neste (oriundos de húmus, raízes e microorganismos, por meio do metabolismo), formando o ácido carbônico e aumentando a concentração de CO<sub>2</sub> (equação 1). Com isso a água adquire acidez relativamente alta (Teixeira et al., 2000).

A água ácida atinge o lençol freático, permeando pela rocha e dissolvendo o carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) (equação 2), dando origem a diversas feições físicas.



Essas feições vão se formando, determinadas pelo clima e pelas características geológicas e biológicas de cada região, que originam as diversas feições associadas ao endocarste e ao exocarste (Bicalho, 2003).

O sistema cárstico ocorre em rochas calcárias. No entanto, há a possibilidade de que ele ocorra em outros tipos de rochas carbonáticas, como o mármore e as rochas dolomíticas.

### **3.2 Caverna**

Segundo o Decreto nº 99.556, de 1º de outubro de 1990, entende-se como cavidade natural subterrânea todo e qualquer espaço subterrâneo penetrável pelo homem, com ou sem abertura identificada, popularmente conhecido como caverna, incluindo seu ambiente, conteúdo mineral e hídrico, a fauna e a flora ali encontrados e o corpo rochoso onde os mesmos se inserem, desde que a sua formação tenha ocorrido por processos naturais, independentemente de suas dimensões ou do tipo de rocha encaixante. Nesta designação estão incluídos todos os termos regionais, tais como gruta, lapa, toca, abismo, furna e buraco.

As cavernas são sistemas dinâmicos (em termos geológicos e biológicos) em constante modificação, principalmente pela ação da água que atua na formação, na moldagem e na deposição de inúmeras feições (Gilbert et al., 1994).

Elas podem ser encontradas em vários tipos de rochas, em especial nas mais solúveis, que são formadas de massas rochosas carbonáticas, cuja maioria é formada por calcita (carbonato de cálcio), por apresentar alta solubilidade em água, facilitando o processo de formação das cavernas, pelo processo de carstificação.

Os ambientes externos, ou sistemas epígeos, são utilizados como base para a comparação das condições ecológicas prevalentes nos ambientes subterrâneos, chamados de sistemas hipógeos. Dessa forma, o meio cavernícola é caracterizado, principalmente, pela ausência permanente de luz, fazendo com que muitas das características bióticas e abióticas desses ambientes sejam influenciadas pela constância desta pressão ambiental. Geralmente, o ambiente físico subterrâneo varia menos que o ambiente epígeo circundante e os parâmetros ambientais caracterizam-se por permanecerem praticamente estáveis na maioria das cavernas (Culver, 1982).

Em cavernas mais extensas, a temperatura é caracterizada por apresentar pouca oscilação nos locais mais distantes da entrada. Os valores de temperatura,

geralmente, aproximam-se da média anual do ambiente epígeo (Barr & Kuehne, 1971). Já em cavernas menores, as variações são mais evidentes, devido à maior influência do meio externo. Além disso, o ambiente subterrâneo é caracterizado pela elevada umidade (Poulson & White, 1969; Howarth, 1983). Dessa forma, o meio cavernícola pode ser caracterizado como um ambiente de elevada estabilidade ambiental, devido à ausência permanente de luz e à temperatura e umidade constantes (Poulson & White, 1969; Culver, 1982). Porém, tais condições não são estáticas e podem sofrer alterações ao longo do tempo, dependendo de fatores como dimensão da caverna, localização, morfologia e orientação das entradas, dentre outros.

Segundo Prous et al. (2004), regiões próximas às entradas demonstram gradientes de modificações estruturais, biológicas e físicas, criando uma zona de transição entre os sistemas epígeos e hipógeos. Dessa forma, a entrada de uma caverna pode ser considerada um ecótono. Essa região localiza-se em uma zona diferenciada pelo equilíbrio entre a disponibilidade de recursos (característica epígea) e pela estabilidade ambiental (característica hipógea). Tal fato indica que a zona de entrada pode funcionar como um filtro entre dois ambientes adjacentes, permitindo que somente organismos pré-adaptados possam atravessar e colonizar as cavernas.

### **3.2.1 A importância de alguns fatores ecológicos**

A biodiversidade é afetada diretamente por alguns fatores ecológicos que variam de acordo com a especificidade de cada caverna e da respectiva região.

Em relação à luz, a caverna pode ser caracterizada em três zonas importantes que são: zona iluminada, predominante na entrada da gruta, com grande quantidade de luz, permitindo assim o desenvolvimento de plantas que necessitam da luz solar para realizarem as suas funções vitais; zona de penumbra, predominante no interior da cavidade, onde a luz é significativamente reduzida,

não permitindo o desenvolvimento de plantas, exceto quando sementes são carregadas para dentro da caverna e na qual desenvolvem-se alguns tipos de fungos e zona escura, ou profunda, na qual a ausência de luz é total e permanente e onde existe uma rica bacteriota, que exerce função primordial na decomposição do guano e na alimentação de alguns outros organismos (Camacho, 1992).

A temperatura é, geralmente, constante e igual à média das temperaturas anuais exteriores, apresentando variação de acordo com a forma das galerias, o número de entradas a localização e a altitude das cavidades (Poulson & White, 1969; Culver, 1982).

A matéria orgânica proveniente do meio externo compõe-se de restos orgânicos em decomposição que penetram pelas entradas ou fissuras nas rochas que acessam as cavernas. Além disso, alguns agentes biológicos (como morcegos) podem transportar compostos orgânicos na forma de fezes (guano) ou de seus próprios cadáveres. Esses substratos são responsáveis pela sobrevivência de grande parte da vida subterrânea (Prous et al., 2004).

### **3.3 Fauna cavernícola**

Nesse ambiente afótico e com escassez de alimento surgiram, ao longo de gerações, espécies com características muito diferenciadas, quando comparadas às espécies existentes nos ambientes externos.

As espécies encontradas nas cavernas podem ser classificadas em três categorias, de acordo com o proposto por Schinner e Racovitza (modificado em & Culver, 1988), as quais são descritas a seguir.

#### **3.3.1 Troglóxenos**

Os troglóxenos são regularmente encontrados em ambientes subterrâneos, utilizando-os como abrigos, no entanto, devem obrigatoriamente sair das cavernas para completar seu ciclo de vida. Os mais comuns são os

morcegos e alguns aracnídeos, além de anfíbios e répteis, que podem ser citados como exemplo dessa categoria (Holsinger & Culver, 1988).

### **3.3.2 Troglófilos**

Os troglófilos também são encontrados em ambientes subterrâneos, porém, não vivem exclusivamente em cavernas. Eles podem completar seu ciclo de vida tanto nesse meio quanto fora dele e também podem utilizá-lo em fases do seu ciclo de vida, para abrigo ou reprodução (Holsinger & Culver, 1988).

Certas espécies podem, ainda, ser troglófilas, sob certas circunstâncias e troglóxenas em outras (por exemplo, em cavernas que apresentam baixa disponibilidade de alimento).

### **3.3.3 Troglóbios**

Os troglóbios são restritos ao meio subterrâneo, podendo ser peixes, crustáceos, insetos e esponjas, dentre outros grupos, sendo os peixes o foco principal do presente estudo. São organismos altamente especializados e perfeitamente adaptados ao meio subterrâneo (Trajano, 2000).

Os troglóbios vivem em isolamento e suas populações são relativamente pequenas. Possuem alto grau de diferenciação em comparação aos animais de espécies semelhantes, que vivem fora do ambiente subterrâneo. Essas diferenças podem ser percebidas quanto: à morfologia (redução dos olhos e da pigmentação melânica), à biologia (fecundidade baixa, maturidade retardada, taxas de crescimento baixas e alta longevidade), à fisiologia (taxas metabólicas reduzidas) e ao comportamento (alteração da ritmicidade cicardiana) (Hadley et al., 1981).

Além das três categorias anteriormente mencionadas (que serão detalhadas à frente), existem os chamados “acidentais”. Tais organismos fazem parte da fauna externa e não têm nenhuma pré-adaptação à vida subterrânea, mas

podem ser encontrados em cavernas, por terem caído em abismos ou para se esconder de predadores, dentre outras situações (Ferreira et al., 2009).

### **3.4 Modificações no animal troglóbio**

Uma modificação morfológica bastante difundida entre espécies troglóbias é a redução da pigmentação. Os pigmentos exercem uma função de proteção para os animais contra a radiação solar. Como o ambiente subterrâneo é desprovido de luz, os troglóbios, em geral, exibem despigmentação total ou parcial.

Outro aspecto que pode ser observado é a redução oftálmica ou anofthalmia, que é a regressão das estruturas oculares ou a sua inexistência no estado adulto, como resposta à ausência de luz. No estado embrionário ou larval, muitas espécies ainda possuem as estruturas oculares, que vão regredindo à medida que se dá o desenvolvimento (Holsinger & Culver, 1988). Como consequência da perda da visão, o tato e o olfato se tornam mais sensíveis, ou seja, órgãos táteis, como as antenas, apresentam-se mais desenvolvidos. Também pela inviabilização das asas ou apterismo, no caso de insetos, cujas asas deixam de exercer suas funções, as mesmas reduzem-se, podendo chegar a inexistir.

Pela redução ou o aumento de tamanho, quando comparado com animais não troglóbios de mesma espécie, os troglóbios possuem tendência ao nanismo ou ao gigantismo, além do aumento da linha lateral, que pode ser considerado uma compensação sensorial, pelo aumento significativo da sensibilidade em relação à temperatura e vibrações existentes no meio.

A produção de menos ovos também é uma característica importante, pois, como as cavernas são consideradas ambientes estáveis, a estratégia ecológica do tipo K é a mais utilizada pelos troglóbios. Isso acontece com o objetivo de poupar energia e diminuir a quantidade de ovos, consequentemente aumentando a quantidade de nutrientes em cada ovo, de forma a garantir um

aumento do tamanho corporal da prole, diminuindo a predação e aumentando as chances de sobrevivência nos primeiros momentos de vida (Poulson & White, 1969; Culver, 1982).

Os animais troglóbios possuem elevada capacidade de armazenar nutrientes e passar longos períodos em jejum. Além disso, exibem taxa metabólica inferior às observadas em espécies epígeas. Consequentemente, ocorre menor desgaste celular, permitindo viverem por muito mais tempo (Culver, 1982).

### **3.5 Lipídeos**

Inúmeros estudos já foram desenvolvidos com o objetivo de descobrir a origem e os fatores que caracterizam as mudanças sofridas pelos animais troglóbios ao longo de sua evolução, dando origem a diferentes caracteres troglomórficos. Uma das estratégias utilizadas para iniciar essa investigação e tentar avaliar essas modificações no metabolismo de peixes é o estudo da composição lipídica.

No Brasil, apesar de sua riqueza hidrográfica, somente algumas espécies de peixes, não troglóbias, foram avaliadas quanto à composição dos ácidos graxos (Gurgel & Freitas, 1977). Para espécies troglóbias, ainda não há nenhum relato de estudos dessa natureza.

Quanto aos lipídeos, os mesmos podem ser definidos como um grupo heterogêneo de compostos que incluem os óleos e as gorduras, as ceras e os componentes correlatos encontrados em todo tipo de organismo vivo.

Os lipídeos são caracterizados por sua baixa solubilidade em água e alta solubilidade em solventes orgânicos. Dentre as várias funções dos lipídeos no organismo, as principais são armazenar e fornecer energia, além de servirem como componentes estruturais da membrana (Figura 1) (Lehninger, 2006). Eles classificam-se, tradicionalmente, em: acilgliceróis, ceras, fosfolipídeos,

esfingolípídeos, glicolípídeos e lípídeos terpenóides, nos quais estão incluídos os carotenóides, e os esteróides (Conn & Stumpf, 1980). Nos peixes, que são animais ectotérmicos, os lípídeos polares, como os fosfolípídeos, atuam como componentes estruturais responsáveis pela manutenção da fluidez da membrana plasmática; já os lípídeos neutros, como os triacilgliceróis, atuam como fornecedores e armazenadores da energia que será utilizada como combustível, para a realização das funções fisiológicas básicas, como metabolismo, locomoção, crescimento e gametogênese (Brown & Murphy, 1995).

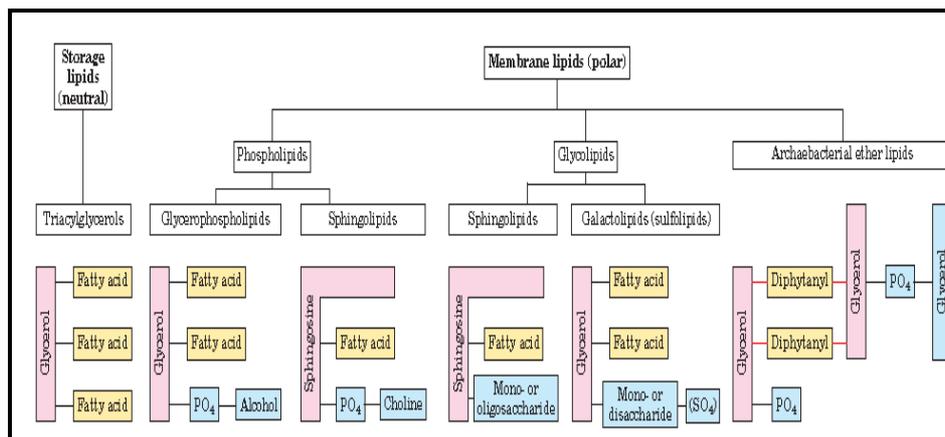


FIGURA 1 Alguns tipos comuns de lípídeos de estoque e de membrana  
Fonte: Lehninger (2006).

A digestão e a absorção dos lípídeos ingeridos ocorrem no intestino delgado e os ácidos graxos liberados dos triacilgliceróis são reunidos e enviados para os músculos e o tecido adiposo (Lehninger, 2006).

A maioria dos lípídeos contém ou é derivado de ácidos graxos (Devlin, 2007).

### 3.5.1 Ácidos graxos

Os ácidos graxos estão associados à maioria dos lipídeos, como principal componente, contendo número par de átomos de carbono (de 4 a 30) em cadeias retas, geralmente saturadas e que podem conter de uma a seis duplas ligações (Conn & Stumpf, 1980). Ácidos graxos de número ímpar de carbono também são encontrados em peixes, porém, em pequenas proporções (Lehninger, 2006).

Os ácidos graxos podem ser definidos como compostos que possuem cadeias longas de hidrocarboneto, contendo um grupo carboxila em uma extremidade e um grupo metil na outra. Eles podem ser classificados como ácidos graxos saturados (*saturated fatty acids* ou SFA) (Figura 2), monoinsaturados (*monounsaturated fatty* ou MUFA), poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids* ou PUFA) (Figura 3) e os ácidos graxos trans ou cis (Figura 3) (Devlin, 2007).

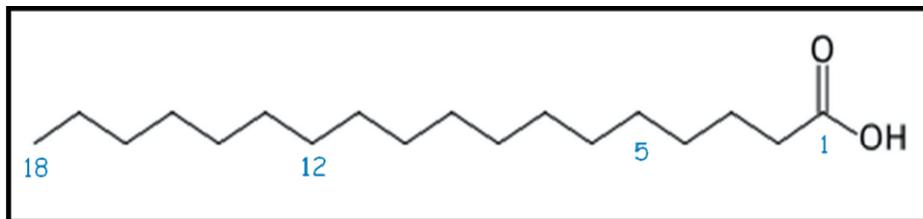


FIGURA 2 Ácido esteárico (C18:0): exemplo de AGS.

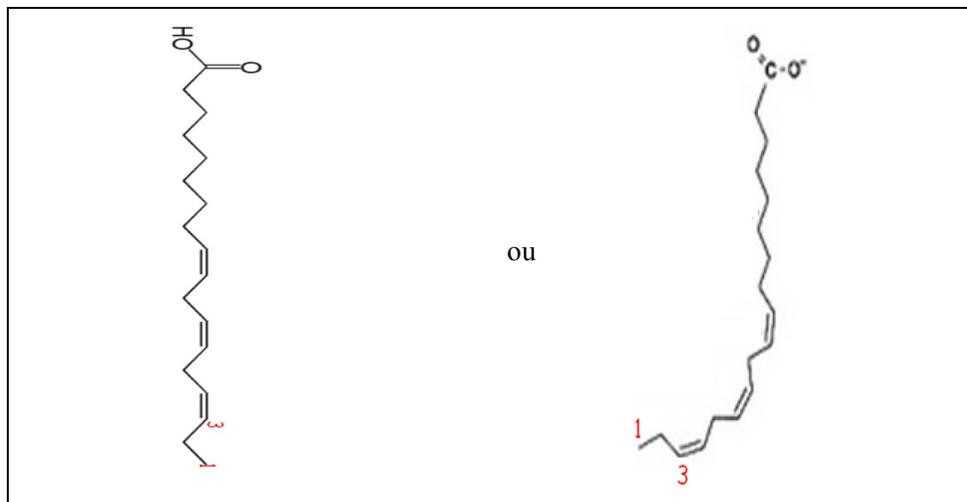


FIGURA 3 Ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico (ácido  $\alpha$ -linolênico) (C18:3,  $\omega$ -3): exemplo de AGI do tipo ômega e cis.

Os ácidos graxos podem ser descritos por uma notação abreviada, em que o primeiro número é de átomos de carbono. Separado por dois pontos vem o de duplas ligações e, por fim, a posição das duplas ligações, contando-as a partir da carboxila. Então, como exemplo, o ácido araquidônico, um ácido graxo insaturado de 20 átomos de carbono, pode ser descrito como 20:4 (5,8,11,14) ou C20:4 (5,8,11,14) ou C20:4 (Conn & Stumpf, 1980).

A designação de ômega tem relação com a posição da primeira dupla ligação (Figura 3), contando a partir do grupo metílico final da molécula de ácido graxo. Os ácidos graxos  $\omega$ -3 apresentam a primeira dupla ligação entre o terceiro e o quarto átomo de carbono, enquanto os ácidos graxos  $\omega$ -6 têm a primeira dupla ligação entre o sexto e o sétimo átomo de carbono (Sonntag, 1979). As famílias de ácidos graxos ômega-3 (n-3 ou  $\omega$ -3) e ômega-6 (n-6 ou  $\omega$ -6) contêm de 18 a 22 carbonos. Os principais ácidos graxos  $\omega$ -3 são o ácido linolênico 18:3, o ácido eicosapentaenoico (EPA) 20:5 e o ácido docosahexaenoico (DHA) 22:6,

enquanto os principais  $\omega$ -6 são o ácido linoleico 18:2 (Mayser et al., 1998) e o ácido araquidônico 20:4.

Entre as principais funções dos ácidos graxos estão o depósito de energia e a conformação das membranas celulares, sendo também precursoras de substâncias como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (Harris, 1999). O número e a posição das duplas ligações determinam as propriedades físicas e químicas dos PUFA's. As famílias  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 têm diferentes funções fisiológicas e atuam em conjunto para regular os processos biológicos (Newton, 1996). O ácido linoleico e o ácido  $\alpha$ -linolênico são ácidos graxos essenciais (*essential fatty acids* ou EFA) porque as duplas ligações, situadas no terceiro e no sexto átomos de carbono, não podem ser produzidas pelo organismo humano, de forma que os ácidos graxos essenciais devem ser obtidos a partir da dieta. O ácido linoleico e o ácido  $\alpha$ -linolênico, porém, podem ser alongados e dessaturados pelo sistema enzimático para produzir DHA e EPA, a partir de óleos vegetais provenientes da alimentação. Porém, isso ocorre em baixa porcentagem (Connor, 2000).

### **3.5.2 Síntese dos ácidos graxos**

A síntese orgânica dos ácidos graxos saturados acontece no citoplasma, por um sistema enzimático complexo cujo ponto de partida é a acetil-CoA (Ribeiro, 2003). A partir dos ácidos graxos saturados formam-se os monoinsaturados, no fígado, por meio de reações catalisadas por dessaturases microsossomais. Dos monoinsaturados originam-se os poliinsaturados, por ação de dessaturases específicas para a posição da dupla ligação na cadeia (Belda & Pourchet-Campos, 1991), conforme ilustrado na Figura 4.

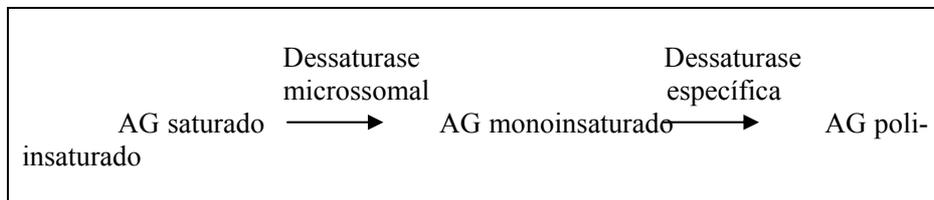


FIGURA 4 Resumo da síntese dos ácidos graxos poli-insaturados, a partir de um ácido graxo saturado.

Os ácidos linoleico e araquidônico possuem em comum uma dupla ligação entre os carbonos 6 e 7 (série linoleica ou  $\omega$ -6), o que possibilita a síntese do araquidônico a partir do linoleico, mas não o contrário. Já o ácido graxo  $\alpha$ -linolênico tem duplas ligações entre os carbonos 3,4 e 6,7 (série linolênica ou  $\omega$ -3) (Figura 5). O metabolismo animal não tem capacidade de dessaturar para a extremidade metila e, portanto, a conversão de membros de uma família ômega em outra não é possível em mamíferos. Os animais são incapazes de produzir endogenamente as famílias ômega-6 e ômega-3 que, portanto, devem ser supridas pela alimentação. Dessa forma, os ácidos linoleico e linolênico, precursores dessas famílias, são essenciais para os animais, sendo sintetizados somente pelas plantas.

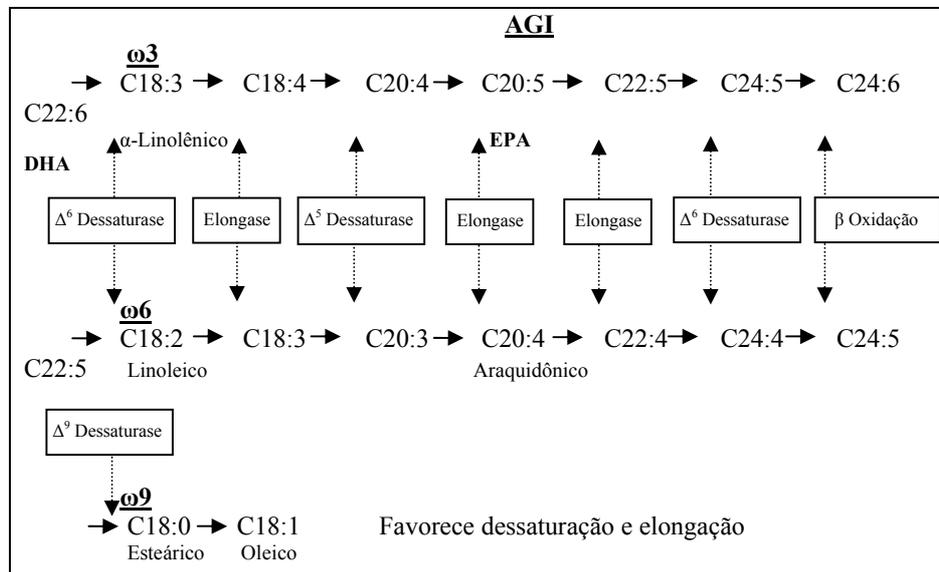


FIGURA 5 Biossíntese de ácidos graxos essenciais em animais.

### 3.5.3 Função dos ácidos graxos no peixe

Os ácidos graxos poli-insaturados das séries  $\omega$  são componentes estruturais da membrana celular, sendo parte integrante de sua estrutura lipoproteica, garantindo a sua manutenção. São também precursores de um grupo de substâncias denominadas eicosanoides. Estes atuam como hormônios locais na regulação de processos fisiológicos, inclusive os processos inflamatórios, que sofrem influência da proporção de ácidos graxos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3.

Além disso, quanto maior o número de insaturações, mais baixo é o ponto de fusão do ácido graxo, ou seja, a formação de alguns deles é diretamente influenciada pela temperatura da água a que o animal estiver submetido.

Os ácidos graxos  $\omega$ -3, principalmente o eicosapentaenoico ( $C20:5$ ) e o docosa-hexaenoico ( $C22:6$ ), incorporados no interior da membrana celular, influem na permeabilidade da mesma, agindo nas funções de receptor, na

atividade enzimática, nas citoquinas e na produção de eicosanoides (Meydani, 2000).

Os  $\omega$ -6 geram eicosanoides das séries 2 e 4 e os  $\omega$ -3 e eicosanoides, das séries 3 e 5. Dependendo da procedência dos eicosanoides, o efeito fisiológico no organismo será diferente. O ácido linoleico converte-se em longas cadeias, tal como o ácido  $\alpha$ -linolênico e o ácido araquidônico (AA), por meio do processo de dessaturação e alongação. O ácido graxo  $\alpha$ -linolênico é convertido em ácido eicosapentaenoico e em ácido docosa-hexaenoico.

O ácido araquidônico (C20:4,  $\omega$ -6) é obtido a partir de três fontes: fosfolipídeos de reserva do organismo, alimentação e do processo de alongamento e dessaturação do ácido linoleico (C18:2,  $\omega$ -6), muito frequente nos alimentos e oxidado em presença da enzima lipoxigenase ou cicloxigenase, convertendo-se em peróxidos lineais ou cíclicos (endoperóxidos). Um peróxido cíclico transforma-se dentro das plaquetas em tromboxano-TXA2 e, no endotélio dos vasos sanguíneos, em prostaciclina - PGI2 e diversas protaglandinas (Stansby, 1982).

É necessário destacar como são importantes os efeitos antagonistas do tromboxano e a prostaciclina. O tromboxano favorece a agregação das plaquetas, enquanto a prostaciclina inibe a agregação das plaquetas e dispersa os agregados já formados (Sanders, 2000).

A composição dos lipídeos varia não só pelo efeito da alimentação do animal, mas também com a espécie analisada e seu estágio de desenvolvimento.

### **3.6 Síntese dos ácidos graxos**

O ambiente subterrâneo tem a escassez de alimento como uma característica marcante. Os animais troglóbios, oriundos desse ambiente, são submetidos a essa escassez e utilizam, como estratégia de sobrevivência, o

armazenamento de calorias, quando um alimento está disponível. Posteriormente, tais calorias são mobilizadas quando o resto do corpo estiver precisando.

A regulação hepática tem papel fundamental no equilíbrio energético corporal, em que o fígado é o principal local do metabolismo de carboidrato (glicólise e síntese de glicogênio) e síntese de triglicerídeos (lipogênese). A lipogênese é regulada por atividades enzimáticas específicas fundamentais controladas pela insulina e pela presença de glicose (Granner & Piskis, 1990).

As enzimas glicolíticas e lipogênicas envolvidas no metabolismo de carboidrato e lipídeo são: glicoquinase (GK), piruvato quinase hepática (L-PK), ATP citrato liase, acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), enzima málica e 6 fosfogliconato desidrogenase (6PGDH) (Dentin et al., 2005).

O excesso de glicose é convertido em piruvato via glicólise. O piruvato é importado para a mitocôndria e convertido em acetil-CoA, então transportado como citrato da mitocôndria para o citoplasma. O citrato é convertido de volta para acetil-CoA pela enzima ATP citrato liase. Em sete passos enzimáticos, o acetil-CoA e o malonil-CoA são convertidos em palmitato pela enzima ácido graxo sintase (utilizando NADPH gerado pela via das pentoses fosfato e pela enzima málica) (Griffin & Sul, 2004) (Figura 6).

Com isso, o excesso de carboidrato aumenta a disponibilidade de glicose que ativa a insulina, sendo que ambas ativam as enzimas lipogênicas e glicolíticas, promovendo maior estoque de triglicerídeos (Granner & Piskis, 1990).

A concentração de ácidos graxos no sangue que entra no fígado é um importante determinante da taxa de cetogênese, ou seja, superprodução metabólica de acetoacetato e seus derivados,  $\beta$ - hidroxibutirato e acetona, na matriz mitocondrial do fígado, quando o acetil-CoA é produzido em excesso durante jejum prolongado (Devlin, 2007).

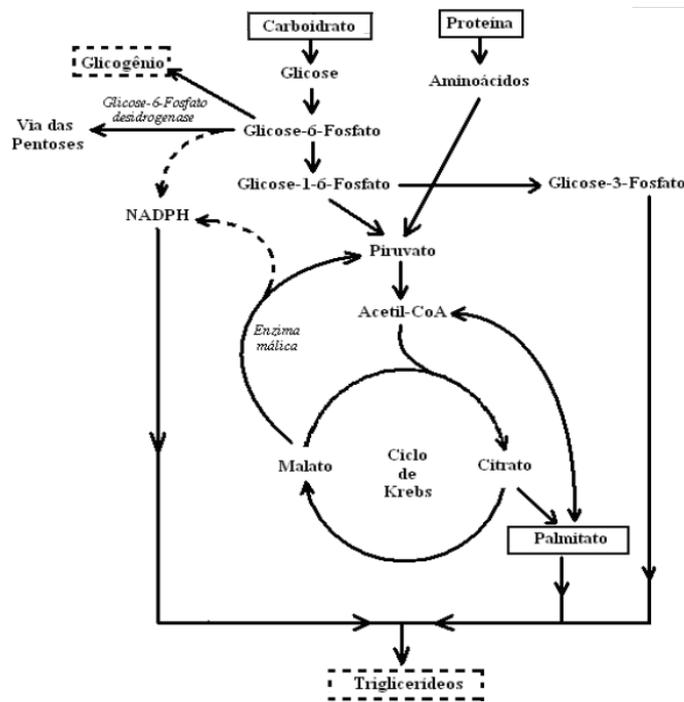


FIGURA 6 Ilustração da síntese de ácido graxo e triglicerídeos, a partir da proteína e da glicose.

De modo geral, o NADPH é o transportador de elétrons para as reações anabólicas e  $\text{NAD}^+$  é utilizado nas reações catabólicas. Nos hepatócitos, a relação  $[\text{NADPH}]/[\text{NADP}^+]$  é muito elevada no citosol, fornecendo um ambiente fortemente redutor para a síntese redutiva dos ácidos graxos e outras biomoléculas. Como a proporção citosólica  $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$  é muito menor, o catabolismo oxidativo da glicose dependente de  $\text{NAD}^+$  pode ocorrer no mesmo compartimento e ao mesmo tempo que ocorre a síntese de ácidos graxos. O  $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$  na mitocôndria é muito maior do que no citosol por causa do fluxo de elétrons para o  $\text{NAD}^+$  proveniente da oxidação dos ácidos graxos,

aminoácidos, piruvato e acetil-CoA. A alta relação  $[NADH] / [NAD^+]$  facilita a redução do oxigênio por meio da cadeia respiratória.

Nos hepatócitos e nos adipócitos, o NADPH citosólico é produzido em grandes quantidades pela enzima málica, conforme Figura 7, e pela via das pentoses, conforme Figura 8.

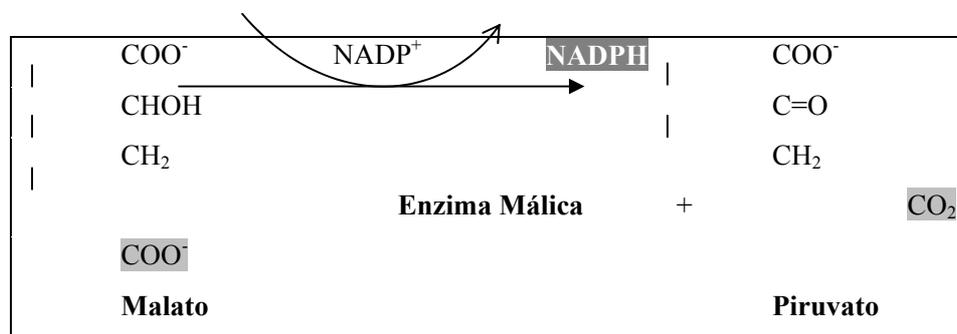


FIGURA 7 Produção de NADPH catalisada pela enzima málica.

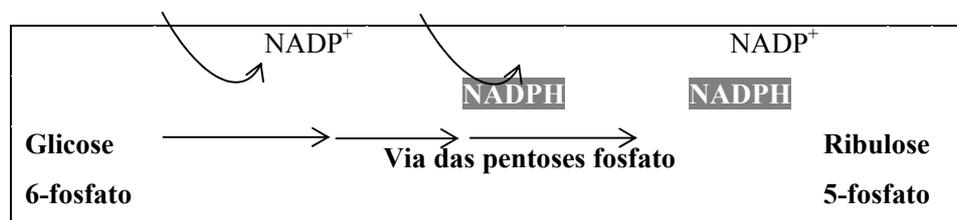


FIGURA 8 Produção de NADPH a partir da via das pentoses.

De forma geral, a enzima málica catalisa a descarboxilação oxidativa do malato a piruvato e  $\text{CO}_2$  que, em paralelo, reduz o cofator  $\text{NADP}^+$  à NADPH.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AULER, A. Espeleologia no Brasil: uma abordagem histórica. **Espeleo-Tema**, São Paulo, v. 18, p. 23-30, 1997.

AULER, A. Relevância de cavidades naturais subterrâneas - contextualização, impactos ambientais e aspectos jurídicos. In: BRASIL. Ministério das Minas e Energia. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. **Projeto BRA/01/039: apoio à reestruturação do setor energético**. Brasília, 2006. 166 p.

BARR, T. C.; KUENHE, R. A. Ecological studies in the mammoth cave ecosystems of Kentucky, II. The ecosystem. **Annales de Speleologie**, Paris, v. 26, n. 1, p. 47-96, 1971.

BELDA, M. C. R.; POURCHET-CAMPOS, M. A. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 5-35, 1991.

BICALHO, C. C. **Noções básicas de espeleologia**. Brasília: EGB, 2003. Apostila. Disponível em: <<http://www.espeleogrupodebrasil.org/cavernas/downloads.asp>>. Acesso em: 1 dez. 2009.

BRASIL. Decreto 99556/90, de 1º de outubro de 1990. Dispõe sobre a proteção das cavidades naturais subterrâneas existentes no território nacional, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 out. 1990.

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

CAMACHO, A. I. **The natural history of biospeleology**. Madrid: SCIC, 1992. 680 p.

CENTRO NACIONAL DE ESTUDOS, PROTEÇÃO E MANEJO DE CAVERNAS. **Base de dados geoespacializados de cavidades naturais subterrâneas do CECAV/IBAMA**. Disponível em: <[www.ibama.gov.br/cecav/index.php?id\\_menu=228](http://www.ibama.gov.br/cecav/index.php?id_menu=228)>. Acesso em: 16 nov. 2009.

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

CONNOR, W. E. Importance of  $\omega$ -3 fatty acids in health and disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 71, n. 1, p. 171S-175S, Jan. 2000. Supplement.

CULVER, D. C. **Cave life evolution and ecology**. Cambridge: Harvard University, 1982. 189 p.

DENTIN, R.; GIRARD, J.; POSTIC, C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. **Biochimie**, Paris, v. 87, n. 1, p. 81-86, Jan. 2005.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: E. Blücher, 2007.

FERREIRA, A. S.; DANTAS, M. A. T.; DONATO, C. R. Ocorrência de *leptodactylus vastus lutz*, 1930 (amphibia-anura:leptodactylidae) na caverna Toca da Raposa, Simão Dias, Sergipe. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 30., 2009, Montes Claros. **Anais...** Montes Claros: SBE, 2009. p. 57-62.

GILBERT, J.; DANIELOPOL, D. L.; STANFORD, J. A. **Groundwater ecology**. San Diego: Academic, 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.

GRIFFIN, M. J.; SUL, H. S. Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: Roles of USF and SREBP -1c. **IUBMB Life**, Philadelphia, v. 56, n. 10, p. 595-600, Oct. 2004.

GURGEL, J. J. S.; FREITAS, J. V. F. Variação estacional do teor de gordura do curimatã comum, *Prochilodus cearensis* Steindachner, pescada do Piauí, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel) e traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch) no açude Orós, em Orós, Ceará. **Boletim Técnico DNOCS**, Fortaleza, v. 35, n. 2, p. 149-163, dez. 1977.

HADLEY, N. F.; AHEARN, G. A.; HOWARTH, F. G. Water and metabolic relations of cave adapted and epigeal lycosid spiders in Hawaii. **Journal of Arachnology**, Lubbock, v. 9, n. 2, p. 215-222, 1981.

HARRIS, W. S. Nonpharmacologic treatment of hypertriglyceridemia: focus on fish oils. **Clinical Cardiology**, Mahwah, v. 22, n. 6, p. 40-43, June 1999. Supplement II.

HOLSINGER, J. R.; CULVER, D. C. The invertebrate cave fauna of Virginia and a part of eastern tennessee: zoogeography and ecology. **Brimleyana**, Raleigh, v. 14, p. 1-162, 1988.

HOWARTH, F.G. Ecology of cave arthropods. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 28, p. 365-389, 1983.

KOHLER, H. C. Geomorfologia carstica. In: TEIXEIRA, A. J. G.; CUNHA, S. B. (Org.). **Geomorfologia: uma atualização de bases e conceitos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Bertrand, 2001. p. 309-334.

LEHNINGER, A. L. Lipídeos. In: \_\_\_\_\_. **Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. cap. 10, p. 342-367.

MACHADO, S. F.; FERREIRA, R. L. **Invertebrados, biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para a sua conservação**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2005. 94 p.

MAYSER, P.; MROWIETZ, U.; ARENBERGER, P.; BARTAK, P.; BUCHVALD, J.; CRISTHOPHER, E.; JABLONSKA, S.; SALMOHOFER, W.; SCHILL, W. B.; KRAMER, H. J.; SCHLOTZER, E.; MAYER, K.; SEEGER, W.; GRIMMINGER, F. Omega-3 fatty acid-based lipid infusion in patients with chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v. 38, n. 4, p. 539-547, Apr. 1998.

MEYDANI, M. Omega-3 fatty acids alter soluble markers of endothelial function in coronary heart disease patients. **Nutrition Reviews**, New York, v. 58, n. 2, p. 56-59, Feb. 2000.

NEWTON, I. S. Food enrichment with long-chain  $\omega$ -3 PUFA. **Food Technology**, Chicago, v. 7, n. 2, p 169-177, 1996.

POULSON, T. L.; WHITE, W. B. The cave environment. **Science**, Washington, v. 165, n. 3897, p. 971-981, Sept. 1969.

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

RIBEIRO, P. A. P. **Perfil de ácidos graxos poliinsaturados em filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) mantidas em diferentes condições de cultivo**. 2003. 56 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANDERS, A. B. T. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 71, n. 1, p. 176S-178S, Jan. 2000. Supplement.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ESPELEOLOGIA. **Cadastro nacional de cavernas do Brasil**. Disponível em: <[www.ssbe.com.br/cnc.asp](http://www.ssbe.com.br/cnc.asp)>. Acesso em: 1 dez. 2009.

SONNTAG, N. O. V. Structure and composition of fats and oils. In: SWERN, D. (Ed). **Bailey's industrial oil and fat products**. New York: J. Wiley, 1979. v. 1, p. 1-98.

STANSBY, M. E. Properties of fish oils and their application to handling of fish and to nutritional and industry use. In: MARTIN, R. E.; FLICK, G. J.; HEBARD, C. E.; WARD, D. R. (Ed.). **Chemistry and biochemistry of marine food products**. Wesport: AVI, 1982. p. 75-92.

TEIXEIRA, W.; TOLEDO, M. C. M.; FAIRCHILD, T. R.; TAIOLI, F. **Decifrando a terra São Paulo**: oficina de textos. São Paulo: Terra Virgem, 2000.

TRAJANO, E. Cave faunas in the Atlantic tropical rain forest: composition, ecology, and conservation. **Biotropica**, Washington, v. 32, n. 4, p. 882-983, Dec. 2000.

## CAPÍTULO 2

### **AVALIAÇÃO DE METAIS PESADOS E PERFIL LIPÍDICO DE TRÊS ESPÉCIES DE PEIXES TROGLÓBIOS (*Ituglanis passensis*, *Trichomycterus itacarambiensis* e *Stygichthys typhlops*) E UMA TROGLÓFILA (*Ituglanis* spn.)**

(O capítulo 2 será transcrito em forma de artigo e posteriormente submetido ao  
Journal of Cave and Karst Studies)

#### **1 RESUMO**

Neste trabalho, foram utilizadas três espécies de peixes troglóbios (*Ituglanis passensis*, *Trichomycterus itacarambiensis* e *Stygichthys typhlops*) e uma troglófila (*Ituglanis* spn.). Apesar de o Brasil ter um grande potencial de cavernas, a maioria delas ainda não foi descoberta ou biologicamente explorada. A fauna associada a esses ambientes encontra-se ameaçada pelo desconhecimento de seu potencial ou má utilização das cavernas. No intuito de verificar a existência de contaminação dessas cavernas, foi realizada a pesquisa de metais pesados nos peixes. Com o objetivo de pesquisar sobre o metabolismo desses animais, em especial aqueles que sofreram modificações devido ao meio em que estão submetidos, foi realizada uma análise do perfil lipídico, por meio de cromatografia gasosa com um detector de ionização de chama. Com isso, a espécie *Trichomycterus itacarambiensis* apresentou diferenças significativas na concentração de Fe (59,99 ppm), Hg (0,70 ppm), Mn (15,22 ppm) e Pb (3,44 ppm), o *Stygichthys typhlops* de Cr (1,19 ppm), Fe (219,80 ppm), Mn (81,47 ppm), Pb (9,13 ppm) e Se (1,9 ppm) e o *Ituglanis* spn. de Fe (53,74 ppm) e Mn (2,56 ppm), estando tais concentrações acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Foram identificados 25 ácidos graxos nas espécies troglóbias *Ituglanis passensis*, 28 na *Trichomycterus itacarambiensis*, 25 na *Stygichthys typhlops* e 30 na troglófila *Ituglanis* spn., onde alguns desses ácidos apresentaram maior concentração em relação aos outros para todas as espécies, como os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9c) e o ácido linoleico (C18:2n6c). Esses resultados mostraram que a composição lipídica de cada espécie analisada foi influenciada pelas condições do hábitat, principalmente pela alimentação.

## 2 ABSTRACT

In this study, we used three species of troglobius fishes (*Ituglanis Passensis*, *Trichomycterus itacarambiensis* and *Stygichthys typhlops*) and a troglophilous fish (*Ituglanis spn*). Although Brazil has a great potential of caves, most of them have not been discovered or biologically explored. The fauna associated with these environments is threatened by ignorance of its potential, or misuse of the caves. In order to check for contamination of these caves, heavy metals content were analyzed in fish. With the goal to investigate the metabolism of these animals, especially those that have been changed due to the environment in which they are submitted, an analysis of the lipid profile, by means of gas chromatography with flame ionization detector, was taken. The *Trichomycterus itacarambiensis* showed significant differences in the concentration of Fe (59.99%), Hg (0.70%), Mn (15.22%) and Pb (3.44%), the *Stygichthys typhlops* of Cr (1.19%), Fe (219, 80%), Mn (81.47%), Pb (9.13%) and Se (1.9%) and *Ituglanis spn* of Fe (53.74%) and Mn (2.56%). Such concentrations are above the limits established by Brazilian legislation. We identified 25 fatty acids in *Ituglanis passensis*, 28 in *Trichomycterus itacarambiensis*, 25 in *Stygichthys typhlops* and 30 in *Ituglanis spn* (troglophilous specie). Some of these acids had higher concentration compared to each other in all the species, such as palmitic acid (C16: 0), stearic acid (C18: 0), oleic acid (C18: 1n9c) and linoleic acid (C18: 2n6c). These results showed that the different conditions under which these animals were subjected may interfere in the lipid composition of each analyzed specie.

### 3 INTRODUÇÃO

Segundo dados relatados pela Sociedade Brasileira de Espeleologia (SBE) e o Centro Nacional de Estudo, Proteção e Manejo de Cavernas/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (CECAV/IBAMA), o Brasil tem grande quantidade de cavernas que ainda não foram exploradas. Tais dados demonstram a potencialidade de cavernas que o país possui (a grande maioria ainda não estudada) e, por consequência, a enorme riqueza de espécies que, provavelmente, ainda não foi descoberta.

Apesar dos relativamente poucos estudos acerca da fauna subterrânea do país (comparados ao potencial de cavernas existentes), o Brasil é considerado o país mais rico em espécies cavernícolas da América do Sul, apresentando cerca de 700 espécies cadastradas, segundo Marchesan et al. (2009). Tal número, entretanto, é ínfimo, pois, certamente, mais de 5.000 táxons já foram registrados em cavernas brasileiras (dados estes retirados de teses e dissertações, algumas das quais, ainda não publicadas).

Dentre os inúmeros grupos de organismos presentes em cavernas brasileiras, destacam-se, dentre os vertebrados, diversas espécies de peixes, muitas das quais altamente especializadas ao modo de vida subterrânea, sendo restritas a estes habitats.

A pesquisa dedicada ao estudo da fração lipídica em peixes mostra a grande relação com características biológicas, fisiológicas e ecológicas dos mesmos, além de permitir avaliar a dinâmica desses compostos em diversos tecidos do peixe e também em diversas fases de seu desenvolvimento (Macfarlane et al., 1993). Além disso, tais estudos podem avaliar os efeitos da sazonalidade sobre o metabolismo do animal (Oliveira, 2000).

Dessa forma, o conhecimento das séries lipídicas em espécies subterrâneas é de extrema importância, principalmente pelo fato de esses animais estarem submetidos a um meio completamente adverso. Outro fator também muito importante é conhecer a capacidade que o animal possui de converter precursores em ácidos graxos, principalmente pelos que desempenham grande importância fisiológica para o organismo.

Outro aspecto relevante a ser considerado é a possível bioacumulação de metais pesados nos peixes, que pode ser evidente, mesmo quando os contaminantes encontrados estão em concentrações quase não detectáveis.

Considerando a grande importância, devido à carência de informações sobre a composição química dos peixes cavernícolas no Brasil e no mundo, além dos níveis de metais existentes nestes animais, este estudo poderá ajudar na compreensão da evolução dos grupos estritamente cavernícolas, bem como para que sejam utilizados como subsídios para planos de conservação e proteção dessas espécies e das cavernas às quais se associam.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Descrição das amostras de peixes estudadas

O *Ituglanis passensis* (Figura 1) é uma espécie de peixe troglóbico que foi coletada na caverna de Passa Três, localizada na região de São Domingos, no estado de Goiás.

Esta espécie tem coloração que varia de amarela a cinza-clara. Possui manchas mais escuras espalhadas na cabeça e limitadas à região dorsal do corpo e olhos reduzidos. Ocorre em rios com correntes lentas, com aproximadamente 15-20 cm de profundidade. Tem comportamento bem característico, de viver escondida no fundo de cascalhos ou de pedras. Além de possuírem comportamento agonístico.



FIGURA 1 Peixe troglóbico: *Ituglanis Passensis*  
(foto cedida pelo professor Rodrigo Lopes).

O *Trichomycterus itacarambiensis* é uma espécie troglóbica e de distribuição restrita à caverna Olhos D'Água, situada na cidade de Itacarambi, no

norte de Minas Gerais (Trajano & Pinna, 1996). Esta caverna é sujeita a uma pronunciada sazonalidade, com grandes pulsos de inundação durante o período das cheias (Trajano, 1997). É uma espécie altamente endêmica e susceptível a flutuações ambientais, em função da especialização à relativa estabilidade característica do meio subterrâneo. Cerca de 1/3 da população é constituído de albinos verdadeiros, podendo os demais apresentar variações no grau de pigmentação (Trajano, 1997). Sua densidade populacional é relativamente alta para os padrões de peixes subterrâneos (0,15 a 0,20 indivíduos por m<sup>2</sup>), porém, com população total muito pequena (1.500 a 2.000 indivíduos, com 20 mm ou mais de comprimento padrão), em virtude da limitada distribuição geográfica (Trajano, 1997). Devido à sua distribuição restrita, a condições acentuadas de estresse alimentar sazonal e ao alto grau de endemismo, esta espécie foi incluída na lista da fauna brasileira ameaçada de extinção (Trajano, 2009). De acordo com Trajano (1997), *T. itacarambiensis* compreende a única espécie de peixe encontrada nesta caverna.

Dentre os indivíduos de *T. itacarambiensis* avaliados, havia peixes com diferentes graus quanto aos caracteres morfológicos. A amostra era composta por peixes completamente cegos, com olhos vestigiais e com olhos “normais”. A pigmentação também variou de indivíduos albinos (Figura 2) e pigmentados (escuros).



FIGURA 2 Peixe troglóbio: *Trichomycterus itacarambiensis* - albino (foto cedida pelo professor Rodrigo Lopes).

O *Stygichthys typhlops*, conhecido localmente por piaba-branca, é uma espécie troglóbia, altamente especializada, que ocorre em lençóis freáticos na região de Jaíba, norte de Minas Gerais (Brittan & Böhlke, 1965). Sua distribuição é restrita a essa área, na drenagem do córrego Escuro, afluente do rio Verde Grande, na região do alto São Francisco.

O *Stygichthys typhlops* apresenta aspectos como a perda de ossos circunorbitais, o que sugere um estágio muito avançado de adaptação ao ambiente subterrâneo (Figura 3).



FIGURA 3 Peixe troglóbion: *Stygichthys typhlops*  
(foto cedida pelo professor Rodrigo Lopes).

A espécie, atualmente, encontra-se seriamente ameaçada, devido ao seu alto endemismo e ao rebaixamento do lençol freático. Sobre a área de ocorrência da espécie está instalado um grande pólo de fruticultura irrigada no estado, o qual traz sérias ameaças para uma espécie ainda pouco estudada, como a crescente retirada de água subterrânea e o risco de contaminação por insumos agrícolas.

Em relação à espécie troglófila utilizadas neste trabalho, o *Ituglanis* spn. (Figura 4) é uma espécie de peixe que foi recentemente descoberta e que ocorre em corpos d'água na região de Pains, no estado de Minas Gerais.



FIGURA 4 Peixe troglófilo: *Ituglanis* spn.

A distribuição das espécies do gênero é ampla, ocorrendo na América do Sul, com registros em pontos ao norte como no Amazonas, Guiana Francesa e Colômbia e ao sul, na bacia do Paraíba do Sul, além dos registros a oeste, no rio Paraguai (Pinna & Wosiachk, 2003). No Brasil, estas espécies ocorrem em rios de superfície e em algumas cavernas. Foi registrada a ocorrência de *Ituglanis* spn. nos trechos epígeo e hipógeo de um pequeno curso d'água presente na bacia do rio São Miguel. Tal sistema é atípico, já que a drenagem aparece em uma surgência presente em uma caverna situada à montante da drenagem, percorre um trecho de cerca de 150 m no meio epígeo e, novamente, torna-se subterrânea ao penetrar em uma segunda caverna a jusante (conhecida localmente como Loca D'água de baixo). O curso d'água torna-se inacessível a cerca de 100 m da entrada desta segunda caverna. Indivíduos desta espécie podem se deslocar entre os dois ambientes, embora no trecho epígeo do riacho a população mostre-se muito mais numerosa. Para os testes, foram coletados os peixes presentes somente no segmento hipógeo (Gruta Loca D'água de baixo, situada a jusante no sistema).

#### **4.2 Determinação da umidade**

A determinação da umidade foi realizada em estufa, em laboratório, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), segundo a metodologia da Association Of Official Analytical Chemists - AOAC (2000), que consiste na perda de água por desidratação, em temperaturas de 100°C a 105°C, por 12 horas.

O teste de umidade é comumente utilizado em trabalhos com peixes de água doce, para conversão de resultados bromatológicos. Esses testes são, normalmente, expressos em g por matéria seca.

Neste estudo, a determinação de umidade foi feita como parte do procedimento para a realização da determinação de minerais.

#### 4.2.1 Amostras

Os animais utilizados para a análise de umidade estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 Espécies utilizadas para a análise de umidade

<b>Espécie</b>	<b>Característica</b>	<b>Indivíduos</b>
<i>Trichomycterus itacarambiensis</i>	Troglóbio	2
<i>Stylichthys typhlops</i>	Troglóbio	1
<i>Ituglanis</i> spn.	Troglófilo	3

#### 4.3 Análise de metais

Uma vez que o propósito principal deste trabalho era verificar o grau de contaminação no animal de forma geral, em consequência da poluição ambiental da região, os resultados experimentais aqui apresentados referem-se ao peixe inteiro e da matéria seca.

A análise para pesquisa de metais foi realizada no Laboratório de Análises de Solo, do Departamento de Solos da UFLA, seguindo o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (1997).

##### 4.3.1 Amostras

Foram utilizadas as amostras secas de animais cavernícolas descritas na Tabela 2.

TABELA 2 Espécies utilizadas para análise de minerais

<b>Espécie</b>	<b>Característica</b>	<b>Indivíduos</b>
<i>Trichomycterus itacarambiensis</i>	Troglóbio	2
<i>Styichthys typhlops</i>	Troglóbio	1
<i>Ituglanis</i> spn.	Troglófilo	3

#### 4.4 Avaliação do perfil lipídico

No presente estudo, tomaram-se como referências metodologias e estudos em peixes não troglóbios, por serem metodologias já utilizadas e padronizadas.

##### 4.4.1 Amostras

O experimento foi realizado utilizando-se quatro espécies distintas de peixes, conforme dados da Tabela 3.

TABELA 3 Espécies submetidas à avaliação dos ésteres de ácidos graxos

<b>Espécie</b>	<b>Característica</b>	<b>Indivíduos</b>
<i>Ituglanis passensis</i>	Troglóbio	2
<i>Trichomycterus itacarambiensis</i>	Troglóbio	2
<i>Styichthys typhlops</i>	Troglóbio	2
<i>Ituglanis</i> spn.	Troglófilo	3

A coleta de todas as amostras de peixe utilizadas neste trabalho foi feita pelo Professor Doutor Rodrigo Lopes Ferreira, do Departamento de Biologia da UFLA.

As amostras coletadas foram devidamente embaladas e mantidas sob refrigeração até o início das avaliações, quando, então, foram descongeladas até a temperatura ambiente.

#### **4.4.2 Extração de lipídeos**

Neste trabalho, utilizou-se a metodologia de Folch et al. (1957). Numa breve descrição, os peixes foram filetados e pesados, aproximadamente, 0,25 g de cada um. Adicionaram-se 1,5 mL de clorofórmio, 2,0 mL de metanol e 1,2 mL 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 680 g, por 15 minutos. As fases foram separadas, sendo descartada a parte metanólica e a clorofórmica acondicionada para evaporação do solvente, utilizando nitrogênio gasoso.

#### **4.4.3 Esterificação**

Após a evaporação do resíduo, foi realizada a esterificação da amostra, utilizando a metodologia de Hartman & Lago (1973) e que foi adaptada por Rosa (1999).

Foram adicionados 2 mL de NaOH 0,5 M em metanol, levado a banho fervente, por 5 minutos e adicionados 2,5 mL de reagente esterificante. O mesmo foi aquecido em ebulição por 5 minutos e, depois, resfriado. Após resfriado, adicionaram-se 2,0 mL de solução de NaCl saturada e 2,5 mL de hexano. Depois de agitada, a amostra foi levada à centrifugação, a 500 g, 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 acondicionadas sob refrigeração (-20°C) até a realização das análises.

#### **4.4.4 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), na Universidade Federal de Lavras (UFLA), por cromatografia gasosa, sendo utilizado o cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida com 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, contendo polietilenoglicol como fase estacionária líquida. O padrão utilizado foi uma mistura de 37 ésteres metílicos considerados mais importantes para o metabolismo de peixe (Supelco<sup>TM</sup> 37 Component FAME Mix).

Foram utilizados os seguintes parâmetros operacionais: modo de injeção “split”, com razão de divisão de 1:100; volume injetado de 1 µL; temperatura do detector de 260°C; temperatura do injetor de 260°C; programa de temperatura: 4°C/min, até atingir 140°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, mantendo a rampa de aquecimento de 4°C/min até atingir 240°C, permanecendo por 30 minutos nesta temperatura.

Para a realização da cromatografia gasosa, foi necessário redissolver as amostras em 0,50 mL de n-hexano.

A identificação dos picos foi realizada por método comparativo, com os tempos de retenção do padrão de ésteres de ácidos graxos.

#### **4.5 Análise estatística - PCA**

A variação dos ácidos graxos, componentes da fração lipídica, foi determinada por meio de uma análise de agrupamento do tipo análise de componentes principais (PCA).

A PCA foi realizada a partir de uma matriz de dados constituída pelos teores dos ácidos graxos para cada amostra. Antes da análise, os dados foram autoescalonados e a mesma foi realizada no programa The Matlab Mathworks (2007).

Esta técnica de análise multivariada estabelece correlações lineares de cada uma das matrizes de dados para maximizar a correlação de Pearson entre elas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição química – umidade, metais e ácidos graxos

De acordo com os resultados da análise de variância, é possível observar uma diferença significativa sobre o teste de umidade ( $P < 0,05$ ). As espécies *Stygichthys typhlops* apresentaram valor próximo do resultado da espécie *Ituglanis* spn., conforme descrito na Tabela 4. Essa diferença pode ser explicada por se tratarem de peixes de espécies diferentes, resultado este esperado quando se comparam espécies diferentes de peixe de água doce e marinho.

O resultado deste teste é apenas informativo e poderá ser utilizado para fins de comparação com animais da mesma espécie, em outras determinações que poderão ser realizadas futuramente.

TABELA 4 Resultado da análise de umidade

Espécie	% umidade*
<i>Trichomycterus itacarambiensis</i> (n=4)	31,59±1,60 <sup>b</sup>
<i>Stygichthys typhlops</i> (n=1)	42,76
<i>Ituglanis</i> spn. (n=2)	39,89±1,81 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Os metais pesados e outros contaminantes químicos, geralmente, podem ser encontrados em vários órgãos e tecidos do corpo do animal. Porém, alguns metais se acumulam em maior quantidade por um determinado órgão específico, dependendo da característica do animal (Virga, 2006).

Uma vez que o propósito deste trabalho foi verificar o grau de contaminação no animal como uma consequência da poluição ambiental da região, os resultados experimentais apresentados referem-se ao peixe inteiro.

Os valores de arsênio, cádmio, cromo, cobre, ferro, mercúrio, manganês, níquel, chumbo, selênio e zinco estão apresentados na Tabela 5 e, em destaque, os que se apresentaram acima do limite estabelecido pelo Ministério da Saúde (Brasil, 1998).

TABELA 5 Resultado da análise de metais

Metais	Limite (ppm)*	<i>Trichomycterus itacarambiensis</i>	<i>Stygichthys typhlops</i>	<i>Ituglanis</i> spn.
As	1,00	0,16	0,08	0,08
Cd	1,00	0,17	0,07	0,03
Cr	1,00	0,42	<b>1,19</b>	0,46
Cu	30,00	10,14	12,87	1,64
Mn	0,50	<b>15,22</b>	<b>81,47</b>	<b>2,56</b>
Fe	15,00	<b>59,99</b>	<b>219,80</b>	<b>53,74</b>
Hg	0,50	<b>0,70</b>	0,38	0,30
Ni	5,00	4,71	0,48	0,09
Pb	2,00	<b>3,44</b>	<b>9,13</b>	1,48
Se	0,30	0,26	<b>1,9</b>	0,21
Zn	50,00	0	0	0,02

\*Limites estabelecidos pelo Ministério da Saúde, Portaria 685-980/98.

Para arsênio, cádmio, cobre, níquel e zinco, todas as espécies analisadas apresentaram valores abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira.

Para o manganês, as três espécies apresentaram valores acima do limite permitido. Esse tipo de contaminação pode ter sido causado por resíduos e

esgotos domésticos que, segundo Forstiner & Wittmann (1981), são considerados como as principais fontes causadoras de poluição aquática por esses metais.

Em relação aos valores de Fe, Pb e Se, o ferro foi encontrado nas três espécies, o chumbo apenas na *Trichomycterus itacarambiensis* e na *Stygichthys typhlops* e o selênio somente para esta última, acima do limite permitido pela legislação. A principal contaminação por estes elementos pode ser proveniente de fundições de metais, segundo Forstiner & Wittmann (1981). Por isso, este tipo de contaminação pode ter sido causado por algum material que, provavelmente, estava em contato direto com a água em que foram capturados os indivíduos dessas espécies.

A alta absorção de Cr pelo organismo do animal pode ocasionar danos ao estômago, aos rins e ao fígado (Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR, 2005). Como o resultado obtido para o Cr na espécie *Stygichthys typhlops* foi acima do limite, é provável que seja contaminação. Porém, pela proximidade do limite permitido e a impossibilidade de repetição do teste, é necessário cuidado ao considerar o resultado.

O valor acima do limite do metal Hg, na espécie *Trichomycterus itacarambiensis*, poderia ser explicado pela transformação por bactérias do mercúrio inorgânico a metilmercúrio que é, segundo Salgado (1996), o processo responsável pelos elevados níveis do metal no ambiente. Como o mercúrio e seus compostos podem ser encontrados em várias fontes citadas por Salgado (1996), as principais delas, considerando as características da região onde foram capturados os peixes desta espécie, seriam equipamentos elétricos e eletrônicos (baterias, retificadores, relés, interruptores, etc.), aparelhos de controle (termômetros, barômetros, esfingomanômetros), tintas (pigmentos), fungicidas (preservação de madeira, papel, plásticos, etc.), lâmpadas de mercúrio e óleos lubrificantes, dentre outros. Com isso, uma possível contaminação pode estar ocorrendo por decorrência de algumas dessas fontes.

## **5.2 Composição de ácidos graxos da fração lipídica**

A composição de ácidos graxos identificados nas espécies analisadas mostrou-se variável (Tabela 6). De forma similar, os resultados das relações dos ácidos graxos saturados, insaturados, monoinsaturados,  $\omega$  3,  $\omega$  6 e  $\omega$  9, também foram distintos entre as diferentes espécies (Tabela 7).

Os resultados da análise de variância mostram efeito significativo ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos sobre o perfil de alguns ácidos graxos (C14:0; C14:1; C16:1; C18:0; C18:1  $\omega$ 9; C18:2  $\omega$ 6; C20:1; C18:3  $\omega$ 3; C23:0 e C22:6  $\omega$ 3) (Tabela 6).

TABELA 6 Composição dos ácidos graxos da fração de lipídeos totais

Ácido graxo*	<i>Ituglanis passensis</i> (2) %	<i>Trichomycterus itacarambiensis</i> (2) %	<i>Stygichthys typhlops</i> (2) %	<i>Ituglanis</i> spn. (3) %
<b>C12:0</b>	0,63±0,27 <sup>a</sup>	0,18±0,26 <sup>a</sup>	0,02±0,03 <sup>a</sup>	0,46±0,12 <sup>a</sup>
<b>C13:0</b>	0,02±0,03 <sup>a</sup>	0,45±0,14 <sup>b</sup>	0,03±0,04 <sup>a</sup>	0,21±0,16 <sup>ab</sup>
<b>C14:0</b>	1,52±0,05 <sup>ab</sup>	2,68±0,67 <sup>a</sup>	0,95±0,02 <sup>b</sup>	1,83±0,26 <sup>ab</sup>
<b>C14:1</b>	0,03±0,04 <sup>bc</sup>	0,11±0,01 <sup>a</sup>	0,00 <sup>c</sup>	0,08±0,01 <sup>ab</sup>
<b>C15:0</b>	1,09±0,06 <sup>a</sup>	1,23±0,15 <sup>a</sup>	0,92±0,05 <sup>a</sup>	0,88±0,30 <sup>a</sup>
<b>C16:0</b>	<b>23,11±1,22<sup>a</sup></b>	<b>26,79±2,32<sup>a</sup></b>	<b>26,28±0,97<sup>a</sup></b>	<b>25,08±1,45<sup>a</sup></b>
<b>C16:1</b>	<b>12,79±4,65<sup>a</sup></b>	<b>4,03±0,68<sup>ab</sup></b>	<b>8,19±0,03<sup>ab</sup></b>	<b>2,99±1,91<sup>b</sup></b>
<b>C17:0</b>	1,68±0,30 <sup>a</sup>	1,87±0,50 <sup>a</sup>	1,58±0,10 <sup>a</sup>	1,43±0,10 <sup>a</sup>
<b>C17:1</b>	0,60±0,85 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,19±0,34 <sup>a</sup>
<b>C18:0</b>	<b>8,42±0,62<sup>b</sup></b>	<b>8,38±1,76<sup>b</sup></b>	<b>12,60±0,41<sup>a</sup></b>	<b>8,74±0,43<sup>b</sup></b>
<b>C18:1ω9t</b>	0,00 <sup>a</sup>	0,35±0,11 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,40±0,15 <sup>a</sup>
<b>C18:1ω9c</b>	<b>21,30±2,18<sup>b</sup></b>	<b>37,07±0,04<sup>a</sup></b>	<b>35,89±4,66<sup>ab</sup></b>	<b>37,54±5,30<sup>a</sup></b>
<b>C18:2 ω6c</b>	<b>11,15±2,55<sup>a</sup></b>	<b>6,72±0,83<sup>b</sup></b>	<b>6,32±1,00<sup>b</sup></b>	<b>7,58±4,16<sup>ab</sup></b>
<b>C20:0</b>	0,38±0,09 <sup>a</sup>	0,20±0,01 <sup>a</sup>	0,49±0,20 <sup>a</sup>	0,37±0,07 <sup>a</sup>
<b>C18:3ω6</b>	0,53±0,09 <sup>a</sup>	0,34±0,03 <sup>a</sup>	0,34±0,18 <sup>a</sup>	1,03±1,01 <sup>a</sup>
<b>C20:1</b>	1,32±0,20 <sup>ab</sup>	1,61±0,28 <sup>a</sup>	0,64±0,01 <sup>b</sup>	1,87±0,49 <sup>a</sup>
<b>C18:3ω3</b>	1,44±0,27 <sup>a</sup>	0,80±0,06 <sup>b</sup>	0,92±0,28 <sup>ab</sup>	2,97±2,42 <sup>a</sup>

...continua...

“TABELA 6, Cont.”

8	<b>C21:0</b>	0,07±0,10 <sup>a</sup>	0,25±0,14 <sup>a</sup>	0,32±0,03 <sup>a</sup>	0,12±0,10 <sup>a</sup>
9	<b>C20:2</b>	0,61±0,02 <sup>a</sup>	0,55±0,07 <sup>a</sup>	0,40±0,15 <sup>a</sup>	0,86±0,14 <sup>a</sup>
0	<b>C22:0</b>	0,00 <sup>a</sup>	0,16±0,01 <sup>a</sup>	0,24±0,08 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>a</sup>
1	<b>C20:3ω6</b>	0,00 <sup>a</sup>	0,89±0,02 <sup>a</sup>	0,43±0,61 <sup>a</sup>	1,00±0,19 <sup>a</sup>
2	<b>C22:1ω9</b>	0,00 <sup>a</sup>	0,11±0,04 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,24±0,11 <sup>a</sup>
3	<b>C20:3ω3</b>	1,52±0,39 <sup>a</sup>	0,07±0,02 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,26±0,07 <sup>b</sup>
4	<b>C20:4ω6</b>	7,15±1,81 <sup>a</sup>	2,37±0,81 <sup>b</sup>	2,40±0,66 <sup>b</sup>	2,00±0,10 <sup>b</sup>
5	<b>C23:0</b>	0,00 <sup>a</sup>	0,06±0,00 <sup>a</sup>	0,26±0,37 <sup>a</sup>	0,06±0,05 <sup>a</sup>
6	<b>C22:2</b>	0,23±0,11 <sup>a</sup>	0,17±0,05 <sup>a</sup>	0,06±0,09 <sup>a</sup>	0,36±0,09 <sup>a</sup>
7	<b>C24:0</b>	0,08±0,12 <sup>a</sup>	0,13±0,08 <sup>a</sup>	0,04±0,06 <sup>a</sup>	0,11±0,04 <sup>a</sup>
8	<b>C20:5ω3</b>	0,92±0,24 <sup>a</sup>	0,51±0,17 <sup>a</sup>	0,22±0,04 <sup>a</sup>	0,80±0,21 <sup>a</sup>
9	<b>C24:1</b>	0,17±0,01 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,11±0,11 <sup>a</sup>
0	<b>C22:6ω3</b>	2,83±1,24 <sup>a</sup>	0,18±0,07 <sup>ab</sup>	0,45±0,20 <sup>b</sup>	1,20±0,16 <sup>ab</sup>

\*Os ácidos graxos estão apresentados em ordem de eluição na coluna cromatográfica, sendo destacados os quantitativamente mais importantes. E médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

TABELA 7 Relações sobre a composição dos ácidos graxos

Ácido Graxo*	<i>Ituglanis passensis</i>	<i>Trichomycterus itacarambiensis</i>	<i>Stygichthys typhlops</i>	<i>Ituglanis</i> spn.
AGS	44,53±1,40 <sup>a</sup>	43,48±0,26 <sup>a</sup>	45,87±2,51 <sup>a</sup>	41,48±1,89 <sup>a</sup>
AGMI	36,22±3,23 <sup>a</sup>	44,59±0,82 <sup>a</sup>	44,71±1,63 <sup>a</sup>	43,19±1,28 <sup>a</sup>
AGPI	19,23±1,86 <sup>a</sup>	11,80±1,15 <sup>ab</sup>	9,42±2,11 <sup>b</sup>	16,12±2,18 <sup>a</sup>
AGPI/AGS	0,43±0,10 <sup>a</sup>	0,27±0,03 <sup>a</sup>	0,21±0,03 <sup>a</sup>	0,39±0,14 <sup>a</sup>
ω 3	6,71±0,82 <sup>a</sup>	3,08±0,31 <sup>ab</sup>	1,59±0,45 <sup>b</sup>	5,98±1,22 <sup>a</sup>
ω 6	11,68±2,64 <sup>a</sup>	7,11±0,80 <sup>a</sup>	6,93±0,82 <sup>a</sup>	8,67±3,18 <sup>a</sup>
ω 9	21,30±2,18 <sup>b</sup>	37,54±0,03 <sup>a</sup>	35,89±2,66 <sup>ab</sup>	38,18±1,24 <sup>a</sup>
ω 3 / ω 6	0,57±0,05 <sup>a</sup>	0,43±0,00 <sup>ab</sup>	0,23±0,04 <sup>b</sup>	0,69±0,17 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Foram identificados, por meio do padrão (Figura 17 – ANEXO), 25 ácidos graxos da espécie *Ituglanis passensis* (Figura 18 – ANEXO), 28 da *Trichomycterus itacarambiensis* (Figura 19 – ANEXO), 25 da *Stygichthys typhlops* (Figura 20 – ANEXO) e 30 da espécie *Ituglanis* spn. (Figura 21 – ANEXO).

Alguns ácidos graxos tiveram maior destaque, como o palmítico (C16:0) que, para a espécie *Trichomycterus itacarambiensis*, foi de 26,79%; o esteárico (C18:0) que, para o *Stygichthys typhlops*, foi de 12,60%; o oleico (C18:1n9c) que para o *Ituglanis* spn. foi de 29,07% e o ácido linoleico (C18:2n6c) e o palmitoleico que, para o *Ituglanis passensis*, foi de 11,15% e 12,79%, respectivamente.

Até o momento não existem estudos dessa natureza com as espécies *Ituglanis passensis*, *Trichomycterus itacarambiensis*, *Stygichthys typhlops* e

*Ituglanis* sp., fato que dificulta o entendimento dos resultados, por não existir dados que possam ser utilizados para comparação. Portanto, tomou-se como base estudos de alguns ácidos graxos de algumas espécies de água doce, de forma geral.

Considerando os ácidos graxos C16 e C18, além do C20 e do C22 identificados nas quatro espécies de peixe cavernícolas analisadas, os resultados foram compatíveis com o esperado para a maioria das espécies de água doce, ou seja, maiores teores de ácidos graxos C16 e C18 e menores proporções de C20 e C22 (Inhamuns, 2000).

O ácido graxo C18:2  $\omega$ 6 foi encontrado em maior quantidade nas espécies *Ituglanis passensis* e *Ituglanis* spn. (11,15% e 7,58%, respectivamente). Essa relação de que o aumento do C18:2  $\omega$ 6 é proporcional à quantidade de alimento ingerida pelo peixes está de acordo com Maia (1992), assim como com Aiura (2003), que trabalhou variando a quantidade de ração, utilizando peixes de água doce (não cavernícolas) e encontrou valores superiores para os indivíduos que receberam maior quantidade de alimento. A quantidade mais elevada de ácido graxo pode ser explicada pela grande quantidade de matéria orgânica observada nos locais de coleta dessas duas espécies, o que não foi observado para as espécies *Trichomycterus itacarambiensis* e *Stygichthys typhlops*, o que justifica o fato de os valores encontrados terem sido menores.

A maior concentração de C18:3  $\omega$ 3 encontrada nas espécies *Ituglanis passensis* e *Ituglanis* spn. (1,44% e 2,97%, respectivamente) está relacionada à grande quantidade de matéria orgânica disponível. Foi observada a presença de guano, algas e macrófitas nos locais a que o *Stygichthys typhlops* estava submetido, porém, a quantidade desse material, que pode estar servindo de alimento, era muito menor, quando comparado às duas outras espécies descritas anteriormente. E, para o *Trichomycterus itacarambiensis*, a quantidade de material orgânico disponível era a menor quando comparada com a das três

espécies estudadas. Portanto, mais uma vez se confirma o reflexo da quantidade do alimento disponível no perfil de ácidos graxos dos animais em estudo.

Considerando as espécies *Ituglanis passensis*, *Trichomycterus itacarambiensis* e *Ituglanis* spn., foi encontrada maior quantidade de C22:6  $\omega$ 3 (DHA), comparada à quantidade de C20:5  $\omega$ 3 (EPA). Esta relação é observada na maioria dos peixes de água doce, provavelmente por apresentarem maior atividade de uma enzima específica dessaturase que produz DHA a partir de EPA (Ahlgren et al., 1994). O contrário foi observado em *Stygichthys typhlops* que é uma das espécies troglóbias mais pré-adaptadas e modificadas morfológicamente.

Dentre os ácidos graxos insaturados de cadeia longa, a maior quantidade foi observada para o C22:6  $\omega$ 3, na espécie *Ituglanis passensis*. Este percentual é, em grande parte, atribuído à grande quantidade de matéria orgânica disponível para esses indivíduos.

O ácido linoleico (18:2  $\omega$ 6) é um ácido graxo essencial e precursor do ácido araquidônico (20:4  $\omega$ 6) que, por meio de reações de alongação e dessaturação, dá origem a AGPI  $\omega$ 6 de cadeia mais longa (Gibson, 1983). O ácido araquidônico (C20:4  $\omega$ 6) é de grande importância fisiológica e nutricional para os peixes. Porém, as espécies *Trichomycterus itacarambiensis*, *Stygichthys typhlops* e *Ituglanis* spn. apresentaram 2,37%, 2,40% e 2,00%, respectivamente, que, segundo Oliveira (2000), são valores considerados muito baixos para peixes de água doce, ao contrário da espécie *Ituglanis passensis*, que apresentou valor de 7,15%.

Os totais de AGS nas espécies *Ituglanis passensis*, *Trichomycterus itacarambiensis*, *Stygichthys typhlops* e *Ituglanis* spn. foram de 44,53%, 43,48%, 45,87% e 41,48%, respectivamente. Os totais de AGMI foram de 36,22%, 44,59%, 44,71% e 43,19%, respectivamente e os totais de AGPI foram de 19,23%, 11,80%, 9,42% e 16,12%, respectivamente.

A predominância do ácido palmítico, dentre os AGSs; do ácido oleico, dentre os AGMIs e do ácido araquidônico, dentre os AGPIs, nas espécies estudadas, corrobora também o verificado para a grande maioria dos peixes de água doce (Ackman, 1967; Wang et al., 1990).

Segundo relatos de diversos autores, considerando peixes de água doce (Wang et al., 1990; Ahlgren et al., 1994), quando a proporção é mais elevada de AGS, dos quais o C16:0 apresenta maior percentagem, seguida pelos AGMI, em que o 18:1  $\omega$ 9 for o mais abundante, menor teor de AGPI, com predomínio de 18:3  $\omega$ 3, menor será o teor de AG da série  $\omega$ 3 e menor relação  $\omega$ 3/ $\omega$ 6. Estes resultados para as espécies *Ituglanis passensis* e, principalmente, para o *Stygichthys typhlops*, comprova o relato desses autores, porém, os resultados das espécies *Trichomycterus itacarambiensis* e *Ituglanis* spn são apresentados de maneira diferente.

A espécie que apresentou maior razão  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 foi a *Ituglanis* spn., quando comparada às demais espécies.

A PCA permitiu evidenciar melhor a composição dos ácidos graxos de cada espécie estudada. O gráfico de escores (Figura 12) indicou que houve distinção entre as espécies *Ituglanis passensis*, *Trichomycterus itacarambiensis*, *Stygichthys typhlops* e *Ituglanis* spn., em função da composição dos ácidos graxos.

O gráfico de *loadings* mostra a influência dos ácidos graxos na separação das amostras. Tal estudo indicou que a espécie *Ituglanis passensis* se diferenciou por apresentar maior teor dos ácidos graxos C12:0 (1), C16:1 (7), C17:1 (9), C18:2  $\omega$ 6 (13), C20:4  $\omega$ 6 (24), C20:5  $\omega$ 3 (28) e o C22:6  $\omega$ 3 (30). Para o *Trichomycterus itacarambiensis*, os ácidos graxos C13:0 (2), C14:0 (3), C14:1 (4), C15:1 (5), C16:0 (6) e C17:0 (8) foram os principais responsáveis pela diferenciação da espécie. A espécie *Stygichthys typhlops* se caracterizou por apresentar um maior teor dos ácidos graxos C18:0 (10), C20:0 (14), C21:0 (18) e

o C23:0 (25). A espécie *Ituglanis* spn. se diferenciou, principalmente, das demais por apresentar maior teor dos ácidos graxos C20:1 (16), C20:2 (19) e C22:2 (26). Isso mostra quais os ácidos graxos que estão sendo responsáveis pelas diferenças existentes entre as quatro espécies utilizadas neste estudo.

Os escores derivados da PCA, considerando-se os exemplares analisados, são apresentados na Figura 5, cuja numeração representa o ácido graxo descrito na Tabela 6.

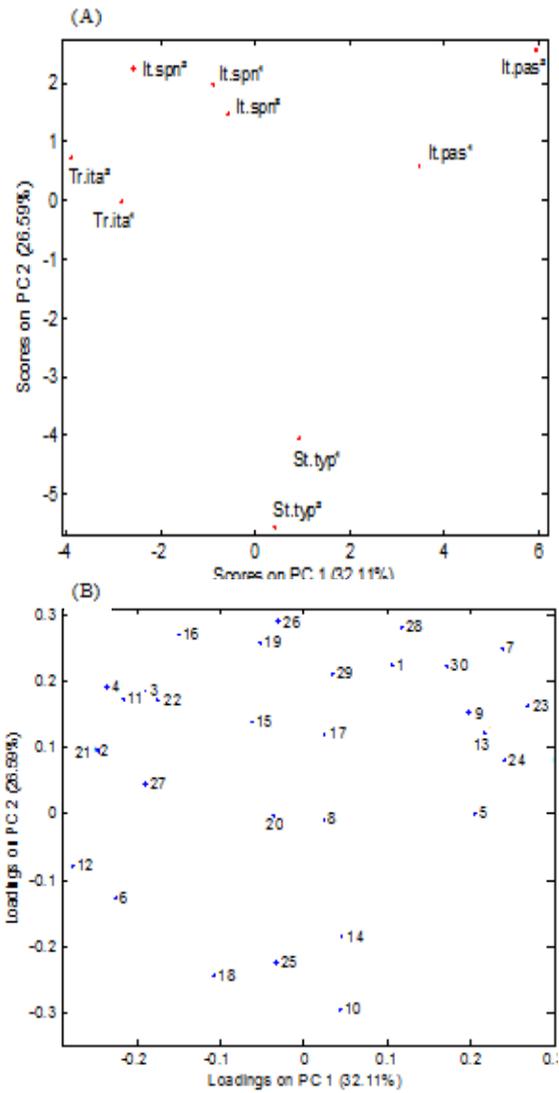


FIGURA 5 Escores derivados da análise de componentes principais para as espécies. Relação envolvendo os exemplares analisados (A) e os teores de ácidos graxos (B).

Para o *Stygichthys typhlops*, a influência do C18:0, conforme a Figura 12, foi a maior responsável pela diferença encontrada para esta espécie quando comparada às demais. Em relação aos resultados obtidos para a espécie *Ituglanis* spn., quando comparada com a espécie do mesmo gênero *Ituglanis passensis*, podem-se observar relações próximas entre eles e diferenças que podem ser explicadas quanto ao fato de os mesmos serem de espécie diferente, além de serem troglófilo e troglóbico, respectivamente, uma vez que ambos foram coletados de lugares diferentes, porém, com alta disponibilidade de alimento.

Todas as diferenças apresentadas pelos resultados do perfil de ácidos graxos, para as espécies troglóbica e troglófila utilizadas na realização deste trabalho, podem ser explicadas, devendo ser levada em consideração a diversidade do seu respectivo habitat e sua consequente alimentação diferenciada. No caso do *Ituglanis passensis*, essas diferenças podem ser relacionadas ao fato de os indivíduos dessa espécie terem sido capturados de sumidouros, onde a disponibilidade de alimento (matéria orgânica) era abundante. Tal fato faz com que a composição de ácido graxo para esta espécie seja qualitativamente melhor em relação a alguns diferentes tipos de ácidos graxos e em comparação com as demais espécies. Para a espécie *Trichomycterus itacarambiensis*, ocorre que a disponibilidade de alimento era muito menor e o teor de alguns ácidos graxos era maior em relação às outras espécies. Este resultado pode ter sido influenciado pela grande capacidade que os animais cavernícolas têm de armazenar gordura para, posteriormente, serem utilizados conforme a necessidade do organismo, comprovando a sua característica de ser um animal troglóbico.

## 6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento, todas as espécies utilizadas para a avaliação do teor de metais apresentaram teores superiores de alguns metais, ao limite máximo permitido pela legislação brasileira. O *Trichomycterus itacarambiensis* apresentou teores superiores de ferro, mercúrio, manganês e chumbo; o *Stygichthys typhlops*, teores de cromo, ferro, manganês, chumbo e selênio e o *Ituglanis spn.*, de ferro e manganês. Esses resultados podem sugerir contaminação nas regiões onde os peixes foram coletados.

Em relação à composição de ácidos graxos da fração lipídica, é possível dizer que as diferentes condições a que as quatro espécies estavam submetidas interferiram na composição lipídica desses peixes. A espécie *Trichomycterus itacarambiensis spn.*, que tinham menos alimento disponível, apresentou grande deposição lipídica, destacando alguns ácidos, como C16:0 e o C18:1  $\omega$ 9c. O perfil lipídico das espécies *Ituglanis passensis* e *Ituglanis spn.* provenientes de ambientes com maior disponibilidade de alimento apresentou melhor relação  $\omega$ 3/ $\omega$ 6, com altos níveis de ácido docosaenoico (DHA). Da mesma forma, o *Stygichthys typhlops* apresentou maior teor de AGS e menor de AGPI, refletindo a influência do tipo de alimentação.

Considerando a fragilidade dessas populações, a possibilidade de extinção de algumas espécies e, conseqüentemente, a impossibilidade da coleta de muitos indivíduos, foi utilizado o maior número de animais por espécie possível, sendo avaliado o maior número de variáveis.

Contudo, todos os resultados obtidos são de grande importância, servindo como base inicial para a realização de trabalhos futuros.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKMAN, R. G. Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some fresh-water fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 22, n. 3, p. 907-922, Sept. 1967.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile health service**. 2005. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60.html>>. Acesso em: 5 jan. 2010.

AHLGREN, G.; BLOMQUIST, P.; BOBERG, M.; GUSTAFSSON, I. B. Fatty acid content of the dorsal muscle: an indicator of fat quality in freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, London, v. 45, n. 1, p. 131-157, July 1994.

AIURA, F. S. **Efeito do tanino sobre a deposição lipídica, composição em ácidos graxos e rendimento de filé de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2003. 55 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

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

BRASIL. Portaria n. 685 de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 ago. 1998. Seção 1.

BRITTAN, M. R.; BÖHLKE, J. E. A new blind characid fish from southeastern Brazil. **Notulae Naturae**, Philadelphia, n. 380, p. 1-4, 1965.

CENTRO NACIONAL DE ESTUDOS, PROTEÇÃO E MANEJO DE CAVERNAS. **Base de dados geoespacializados de cavidades naturais subterrâneas do CECAV/IBAMA**. Disponível em: <[www.ibama.gov.br/cecav/index.php?id\\_menu=228](http://www.ibama.gov.br/cecav/index.php?id_menu=228)>. Acesso em: 16 nov. 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de métodos de análises de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 212 p.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 226, n. 1, p. 497-509, May 1957.

FÖRSTNER, V.; WITTMANN, G. T. W. **Estudos dos teores e biodisponibilidade de metais pesados (cromo, cobalto, cobre, níquel, zinco, ferro e manganês) em sedimentos da plataforma continental do estado de Amapá, entre os Cabos Orange (AP) e Norte (PA)**. 2000. 124 p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) - Instituto Oceanógrafo da Universidade de São Paulo, São Paulo.

FÖRSTNER, U.; WITTMANN, G. **Metal pollution in the aquatic environment**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1981. 486 p.

GIBSON, R. A. Australian fish – an excellent source of both arachidonic acid and w-3 polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, Champaign, v. 18, n. 11, p. 743-752, Nov. 1983.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, n. 6, p. 475-477, June 1973.

INHAMUNS, A. J. **Composição de ácidos graxos de peixes de água doce da região amazônica brasileira**. 2000. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

MACFARLANE, R. B.; NORTON, E. C.; BOWERS, M. J. Lipid dynamics in relation to the annual reproductive cycle in yellowtail rockfish (*Sebastes flavidus*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 50, n. 2, p. 391-401, Feb. 1993.

MAIA, E. L. **Otimização da metodologia para caracterização de constituintes lipídicos e determinação da composição em ácidos graxos e aminoácidos de peixes de água doce**. 1992. 242 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

MARCHESAN, A. M. M.; RODRIGUES, J. E. R.; MIRANDA, M. P. S.; CUREAU, S.; SOUZA, Z. C. T. **Inconstitucionalidades do Decreto 6.640/2008 que dispõe sobre o patrimônio espeleológico brasileiro**. 2008. 25 p. Disponível em: <<http://www.abrampa.org.br/pdf/inconstitucionalidades.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2009.

THE MATLAB MATHWORKS. **Matlab version 7.5**. Natick, 2007.

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. 29 p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

PINNA, M. C. C.; KEITH, P. A new species of the catfish genus *Ituglanis* from French Guyana (Osteichthyes: Siluriformes: Trichomycteridae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, Washington, v. 116, n. 4, p. 873-882, Dec. 2003.

PINNA, M. C. C.; WOSIACKI, W. Trichomycteridae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Ed.). **Check list of the freshwater fishes of south and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 270-290.

ROSA, F. C. **Teor de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 no peito e na coxa de frangos de corte alimentados com rações contendo três fontes de óleo**. 1999. 93 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SALGADO, P. E. T. Toxicologia dos metais. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. cap. 3.2, p. 154-172.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ESPELEOLOGIA. **Cadastro nacional de cavernas do Brasil**. Disponível em: <[www.ssbe.com.br/cnc.asp](http://www.ssbe.com.br/cnc.asp)>. Acesso em: 1 dez. 2009.

TRAJANO, E. **Biologia subterrânea**. São Paulo: Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2006. Disponível em: <[http://www.redespeleo.org/espeleologia\\_biologia\\_subterranea.php](http://www.redespeleo.org/espeleologia_biologia_subterranea.php)>. Acesso em: 19 nov. 2009.

TRAJANO, E. Population ecology of *Trichomycterus itacarambiensis*, a cave catfish from eastern Brazil (Siluriformes, Trichomycteridae). **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v. 50, n. 4, p. 357-369, Dec. 1997.

TRAJANO, E.; PINNA, M. C. C. A new cave species of *Trichomycterus* from eastern Brazil. (Siluriformes, Trichomycteridae). **Revue Française d'Aquariologie**, Nancy, v. 23, n. 3/4, p. 85-90, 1996.

VIRGA, R. H. P. **Análise quantitativa de metais pesados (Cd, Cr, Cu, Pb e Zn) em siris azuis do gênero *Callinectes* sp (Crustácea, Portunidae), provenientes do Rio Cubatão, Cubatão, São Paulo, Brasil.** 2006. 105 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Católica de Santos, Santos.

WANG, Y. J.; MILLER, L. A.; PERREN, M.; ADDIS, P. B. Omega-3 fatty acids in lake superior fish. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 71-73, Jan. 1990.

## CAPITULO 3

### AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO PERFIL LIPÍDICO ENTRE A ESPÉCIE TROGLÓBIA *Ancistrus cryptophthalmus* E A NÃO TROGLÓBIA *Ancistrus sp.*

(O capítulo 3 será transcrito em forma de artigo e posteriormente submetido ao  
Journal of Cave and Karst Studies)

#### 1 RESUMO

Diversos estudos vêm sendo realizados para avaliar o perfil lipídico de peixes comuns de água doce e marinha. Porém, no Brasil, ainda não existiam relatos de estudos realizados com peixes cavernícolas, em especial, os troglóbios. O trabalho foi realizado utilizando quatro exemplares de cada uma das espécies: *Ancistrus cryptophthalmus* (troglóbia) e *Ancistrus sp.* (não troglóbia), coletadas na Lapa do Angélica (porções epígeas e hipógeas do rio Angélica), localizada no município de São Domingos, GO. As análises foram realizadas nos Departamentos de Química, Zootecnia e Solos, da Universidade Federal de Lavras. Para as análises de proteína, umidade e extrato etéreo, foram encontrados, respectivamente, valores de 52%, 46% e 18%, para a espécie troglóbia *Ancistrus cryptophthalmus*. Já para a espécie não troglóbia *Ancistrus sp.*, os valores foram 46%, 36% e 14%, respectivamente. Em relação aos nutrientes analisados (N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Zn e Fe), os valores dos teores médios encontrados foram idênticos, tendo apenas o cobre apresentado diferença, com valores de 128,1 ppm para *Ancistrus cryptophthalmus* e 34,8 ppm para *Ancistrus sp.* Na fração lipídica, as espécies *Ancistrus cryptophthalmus* e *Ancistrus sp.* apresentaram maiores diferenças quanto ao teor de C16:1 (10,53% e 6,54%, respectivamente), C18:1  $\omega$ 9 (17,86% e 12,54%, respectivamente), C18:2  $\omega$ 6 (8,13% e 10,20%, respectivamente), C18:3  $\omega$ 3 (1,17% e 4,84%, respectivamente) e C22:6  $\omega$ 3 (4,38% e 8,01%, respectivamente). O total de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) e as razões AGPI/AGS e  $\omega$ 3/ $\omega$ 6, para as espécies *Ancistrus sp.* e *Ancistrus cryptophthalmus* foram, respectivamente, 50,43% e 52,28%, 20,00% e 29,87%, 29,57% e 17,88%, 0,59% e 0,34 e 1,48 e 0,52. A variação verificada na composição de ácidos graxos nos indivíduos analisados pode ser um indicativo da diferença nas condições de

hábitat dos peixes, que refletem na oferta de alimento ou, mesmo, indicativo de alterações no próprio metabolismo do peixe.

## 2 ABSTRACT

Several studies have been conducted to evaluate the lipid profile of common fishes from fresh and marine water. In Brazil, there were no reports of studies with cave fish, specially the troglobite. The work was performed using 4 copies of each species: *Ancistrus cryptophtalmus* (troglobite) and *Ancistrus sp* (epigeal), collected in the Lapa do Angélica (epigeal and hypogeal parts of the river Angélica), located in São Domingos, Goiás. The tests were performed in the Departments of Chemistry, Animal Husbandry and Soil, of Federal University of Lavras. The values determined for protein, moisture and ether extract analysis were, respectively, 52%, 46% and 18% for the troglobite specie *Ancistrus cryptophtalmus*. Therefore, for the not troglobite specie *Ancistrus sp*, values were 46%, 36% and 14% respectively. For nutrient analysis (N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Zn and Fe), the average levels were identical, except copper, with values of 128.1ppm for *Ancistrus cryptophtalmus* and 34.8ppm for *Ancistrus sp*. In the lipid fraction, *Ancistrus cryptophtalmus* and *Ancistrus sp* species showed greater differences in the content of C16: 1 (10.53 and 6.54%, respectively), C18: 1  $\omega$ 9 (17.86 and 12.54%, respectively), C18: 2  $\omega$ 6 (8.13 and 10.20%, respectively), C18: 3  $\omega$ 3 (1.17 and 4.84%, respectively) and C22: 6  $\omega$ 3 (4.38 and 8.01%, respectively). The total of saturated fatty acids (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) and the ratios PUFA / SFA and  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 for the *Ancistrus cryptophtalmus* and *Ancistrus sp* species were respectively 50.43 and 52.28%, 20.00 and 29.87%, 29.57 and 17.88%, 0.59 and 0.34 and 1.48 and 0.52. The variation in fatty acid composition in the subjects studied may be indicative of the difference in the conditions of fish habitat, which reflect in the supply of food, or even indicative of changes in the metabolism of fish.

### 3 INTRODUÇÃO

A composição química de peixes, em particular da fração lipídica, vem sendo estudada há muitos anos, principalmente por permitir a correlação com suas características biológicas, fisiológicas e ecológicas (Macfarlane et al., 1993). Porém, esses estudos vêm sendo realizados apenas em peixes comuns de água doce ou marinha.

No Brasil, ainda não havia sido relatado nenhum estudo nessa área utilizando de peixes cavernícolas. Diferentes espécies de peixes troglóbios já vêm sendo biologicamente estudadas, mas características químicas ainda não haviam sido exploradas.

Os ácidos graxos exercem diversas funções nos organismos, dentre as quais se destacam o depósito de energia e a conformação das membranas celulares (Devlin, 2007).

Os peixes, de forma geral, têm uma série de enzimas capazes de modificar o perfil dos ácidos graxos, assim como dos produtos da sua biossíntese, por isso, segundo Ribeiro (2007) o tipo e a quantidade de alimento disponível podem ser responsáveis pelas diferenças observadas para peixes marinhos e de água doce. Muitas espécies podem transformar um determinado ácido graxo em seu correspondente de cadeia mais longa, como o que ocorre com o ácido alfa linolênico (C18:3  $\omega$ -3), que pode ser convertido em EPA (C20:5  $\omega$ -3) e este originar o DHA (C22:6  $\omega$ -3) (Martino, 2003).

Isso porque, a partir dos ácidos graxos saturados, formam-se os monoinsaturados, no fígado, por meio da reação catalisada por dessaturases microsossomais. Dos monoinsaturados originam-se os poli-insaturados, por ação de dessaturases específicas para a posição da dupla ligação na cadeia (Belda &

Pourchet-Campos, 1991).

Essa capacidade de alongar e dessaturar ácidos graxos, gerando compostos fisiologicamente importantes para o desenvolvimento, depende de uma série de fatores, entre eles o sistema enzimático de cada peixe (Ribeiro, 2007).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência do meio a que os indivíduos da espécie *Ancistrus Cryptoptalmus* são submetidos, por meio de determinação da composição química do animal. Foram utilizados, para comparação, indivíduos da espécie *Ancistrus* sp., por se tratarem de peixes do mesmo gênero e que habitam a mesma região.

Considerando a carência de informações sobre a composição química dos peixes cavernícolas no Brasil e no mundo, além dos níveis de metais existentes nesses animais, este estudo poderá ajudar na compreensão da evolução dos grupos estritamente cavernícolas, bem como para que sejam utilizados como subsídios para planos de conservação e proteção dessas espécies e das cavernas às quais se associam.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Descrição das amostras de peixes estudadas

Os peixes utilizados para a realização deste trabalho foram coletados pelo Professor Doutor Rodrigo Lopes do Departamento de Biologia da UFLA.

O *Ancistrus cryptoptalmus* é uma espécie troglóbia e que foi coletada na caverna da Lapa do Angélica, localizada no município de São Domingos, no estado de Goiás. A Lapa do Angélica encontra-se inserida no Parque Estadual de Terra Ronca e é considerada uma das maiores cavernas da região, sendo de grande importância espeleológica.

*Ancistrus cryptoptalmus* apresenta características troglomórficas, como variação no tamanho dos olhos, tendendo a uma redução de tamanho (Figura 1) e redução marcante da pigmentação melânica. Tais características são bastante difundidas entre espécies de peixes troglóbias.



FIGURA 1 Peixe troglóbio: *Ancistrus Cryptoptalmus*

O *Ancistrus* sp. constitui uma espécie de peixe não troglóbia (Figura 2), descoberta recentemente. A espécie foi coletada no rio, localizado na parte epígea da caverna Angélica, situada no município de São Domingos, GO.



FIGURA 2 *Ancistrus* sp.

Ambas as espécies de *Ancistrus* possuem certas semelhanças e diferenças, que podem ser observadas nas Figuras 1 e 2. Esse tipo de comparação permite observar algumas características morfológicas que demonstram claramente o grau de troglomorfismo da espécie troglóbia, como a redução da pigmentação e das estruturas oculares.

#### **4.2 Amostras**

O presente estudo utilizou como referências as metodologias apresentadas em estudos realizados em peixes não troglóbios, por serem metodologias já utilizadas e padronizadas.

Os experimentos foram realizados utilizando-se duas espécies distintas de peixes, conforme consta na Tabela 1.

TABELA 1 Espécies utilizadas em todas as avaliações

<b>Espécie</b>	<b>Característica</b>	<b>Quantidade de indivíduos</b>
<i>Ancistrus cryptoptalmus</i>	Troglóbio	4 (2 machos e 2 fêmeas)
<i>Ancistrus</i> sp.	Não troglóbio	3 (1 macho e 2 fêmeas)

A coleta de todas as amostras de peixe utilizadas neste trabalho foi realizada pelo professor Dr. Rodrigo Lopes Ferreira e sua equipe, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Essas amostras foram devidamente embaladas e mantidas sob refrigeração (-20°C) até o início das análises, quando, então, foram descongeladas até a temperatura ambiente.

Na realização dos testes de extrato etéreo, as amostras foram liofilizadas e mantidas sob refrigeração (-20°C), até o início das análises.

#### **4.3 Determinação da umidade**

A análise para a determinação de umidade foi realizada em estufa, em laboratório, no Departamento de Zootecnia da UFLA, segundo a metodologia da AOAC (2000), que consiste na perda de água por desidratação, em temperaturas de 100°C a 105°C, por 12 horas.

#### **4.4 Análises de extrato etéreo**

O teste de extrato etéreo, também conhecido como gordura bruta, é assim denominado por representar não somente o teor de ácidos graxos, mas também o teor de vários outros compostos, como esteróis, fosfatídeos, carotenoides,

vitaminas A e D, óleos essenciais, pigmentos e outros. A metodologia foi realizada segundo a AOAC (1998).

#### 4.4.1 Procedimento de análise

Cerca de 0,5 g (g) do material liofilizado foram colocados em um pacote, confeccionado manualmente, de papel de filtro seco (G) (Figura 3), a fim de evitar perdas da amostra e, posteriormente, levadas à estufa, a 105°C, por uma noite. Depois de seco, o pacote com a amostra foi colocado dentro do 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. O éter foi destilado e recuperado em outro recipiente, a amostra foi deixada novamente em estufa para a volatilização de todo o éter e, depois de totalmente fria, foi pesada (T).

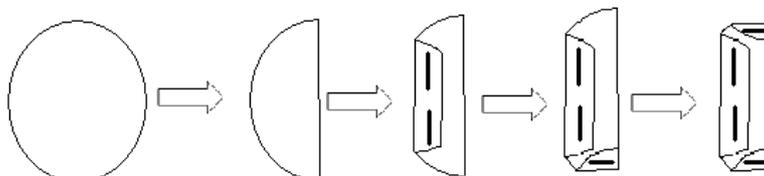


FIGURA 3 Exemplo da confecção do pacote utilizado na análise

#### 4.4.2 Cálculo do extrato etéreo

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

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

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 (liofilizada).

#### **4.5 Análise de minerais**

A análise para pesquisa do teor de minerais (Ca, Cu, Fe, K, Mg, N, P, S e Zn) foi realizada no Laboratório de Análise Foliar, no Departamento de Química da UFLA.

Para a determinação dos teores dos elementos, a abertura da amostra liofilizada foi feita por digestão nitroperclórica. Os teores de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn foram determinados por absorção atômica em um aparelho Espectra A 110 (Varian INE). O teor de K foi determinado por fotometria de emissão de chama em um aparelho Micronal B262.

Para os demais elementos, foram utilizados os métodos colorimétricos: colorimetria do metavanadato fósforo total (P) e turbidimetria do sulfato de bário (S). Os teores dos elementos foram determinados por um espectrofotômetro de UV/visível Lambda 25, Perkin Elmer.

A determinação de N total foi feita pelo método Kjeldahl.

Para todas as análises foram utilizados procedimentos descritos por Malavolta et al. (1989).

#### **4.6 Análise de proteína**

A análise para pesquisa do teor de proteína foi realizada no Laboratório de Análise Foliar, no Departamento de Química da UFLA, como descrito por Malavolta et al. (1989).

O resultado de proteína na amostra foi calculado com base no resultado do teor de nitrogênio, determinado pelo método de Kjeldahl, que foi multiplicando pelo fator 6,25.

Para utilização desse fator de correção, considerou-se, de forma geral, que as proteínas têm, em média, 16% de nitrogênio.

#### **4.7 Extração de lipídeos**

Neste trabalho, utilizou-se a metodologia de Folch & Lees (1957).

Os peixes foram filetados e pesados, aproximadamente, 0,25 g de cada um. Adicionaram-se 1,5 mL de clorofórmio, 2,0 mL de metanol e 1,2 mL 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 680 g, por 15 minutos. As fases foram separadas, a parte metanólica foi descartada e a clorofórmica acondicionada para evaporação do solvente, utilizando nitrogênio gasoso.

##### **4.7.1 Esterificação**

Após a evaporação do resíduo, foi realizada a esterificação da amostra, utilizando a metodologia de Hartman & Lago (1973) e que foi adaptada por Rosa (1999).

Foram adicionados 2 mL de NaOH 0,5 mol/L em metanol, levou-se ao banho fervente, por 5 minutos e adicionados 2,5 mL de reagente esterificante. Aqueceu-se em ebulição por 5 minutos e, depois, foi resfriado. Após resfriado, adicionaram-se 2,0 mL de solução de NaCl saturada e 2,5 mL de hexano. Depois de agitada, a amostra foi levada à centrifugação, a 500 g 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.

#### **4.7.2 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), na Universidade Federal de Lavras (UFLA), por cromatografia gasosa, sendo utilizado o cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida com 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, contendo polietilenoglicol como fase estacionária líquida. O padrão utilizado foi uma mistura de 37 ésteres metílicos considerados mais importantes para o metabolismo de peixe (Supelco<sup>TM</sup> 37 Component FAME Mix).

Foram utilizados os seguintes parâmetros operacionais: modo de injeção “split”, com razão de divisão de 1:100; volume injetado de 1 µL; temperatura do detector de 260°C; temperatura do injetor de 260°C; programa de temperatura: 4°C/min até atingir 140°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, mantendo a rampa de aquecimento de 4°C/min até atingir 240°C, permanecendo por 30 minutos nesta temperatura.

Para a realização da cromatografia gasosa, foi necessário redissolver as amostras em 0,50 mL de n-hexano.

A identificação dos picos foi realizada por método comparativo com os tempos de retenção do padrão de ésteres de ácidos graxos.

#### **4.8 Análise estatística - PCA**

A variação dos ácidos graxos e dos componentes da fração lipídica foi determinada por meio de uma análise de agrupamento do tipo análise de componentes principais.

A PCA foi realizada com matriz de dados constituída dos teores dos ácidos graxos para cada amostra. Antes da análise, os dados foram

autoescalados e a mesma foi realizada no programa The Matlab Mathworks (2007).

Essa técnica de análise multivariada estabelece correlações lineares de cada uma das matrizes de dados para maximizar a correlação de Pearson entre elas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição química

De acordo com os resultados da análise de variância, é possível observar uma diferença significativa sobre os testes de extrato etéreo, proteína e umidade ( $P < 0,05$ ).

A avaliação da composição química da espécie troglóbia *Ancistrus cryptophtalnus* e a não troglóbia *Ancistrus sp.*, capturadas no município de São Domingos, GO, demonstrou que a espécie troglóbia apresentou teores médios de gordura bruta, proteína e umidade superiores à espécie não troglóbia (Tabela 2).

TABELA 2 Porcentagem média de proteína, umidade e extrato etéreo nos peixe, de origem hipógea e epígea

Parâmetros*	<i>Ancistrus cryptophtalnus</i>	<i>Ancistrus sp.</i>
<b>Extrato etéreo (gordura bruta)</b>	18,14+0,22a	14,52+0,49b
<b>Proteína</b>	52,80+0,75a	46,10+0,84b
<b>Umidade</b>	46,84+1,06a	36,63+0,89b

\* Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tal fato pode ser atribuído às condições a que esses animais estavam submetidos. A escassez de alimentação faz com que o animal troglóbio deposite, em seu organismo, uma quantidade maior de gordura e de outros nutrientes, a fim de garantir energia nos períodos de falta do mesmo (Cyrino et al., 2000).

A variação verificada para o teor de gordura bruta nos indivíduos analisados pode decorrer das diferenças nas condições dos habitats dessas espécies. Tais diferenças, principalmente na oferta de alimento, podem ter resultado em alterações no próprio metabolismo dos peixes, o que pode ter afetado suas condições nutricionais e fisiológicas.

TABELA 3 Análise de minerais nos peixes

<b>Minerais</b>	<i>Ancistrus cryptoptalnus</i>	<i>Ancistrus sp.</i>
<b>Ca</b>	8,2 %	8,4 %
<b>Cu</b>	128,1ppm	34,8 ppm
<b>Fe</b>	616,8a ppm	503,5 ppm
<b>K</b>	0,8 %	0,7 %
<b>Mg</b>	0,3 %	0,3 %
<b>N</b>	8,5 %	7,4 %
<b>P</b>	0,6 %	0,6 %
<b>S</b>	0,6 %	0,66 %
<b>Zn</b>	188,5 ppm	211,8 ppm

Não foi possível aplicar o teste de Tukey, para os resultados obtidos na análise de minerais, pois, pela quantidade de amostra disponível, não houve repetição da análise.

Segundo Portaria nº 685-980/98871, do Ministério da Saúde, os limites máximos de tolerância de cobre, ferro e zinco são de 30, 15 e 50 ppm, respectivamente.

Com base nos resultados mostrados na Tabela 1, foi possível observar que os teores de Cu, Fe e Zn estão acima dos limites permitidos pela legislação brasileira, indicando uma possível contaminação por esses metais.

Para o Cu, dentre as principais fontes naturais de contaminação do meio ambiente, estão os sedimentos aquáticos, oriundos de organismos mortos (World Health Organization - WHO, 1998).

Em relação ao Fe, a principal contaminação por este elemento pode ser proveniente de fundições de metais, segundo Forstner & Wittmann (1981). Por isso, esse tipo de contaminação pode ter sido causado por algum material que, provavelmente, estava em contato direto com a água na qual foram capturados os indivíduos de ambas as espécies.

A principal contaminação por Zn pode ser proveniente de baterias, fertilizantes, aros e rodas de veículos, tintas, plásticos e borrachas, segundo Moore & Ramamoorthy, 1984 e Lester, 1987.

Considerando as duas espécies analisadas, a avaliação dos demais componentes minerais demonstrou teores muito próximos entre ambos (Tabela 3). Estes resultados indicam que não houve nenhuma influência do meio hipógeo e epígeo a que ambas estavam submetidas.

Porém, análises futuras devem ser realizadas, utilizando outros elementos da caverna, para que seja possível comprovar possíveis contaminações.

## **5.2 Composição de ácidos graxos da fração lipídica**

A composição de ácidos graxos identificados das espécies analisadas *Ancistrus cryptophtalnus* e *Ancistrus* sp. mostrou-se variável (Tabela 4). De forma similar, os resultados das relações dos ácidos graxos saturados, insaturados, monoinsaturados,  $\omega$  3,  $\omega$  6 e  $\omega$  9 também foram distintas entre as diferentes espécies (Tabela 5).

Os resultados da análise de variância mostram efeito significativo ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos sobre o perfil de alguns ácidos graxos (C15:0; C16:1; C18:0; C18:1  $\omega$ 9; C18:2  $\omega$ 6; C18:3  $\omega$ 3 e C22:6  $\omega$ 3) (Tabela 4).

TABELA 4 Composição dos ácidos graxos da fração de lipídeos totais

Ácido graxo*	<i>Ancistrus cryptoptalmus</i> (n=4) (%)	<i>Ancistrus</i> sp. (n=3) (%)
C12:0	0,10±0,09 <sup>a</sup>	0,06± 0,11 <sup>a</sup>
C13:0	0,17±0,12	<b>nd</b>
C14:0	2,48±0,22 <sup>a</sup>	2,08±0,37 <sup>a</sup>
C15:0	2,17±0,17 <sup>a</sup>	1,19±0,56 <sup>b</sup>
C15:1	<b>nd</b>	<b>nd</b>
C16:0	<b>23,28±1,35<sup>a</sup></b>	<b>23,61±1,69<sup>a</sup></b>
C16:1	<b>10,53±1,50<sup>a</sup></b>	<b>6,54±3,09<sup>b</sup></b>
C17:0	1,78±0,27 <sup>a</sup>	1,87±0,26 <sup>a</sup>
C17:1	0,68±0,07 <sup>a</sup>	0,42±0,38 <sup>a</sup>
0 C18:0	<b>12,23±1,00<sup>a</sup></b>	<b>12,10±0,96<sup>a</sup></b>
3 C18:1ω9c	<b>17,86±4,94<sup>a</sup></b>	<b>12,54±1,18<sup>b</sup></b>
4 C18:2ω6c	<b>8,13±0,95<sup>b</sup></b>	<b>10,20±2,21<sup>a</sup></b>
5 C20:0	0,62±0,06 <sup>a</sup>	0,45±0,07 <sup>a</sup>
6 C18:3ω6	0,53±0,26 <sup>b</sup>	1,15±0,53 <sup>a</sup>
7 C20:1	0,61±0,13 <sup>a</sup>	0,34±0,02 <sup>b</sup>
8 C18:3ω3	<b>1,17±0,23<sup>b</sup></b>	<b>4,84±2,74<sup>a</sup></b>
9 C21:0	<b>nd</b>	0,04±0,08
0 C20:2	0,54±0,13 <sup>a</sup>	0,99±0,48 <sup>a</sup>
1 C22:0	0,18±0,15 <sup>a</sup>	0,06±0,10 <sup>a</sup>
2 C20:3ω6	<b>nd</b>	<b>nd</b>
3 C22:1ω9	<b>nd</b>	<b>nd</b>

...continua...

“TABELA 4, Cont.”

4	<b>C20:3<math>\omega</math>3</b>	2,65 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	2,79 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>
5	<b>C20:4<math>\omega</math>6</b>	<b>9,06<math>\pm</math>2,70<sup>a</sup></b>	<b>8,69<math>\pm</math>2,76<sup>a</sup></b>
6	<b>C23:0</b>	<b>Nd</b>	<b>nd</b>
7	<b>C22:2</b>	0,14 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
8	<b>C24:0</b>	0,21 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	0,27 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
9	<b>C20:5<math>\omega</math>3 (EPA)</b>	0,34 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	1,16 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>
0	<b>C24:1</b>	0,18 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	0,16 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>
1	<b>C22:6<math>\omega</math>3 (DHA)</b>	<b>4,38<math>\pm</math>0,92<sup>b</sup></b>	<b>8,01<math>\pm</math>3,02<sup>a</sup></b>

\*Os ácidos graxos estão apresentados em ordem de eluição na coluna cromatográfica, sendo destacados os quantitativamente mais importantes. Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

TABELA 5 Relações sobre a composição dos ácidos graxos

<b>Ácido Graxo*</b>	<b><i>Ancistrus cryptoptalmus</i> (%)</b>	<b><i>Ancistrus sp.</i> (%)</b>
<b>AGS</b>	52,28 $\pm$ 3,65 <sup>a</sup>	50,43 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>
<b>AGMI</b>	29,87 $\pm$ 3,00 <sup>a</sup>	20,00 $\pm$ 4,02 <sup>b</sup>
<b>AGPI</b>	17,88 $\pm$ 2,85 <sup>b</sup>	29,57 $\pm$ 4,51 <sup>a</sup>
<b>AGPI/AGS</b>	0,34 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>	0,59 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
<b><math>\omega</math> 3</b>	5,88 $\pm$ 4,39 <sup>b</sup>	16,80 $\pm$ 6,56 <sup>a</sup>
<b><math>\omega</math> 6</b>	11,30 $\pm$ 1,39 <sup>a</sup>	11,35 $\pm$ 2,74 <sup>a</sup>
<b><math>\omega</math> 9</b>	17,86 $\pm$ 2,78 <sup>a</sup>	12,54 $\pm$ 1,18 <sup>b</sup>
<b><math>\omega</math> 3 / <math>\omega</math> 6</b>	0,52 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	1,48 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Foram identificados, por meio do padrão (Figura 17 – ANEXO), 23 ácidos graxos da espécie *Ancistrus cryptoptalmus* (Figura 22 – ANEXO) e 24 da *Ancistrus* sp. (Figura 23 – ANEXO).

Alguns tiveram maior destaque nas espécies de origem hipógea e epígea, como ácido palmítico (C16:0), 23,28% e 23,61%; ácido palmitoleico (C16:1), 10,53% e 6,54%; ácido esteárico (C18:0), 12,23% e 12,10%; ácido oleico (C18:1n9c), 17,86% e 12,54%; ácido linoleico (C18:2n6c), 8,13% e 10,20%; ácido linolênico (C18:3n3) 1,17% e 4,84%; ácido tricosanoico (C23:0), 9,06% e 8,69% e DHA (C22:6n3), 4,38% e 8,01%.

Até o momento não existem estudos desta natureza com as espécies *Ancistrus cryptoptalmus* e *Ancistrus* sp., fato que dificulta o entendimento dos resultados, por não existirem dados que possam ser utilizados para comparação. Portanto, tomaram-se como base estudos de alguns ácidos graxos de algumas espécies de água doce, de forma geral.

A predominância do palmítico (C16:0), dentre os AGSs, do palmitoleico (C16:1) e do oleico (C18:1 ω9), dentre os AGMIs, e do ácido araquidônico (C20:4 ω6), dentre os AGPIs, nas duas espécies estudadas, corrobora também o verificado para a grande maioria dos peixes de água doce (Ackman, 1967; Wang et al., 1990).

O ácido graxo C18:2 ω6 foi encontrado em menor quantidade na espécie *Ancistrus cryptoptalmus* (8,13% ) e em maior quantidade na espécie *Ancistrus* sp. (10,20%). Essa diferença se explica pelo fato de o aumento do C18:2 ω6 ser proporcional à quantidade de alimento ingerido pelo peixes, segundo Maia (1992), assim como Aiura (2003), que trabalhou variando a quantidade de ração, utilizando peixes de água doce (não cavernícolas), encontrando valores superiores para os indivíduos que receberam maior quantidade de alimento. Este resultado está de acordo com o fato de que os animais de origem epígea possuem mais alimento disponível em relação ao animal troglóbio.

O ácido C18:2 $\omega$ 6 e o 20:4 $\omega$ 6 estão presentes em ambas as espécies, corroborando os resultados esperados que, segundo Gibson (1983), o ácido linoleico (18:2 $\omega$ 6), um ácido graxo essencial para os peixes, é o precursor do ácido araquidônico (20:4 $\omega$ 6) que, por sua vez, por meio de reações de alongação e dessaturação, dá origem a AGPI  $\omega$ 6 de cadeia mais longa.

Foi encontrada, para ambas as espécies, maior quantidade de C22:6  $\omega$ 3 (DHA), comparado à quantidade de C20:5  $\omega$ 3 (EPA). Esta relação é observada na maioria dos peixes de água doce, provavelmente por apresentar maior atividade de uma enzima específica dessaturase que produz DHA a partir de EPA (Ahlgren et al., 1994).

A relação AGPI/AGS se diferenciou pela influência do total de ácidos graxos poli-insaturados produzidos pelo peixe *Ancistrus* sp. por meio dos processos de alongação e dessaturação.

No momento da amostragem, a temperatura da água, à qual os peixes de origem hipógea e epígea estavam submetidos, era de 22° e 20°C, respectivamente. Pelos resultados ilustrados na Tabela 13, é possível que a temperatura menor (20°C) tenha influenciado um aumento na produção dos AGPI, nos peixes *Ancistrus* sp. Este resultado está de acordo com o de diversos autores (Ackman, 1967; Wang et al., 1990) que discutem o efeito da temperatura na biossíntese de ácidos graxos em peixe e com o de Oliveira (2000), que constatou em seu estudos que, com a diminuição da temperatura, há um aumento na produção de AGPI.

A razão  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 é considerada, por Ahlgren et al. (1994), como o principal indicador da qualidade dos lipídeos em peixes e que melhor reflete a qualidade do alimento por ele ingerido. Os ácidos 18:3 $\omega$ 3, EPA e DHA são os principais ácidos graxos  $\omega$ 3 responsáveis pela razão  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 ser igual a 0,60 e 0,52, no *Ancistrus* sp. e no *Ancistrus cryptoptalmus*, respectivamente. Este resultado indica que não há diferenças significativas na qualidade do alimento disponível para ambas as espécies.

Os escores derivados da PCA, considerando-se os exemplares analisados, são apresentados na Figura 15B, cuja numeração representa o ácido graxo descrito na Tabela 4.

A PCA permitiu evidenciar melhor a composição dos ácidos graxos de cada espécie estudada. O gráfico de escores (Figura 4) indicou que houve distinção entre as espécies *Ancistrus* sp. e *Ancistrus cryptophthalmus*, em função da composição dos ácidos graxos.

O estudo indicou que a espécie *Ancistrus* sp. se diferenciou por apresentar um maior teor, principalmente dos ácidos graxos C18:2n6c (14), C18:3 ω3 (18), C20:3 ω3 (24), C20:5ω3 (EPA) (29) e o C22:6ω3 (DHA) (31). Para o *Ancistrus cryptophthalmus*, os ácidos graxos C15:0 (4), C16:1 (7) e C18:1ω9c (13) foram os principais responsáveis pela diferenciação da espécie.

Tem sido observado, para algumas espécies, que o aumento de AGS é acompanhado pela redução nos teores de AGPI (Ahlgren et al., 1994). Partindo desse pressuposto, o resultado da análise de componentes principais para as duas espécies avaliadas indicou um comportamento, entre alguns AGPIs de cadeia longa e alguns AGSs e AGMIs de menor cadeia, que corresponde ao desses estudos realizados com peixes de água doce, por se tratarem de duas espécies do mesmo gênero.

Na análise de componentes principais também se pode observar que uma amostra do peixe não troglóbio *Ancistrus* sp. (macho) se diferenciou dos demais indivíduos dessa mesma espécie. Os ácidos graxos C16:0 (7), C18:2 ω6c (14) e C21:0 (19) foram os responsáveis por esta diferença, em que os valores foram maiores. Os outros indivíduos (fêmeas) apresentaram valores menores, porém, próximos entre si, em que as diferenças não foram significativas. Este comportamento também ocorreu com a espécie troglóbia *Ancistrus cryptophthalmus*, para a qual a maior diferença foi influenciada pelo ácido graxo C16:1 (7). Tal resultado pode estar relacionado com o sexo do animal, uma vez

que os indivíduos machos apresentaram valores maiores quando comparados ao das fêmeas.

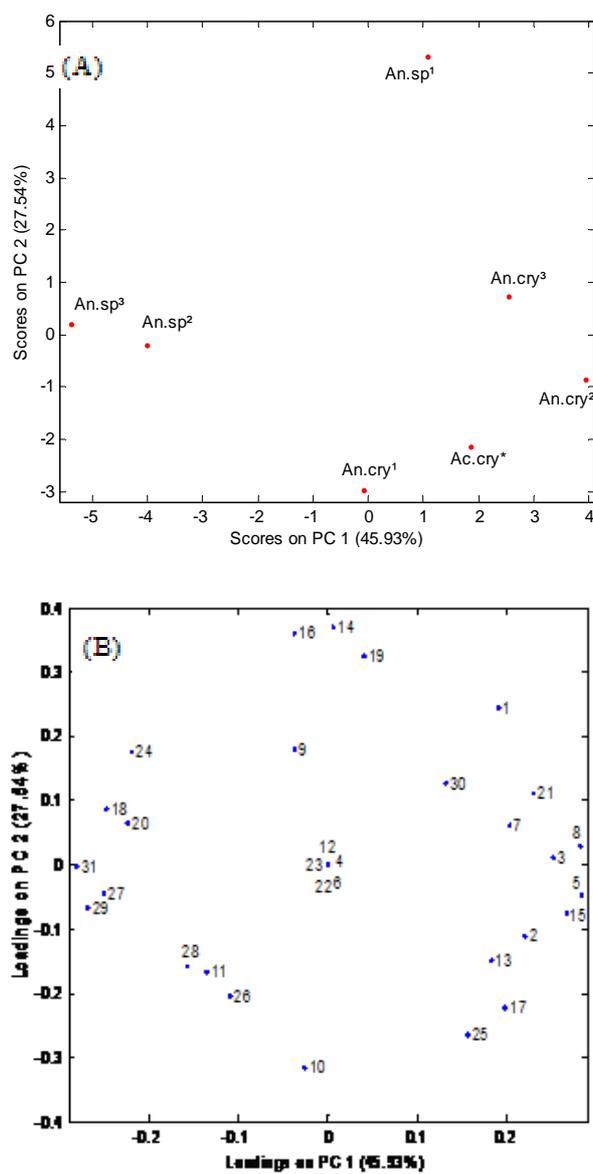


FIGURA 4 Escores derivados da análise de componentes principais para as duas espécies. Relação envolvendo os exemplares analisados (A) e os teores de ácidos graxos (B).

## 6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento, as espécies *Ancistrus cryptophthalmus* e *Ancistrus* sp. apresentaram teores superiores dos metais Cu, Fe e Zn, ao limite máximo permitido pela legislação brasileira, podendo ser um indício de contaminação nas regiões onde os peixes foram coletados.

As espécies *Ancistrus cryptophthalmus* e *Ancistrus* sp. apresentaram maiores diferenças quanto ao teor de C16:1 (10,53% e 6,54%, respectivamente), C18:1n9 (17,86% e 12,54%, respectivamente), C18:2 n6 (8,13% e 10,20%, respectivamente), C18:3 n3 (1,17% e 4,84 %, respectivamente) e C22:6 n3 (4,38% e 8,01%, respectivamente).

A variação verificada na composição de ácidos graxos nos indivíduos analisados pode ser um indicativo da diferença nas condições de habitat dos peixes, que refletem na oferta de alimento ou, mesmo, indicativo de alterações no próprio metabolismo do peixe. Essa variação para alguns ácidos graxos pode ser influenciada também pelo sexo do animal, considerando que os machos da espécie *Ancistrus cryptophthalmus* apresentaram teores mais altos dos ácidos graxos C21:0, C16:0 (7) e C18:2 ω6c (14) e os da espécie *Ancistrus* sp. teor de 16:1 (7), quando comparados com indivíduos fêmeas das respectivas espécies.

Considerando a fragilidade dessas populações, a possibilidade de extinção de algumas espécies e, conseqüentemente, a impossibilidade da coleta de muitos indivíduos, foi utilizado o maior número de animais por espécie possível, sendo avaliado o maior número de variáveis.

Contudo, todos os resultados obtidos são de grande importância, servindo como base inicial para a realização de trabalhos futuros.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKMAN, R. G. Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some fresh-water fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 22, n. 3, p. 907-922, Sept. 1967.

AHLGREN, G.; BLOMQVIST, P.; BOBERG, M.; GUSTAFSSON, I. B. Fatty acid content of the dorsal muscle: an indicator of fat quality in freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, London, v. 45, n. 1, p. 131-157, July 1994.

AIURA, F. S. **Efeito do tanino sobre a deposição lipídica, composição em ácidos graxos e rendimento de filé de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2003. 55 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC, 1998. v. 2.

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

BELDA, M. C. R.; POURCHET-CAMPOS, M. A. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 5-35, 1991.

BRASIL. Portaria n. 685 de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 ago. 1998. Seção 1.

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

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica**: com correlações clínicas. 6. ed. São Paulo: E. Blucher, 2007. 1186 p.

FOLCH, J.; LEES, M. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 226, n. 1, p. 497-509, May 1957.

FÖRSTNER, U.; WITTMANN, G. **Metal pollution in the aquatic environment**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1981. 486 p.

GIBSON, R. A. Australian fish – an excellent source of both arachidonic acid and w-3 polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, Champaign, v. 18, n. 11, p. 743-752, Nov. 1983.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, n. 6, p. 475-477, June 1973.

MACFARLANE, R. B.; NORTON, E. C.; BOWERS, M. J. Lipid dynamics in relation to the annual reproductive cycle in yellowtail rockfish (*Sebastes flavidus*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 50, n. 2, p. 391-401, Feb. 1993.

MAIA, E. L. **Otimização da metodologia para caracterização de constituintes lipídicos e determinação da composição em ácidos graxos e aminoácidos de peixes de água doce**. 1992. 242 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, A. S. **Avaliação do estado nutricional das plantas**: princípios e aplicações. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201 p.

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

THE MATLAB MATHWORKS. **Matlab version 7.5**. Natick, 2007.

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. 29 p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

RIBEIRO, P. A. P. **Efeitos de fontes de ácidos graxos na dieta e da redução da temperatura sobre o metabolismo lipídico de tilápias nilóticas (*Oriochromis niloticus*) e truta arco-íris (*Oncirhynchus mykiss*).** 2007. 162 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ROSA, F. C. **Teor de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 no peito e na coxa de frangos de corte alimentados com rações contendo três fontes de óleo.** 1999. 93 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WANG, Y. J.; MILLER, L. A.; PERREN, M.; ADDIS, P. B. Omega-3 fatty acids in lake superior fish. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 71-73, Jan. 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme on Chemical Safety. **Environmental health criteria.** Geneva, 1998.

## ESTUDO DE CASO – Atividade específica da enzima málica

### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Papel da enzima málica no metabolismo de peixes

Análises qualitativas e quantitativas da composição química de uma espécie de peixe e dos tecidos e órgãos que a compõem fornecem elementos para o estudo de suas necessidades nutricionais básicas que, por sua vez, são primordiais para o entendimento do hábito desses animais. Esse conhecimento segue no sentido de facilitar tomadas de decisão com o objetivo de promover a preservação e a manutenção de cada espécie no decorrer de suas vidas.

Ribeiro (2007) descreve que a composição lipídica tecidual, em peixes, é reflexo direto da alimentação, influenciando a síntese lipídica no organismo e a composição dos ácidos graxos. Segundo Nielsen et al. (2005), citados por Ribeiro (2007), dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados, por exemplo, podem diminuir a capacidade lipogênica do tecido hepático e adiposo, promovendo uma melhor composição lipídica da carcaça.

Nos peixes em geral, os processos lipogênicos ocorrem no fígado, em que é requerida a ação de algumas enzimas específicas, como a málica e a glicose-6-fosfato desidrogenase. Porém, para algumas espécies de peixes comuns, as atividades dessas enzimas diminuem, proporcionalmente, com o aumento da quantidade de lipídeos (Wang et al., 2005).

Os animais cavernícolas são protegidos por leis ambientais e o número de indivíduos por espécies para serem utilizados em pesquisa é bastante limitado. Esse controle também ocorre devido ao fato de que a população desses animais é bastante reduzida, quando comparada a de outros tipos de animais que não vivem em cavernas.

Contudo, conhecer um pouco do metabolismo desses animais contribui no sentido de conhecer também um pouco mais do ambiente ao qual está submetido.

## **2 OBJETIVO**

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os processos bioquímicos envolvidos na lipogênese hepática de duas espécies de peixes diferentes, um troglóbio, *Ancistrus cryptoptalmus* e outro, não troglóbio, *Ancistrus* sp., sendo ambos do mesmo gênero.

## **3 DISSECAÇÃO E DESCRIÇÃO DOS PEIXES *Ancistrus cryptoptalmus* E *Ancistrus* sp.**

As principais dificuldades encontradas no decorrer da realização deste trabalho ocorreram devido ao número reduzido de indivíduos, impossibilitando a repetição das análises. O tamanho reduzido, característico dos peixes de caverna, também dificultou a identificação e a extração do hepatopâncreas, órgão utilizado para a realização da atividade enzimática. Portanto, seria necessária a realização de novas análises, utilizando um número maior de indivíduos por espécies possíveis. Será feito, então, um breve relato sobre os testes realizados.

No momento da extração do hepatopâncreas, foi de grande importância conhecer um pouco das características do peixe.

A informação de que os peixes das espécies *Ancistrus cryptoptalmus* e *Ancistrus* sp. apresentam hepatopâncreas (Figura 16) é de grande importância para a localização do mesmo e realização de uma correta extração.

O fato de essas espécies de peixes serem morfologicamente diferentes pode causar confusão na identificação do órgão de interesse.

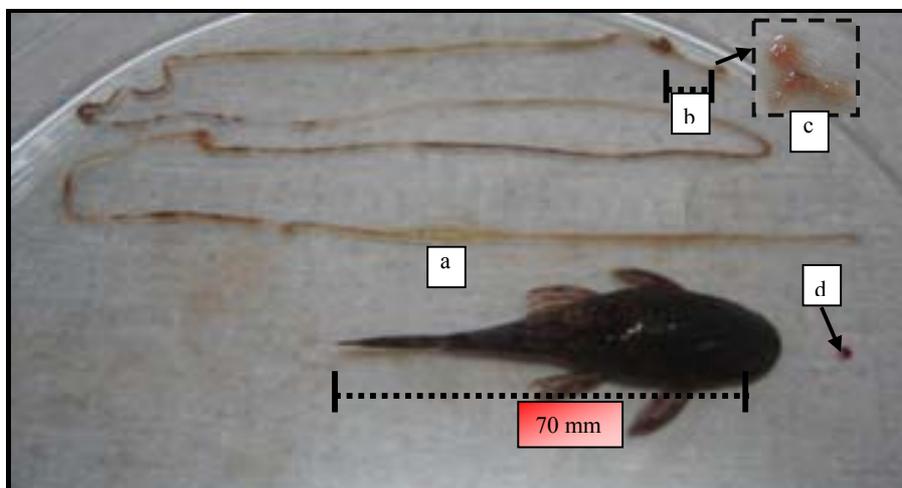


FIGURA 1 *Ancistrus* sp. (a) representa o intestino desenovelado, (b) o estômago, (c) o hepatopâncreas ligado ao estômago e (d) o baço.

Os indivíduos analisados apresentavam tamanhos que variavam entre 50 e 72 mm de comprimento, variando entre macho e fêmea.

As duas espécies apresentam boca ventral, ou seja, posição que mais corresponde ao hábito alimentar, em que estes são mais encontrados em peixes detritivos e iliófagos, o que caracteriza estes serem peixes raspadores e sugadores (Okamura, 2009).

Quanto à parte digestiva desse animal, o mesmo apresentava o pâncreas difuso no fígado combinado com células hepáticas, ou seja, hepatopâncreas com tamanho de, aproximadamente, 10 mm, ligado ao estômago, conforme item (c) da Figura 16. No item d, da Figura 16, é mostrado o baço que pode ser facilmente confundido com o fígado ou parte dele.

O tamanho, o formato e a anatomia do animal estão diretamente relacionados com a disponibilidade do alimento. *Ancistrus* sp. apresenta intestino longo e enovelado, conforme item (a) da Figura 16, o que caracteriza peixes

herbívoros, nos quais há a presença de glândulas digestivas e sítios de absorção mais espaçados no intestino.

As mesmas características em relação ao *Ancistrus* sp. também foram observadas no *Ancistrus cryptoptalmus*, ou seja, os peixes apresentaram características morfológicas muito próximas. As diferenças percebidas foram na pigmentação e na parte oftálmica.

#### **4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Foi realizado o teste de atividade enzimática utilizando a enzima málica (EM, E.C.1.1.1.40). Esse teste foi realizado seguindo metodologia descrita por Spina et al. (1966), seguida por Ribeiro (2007) e modificada para este trabalho, considerando o baixo volume de amostra.

As amostras de hepatopâncreas foram pesadas em tubo *ependorf*, homogeneizadas em tampão HEPES-KOH, com pH 7,2, na proporção 1:20 (peso/volume), colocadas em banho ultrassônico por 10 minutos e, posteriormente, centrifugadas, a 5.600 g, a 4°C, por 30 minutos. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra e o sobrenadante foi coletado apenas no final.

A solução resultante foi mantida sob refrigeração até o início da leitura em UV.

A cinética enzimática foi realizada, por meio do método de espectrofotometria ultravioleta, a 340 nm e por 5 minutos, no equipamento SpetctroUV, acoplado com UVWin v.5.01. O conteúdo total de proteína no hepatopâncreas foi determinado pela metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A unidade de atividade enzimática (UI), definida como  $\mu\text{mol}$  de substrato convertido em seu respectivo produto, por minuto, foi expressa em mg de proteína solúvel hepática (atividade específica).

#### 4.1 Resultados obtidos, discussão e considerações

Na Tabela 1 são representados os valores médios das atividades da enzima málica, expressos em U/mg de proteína e as diferentes espécies e órgãos analisados.

As espécies tilápia-nilótica (*Oriochromis niloticus*) e surubim (*Pseudoplatystoma* spp.), peixes comumente analisados, foram utilizadas como parâmetros de comparação do resultado obtido para as espécies e *Ancistrus cryptoptalmus* e *Ancistrus* sp.

TABELA 1 Avaliação da atividade da enzima málica (em U/mg de proteína) em diferentes segmentos do trato digestório de espécies de peixes

ATIVIDADE ENZIMÁTICA	
Espécie	Enzima málica
<b>Hepatopâncreas</b>	
<i>Ancistrus cryptoptalmus</i>	0,0159
<i>Ancistrus</i> sp.	0,0068
<b>Fígado</b>	
<i>Oriochromis niloticus</i>	0,026
<i>Pseudoplatystoma</i> spp.	0,066
<b>Baço</b>	
<i>Ancistrus cryptoptalmus</i>	0
<i>Ancistrus</i> sp.	0

Alguns fatores, como temperatura da água, fatores hormonais e alimentação, afetam diretamente a atividade dessas enzimas, que podem ser

utilizadas como indicadores das condições nutricionais de algumas espécies (Méton et al., 2003).

Segundo Ribeiro (2007), nos peixes, a via das pentoses supre cerca de 60% do NADPH requerido nos processos lipogênicos e somente 40% é proveniente da ação da enzima málica. Já para a enzima glicose-6-P desidrogenase, sua participação no processo de fornecimento de energia é maior quando comparada à da enzima málica. Essa variação acontece, diferentemente, de acordo com cada espécie de peixe.

Na formação dos ácidos graxos, as rotas metabólicas requerem quantidades específicas de energia, sob a forma de NADPH. Nos peixes, a principal fonte metabólica é a fase oxidativa da via das pentoses fosfatadas. A enzima málica atua fortemente no ciclo do piruvato/malato, contribuindo para o suprimento de NADPH (Campbell & Farrel, 2007).

De acordo com vários trabalhos relatados na literatura, as atividades consideradas como parâmetros de referência para o peixe de água doce, não troglóbio, é de 0,013 a 0,082 U/mg de proteína para enzima málica (Dias et al., 2004).

Como os peixes analisados eram muito pequenos, a dificuldade de se detectar o fígado ou o hepatopâncreas foi muito grande. De acordo com os resultados para as espécies *Ancistrus cryptoptalmus* e *Ancistrus* sp., confirmou-se a presença do hepatopâncreas, evidenciando a não existência de um fígado isolado para essas espécies de peixe.

Apesar de o resultado obtido para a espécie *Ancistrus cryptoptalmus* estar de acordo com os valores encontrados em diversos trabalhos utilizando peixes de água doce, não troglóbios, o mesmo não foi conclusivo, pois seria necessário realizar um número maior de análises. A *Ancistrus* sp. apresentou atividade baixa, devido à pouca quantidade de amostra.

Considerando as condições em que foi possível realizar o experimento, foram encontradas diversas dificuldades durante a execução do mesmo. Uma delas foi a pequena quantidade de material utilizado na avaliação, por consequência do tamanho do órgão dos peixes, em consequência do tamanho reduzido do animal. Esse fato impossibilitou a repetição das análises, dificultando possíveis conclusões para os resultados obtidos.

A continuidade de pesquisas envolvendo as espécies utilizadas neste trabalho é importante porque, além de buscar respostas para outras questões em aberto, também se aplica no reconhecimento de itens alimentares para esses animais, com vistas à sua conservação e manutenção nas áreas estudadas e na região. Além disso, possibilita a aplicação de métodos que avaliem a disponibilidade desses recursos no ambiente dos animais, a fenologia das espécies utilizadas e a sazonalidade em suas dietas.

Alguns autores, como MacNab (1980) e Dunbar (1988), discutem que muitos aspectos do comportamento animal são afetados pela disponibilidade de recursos que variam sazonalmente. Isso poderia ser verificado ao longo de um período maior de coleta.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, n. 1/2, p. 248-254, May 1976.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S.O. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Thompson Learning, 2007. v. 3.

CENTRO NACIONAL DE ESTUDOS, PROTEÇÃO E MANEJO DE CAVERNAS. **Base de dados geoespacializados de cavidades naturais subterrâneas do CECAV/IBAMA**. Disponível em: <[www.ibama.gov.br/cecav/index.php?id\\_menu=228](http://www.ibama.gov.br/cecav/index.php?id_menu=228)>. Acesso em: 16 nov. 2009.

DIAS, J.; RUEDA-JASSO, R.; PANSERAT, S. Effect of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenil Senegalese sole (*Solea seleganelesis*, Kaup). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 12, p. 1122-1130, Oct. 2004.

DUNBAR, R. I. M. **Primates social systems**. Ithaca: Cornell University, 1988. 382 p.

MACNAB, B. Food habitats, energetics, and the population biology of mammals. **American Naturalist**, Chicago, v. 116, n. 1, p. 106-124, July 1980.

MÉTON, I.; FERNÁNDEZ, F.; BAANANTEI, V. Shot-and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus auratus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 225, n. 1/4, p. 99-107, July 2003.

NIELSEN, N. S.; GÖTTSCHE, J. R.; HOLM, J.; XU, X.; MU, H.; JACOBSEN, C. Effect of structure lipids based on fish oil on the growth and fatty acid composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 250, n. 1/2, p. 411-423, Nov. 2005.

OKAMURA, D. **Influência do amido de milho no metabolismo energético de surubin *Pseudoplatystoma spp.*** 2009. 83 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RIBEIRO, P. A. P. **Efeitos de fontes de ácidos graxos na dieta e da redução da temperatura sobre o metabolismo lipídico de tilápias nilóticas (*Oriochromis niloticus*) e truta arco-íris (*Oncirhynchus mykiss*)**. 2007. 162 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

WANG, J. T.; LIU, Y. J.; TIAN, L. X.; MAI, K. S.; DU, Z. Y.; WANG, Y.; YANG, H. J. Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition, hepatic lipogenesis in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 249, n. 1/4, p. 439-447, Sept. 2005.

## ANEXOS

ANEXO A		Página
FIGURA 1A	Cromatograma do padrão de ésteres de ácido graxo (Supelco <sup>TM</sup> 37 Component FAME Mix).....	95
FIGURA 2A	Cromatograma dos ésteres de ácido graxo de uma amostra do peixe troglóbio <i>Ituglanis Passensis</i> .....	95
FIGURA 3A	Cromatograma dos ésteres de ácido graxo de uma amostra do peixe troglóbio <i>Trichomycterus itacarambiensis</i> .....	96
FIGURA 4A	Cromatograma dos ésteres de ácido graxo de uma amostra do peixe troglóbio <i>Stygichthys typhlops</i> .....	96
FIGURA 5A	Cromatograma dos ésteres de ácido graxo de uma amostra do peixe troglófilo <i>Ituglanis</i> sp.....	97
FIGURA 6A	Cromatograma dos ésteres de ácido graxo de uma amostra do peixe troglóbio <i>Ancystrus cryptophtalmus</i> ...	97
FIGURA 7A	Cromatograma dos ésteres de ácido graxo de uma amostra do peixe não troglóbio <i>Ancystrus</i> sp.....	98

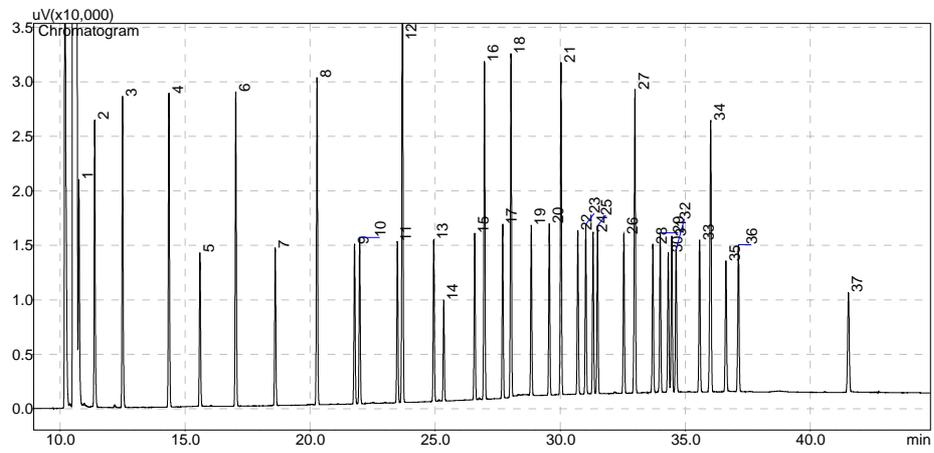


FIGURA 1A Cromatograma do padrão de ésteres de ácido graxo (Supelco™37 Component FAME Mix)

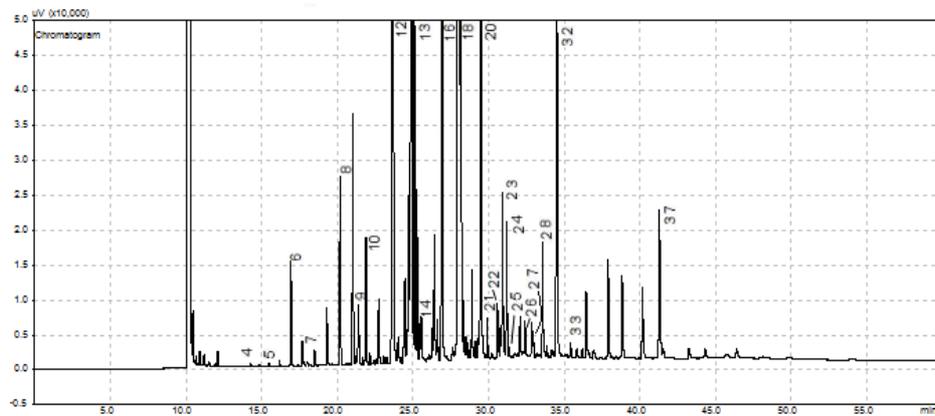


FIGURA 2A Cromatograma dos ésteres de ácido graxo de uma amostra do peixe troglóbio *Ituglanis Passensis*

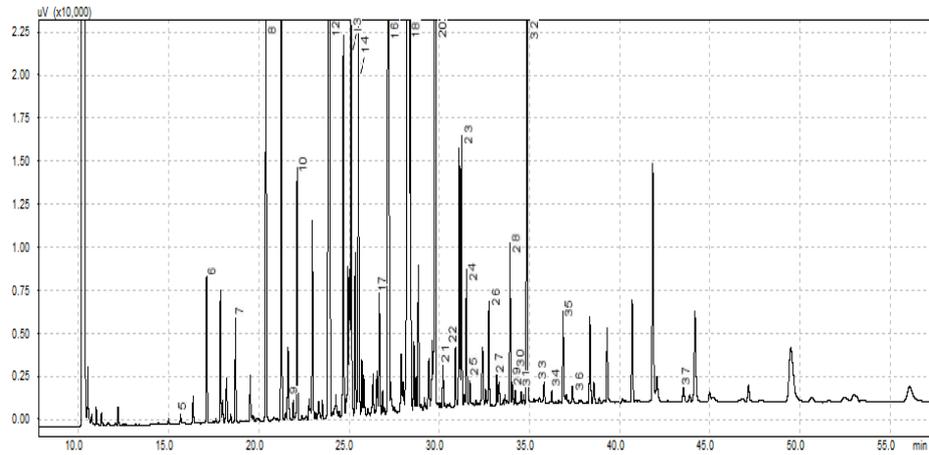


FIGURA 3A Cromatograma dos ésteres de ácido graxo de uma amostra do peixe troglóbio *Trichomycterus itacarambiensis*

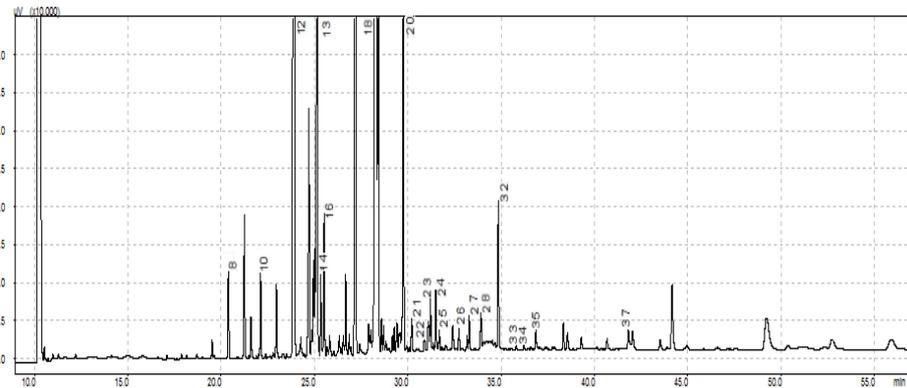


FIGURA 4A Cromatograma dos ésteres de ácido graxo de uma amostra do peixe troglóbio *Stygichthys typhlops*

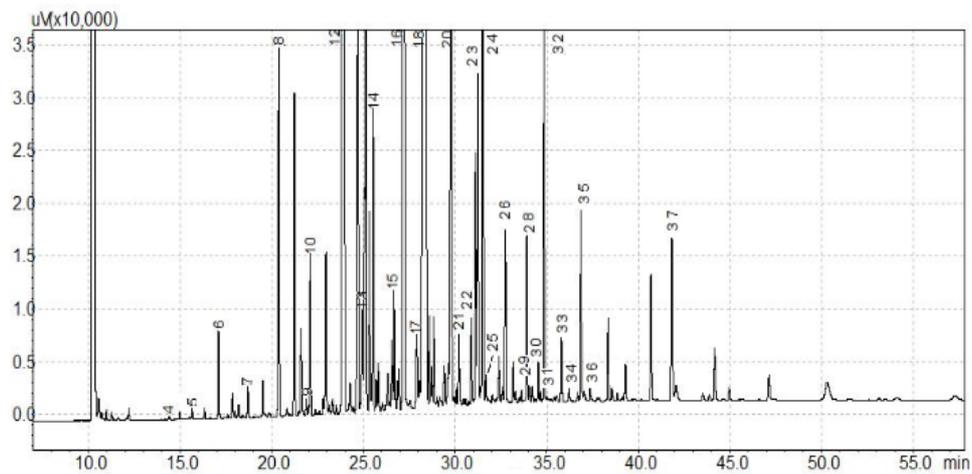


FIGURA 5A Cromatograma dos ésteres de ácido graxo de uma amostra do peixe troglófilo *Ituglanis* sp.

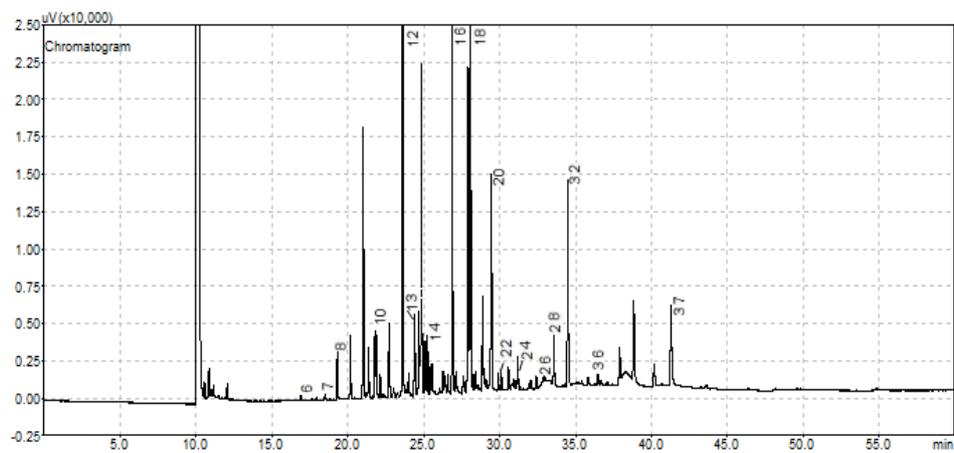


FIGURA 6A Cromatograma dos ésteres de ácido graxo de uma amostra do peixe troglóbio *Ancistrus cryptoptalmus*

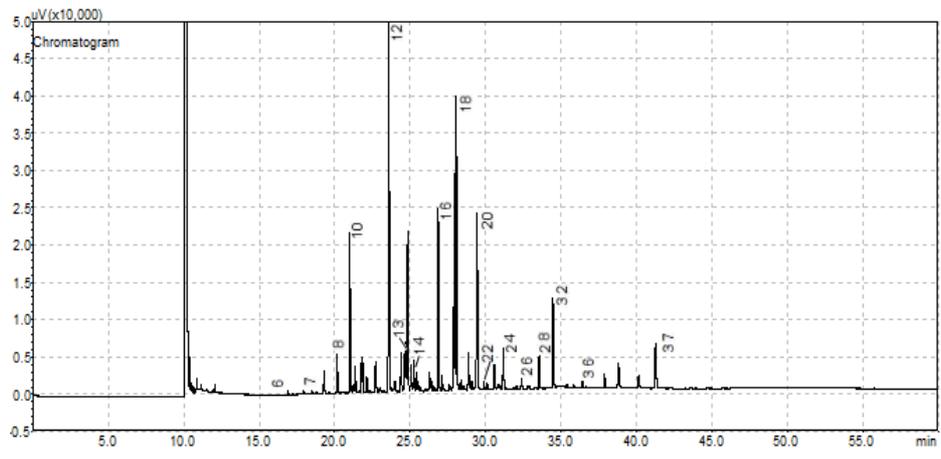


FIGURA 7A Cromatograma dos ésteres de ácido graxo de uma amostra do peixe não troglóbio *Ancistrus* sp.