AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DE PEIXES CAVERNÍCOLAS

Aline Gomes Dias Pinto MONTEIRO* - alinegdpm2008@gmail.com
Mário César GUERREIRO*
Rodrigo Lopes FERREIRA**
Luciana de Matos Alves PINTO*
Universidade Federal de Lavras - UFLA
* Depto. de Química. Caixa Postal 37, Lavras, MG, CEP 37200-000, Brasil - Fax: +55 (35) 3829-1172.
** Depto. de Biologia.

Abstract
Caves can be characterized as a dynamic environment under permanent change, mainly by the action of water which serves as training, shaping and placement of many features. In that dark room without food many species are being generated with characteristics very different from the ones existing outside that habitat. Because of that, new species of animals have been emerging and being discovered. For this study, it was used troglobius (Trichomycterus itacarambiensis and Stygichthys typhlops) and troglophylus (Ituglanis spn) fishes. In order to search on the aquatic environment and the changes experienced by these species it was carried out analysis of the lipid profile, by using gas chromatography with a flame-ionization detector. 30 fatty acids were identified with more evidence for palmitic acid (C16:0), 22,28%; stearic acid (C18:0), 8,52%; oleic acid (C18:1n9c), 29,07%; linoleic acid (C18:2n6c), 5,64%; linolenic acid(C18:3n3), 2,23%; tricosanoic acid (C23:0), 2,27% and cis-4,7,10,13,16,19–docosaexaenoic acid (DHA - C22:6n3), 1,40%. Individual analysis demonstrated that differences between species, habitat and food could be related with the fatty acid profile observed.

***Key-words**: cave, troglobius, troglophylus, lipids.*

Introdução

As cavernas podem ser encontradas em vários tipos de rochas, sendo as carbonáticas as mais comuns, por apresentar uma grande solubilidade em água (1).

Estas são formadas por calcita (carbonato de cálcio), que na presença de ácido carbônico, produz bicarbonato de cálcio, que é solúvel em água. A característica ácida da água é proveniente de chuvas ácidas ou pela presença de CO_2 existente na atmosfera e na decomposição de matéria orgânica, onde é formado o ácido carbônico. A dissolução química das rochas dá origem a diversas feições físicas, que podem ser classificadas como lapiás, cavernas, dolinas, entre outras.

As cavernas podem ser definidas como cavidades naturais, caracterizada pelo seu dinamismo e estando em constante modificação (2).

Nesse ambiente afótico e com escassez de alimento vão surgindo, por meio de adaptação ao longo de anos, espécies com características muito diferenciadas em comparação com as demais existentes fora desse habitat.

As espécies encontradas nas cavernas podem ser classificadas em três categorias: Os troglóxenos, que são regularmente encontrados em ambientes subterrâneos, porém saem do mesmo para completar seu ciclo de vida. Os morcegos e os aracnídeos podem ser citados como exemplo dessa categoria. Os troglófilos que também são encontrados em ambientes subterrâneos, porém podem completar seu ciclo de vida tanto no meio subterrâneo quanto fora dele, como por exemplo, algumas espécies de aracnídeos. E por fim, Os troglóbios que são restritos ao meio subterrâneo (3), que podem ser espécies de peixes, crustáceos, dentre outros.

Os troglóbios vivem em isolamento e sua população é relativamente pequena. Possuem alto grau de diferenciação em comparação com 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 longevidade alta); à fisiologia (capacidade de flutuações ambientais baixas e taxas metabólitas baixas); ao comportamento (redução da ritmicidade cicardiana).

Alguns estudos vêm sendo realizados para descobrir a origem e os fatores que caracterizam essas mudanças.

Uma das estratégias utilizadas para investigar as modificações no metabolismo de peixes é a avaliação do perfil lipídico.

O perfil lipídico vem sendo realizado, na sua maioria, em peixes não troglóbios e de regiões temperadas e boreais.

No Brasil, apesar de sua riqueza hidrográfica, somente algumas espécies de peixes, não troglóbias, foram avaliadas quanto à composição dos ácidos graxos (4). Para espécies troglóbias e troglófilas, ainda não havia nenhum relato de estudos desta natureza.

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 (principalmente a classe dos fosfolipídios), 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 (5).

A concentração e os tipos de ácidos graxos variam de acordo com as condições do habitat e da alimentação de cada espécie alterando a bioquímica dos ácidos graxos.

Os ácidos graxos são classificados como saturados (AGS); monoinsaturados (AGMI); poliinsaturados (AGPI); essenciais (ω3 e ω6) e trans ou cis.

A designação de ômega tem relação com a posição da primeira dupla ligação, contando a partir do grupo metílico final da molécula de ácido graxo. Os ácidos graxos ω-3 apresentam a primeira dupla ligação entre o terceiro e o quarto átomo de carbono, enquanto os ácidos graxos ω-6 têm a primeira dupla ligação entre o sexto e o sétimo átomo de carbono e os ácidos graxos ω-9 têm a primeira dupla ligação entre o nono e o décimo átomo de carbono.

O número e a posição das duplas ligações determinam as propriedades físicas e químicas dos ácidos graxos poliinsaturados. As famílias ω-3 e ω-6 têm diferentes funções fisiológicas e atuam em conjunto para regular os processos biológicos.

As principais famílias de ácidos graxos do tipo ômega-3 (ω-3 ou n-3) e ômega-6 (ω -6 ou n-6) são ácidos graxos poliinsaturados, contendo de 18 a 22 carbonos. Já as de ômega-9 (ω -9 ou n-9), são ácidos graxos monoinsaturados de cadeia longa.

Os principais ácidos graxos ω-3 são o ácido linolênico 18:3, o ácido eicosapentaenóico (EPA) 20:5 e o ácido docosaexaenóico (DHA) 22:6, enquanto os principais ω-6 são o ácido linoléico 18:2 e o ácido araquidônico 20:4.

Os estudos sobre alimentos considerados funcionais são de elevado interesse por existem vários estudos nessa área. Os alimentos funcionais podem ser definidos como alimentos que possuem propriedades de prevenção ou diminuição dos sintomas de certas doenças (6). A carne do peixe possui um destaque, dentre todos os outros alimentos já estudados até hoje, por apresentar alto teor de EPA e DHA, também considerados ácidos graxos altamente insaturados (AGAI) de ω-3.

Dentro desse contexto, o perfil de lipídeos em espécies de caverna, pode ser um coadjuvante no avanço das pesquisas de peixes. O objetivo do presente trabalho é avaliar o perfil lipídico de diferentes espécies de peixes cavernícolas e identificar as possíveis diferenças, analisando sua importância.

Materiais e Métodos

O presente estudo toma como referência metodologias e estudos em peixes não cavernícolas, por serem metodologias já utilizadas e padronizadas.

Amostragem

Os experimentos foram realizados utilizando-se 2 espécies distintas de troglóbios: o *Trichomycterus itacarambiensis* (albino e pigmentado escuro) e o *Stygichthys typhlops*, além de uma espécie troglófila: o *Ituglanis* spn.

A espécie *Ituglanis* spn constitui uma espécie troglófila que ainda não foi descrita e que ocorre em corpos d'água na região de Pains, em Minas Gerais.

A espécie *Trichomycterus itacarambiensis* (7), é restrita à caverna Olhos D'Água, situada na cidade de Itacarambi, no norte de Minas Gerais. Neste caso, foram avaliados peixes com diferentes graus quanto aos caracteres morfológicos. As amostras eram compostas por peixes completamente cegos, sendo um dos indivíduos albino e outro apresentando pigmentação escura.

A espécie *Stygichthys typhlops* ocorre em lençóis freáticos na região de Jaíba, norte de Minas Gerais. Sua distribuição é restrita a essa área, na drenagem do córrego Escuro, afluente do rio Verde Grande, na região do alto São Francisco.

A coleta de todas as amostras de peixe utilizadas neste trabalho foi feita pelo Professor Dr. Rodrigo Lopes Ferreira, do departamento de Biologia da UFLA, e também por sua equipe.

As amostras foram devidamente embaladas e mantidas em freezer até o início das análises, quando então foram descongeladas até temperatura ambiente.

Extração de lipídeos

Neste trabalho, utilizou-se a metodologia de Folch e colaboradores (8). Numa breve descrição, os peixes foram filetados e pesados aproximadamente 0,25 g de cada um. Adicionou-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 por 15 minutos. Após esse procedimento a solução foi centrifugada por 15 minutos. As fases foram separadas onde a parte metanólica foi descartada e a clorofórmica acondicionada para evaporação do solvente, utilizando nitrogênio gasoso.

Esterificação

Após a evaporação do resíduo foi realizada a esterificação da amostra conforme segue. Foram adicionados 2 mL de NaOH 0,5 M em metanol, o mesmo foi levado à banho fervente por 5 minutos e adicionado 2,5 mL de reagente esterificante. O mesmo foi levado a banho fervente por 5 minutos e depois resfriado. Após resfriado, adicionou-se 2,0 mL de solução de NaCl saturada e 2,5 mL de hexano. Depois de agitada, a amostra foi levada à centrifugação. 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 até a realização das análises.

Caracterização dos Ácidos Graxos

A composição dos ácidos graxos foi determinada 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 peixes (Supelco™ 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 ºC; temperatura do injetor de 260 ºC; programa de temperatura: 4 ºC/min. até atingir 140 ºC, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, mantendo a rampa de aquecimento de 4 ºC/min. até atingir 240 ºC, permanecendo por 30 minutos nesta temperatura.

Para a realização da cromatografia gasosa, foi necessário redissolver as amostras em 0,30 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.

Resultados e Discussões

Os resultados das análises da composição de ácidos graxos identificados, das espécies *Ituglanis* spn, *Trichomycterus itacarambiensis* (pigmentado escura), *Trichomycterus itacarambiensis* (albino) *e Stygichthys typhlops* estão apresentados na Tabela 1.

Foram identificados 30 ácidos graxos, porém alguns tiveram maior destaque como o ácido palmítico (C16:0), 22,28%; ácido esteárico (C18:0), 8,52%;

ácido oléico (C18:1n9c), 29,07%; ácido linoléico

(C18:2n6c), 5,64%; ácido linolênico (C18:3n3), 2,23%; ácido tricosanóico (C23:0), 2,27% e ácido *cis*-4,7,10,13,16,19–docosaexaenóico (DHA – C22:6n3), 1,40%.

O ácido araquidônico (C20:4n6) é de grande importância fisiológica e nutricional para o peixe, porém apresentou um percentual de 0,05%, considerado muito baixo para peixes de água doce (9).

Nos quatro indivíduos analisados, *Ituglanis* spn, *Trichomycterus itacarambiensis* (pigmentado escura), *Trichomycterus itacarambiensis* (albino) *e Stygichthys typhlops*, o total de AGS foi 20,62%; 35,12%; 35,08% e 30,97%, respectivamente. O total

de AGMI foi de 20,70%; 34,62%; 33,01% e 30,47%, respectivamente.

O total de AGPI foi de 9,69%; 8,56%; 9,69% e 6,29%, respectivamente.

O ácido linoléico (18:2n6), é um ácido graxo essencial para os peixes, sendo o precursor do ácido araquidônico (20:4n6) que, por meio de reações de elongação e dessaturação, dá origem a AGPI ω6 de cadeia mais longa (10). Nos 4 indivíduos, o ácido araquidônico esteve presente em uma quantidade muito pequena.

A razão ω6/ω3 é considerada o principal indicador da qualidade dos lipídeos em peixes e o que melhor reflete a qualidade do alimento por ele ingerido (11). Nos peixes de água doce seu valor é, em geral, inferior ao de peixes marinhos indicando uma alimentação mais rica em 18:2ω6 e 18:3ω6 do que 18:3ω3 (12).

A espécie que apresentou uma melhor razão ω6/ω3 foi a *Ituglanis* spn.

Os indivíduos da espécie *Trichomycterus itacarambiensis*, apesar de possuírem morfologia bastante diferenciada em relação à pigmentação, apresentaram pouca diferença nos seus respectivos perfis de ácido graxo.

A espécie troglófila e as demais troglóbias apresentaram entre elas diferenças significativas na composição de ácidos graxos. Porém, a espécie troglófila apresentou maiores diferenças no perfil de ácidos graxos, em comparação com as demais espécies troglóbias.

Os resultados do perfil de ácidos graxos apresentados para cada espécie utilizada na realização deste trabalho são influenciados pelas condições existentes nas cavernas: a temperatura da água, a alimentação diferenciada pela qualidade, quantidade e periodicidade da mesma, além de fatores sazonais da região. Estas condições podem ser determinadas pelas diferentes localizações geográficas das espécies, promovendo adaptações químicas e metabólicas nos organismos estudados.

Agradecimentos

CAPQ-UFLA e FAPEMIG.

Tabela 1: Composição dos ácidos graxos das espécies de peixes estudadas. Os resultados estão dispostos como percentagem dos ácidos graxos em relação ao total presente.

	Ituglanis spn	*Trichomycterus itacarambiensis (Escuro)*	*Trichomycterus itacarambiensis (Albino)*	*Stygichthys typhlops*
Ácidos Graxos	*%*	*%*	*%*	*%*
C11:0	0,01	0,03	0,04	0,00
C12:0	0,25	0,29	0,59	0,02
C13:0	0,06	0,28	0,42	0,02
C14:0	0,94	**2,47**	**1,70**	0,64
C14:1	0,04	0,09	0,08	0,00
C15:0	0,36	0,88	**1,03**	0,62
C16:0	**12,37**	**22,28**	**19,41**	**17,76**
C16:1	**1,38**	**3,54**	**2,74**	**5,55**
C17:0	0,74	**1,19**	**1,72**	**1,07**
C17:1	0,15	0,00	0,00	0,00
C18:0	**4,43**	**5,59**	**7,43**	**8,52**
C18:1n9t	0,23	0,22	0,33	0,00
C18:1n9c	**17,93**	**29,07**	**28,60**	**24,49**
C18:2n6c	**4,98**	**4,80**	**5,64**	**4,24**
C20:0	0,17	0,16	0,16	0,32
C18:3n6	0,23	0,28	0,24	0,22
C20:1	0,81	**1,41**	**1,09**	0,43
C18:3n3	**2,23**	0,66	0,59	0,61
C21:0	0,09	0,27	0,12	0,22
C20:2	0,45	0,39	0,46	0,27
C22:0	0,13	0,13	0,12	0,16
C20:3n6	0,46	0,69	0,70	0,46
C22:1n9	0,12	0,11	0,07	0,00
C20:3n3	0,15	0,05	0,07	0,00
C20:4n6	0,02	0,05	0,05	0,00
C23:0	**1,02**	**1,41**	**2,27**	**1,60**
C22:2	0,17	0,16	0,10	0,04
C24:0	0,05	0,15	0,06	0,03
C20:5n3	0,45	0,31	0,49	0,15
C24:1	0,03	0,18	0,10	0,00
C22:6n3	0,58	**1,22**	**1,40**	0,30
AGS	20,62	35,12	35,08	30,97
AGMI	20,70	34,62	33,01	30,47
AGPI	9,69	8,56	9,69	6,29
ω 3	3,41	2,24	2,55	1,06
ω 6	5,69	5,82	6,63	4,93
ω 6/ω 3	1,67	2,60	2,60	4,64
ω 9	18,28	29,40	29,00	24,49

Referências

1. GILBERT, J.; D.L. & STANFORD, J.A. Groundwater Ecology. Academic Press Limited, San Diego, Califórnia, 1994.

2. R.L., FERREIRA, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.

3. HOLSINGER, J. R. & D. C. CULVER. The invertebrate cave fauna of Virginia and a part of Eastern Tennessee: Zoogeography and ecology. *Brimleyana, 14:* 1 - 162. 1988.

4. GURGEL, J. J. S. & FREITAS, J.V. F. (1977). 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.*

5 . LEHNINGER AL. Bioquímica. 4ª ed. São Paulo: Sarvier; 2006.

6. FAST FORWARD INTO FUNCTIONAL FOODS. *Prepared Foods.* New York: Virginia Dare Company Inc. p.38-48. 1995

7. TRAJANO, E. ; PINNA, M.C.C. . A new cave species of Trichomycterus from eastern Brazil..... Ciência Hoje, Rio de Janeiro, p. 16 - 19, 30 jul. 1996.

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

9. E. R. N., OLIVEIRA, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, 2000.

10. GIBSON, R.A. Australian fish – an excellent source of both arachidonic acid and w-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 743-752, 1983.

11. 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*, 131-157, 1994.

12. 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, v.22, 1967.