



PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS EM TILÁPIAS DESAFIADAS COM FUMONISINAS

Gabriel Roldi Geraldo¹, Bruno Meneguim Artacho², Stefania Caroline Claudino da Silva³,
Bruno Lala⁴, Eliane Gasparino⁵

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR, Maringá-PR. Bolsista PIBIC/Fundação Araucária-UniCesumar. gabriel.858@hotmail.com

² Acadêmico do Curso de Biomedicina, UNICESUMAR

³ Orientadora, Doutora, Docente do Departamento de Medicina Veterinária, UNICESUMAR

⁴ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, UEM-PR

⁵ Docente do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá-UEM

RESUMO

A micotoxina fumonisina é produzida durante o metabolismo secundário dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* e pode causar diversos danos à saúde, levando o animal à morte, dependendo dos níveis de contaminação e tempo de exposição à toxina. A ação da fumonisina envolve a ação direta sobre a mucosa intestinal, além da alteração da síntese de ceramida pelo bloqueio enzimático da ceramida sintase, promovendo desta forma, redução na síntese de esfingolípídios complexos e acúmulo e precursores metabólicos. Os danos à mucosa intestinal e o acúmulo de intermediários esfingóides pode causar alteração nutricionais na carcaça dos animais, como aumento dos ácidos graxos saturados e redução dos ácidos graxos insaturados na carcaça, por meio de menor absorção de nutrientes oriundos da alimentação e do acúmulo de palmitoil CoA. Um estudo realizado no Brasil com amostras de ração oriundas de fazendas de tilápias-do-Nilo demonstrou contaminação por fumonisina B1 em 98% das amostras avaliadas representando um grande risco a estes animais, e os tornando um grupo alvo para estudos. Deste modo, esta pesquisa tem como objetivo avaliar o perfil dos ácidos graxos insaturados no músculo de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com níveis crescentes de fumonisina. O perfil dos ácidos graxos saturados foi analisado por cromatografia gasosa e os resultados avaliados por análise de variância utilizando o software SAS, a 5% de probabilidade. O consumo de níveis crescentes de fumonisina promoveu alteração na maioria dos ácidos graxos avaliados na carcaça de alevinos de tilápia-do-Nilo.

PALAVRAS-CHAVE: Micotoxinas, lipídios, peixes.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) possui grande participação na alimentação animal como matéria-prima básica na formulação de diversas rações, e a qualidade destes grãos depende de diversos fatores. A micotoxina fumonisina é produzida durante o metabolismo secundário dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* (Turner et al., 1999). Estudos recentes têm demonstrado que as fumonisina promovem alterações no epitélio intestinal, causando fusão, atrofia e redução da altura das vilosidades intestinais em suínos, e em casos mais severos, promove necrose na túnica média de artérias e veias na camada muscular do intestino. Danos ao epitélio intestinal têm sido frequentemente associados à redução de absorção de nutrientes, e mudança no perfil nutricional na carcaça de animais (Diestel et al., 2012).

Ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o linoleico (18:2n-6, AL) e o alfa-linolênico (18:3n-3, AAL) são considerados essenciais, pois sua síntese ocorre em baixas



quantidades sendo necessária sua ingestão na alimentação (Youdim et al., 2000). São de extrema importância para o correto funcionamento de diversas atividades biológicas e para a manutenção das propriedades físicas da membrana (Ehringer et al., 1990).

É possível que o consumo de níveis crescentes de fumonisinas por alevinos de tilápia-do-Nilo promova alterações na mucosa intestinal, e conseqüentemente, má absorção de ácidos graxos pelo epitélio intestinal. Além disso, é provável que os níveis de fumonisina absorvidos alterem o metabolismo intracelular dos ácidos graxos insaturados, uma vez que fumonisinas afetam a biossíntese de esfingolípídios por meio da ruptura na bioconversão das bases esfingóides, com provável acúmulo de palmioil CoA e, consecutivamente, ácido palmítico (16:0), que atua como precursor dos ácidos graxos naturais saturados e insaturados de cadeias mais extensas (Vianni et al, 1996).

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de ácidos graxos insaturados na carcaça de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), desafiados com níveis crescentes de fumonisina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos neste experimento foram realizados de acordo com regulamento da comissão de ética no uso de animais (CEUA - UniCesumar).

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura em parceria com a Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá – PR. Foram utilizados 180 alevinos revertidos sexualmente para macho, pertencentes ao grupo genético GIFT x Tailandesa, com peso inicial de aproximadamente 2,5g. Os peixes foram distribuídos em três caixas de fibrocimento com volume útil de 870L cada, com sistema individual de renovação da água (15 %/dia) e aeração constante por meio de pedra porosa acoplada a um soprador central. Em cada tanque foram introduzidos quatro hapas totalizando 12 unidades experimentais com quatro tratamentos e três repetições. Cada hapa continha um volume individual de 217,50L onde foram alojados 15 peixes, totalizando 14,5 L/peixe. Os peixes passaram por um período de adaptação de 15 dias antes do início do experimento.

A temperatura foi aferida duas vezes ao dia em cada tanque, às 9:00 e 17:00 horas. As variáveis oxigênio dissolvido e pH foram aferidas pela manhã durante todo o experimento por meio de kit individual colorimétrico.

Foram elaboradas quatro dietas isocalóricas (aproximadamente 3000 kcal de energia digestível ED/kg de dieta) e isoprotéicas (aproximadamente 33% de proteína bruta), variando apenas quanto à inclusão de diferentes níveis de fumonisina B1 (6,06mg de toxina/g de meio) + fumonisina B2 (1,35mg de toxina/g de meio). O meio de cultura foi obtido e laudado pelo laboratório de análises micotoxicológicas – LAMIC, da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. As dietas foram elaboradas considerando a concentração de FB1 + FB2, totalizando uma concentração de 7,41mg de toxina/g de meio.

Foram formados quatro grupos experimentais: GRUPO 1 – dieta controle com 0,0 mg de inclusão de FB/kg de ração, GRUPO 2 - 20 mg de inclusão de FB/kg, GRUPO 3 - 40 mg de FB/kg e GRUPO 4 - 60 mg de inclusão de FB/kg. As concentrações de fumonisina na dieta foram avaliadas por análise laboratorial. A dieta foi peletizada, seca em estufa de ventilação forçada a 55°C por 48 horas, desintegrada em moedor manual, as partículas foram classificadas de acordo com a granulometria (1 a 2mm) e distribuída manualmente três vezes/dia até saciedade aparente

Para análise de perfil de ácidos graxos foram utilizadas as carcaças inteiras evisceradas de todos os animais. A extração de lipídios totais das amostras foi realizada



utilizando a técnica a frio descrita por Bligh & Dyer (1959). Para transesterificação dos triacilgliceróis, as amostras foram submetidas à técnica de Hartman & Lago (1973).

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados por cromatografia gasosa (Cromatógrafo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, EUA) em auto-amostrador, equipado com detector de ionização de chama a 240 °C e coluna capilar de sílica fundida (100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 µm, Restek 2560). O fluxo de gases foi de 1,5 mL min⁻¹ de H₂ (gás de arraste), 30 mL min⁻¹ para N₂ (gás auxiliar) e 35 e 350 mL min⁻¹, respectivamente, para o H₂ e ar sintético (gases para chama). A temperatura inicial da coluna foi estabelecida em 65 °C, mantida por 8 minutos, elevada até 170 °C a uma taxa de 50 °C min⁻¹, mantida por 40 minutos, chegando a 240 °C de temperatura final, sendo elevada a uma taxa de 50 °C min⁻¹ e mantida por 28,5 minutos. A quantificação dos ácidos graxos da amostra foi efetuada por comparação com o tempo de retenção de ésteres metílicos de ácidos graxos de amostras padrões (Sigma Aldrich).

A identificação dos ácidos graxos foi efetuada através da comparação dos tempos de retenção com padrões Sigma (EUA), e o cálculo das áreas dos picos determinadas através do software Clarity Lite versão 2.4.1.91. A quantificação destes em mg g⁻¹ de lipídios totais foi efetuada em relação ao padrão interno, tricosenoato de metila (Sigma). Para avaliar o perfil dos ácidos graxos, os dados provenientes da análise foram linearizados, avaliados usando o procedimento REG Statement (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA) para avaliar a existência ou não do efeito de regressão. Os resultados foram expressos como médias e desvios-padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de ácidos graxos da carcaça de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com níveis crescentes de fumonisina é mostrado na tabela 1. Não houve diferença significativa para ácidos graxos monoinsaturados totais entre os diferentes níveis de fumonisina testados, assim como para poliinsaturados totais tipo ω₆. Embora não haja diferença significativa para poliinsaturados totais tipo ω₆, observamos diferença significativa para estes ácidos graxos quando avaliados individualmente. Para os ácidos graxos poliinsaturados totais tipo ω₃ houve aumento significativo nos peixes alimentados com os maiores níveis (40 e 60 mg/kg). De forma semelhante, observamos aumento significativo dos ácidos graxos poliinsaturados totais para animais alimentados com fumonisina.

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos da carcaça de alevinos de tilápias do Nilo, alimentadas com níveis crescentes de FB1 + FB2

Perfil de AG	Controle	FB20	FB40	FB60
Monoinsaturados				
C14:1 \uparrow	0,25 ± 0,012	0,05 ± 0,004	0,05 ± 0,003	0,07 ± 0,005
C15:1 \uparrow	0,06 ± 0,006	0,06 ± 0,007	0,08 ± 0,008	0,09 ± 0,008
C16:1 \uparrow	2,03 ± 0,066	2,00 ± 0,004	2,00 ± 0,031	1,82 ± 0,028
C17:1 \uparrow	0,99 ± 0,136	0,89 ± 0,009	1,32 ± 0,043	1,22 ± 0,104
C18:1 \S	24,78 ± 0,527	24,27 ± 0,287	23,97 ± 0,137	24,14 ± 0,195
C20:1 \S	1,23 ± 0,043	1,28 ± 0,045	1,24 ± 0,047	1,16 ± 0,078
C22:1 \uparrow	1,64 ± 0,024	1,56 ± 0,024	1,65 ± 0,031	1,70 ± 0,030
C24:1 \uparrow	0,11 ± 0,003	0,11 ± 0,003	0,11 ± 0,004	0,13 ± 0,004
Total ^{ns}	32,20 ± 0,62	31,34 ± 0,30	31,61 ± 0,09	31,52 ± 0,27



Gelderblom et al., 1996 avaliaram o efeito de dois níveis de fumonisina (150 e 50 μM) sobre a capacidade de incorporação de ácido palmítico em hepatócitos de ratos, comprovando que as fumonisinas inibem a incorporação do ácido palmítico. Estes mesmos autores sugerem que este seja o provável mecanismo de ação pelo qual fumonisinas afetem o perfil de ácidos graxos.

Em nossa pesquisa, a concentração de ácido linolênico (18:3n-3) não foi alterada, entretanto, as concentrações de seus derivados, os ácidos docosaheptaenóico (22:6n-3) e eicosapentaenóico (20:5n-3), foram aumentadas. Resultados divergentes foram demonstrados por Santos et al., 2007, no qual a concentração destes ácidos graxos foi reduzida em tilápias do Nilo alimentadas com ácido linoléico conjugado. Gelderblom et al., 2002 observaram aumento dos níveis dos ácidos 20:5n-3 e 22:6n-3 na porção de fosfatidilcolina de hepatócitos de ratos alimentados com 10mg FB/kg de ração, corroborando com os resultados observados nas tilápias. Estes resultados sugerem que fumonisinas podem aumentar os níveis totais de ácidos graxos poliinsaturados da família ômega 3.

Quando avaliados os níveis dos ω_6 , tilápias desafiadas com fumonisinas apresentaram redução nas concentrações do ácido linoléico (C18:2n6) e do ácido eicosatrienóico (C20:3n6), e aumento nas concentrações de ácido eicosapentaenóico (C20:5n6). O ácido linoleico é um ácido graxo de cadeia longa considerado essencial e pode ser encontrado na forma de ácido linoleico conjugado (CLA), com diversas formas de isômeros posicionais e geométricos (Medeiros, 2002). A redução de C18: 2n6 nas tilápias desafiadas com fumonisina representa piora na qualidade de carcaça para este ácido graxo. Gelderblom et al., 1997 avaliaram o efeito dos níveis fumonisina (50, 100 e 250 mg/kg de ração) sobre o perfil lipídico do fígado de ratos e também observaram redução das concentrações de C22:5n6, porém observaram aumento de C18:2n6. Fumonisininas não afetaram a concentração total dos ω_6 . Estes resultados demonstram que o efeito das fumonisinas sobre o metabolismo dos ácidos graxos da família ω_6 requer maiores estudos.

O total dos PUFA foi alterado significativamente pela inclusão das fumonisinas, com efeito de regressão quadrática ($y = 0,387x^2 - 1,486x + 33,60$; $R^2 = 0,834$), sendo os maiores níveis observados para o nível de 60mg. Este aumento dos PUFAs é consequência direta do aumento dos ω_3 , dado que ω_6 total não foi alterado.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados encontrados nesta pesquisa é possível concluir que fumonisinas aumentam a concentração de ácidos graxos da família ω_3 , e consequentemente, os ácidos graxos poliinsaturados totais na carcaça

REFERÊNCIAS

ANDERSON, Gregory J.; CONNOR, William E. Accretion of n-3 fatty acids in the brain and retina of chicks fed a low-linolenic acid diet supplemented with docosaheptaenoic acid. **The American journal of clinical nutrition**, v. 59, n. 6, p. 1338-1346, 1994.

ANDRADE, E. C. et al. Parasitoses intestinais: uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **Rev. APS**, v. 13, n. 2, p. 231-240, 2010.



BEZUIDENHOUT, S. Catherine et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusariummoniliforme*. **Journal of the Chemical Society**, Chemical Communications, n. 11, p. 743-745, 1988.

BOUHET, Sandrine; OSWALD, Isabelle P. The intestine as a possible target for fumonisin toxicity. **Molecular nutrition & food research**, v. 51, n. 8, p. 925-931, 2007.

CONNOR, William E.; NEURINGER, Martha; LIN, Don S. Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes, and plasma of rhesus monkeys. **Journal of Lipid Research**, v. 31, n. 2, p. 237-247, 1990.

DIESTEL, Cristina; DOS SANTOS, Mariana; ROMI, Marcela. Tratamento Nutricional nas Doenças Inflamatórias Intestinais. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 11, n. 4, 2012.

EHRINGER, William et al. A comparison of the effects of linolenic (18: 3 Ω 3) and docosahexaenoic (22: 6 Ω 3) acids on phospholipid bilayers. **Chemistry and physics of lipids**, v. 54, n. 2, p. 79-88, 1990.