

SUPLEMENTAÇÃO DE SELÊNIO NA DIETA ALIMENTAR DE JUNDIÁ

Maria Shimelly Soares ROCHA¹, Robson Luiz PUNTEL², Paulo Rodinei Soares LOPES³, Márcio Aquio HOSHIBA¹, Larissa da CUNHA¹, Alessandra Sayuri Kikuchi TAMAJUSUKU⁴

RESUMO

O estudo objetivou avaliar os efeitos antioxidantes da suplementação de disseleneto de difenila na concentração de 3,0 ppm na dieta alimentar de jundiás (*Rhamdia quelen*). Para isso, 80 peixes foram distribuídos em oito unidades experimentais compostas por oito caixas d'água. Dois grupos de peixes foram constituídos, sendo denominados: T1 - Grupo controle e T2 - Grupo tratado com ração aditivada com selênio, com quatro réplicas de cada tratamento. Foram avaliadas as atividades específicas das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) no tecido hepático; os níveis de Peroxidação Lipídica (Níveis de TBARS) nos tecidos musculares e hepáticos; e a toxicidade do selênio através do teste de Micronúcleo Písceo (MN). A adição de disseleneto de difenila não alterou significativamente o crescimento dos animais, nem as atividades enzimáticas da SOD e da CAT ou, ainda, os níveis de TBARS. A concentração testada não se mostrou tóxica para os animais, como evidenciado pelo teste da contagem de micronúcleos.

Palavras-chave: disseleneto de difenila; estresse oxidativo; nutrição; peixe; *Rhamdia quelen*

FEEDING SUPPLEMENTATION WITH SELENIUM IN THE DIETS OF CATFISH

ABSTRACT

The study objectified evaluated the effects of oxidizing effects of feeding supplement with diphenyl diselenide at a concentration of 3ppm in the catfish diet. For this, 80 fishes were distributed in eight experimental units composed by eight water tanks. The two groups were denominated: T1 - control group and T2 - a group treated with supplemented ration with selenium. Each treatment had four replicates. It have been evaluated the activities of Superoxide Dismutase (SOD) enzymes and Catalase (CAT), in the liver tissue, the lipid peroxidation levels (TBARS levels) from muscle and liver tissue and evaluation toxicological Selenium testing through the Fish micronucleus (MN) assay. The addition of diphenyl diselenide has not appreciably changed the development of these animals, nor the enzymatic activities from SOD and CAT or yet in the TBARS levels. The tested concentration has not been toxic to the animals, as evidenced by the counting micronucleus test.

Key words: diphenyl diselenide; oxidative stress; nutrition; fish; *Rhamdia quelen*

Artigo Científico: Recebido em 14/04/2016; Aprovado em 22/12/2016

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana. Caixa Postal 118 - BR 472 - Km 592 - CEP: 97508-000 - Uruguaiiana - RS - Brasil. e-mail: shimelly@yahoo.com (autor correspondente)

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana. Caixa Postal 118 - BR 472 - Km 592 - CEP: 97508-000 - Uruguaiiana - RS - Brasil.

³Núcleo de Aquicultura (NAQUA), Universidade Federal do Pampa, Campus Dom Pedrito. Rua 21 de abril, 80 - CEP: 96450-000 - Dom Pedrito - RS - Brasil.

⁴NUPILABRU e AQUAPAMPA, Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana. Caixa Postal 118 - BR 472 - Km 592 - CEP: 97508-000 - Uruguaiiana - RS - Brasil.

INTRODUÇÃO

A qualidade da dieta é de fundamental importância em um sistema produtivo para que se obtenham animais saudáveis em menor tempo de produção e com boa conversão alimentar. Dessa forma, a ração deve ser capaz de satisfazer as necessidades básicas de crescimento, desenvolvimento e reprodução, dependendo das características do local. As dietas a serem administradas devem obedecer aos padrões adequados de estocagem e de concentração de vitaminas e minerais, assim como às normas que regulam a adição de antioxidantes que previnem danos oxidativos e atuam melhorando o desempenho do animal em cultivo (NAVARRO *et al.*, 2007).

Contudo, em cativeiro, a situação de estresse está constantemente presente, tanto por manejos inadequados, quanto por altas taxas de estocagem e modificações dos parâmetros de qualidade da água, fatores estes que estão diretamente relacionados ao desempenho produtivo dos peixes, prejudicando o estado de saúde e aumentando a suscetibilidade a doenças.

Pensando na saúde e na qualidade dos peixes, a utilização de selênio nas dietas passa a ter papel importante, pois trata-se de um antioxidante mineral constituinte de selenoproteínas, que contêm um ou mais resíduos de selenocisteína em seus sítios ativos agindo diretamente nas defesas antioxidantes dos animais (MONTEIRO *et al.*, 2007). Desta forma, a sobrevivência, sanidade e resposta aos agentes estressores dos peixes são condicionadas à presença deste micronutriente, pois a funcionalidade destas proteínas - enzimas antioxidantes - é dependente do selênio.

Entretanto, estudos relacionados à suplementação de selênio na dieta de peixes ainda são incipientes e controversos. PEREIRA *et al.* (2009) indicam que matrizes de tilápia (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com selênio orgânico não apresentaram um maior desempenho zootécnico, enquanto sua prole, sim. PIEDRAS *et al.* (2005) obtiveram resultados significativos para jundiá (*Rhamdia quelen*) quando alimentados com selênio orgânico, enquanto com selênio inorgânico os resultados não foram expressivos, resultados estes que podem ter diferentes interpretações, uma vez que o selênio em concentrações moderadas pode ser estocado para manutenção das funções homeostáticas e, em concentrações elevadas, resultar em efeitos

tóxicos (HAMILTON, 2004). Assim, dependendo da dose utilizada, o selênio pode ser tanto um elemento essencial quanto tóxico. Se utilizado nas concentrações adequadas, o selênio pode agir como antioxidante, atuando na sanidade e melhorando o desempenho dos animais.

Em virtude dos dados apresentados e da divergência de informações em relação ao efeito e à dose específica do selênio nos parâmetros de estresse oxidativo na piscicultura, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito antioxidante deste composto, suplementado na dieta de jundiás, nos tecidos muscular e hepático, através da medida das atividades enzimáticas de Superóxido Dismutase (SOD) e de Catalase (CAT) e dos níveis de peroxidação lipídica, assim como da análise de toxicidade do selênio através do teste de Micronúcleo (MN).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e dietas

O experimento foi conduzido no Núcleo de Aquicultura (NAQUA), na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Dom Pedrito, em junho de 2014. Foram utilizados 80 alevinos de jundiá com peso médio de 6,5 gramas e 9,5 cm de comprimento médio, mantidos durante uma semana para aclimação em tanques de polipropileno com sistema de recirculação fechada de água e alimentados com ração controle. Esse período proporcionou adaptação dos peixes ao sistema de cultivo, após o qual foram selecionados os animais mais homogêneos e distribuídos nas unidades experimentais. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIPAMPA. As rações experimentais são descritas na Tabela 1.

Disposições dos tratamentos

O tratamento foi realizado no período de 21 dias. Os peixes foram distribuídos em oito unidades experimentais com 10 indivíduos em cada uma, compostas por caixas d'água de polipropileno com capacidade de 56,1 litros, abastecidas com 40 litros de água, num sistema de circulação fechado termorregulado e acoplado a um biofiltro.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (% do peso seco em g kg⁻¹)

Dieta	Controle	Selênio
Ingrediente		
Farelo de soja	30,00	30,00
Farinha de carne	35,00	35,00
Farelo de trigo	15,00	15,00
Milho	15,00	15,00
Óleo de soja	2,00	2,00
Vitaminas e minerais premix*	1,00	1,00
Fosfato bicálcico	0,5	0,5
BHT (antioxidante)	0,01	0,01
Sal	0,5	0,5
Cloreto de colina	1,0	1,0
Difenil disseleneto (PhSe) ₂	0,0	3,0
Composição centesimal		
Proteína bruta (%)	32,10	33,14
Energia digestível (Kcal kg ⁻¹)	3217,18	3390,49
Extrato etéreo (%)	10,52	11,22
Fibra em detergente neutro	10,16	10,38
Amido	20,56	20,69
Matéria mineral (%)	10,02	10,04

Os grupos foram denominados: T1 – Grupo controle e T2 – Grupo tratado com 3,0 ppm de disseleneto de difenila (PhSe)₂. Cada tratamento foi composto por quatro unidades experimentais.

A alimentação foi ofertada diariamente duas vezes por dia (às 9h e 16h) na quantidade de 3% da biomassa total de cada tanque. Este valor foi corrigido após cada biometria semanal, quando os indivíduos eram submetidos a pesagem em balança de precisão para obtenção do peso total (P), seguida da obtenção dos comprimentos total (CT) e padrão (CP), com auxílio de ictiômetro milimetrado.

Eutanásia dos animais e obtenção de material para cada bioensaio

Após o período de exposição ao tratamento, os animais foram submetidos ao sacrifício, que consistiu na retirada dos tanques, obtenção de dados biométricos (peso e comprimento) e coleta de amostras de sangue, seguida de imersão em MS-222 na concentração de 100 mg L⁻¹ para a

eutanásia e dissecação dos tecidos. Os tecidos foram homogeneizados em tampão TRIS/HCl (50 mM, pH 7,4), centrifugados por 10 min a 3000 g e armazenados em Freezer -20°C, para posterior análise.

Atividade da catalase (CAT)

O método consiste em mensurar a atividade da catalase através da degradação do peróxido de hidrogênio exógeno, gerando oxigênio e água, por meio de espectrofotometria, de acordo com o método descrito em AEBI (1984).

Peroxidação lipídica (níveis de TBARS)

O método consiste em uma reação ácido aquecida, em que uma alíquota de homogeneizado é incubada a 95°C durante 2 horas. As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas por espectrofotometria a 535 nm como descrito por OHKAWA *et al.* (1979).

Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi medida como descrito por MISRA e FRIDOVICH (1972). O método baseia-se na capacidade de SOD para inibir a auto-oxidação de epinefrina para adrenocromo. A cor da reação pode ser monitorizada em 480 nm. Uma unidade enzimática (1 IU) é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a velocidade de auto-oxidação da epinefrina em 50%, a 26 °C.

Determinação de proteína

A proteína foi quantificada por meio do método com Comassie Blue, utilizando albumina do soro bovino como padrão. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro em 595 nm (BRADFORD, 1976).

Micronúcleo písceo

Micronúcleos (MN) são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados de forma normal ao núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntica em aparência ao núcleo celular, indicando normalmente toxicidade, pois, a presença de micronúcleos em demasia pode indicar anomalias celulares, formadas quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose, fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL *et al.*, 2001).

O teste do micronúcleo písceo em hemácias periféricas foi realizado segundo a técnica descrita em HEDDLE (1973) e SCHMID (1975). Coletaram-se amostras de sangue de três exemplares de cada tratamento para realização de esfregaços, os quais foram, então, submetidos ao teste de frequência de Micronúcleos (MN). Para análise por meio do teste de MN foram contadas 2000 células por exemplar e determinadas as frequências de ocorrência de MNs, bem como de alterações morfológicas nucleares.

Análises estatísticas e cálculos

Aos resultados das análises bioquímicas foi aplicado o teste t não pareado e, para as frequências de MNs, o teste Mann-Whitney, sendo, em todos os testes, considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Através dos resultados das análises bioquímicas observadas, verificou-se não haver diferença significativa para os níveis de TBARS nos tecidos muscular e hepático. Foi observada uma tendência de proteção contra a peroxidação lipídica no fígado dos animais tratados com disseleneto de difenila ($p = 0,06$). Já na atividade da CAT no tecido hepático não foram observadas alterações. Também na atividade da SOD não houve diferenças entre os tratamentos T1 e T2 (Tabela 2). O teste de frequência de MN indica que a concentração de 3,0 ppm de disseleneto de difenila não é tóxica para *Rhamdia quelen*, como demonstrado na Figura 1.

Tabela 2. Análises bioquímicas realizadas em tecidos muscular e hepático de *Rhamdia quelen*, sendo T1 - grupo controle (dieta livre de selênio) e T2 - grupo tratado (dieta suplementada com 3,0 ppm de disseleneto de difenila).

	TBARS		CAT	SOD
	Fígado	Músculo	Fígado	Fígado
T1	14,05 ± 3,58	1,68 ± 0,83	1,92 ± 0,71	19848,57 ± 1995,94
T2	5,08 ± 3,11	1,13 ± 0,72	1,96 ± 0,59	25916,92 ± 8806,09

Índices de TBARS foram calculados em nm de MDA por mg de proteína; SOD está representada em UI e CAT, em nm H₂O₂ por min.mg proteína.

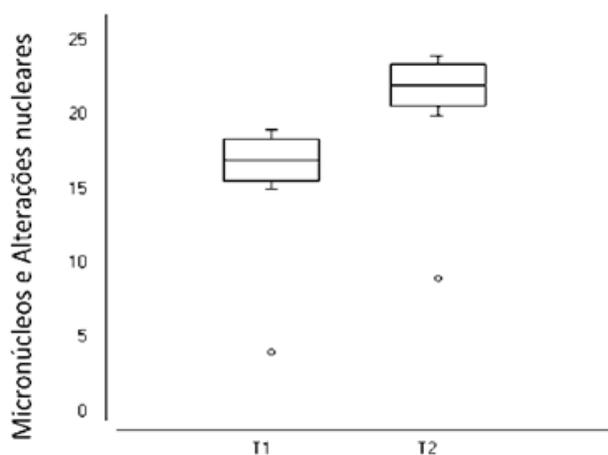


Figura 1. Resultados da análise de micronúcleos e alterações nucleares em alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dieta livre de selênio: T1 (grupo controle) e com dieta contendo 3,0 ppm de disseleneto de difenila: T2.

DISCUSSÃO

Micronutrientes como o selênio podem, muitas vezes, apresentar-se como antioxidantes ou pró-oxidantes. O que define na maioria das vezes sua ação é a concentração em conjunto com o tempo de tratamento dos animais. No estudo de MONTEIRO *et al.* (2007), os autores encontraram resposta negativa para a atividade da SOD no fígado e brânquias da espécie *Brycon cephalus* alimentada com dieta contendo doses de selênio de 0 e 1,5 mg Se kg⁻¹ por 60 dias. No presente estudo não foram observados resultados negativos, isto é, o selênio não se mostrou tóxico nem interferiu na atividade da SOD e da CAT.

A ausência de resposta das enzimas SOD e CAT pode estar relacionada com a toxicidade do selênio em uma suplementação durante grande espaço de tempo. A avaliação de toxicidade através do teste do Micronúcleo (MN) reafirma que, no presente estudo, a concentração de 3,0 ppm não ocasionou danos de toxicidade em *Rhamdia quelen*.

Igualmente, VIDAL *et al.* (2005) adicionaram 4,6; 12 e 18 ug g⁻¹ de selenometionina na dieta de truta durante 90 dias e não obtiveram resultados significativos para os níveis de TBARS no tecido hepático, mesmo havendo tendência a diminuição da peroxidação lipídica nas concentrações de 4,6 e 18 ug g⁻¹, resultados estes, semelhantes aos encontrados

no presente estudo, em que não foram registradas diferenças significativas, apesar da tendência à proteção contra os danos oxidativos no tecido hepático.

ATENCIO *et al.* (2009), avaliando a suplementação de selenito de sódio na dieta de tilápia, concluíram que a atividade protetora do selênio em tecido renal e hepático depende de sua dose e do biomarcador considerado, tendo em vista que com a dose mais baixa analisada no estudo (1,5 ug Se g⁻¹ dieta) foram obtidos resultados benéficos em relação à Catalase e que apenas na dosagem mais alta (6,0 ug Se g⁻¹ dieta) registraram-se bons resultados em relação a SOD e peroxidação lipídica. Tais observações demonstram que cada espécie pode responder de forma diferenciada à suplementação de selênio orgânico e inorgânico.

Do mesmo modo, SOARES *et al.* (2005) avaliaram a atividade específica da enzima δ-ALA-D e a toxicidade de diferentes formas de selênio: disseleneto de difenila, selenito de sódio e disseleneto de dibutila em ratos e peixes, sendo *Rhamdia quelen* a espécie de peixe avaliada. Os resultados encontrados corroboram a constatação de que a atividade enzimática varia consideravelmente, dependendo do tipo de tecido, forma de selênio avaliada e espécie considerada, o que permite concluir que não há uma concentração padrão para cada espécie e que os resultados podem diferir entre pró-oxidantes e antioxidantes, conforme a variável analisada.

Entretanto, estudos como o de MONTEIRO *et al.* (2009) asseguram o potencial antioxidante do selênio frente à exposição a organofosforados. A pesquisa de MONTEIRO *et al.* (2009) foi conduzida com animais da espécie *Brycon cephalus*, alimentados por oito semanas com dieta aditivada com 1,5 mg Se kg⁻¹ e, posteriormente, expostos ao pró-oxidante de *methyl parathion*. Os animais tratados com selênio mantiveram seus níveis de peroxidação lipídica e da atividade da glutathione peroxidase, enquanto os não alimentados com selênio não apresentaram esta proteção. Estes resultados podem indicar que o selênio age de forma preventiva, isto é, apresenta-se como protetor em relação às variáveis analisadas, a partir da exposição a um agente estressor.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo

demonstram que a suplementação da dieta de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) com disseleneto de difenila na concentração de 3,0 ppm não ocasionou danos aos animais, mantendo os parâmetros enzimáticos da Catalase e da SOD em níveis basais e com possível tendência à proteção hepática contra a peroxidação de lipídios.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. 1984 *Catalase in vitro. Methods in Enzymology*, 105: 121-126. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3. [on line] URL: <<http://www.sciencedirect.com/>>
- ATENCIO, L.; MORENO, I.; JOS, Á.; PRIETO, A. I.; MOYANO, R.; BLANCO, A.; CAMEÁN, A. M. 2009 Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Toxicon*, 53(2): 269-282.
- BOMBAIL, V.; GORDON, E.; BATTY, J. 2001 Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, 44(3): 383-392.
- BRADFORD, M.M.A. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- HAMILTON, S.J. 2004 Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of the Total Environment*, 326(1-3): 1-31.
- HEDDLE, J.A. 1973 A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*, 18(2): 187-190.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, L. 1972 The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10): 3170-3175.
- MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. 2007 Uso do selênio na dieta de matrinxã, *Brycon cephalus*. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 8(1): 32-47.
- MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. 2009 The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(1): 40-49.
- NAVARRO, R.D.; LANNA, E.A.T.; DONZELE, J.; MATTA, S.L.P.; SOUZA, M.A. 2007 Níveis de energia digestível da dieta sobre o desempenho de piaçu (*Leporinus macrocephalus*) em fase pós-larval. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 29(1): 109-114.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. 1979 Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2): 351-358.
- PEREIRA, T.S.; FABREGAT, T.E.H.P.; FERNANDES, J.B.K.; BOSCOLO, C. N.; CASTILLO, J.D.A.; KOBERSTEIN, T.C.R.D. 2009 Selênio orgânico na alimentação de matrizes de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 31(4): 433-437.
- PIEDRAS, S.R.N.; MORAE, P.R.R.; ISOLDI, L. A.; POUHEY, J.L.O.F.; RUTZ, F. 2005 Comparação entre o selênio orgânico e o inorgânico empregados na dieta de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Boletim do Instituto de Pesca*, 31(2): 171-174.
- SCHMID, W. 1975 The micronucleus test. *Mutation Research*, 31(1): 9-15.
- SOARES, A.F.; FARINA, M.; BÖETTCHE, A.C.; BRAGA, A.L.; BATISTA, T.R.J. 2005 Organic and inorganic forms of selenium inhibited differently fish (*Rhamdia quelen*) and rat (*Rattus norvegicus albinus*) δ -aminolevulinatase. *Environmental research*, 98(1): 46-54.
- VIDAL, D.; BAY, S.M.; SCHLENK, D. 2005 Effects of dietary selenomethionine on larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49(1): 71-75.