

Área: Sustentabilidade | Tema: Temas Emergentes em Sustentabilidade

EFEITO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Hesperozygis ringens* (BENTH.) EPLING SOBRE A ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE EM JUNDIÁS INFECTADOS POR *Aeromonas hydrophila*

EFFECT OF HEXANIC EXTRACT OF *Hesperozygis ringens* (BENTH.) EPLING ON GLUTATIONA S-TRANSFERASE ACTIVITY IN SILVER CATFISH INFECTED BY *Aeromonas hydrophila*

Isadora Aguirre Rosa, Adriane Erbice Bianchini, Karine Ariotti, Natacha Cossetin Mori e Berta Maria

Heinzmann

RESUMO

A espécie *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling (Lamiaceae) é nativa do Bioma Pampa, sendo de notória relevância para uso em aquicultura por suas propriedades larvicida, anestésica, antibacteriana e antiparasitária. Por esta razão, objetivou-se determinar a atividade da glutatona S-transferase (GST) no músculo de jundiás experimentalmente infectados por *Aeromonas hydrophila* e tratados com o extrato hexânico de *H. ringens* (EHHR). O EHHR foi obtido conforme descrito na literatura. Juvenis de jundiá foram aclimatados e divididos em oito grupos experimentais, que receberam injeção de solução salina (n= 36) ou suspensão de *A. hydrophila* (n= 36) e submetidos a quatro tratamentos: controle, EHHR 15 mg/L, EHHR 30 mg/L e florfenicol (FLOR) 4 mg/L. Após 7 dias, os peixes foram eutanasiados e amostras de tecido muscular foram coletadas (n= 9) para a determinação da atividade da GST. O EHHR obteve rendimento de $5,8 \pm 0,36\%$. Os grupos não infectados e tratados com FLOR e EHHR 30 demonstraram uma redução na atividade da GST ($12,8 \pm 1,84$; $7,98 \pm 1,1$, respectivamente), ao passo que o grupo não infectado e tratado com EHHR 15 ($20,41 \pm 2,14$) não diferiu estatisticamente em relação ao controle não infectado. O grupo infectado e tratado com EHHR 30 ($23,47 \pm 2,19$) não diferiu quando comparado ao controle não infectado, porém diferiu estatisticamente do controle infectado ($14,07 \pm 1,71$). Os demais grupos infectados e tratados com FLOR e EHHR 15 ($9,3 \pm 1,18$; $10,35 \pm 1,89$, respectivamente) apresentaram redução na atividade de GST em relação ao controle não infectado. O EHHR constitui uma fonte biodegradável com promissora atividade antioxidante in vivo.

Palavras-Chave: Antioxidante; Espanta-pulga; Lamiaceae; Enzima; *Rhamdia quelen*

ABSTRACT

The species *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling (Lamiaceae) is native to Pampa Biome and is notoriously relevant for use in aquaculture for its larvicidal, anesthetic, antibacterial and antiparasitic properties. For this reason, the objective of this study was to determine the activity of glutathione S-transferase (GST) in the muscle of silver catfish experimentally infected with *Aeromonas hydrophila* and treated with hexane extract of *H. ringens* (HEHR). HEHR was obtained as described in the literature. Silver catfish juveniles were acclimated and divided into eight experimental groups, which received saline injection (n= 36) or *A. hydrophila* suspension (n= 36) and underwent four treatments: control, HEHR 15 mg/L, HEHR 30 mg/L and florfenicol (FLOR) 4mg/L. After 7 days, the fish were euthanized and muscle tissue samples were collected (n= 9) to determine GST activity. HEHR yielded $5.8 \pm 0.36\%$. The uninfected and treated with FLOR and HEHR 30 groups showed a reduction in GST activity (12.8 ± 1.84 ; 7.98 ± 1.1 , respectively), whereas the uninfected group and treated with HEHR 15 (20.41 ± 2.14) did not differ statistically in relation to uninfected control. The infected group treated with HEHR 30 (23.47 ± 2.19) did not differ when compared to the uninfected control, but differed statistically from the infected control (14.07 ± 1.71). The other infected groups and treated with FLOR and HEHR 15 (9.3 ± 1.18 ; 10.35 ± 1.89 , respectively) showed a reduction in GST activity in relation to the uninfected control. HEHR is a biodegradable source with promising antioxidant activity in vivo.

Keywords: Antioxidant; Espanta-pulga; Lamiaceae; Enzyme; *Rhamdia quelen*

EFEITO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Hesperozygis ringens* (BENTH.) EPLING SOBRE A ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE EM JUNDIÁS INFECTADOS POR *Aeromonas hydrophila*

1 INTRODUÇÃO

Os radicais livres (RLs) são moléculas altamente reativas, que possuem na sua estrutura eletrônica um elétron desemparelhado (CUNHA et al., 2016). Tais moléculas são resultantes do metabolismo aeróbico e desempenham papéis cruciais em processos fisiológicos normais, como mensageiros secundários nas cascatas de sinalização intracelular, auxiliando o sistema imunológico na defesa contra agentes infecciosos, prevenindo doenças, na fagocitose e induzem a apoptose de células danificadas (VALKO et al., 2006). Contudo, quando os RLs estão presentes em quantidades elevadas dentro de uma célula, podem danificar macromoléculas, tais como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (VALKO et al., 2006; SEIFRIED et al., 2007).

Os antioxidantes, sejam naturais ou sintéticos, exercem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos RLs, uma vez que possuem elevada estabilidade oxidativa em função de sua estrutura molecular (FRANÇA et al., 2013). Os sistemas de defesa antioxidantes podem ser enzimáticos e não-enzimáticos, sendo que os enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona S-transferase (GST), enquanto que os não-enzimáticos podem ser origem endógena ou exógena (sintética ou natural), incluindo-se glutaciona, ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (precursor da vitamina E), compostos fenólicos, entre outros (VALKO et al., 2006; FRANÇA et al., 2013).

A utilização de extrativos vegetais, como óleos essenciais e extratos vegetais, vem se expandindo, especialmente visando o tratamento e prevenção de doenças, bem como promovendo o bem-estar animal, em virtude das vantagens apresentadas em relação aos produtos de origem sintética (SILVA et al., 2013; BANDEIRA JUNIOR et al., 2017). Os efeitos residuais de antimicrobianos sintéticos no músculo de peixes e camarões, assim como a presença destes compostos no ambiente aquático, favorecendo a indução de resistência bacteriana, são alguns dos principais efeitos secundários deletérios ocasionados pelo uso de substâncias sintéticas (CITARASU, 2010).

A espécie *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling (Lamiaceae), conhecida popularmente por “espanta-pulga”, é uma espécie arbustiva sul americana de ocorrência em campos que integram o bioma Pampa (PINHEIRO, 2014). O óleo essencial das folhas desta espécie vegetal é detentor de diversas propriedades farmacológicas aplicáveis no setor de piscicultura, tais como larvicida (SILVA et al., 2014), anestésica (SILVA et al., 2013), antibacteriana e antiparasitária (BANDEIRA JUNIOR et al., 2017). Recentemente evidenciou-se que o extrato hexânico das folhas de *H. ringens* (EHHR) possui potencial para o uso no tratamento de jundiás (*Rhamdia quelen*) experimentalmente infectados pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. Esse extrato foi capaz de promover uma taxa de sobrevivência relativa maior que o antimicrobiano de uso convencional, florfenicol (ROSA et al., 2019).

Neste sentido, é de notória relevância o estudo das propriedades do EHHR, bem como a elucidação dos efeitos do mesmo sobre o sistema fisiológico dos peixes. Por esta razão, buscou-se avaliar a atividade da GST no músculo de juvenis de jundiá experimentalmente infectados por *A. hydrophila* e tratados com o EHHR, visando encontrar uma alternativa de origem natural eficaz no controle de bacterioses e com potencial antioxidante, estimulando a redução do uso de antimicrobianos sintéticos de uso convencional.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *H. ringens*

Folhas de *H. ringens* foram coletadas no distrito de Santo Antônio em Santa Maria, RS, Brasil e a exsicata (HDCF 6720) foi depositada no Herbário do Departamento de Ciências Florestais da UFSM. Em virtude de tratar-se de uma espécie ameaçada de extinção, solicitou-se uma autorização prévia para a coleta do material vegetal pelo Sistema de Autorização e Informações em Biodiversidade (SISBIO, número 44197-2). Posterior à coleta, as folhas foram secas à temperatura ambiente, pulverizadas em moinho de facas e submetidas à extração utilizando hexano até a exaustão do material vegetal. O extrato foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida, mantido em dessecador até peso constante e, posteriormente, liofilizado para assegurar que a amostra estivesse completamente livre de solvente. O rendimento extrativo foi expresso em porcentagem, considerando o peso do material vegetal extraído (massa do extrato seco / massa do material vegetal seco %).

2.2 ENSAIO *IN VIVO*

Juvenis de jundiá ($8,24 \pm 0,28$ g; $11,25 \pm 0,25$ cm) foram adquiridos de uma piscicultura local e transferidos ao Laboratório de Fisiologia dos Peixes (LAFIPE), onde foram mantidos aclimatados em tanques sob condições controladas de temperatura, oxigênio, pH e amônia. Após aclimação, os animais receberam injeção de solução salina (n= 36) ou suspensão de *A. hydrophila* MF 372510 (*optical density*, OD = 0,3; 600 nm) (n= 36), foram transferidos para caixas plásticas contendo 15 L e, após 5h, submetidos a quatro tratamentos: controle, EHHR 15 mg/L, EHHR 30 mg/L e florfenicol (FLOR) 4 mg/L. As concentrações utilizadas neste experimento estão em conformidade com o previamente descrito por Rosa e colaboradores (2019). A partir do segundo dia após injeção de patógeno e solução salina, 20% da água das caixas foi renovada. Diariamente, os animais eram alimentados com ração comercial até a saciedade. Após o período experimental de 7 dias, os animais foram eutanasiados por secção medular e amostras de tecido muscular foram coletadas (n= 9) e armazenadas em freezer a -80°C até a análise da atividade da GST. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – UFSM sob protocolo 074/2014.

2.3 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A atividade da GST foi avaliada com base na reação de conjugação com glutatona reduzida (GSH), utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato (HABIG et al., 1974). Alíquotas de amostra (0,05 mL) foram adicionadas a 0,6 mL da mistura de ensaio contendo 100 mmol/L de tampão fosfato (pH 6,5), GSH e CDNB a uma concentração final de 1 mmol/L. A atividade da GST foi calculada a partir das mudanças na absorbância em 340 nm e foi expressa como pmol/min/mg de proteína. A concentração de proteína no músculo foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

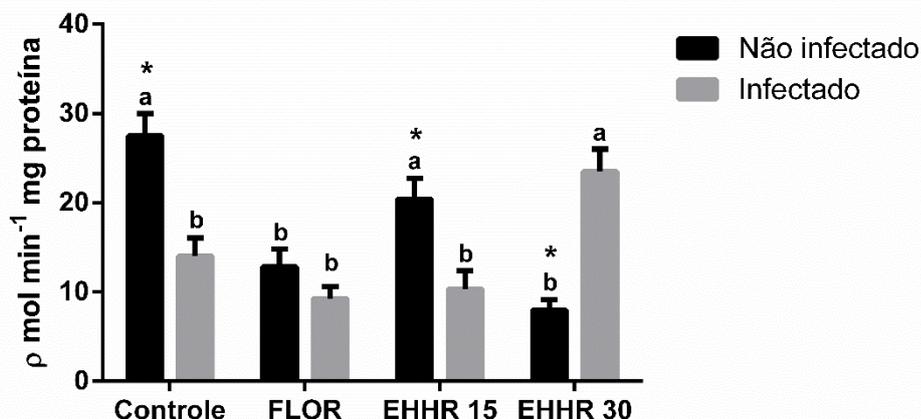
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos em média \pm erro padrão. Os dados foram submetidos aos testes de homogeneidade das variâncias e normalidade anteriormente à análise estatística. Para análise de variância utilizou-se ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. O nível mínimo de significância foi estabelecido em 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

O rendimento extrativo do EHHR foi de $5,8 \pm 0,36 \%$. No presente estudo, verificou-se que a infecção por *A. hydrophila* reduziu a atividade da GST no músculo dos jundiás, uma vez que o controle infectado ($14,07 \pm 1,71$) diferiu significativamente dos animais que receberam apenas injeção contendo solução salina ($27,53 \pm 2,28$) (Figura 1). Os grupos não infectados e tratados com FLOR e EHHR 30 demonstraram uma redução na atividade da GST ($12,8 \pm 1,84$; $7,98 \pm 1,1$, respectivamente), ao passo que o grupo não infectado e tratado com EHHR 15 ($20,41 \pm 2,14$) não diferiu estatisticamente em relação ao controle não infectado. Referente aos grupos infectados, apenas o grupo tratado com EHHR 30 ($23,47 \pm 2,19$) não demonstrou diferença estatística quando comparado ao grupo controle não infectado, ao mesmo tempo em que foi o único tratamento na presença de infecção que diferiu estatisticamente do grupo controle infectado. Os demais grupos infectados e tratados com FLOR e EHHR 15 ($9,3 \pm 1,18$; $10,35 \pm 1,89$, respectivamente) apresentaram uma menor atividade de GST em relação ao grupo controle não infectado.

Figura 1 – Atividade da glutatona S-transferase (GST) no músculo de juvenis de jundiás experimentalmente infectados por *Aeromonas hydrophila* e tratados com o extrato hexânico de *Hesperozygis ringens* (EHHR) nas concentrações de 15 e 30 mg/L. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os diferentes tratamentos. (*) indicam diferença estatística dentro de um mesmo tratamento. ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).



No que concerne ao processo de detoxificação, a atividade da GST no músculo de jundiás infectados e tratados com EHHR 30, que se manteve em níveis basais, é de suma importância, uma vez que esta enzima representa uma relevante linha de defesa em peixes. Mais especificamente, a GST é uma enzima antioxidante que protege as células dos efeitos deletérios dos produtos tóxicos resultantes da peroxidação lipídica (REN et al., 2017). O estímulo da atividade desta enzima na presença de infecção e exposição ao EHHR 30, na forma de banho terapêutico único, pode estar atuando diretamente em favor da atenuação de fatores de virulência, como enzimas extracelulares, expressados pela bactéria *A. hydrophila*, que podem estar sofrendo ação da GST através de reações de conjugação, contribuindo para a eliminação do patógeno e a sobrevivência dos animais infectados (REN et al., 2017; ROSA et al., 2019). É importante salientar, ainda, que o antimicrobiano de uso convencional, florfenicol, reduziu a atividade da GST quando na presença de infecção, ao passo que o EHHR 30 foi capaz de aumentar significativamente a atividade da GST quando comparado ao florfenicol. No entanto, os efeitos *per se* verificados para o FLOR e EHHR 30 permitem

inferir que a aplicação dos mesmos na ausência de infecção não é indicada, uma vez que reduziu significativamente a atividade desta enzima.

4 CONCLUSÃO

O EHHR 30 demonstrou ser eficaz como antioxidante, uma vez que a atividade da GST, no músculo de jundiás infectados por *A. hydrophila*, manteve-se em níveis basais, considerados adequados quando comparados ao grupo controle não infectado. Tal fato permite inferir que a atividade da GST pode estar favorecendo o aumento da sobrevivência dos jundiás, comprovada previamente. Este extrato proporcionou, ainda, uma maior atividade do que a induzida pelo florfenicol na presença de infecção, reforçando o potencial deste extrativo vegetal. Portanto, o EHHR 30 constitui uma fonte biodegradável com promissora atividade antioxidante para o uso no tratamento de infecções bacterianas em aquicultura orgânica, além de caracterizar uma alternativa de menor impacto ao meio ambiente que deve ter seu cultivo estimulado, visando à perpetuação desta espécie ameaçada de extinção e com diferentes propriedades farmacológicas.

REFERÊNCIAS

BANDEIRA JUNIOR, G., PÊS, T. S.; SACCOL, E. M. H.; SUTILI, F. J.; ROSSI, W.; MURARI, A. L.; HEINZMANN, B. M.; PAVANATO, M. A.; VARGAS, A. C.; SILVA, L. L.; BALDISSEROTTO, B. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 484-491, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016308706>.

Acesso em: 13 jan. 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.12.040.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>. Acesso em: 06 ago. 2019. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

CITARASU, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry.

Aquaculture International, v. 18, p. 403-414, 2010. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-009-9253-7>. Acesso em: 18 jun. 2019. DOI: 10.1007/s10499-009-9253-7.

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; SANTOS, A. F. Fundamentos químicos da ação dos radicais no organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 1, p. 8-18, 2016. Disponível em: http://periodicos.ifal.edu.br/diversitas_journal/article/view/450. Acesso em: 15 jun. 2019. DOI: 10.17648/diversitas-journal-v1i1.450.

FRANÇA, B. K.; ALVES, M. R. M.; SOUTO, F. M. S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R. F.; GUIMARÃES, A.; ALVES JR, A. Peroxidação lipídica e obesidade: métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0872817813000507>. Acesso em: 21 jun. 2018. DOI: 10.1016/j.jpg.2013.04.002.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4436300>. Acesso em: 12 mar. 2019.

PINHEIRO, C. G. **Óleo essencial de *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: variabilidade do rendimento, composição química e atividades biológicas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

REN, X.; WANG, Z.; GAO, B.; LIU, P.; LI, J. Toxic responses of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) larvae exposed to environmentally realistic concentrations of oxytetracycline. **Chemosphere**, v. 173, n. , p. 563-571, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28152408>. Acesso em: 26 ago. 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.078.

ROSA, I. A.; RODRIGUES, P.; BIANCHINI, A. E.; SILVEIRA, B. P.; FERRARI, F. T.; BANDEIRA JUNIOR, G.; VARGAS, A. P. C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M. Extracts of *Hesperozygisingens* (Benth.) Epling: *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1353-1361, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30735293>. Acesso em: 10 abr. 2019. DOI: 10.1111/jam.14219.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 567-579, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360173>. Acesso em: 21 mar. 2019. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2006.10.007.

SILVA, D. T.; SILVA, L. L.; AMARAL, L. P.; PINHEIRO, C. G.; PIRES, M. M.; SCHINDLER, B.; GARLET, Q. I.; BENOVI, S. C.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S. J.; KOTZIAN, C. B.; HEINZMANN, B. M. Larvicidal activity of Brazilian plant essential oils against Coenagrionidae larvae. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 4, p. 1713-1720, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25195467>. Acesso em: 06 jun. 2018. DOI: 10.1603/EC13361.

SILVA, L. L.; SILVA, D. T.; GARLET, Q. I.; CUNHA, M. A.; MALLMANN, C. A.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S. J.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN, B. M. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252013000200443. Acesso em: 06 jun. 2018. DOI: 10.1590/S1679-62252013000200014.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279705004333>. Acesso em: 21 mar. 2019. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.