



# AÇÃO DA *LIPPIA ALBA* SOBRE AS BRÂNQUIAS DE JUNDIÁ (*RHAMDDIA QUELEN*)

Mattiazzi, J.

Azambuja, C. R.; Riffel, A.P.K; Finamor, I.A.; Saccol, E.M.H.; Garcia, L.O.; Heldwein, C.G.; Llesuy, S. F.; Baldisserotto, B.; Pavanato, M. A.

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, 1000/ Prédio 21, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brasil, CEP 97.105 - 900. e - mail: jovimattiazzi@gmail.com

## INTRODUÇÃO

O jundiá, *Rhamdia quelen*, Heptapteridae, é de grande importância econômica no Rio Grande do Sul. É uma espécie nativa bem adaptada, muito utilizada em viveiros de piscicultura por ser um peixe bastante consumido pela população. Pode ser encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México (Gomes *et al.*, 2000). A espécie habita águas calmas com fundo de areia e lama, junto às margens de lagos e rios. Possui hábitos noturnos escondendo - se durante o dia entre pedras e troncos, saindo à noite para alimentar - se. Os adultos possuem uma variada alimentação que inclui peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos, sendo onívoros. As larvas alimentam - se de zooplâncton (Baldisserotto, 2004).

As principais estruturas do sistema respiratório dos peixes, as brânquias, são responsáveis pelas trocas gasosas, ou seja, absorvem o O<sub>2</sub> da água, difundindo - o para o sistema circulatório e liberam CO<sub>2</sub> resultante do metabolismo. Elas estão em contato direto com a água e são os primeiros órgãos afetados pelas variações de concentração de oxigênio dissolvido. Essa concentração de oxigênio dissolvido na água depende da temperatura, pressão atmosférica e concentração de vários íons. Oscilações de concentração de oxigênio podem provocar alterações no ambiente, como hipóxia (baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água) ou hiperóxia (altas concentrações de oxigênio dissolvido na água) causando algumas conseqüências graves como, por exemplo, a morte de peixes e de outros organismos aquáticos (Lucas, A. F. B., *et al.*, 1988). Existem alguns peixes que toleram a variação dos níveis de oxigênio na água, como os ciprinículas, que podem sobreviver a partir da completa anoxia até hiperóxia (Love, 1980; van den Thillart e van Waarde, 1985; Lushchak *et al.*, , 2001; Lushchak e Bagnyukova, 2006).

Os organismos que utilizam oxigênio na respiração estão sujeitos a inúmeros danos causados pela formação das espécies ativas de oxigênio (EAO), levando ao estresse oxidativo que, no sistema biológico, está associado ao aumento na veloci-

dade da geração de espécies oxidantes e/ou à diminuição na atividade dos sistemas de defesa, resultando em aumento sustentado das concentrações em estado estacionário de espécies ativas de oxigênio (González - Flecha *et al.*, , 1991). Os radicais livres estão envolvidos com condições patológicas em animais. Eles reagem com macromoléculas orgânicas prejudicando todo o metabolismo animal. Dentre as reações geradas por estes compostos estão: inativação enzimática, peroxidação lipídica, danos ao DNA e até morte celular (Cazenave *et al.*, , 2006).

Na piscicultura condições de hiperóxia são comuns na natureza e no manejo (a supersaturação é utilizada no transporte de peixes). Os dados sobre os efeitos das condições hiperóxicas em danos oxidativos aos tecidos, bem como a utilização de substâncias antioxidantes são limitados.

## OBJETIVOS

Considerando que a *Lippia alba* pertencente à família Verbenaceae, tem sido utilizada em inúmeros trabalhos em diferentes modelos experimentais, onde se demonstrou atividade antibacteriana, antiviral, neurosedativa, antiinflamatória, analgésica, cardiovascular e antioxidante (Bailleul *et al.*, 008), o objetivo deste trabalho foi determinar os níveis de lipoperoxidação nas brânquias dos jundiás submetidos a diferentes concentrações de oxigênio e ao óleo essencial de *Lippia alba*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 - Protocolo experimental

Foram utilizados juvenis de jundiá ( $64,7 \pm 5,9$  g e  $18,9 \pm 0,6$  cm) coletados em viveiros de alevinagem de pisciculturas da região de Santa Maria, sul do Brasil. Os juvenis foram transportados para o Laboratório de Fisiologia de Peixes da Universidade Federal de Santa Maria, onde permaneceram por uma semana, para aclimação, em caixas de 250

litros (volume utilizado de 200 litros de água), continuamente aerados (bombas de 20 Watts / caixa) e temperatura mantida em torno de 23<sup>o</sup> C, através de ar condicionado. Para cada série de experimentos foram utilizados diferentes exemplares.

A alimentação dos juvenis ocorreu sempre no mesmo horário (13hs) e a quantidade de ração oferecida aos juvenis foi de 5% da sua biomassa / dia, durante o período de aclimação. Trinta minutos após a alimentação eram retiradas as fezes e os restos de ração por sifonagem. A retirada de água, durante o processo de sifonagem, foi de aproximadamente 15% do total das caixas e a mesma quantidade era repostada nas mesmas condições da que estava nas caixas antes da alimentação.

Depois de estabelecida a concentração de *Lippia alba* (10 µL/L) para o experimento, os animais foram divididos em 3 grupos de 10 juvenis cada, e colocados em sacos plásticos de 5 L, contendo 2 L de água e diferentes concentrações de oxigênio: grupo 1, normóxia (7,35 ± 0,35 mg/L O<sub>2</sub>) ; grupo 2, hiperóxia (13,25 ± 0,35 mg/L O<sub>2</sub>) ; grupo 3, hiperóxia+*Lippia alba* ( 9,92 ± 0,18 mg/L O<sub>2</sub> ), sendo então transportados por um período de 7 horas.

O experimento foi realizado pelo período de 7 horas, em sacos plásticos com capacidade para 5 L, contendo 2 L de água, densidade de carga de 140 à 200 g/L e oxigênio. O estágio de hiperóxia foi induzido através do borbulhamento de oxigênio no saco plástico. Antes e após o experimento foram coletadas amostras de água de cada saco plástico para determinação dos parâmetros de qualidade de água.

### 3.2 - Preparação de Homogeneizado Fresco

Os tecidos foram pesados e homogeneizados em um tampão fosfato de sódio 0,3 M (KCl 140mM, pH 7,4) com o aparelho Ultra - Turrax™ durante 60 segundos, à temperatura de 0 à 4<sup>o</sup> C. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada por 10 minutos à 3000 rpm (1100 x g) (BUEGE e AUST, 1978). O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante retirado e congelado em freezer para posteriores dosagens.

### 3.3 - Determinação de Proteína

As proteínas dos tecidos foram quantificadas pelo método de LOWRY *et al.*, (1951), utilizando como padrão, albumina bovina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro à 625 nm.

### 3.4 - Determinação dos Produtos que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico

A determinação dos produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi obtida segundo o método de WILLS (1987). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em nmoles/mg de proteína.

### 3.5 - Análise estatística

A partir dos dados coletados, as médias e erros padrões das médias de cada grupo foram calculadas, utilizando para análise estatística o software GraphPad Instat™, versão 3.0 para Windows 95 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) de um fator (*Lippia alba*) seguida do teste de Tukey. A homogeneidade das variâncias dos diferentes grupos foi verificada com

teste de Levene. O nível mínimo de significância (a) adotado foi de 95% (P < 0,05).

## RESULTADOS

Uma adequada concentração de oxigênio no meio ambiente é vital para a sobrevivência e crescimento dos peixes, condições extremas de concentração de oxigênio na água, hipóxia e hiperóxia podem provocar mudanças nos lipídios, proteínas e DNA (Liepelt *et al.*, 1995).

No presente estudo foram detectadas concentrações de TBARS de 5,33 ± 0,44 nmol.mg<sup>-1</sup> (p < 0,05) nas brânquias no grupo normóxico (grupo1) sem o óleo essencial de *L. alba*, enquanto que o grupo hiperóxico (grupo 2) apresentou 7,26 ± 0,70 nmol.mg<sup>-1</sup> (p < 0,05). Este resultado sugere que houve dano oxidativo a nível lipídico no grupo 2. Já no grupo 3 (hiperóxia+*L. alba*) os níveis de TBARS nas brânquias foram de 5,10 ± 0,26 nmol.mg<sup>-1</sup> (p < 0,05), semelhante ao grupo normoxia.

Os danos sofridos pelo grupo hiperóxico ocorreram provavelmente devido a alta concentração de oxigênio a que os peixes deste grupo foram submetidos, pois essa condição promove um aumento na formação de espécies ativas de oxigênio, que causam a lipoperoxidação. Sob condições de anóxia/hipóxia, os organismos não parecem sofrer tanto estresse oxidativo, pois ocorre uma redução no metabolismo oxidativo. A situação é alterada durante a reoxigenação, quando o consumo de oxigênio é superior a exposição normóxico (Virani e Rees, 2000). O grupo 3 apresentou níveis de lipoperoxidação semelhante ao grupo normóxico, resultado este que sugere que a *L. alba* teve um efeito protetor e antioxidante. Futuras análises de enzimas antioxidantes por este grupo neste modelo, deverão comprovar este achado.

## CONCLUSÃO

Os resultados encontrados indicam que o óleo essencial de *L. alba* pode ter atuado como antioxidante nas brânquias dos peixes submetidos a hiperóxia, pois houve significativa redução nos produtos de TBARS nas brânquias dos animais deste grupo.

(Apoio Financeiro: FIPE - UFSM)

## REFERÊNCIAS

- Baldisserotto, B., Radünz Neto, J. *Criação do jundiá*. UFSM, Santa Maria, RS, 2004, 232p.
- Barroso, G.M. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. vol III., UFV, Viçosa, MG, Brasil, 1991, 255p.
- Cazenave, J., Bistoni, M.L.A., Pesce, S.F., Wunderlin, D.A. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin - RR. *Aquat. Toxicol.*, 76: 1 - 12. 2006.
- Gomes, L.C., Golombieski, J., Chippari - Gomes, A.R., Baldisserotto, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural*, 30: 179-185. 2000.

- Gonzalez - Flecha, B.; Llesuy, S.; Boveris, A. Hydroperoxide - initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad. Med.*, 10: 93 - 100, 1991.
- Halliwell B.; Gutteridge, J.M.C. *En Free Radicals In: Biology and Medicine*. 3 ed., Oxford University Press, 1999.
- Liepelt, A.; Karbe, L.; Westendorf, J. Induction of DNA strand breaks in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under hypoxic and hyperoxic conditions. *Aquat. Toxicol.*, 33:177 - 181, 1995.
- Love, M.R., 1980. *The Chemical Biology of Fishes*, vol. II. Academic Press, London.
- Lucas, A. F. B., Nascimento, V. M., Colares de Melo, J. S., *Variação nictimeral e sazonal de temperatura e oxigênio dissolvido em viveiro e tanques do CEPTA*. Boletim técnico do CEPTA 1, Pirassununga, SP, Brasil, 1988, p.37 - 45.
- Lushchak, V. I., Lushchak, L. P., Mota, A. A., Hermes - Lima, M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.*, 280: 100-107, 2001.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues: 1. Indices of oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 143: 30-35, 2006.
- Rao, G.P. Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf of *Lippia alba* (Mill). *Indian Jour. Of Chem Techn.* 6: 332 - 335, 2000.
- Stashenko, E.E.; Jaramillo, B.E.; Martinez, J.R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grow in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J Chromatogr A*. 1025: 93 - 103, 2004.
- van den Thillart, G., van Waarde, A. Teleosts in hypoxia: aspects of anaerobic metabolism. *Mol. Physiol.* 8: 393-409, 1985.
- Virani, N. A., Rees, B. B. Oxygen consumption, blood lactate and interindividual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 126: 397-405, 2000.