



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

Jeffesson de Oliveira Lima

**Ação do extrato alcoólico de *Baccharis dracunculifolia*
(Asteraceae) em órgãos de *Prochilodus lineatus* (curimatá).**



Rio Claro - SP
2018

Jeffesson de Oliveira Lima

**Ação do extrato alcoólico de *Baccharis dracunculifolia*
(Asteraceae) em órgãos de *Prochilodus lineatus* (curimbatá).**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

ORIENTADOR: Prof. Dr. Flavio Henrique Caetano

COORIENTADOR: Prof. Dr. Bruno Fiorelini Pereira

Rio Claro - SP
2018

L732a

Lima, Jeffesson de Oliveira

Ação do extrato alcoólico de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) em órgãos de *Prochilodus lineatus* (curimatá) / Jeffesson de Oliveira
Lima. -- Rio Claro, 2018

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Flavio Henrique Caetano

Coorientador: Bruno Fiorelini Pereira

1. Asteraceae. 2. Teleósteo. 3. Fígado. 4. Brânquias. 5. Intestino. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Ação do extrato alcoólico de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) em órgãos de *Prochilodus lineatus* (curimatã).

AUTOR: JEFFESSON DE OLIVEIRA LIMA
ORIENTADOR: FLAVIO HENRIQUE CAETANO
COORIENTADOR: BRUNO FIORELINI PEREIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. BRUNO FIORELINI PEREIRA
x / Universidade Federal do Oeste da Bahia

Prof. Dr. WAGNER DOS SANTOS MARIANO
Colegiado de Biologia / Universidade Federal do Tocantins
Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 03 de dezembro de 2018

Dedico este trabalho a minha família pelo amor e dedicação e ensinamentos.

O que um peixe sabe sobre a água da qual nadou a vida inteira?

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS:

Agradeço primeiramente a Deus por ser minha inspiração e nunca me abandonar mesmo nos momentos difíceis da minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Ao meu orientador professor Dr. Flavio Henrique Caetano, por me conceder a oportunidade de realizar uma Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular). Obrigado pelos ensinamentos e pelo otimismo para encarar as dificuldades encontradas durante esta pesquisa. E sobretudo, pela amizade, por ser um exemplo de pessoa e também pesquisador. Ao meu co-orientador Bruno Pereira Fiorelini, pela amizade e todos os ensinamentos e contribuição na pesquisa.

Aos professores e doutores da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, pelos conhecimentos transmitidos que contribuíram para a minha formação acadêmica. Em especial a Prof.^a Dr.^a Maria Izabel “Bell”, Prof. Dr Diogo Cabral, Prof.^a Dr.^a Patrícia Maltempo e Prof.^a Dr.^a Patrícia Ucelli, “não existe palavras para descrevê-la” um exemplo de profissional e pessoa, espero um dia ser igual você.

Aos meus amigos e professores da Universidade Federal do Tocantins - UFT, em especial a Jayne Barros de Aguiar Silva “feia e mamãe favorita” Patrícia Carneiro da Silva e Vânia da Silva Gomes. A Prof.^a Dr.^a Vivian Eliana Sandoval Gómez, Prof. Dr Wagner dos Santos, Prof. Dr Sandro Estevan Moron e Prof.^a Dr.^a Tatiane Marinho Vieira Tavares.

Aos meus dois grandes amigos e irmãos: Gleno Pereira Marques e Eduardo Libanio Reis Santos.

Ao meu grande amigo e segundo pai, Luís Fernando Sodelli e a sua família, Adriana Sodelli, Laís Sodelli e Matheus Sodelli. Ao Gerson Mello de Souza, Marcelo João da Silva, Cristiane Mileo, Juan dos Santos Parente, Thiago Gazoni, José Ribamar Lima, Michelen Schiavolin, Diogo Milani, Octavio Palácios, Paulo Silveira e Joyce Faria, pessoas extremamente maravilhosas as quais jamais esquecerei. Obrigado por integrarem minha segunda família em Rio Claro - SP.

A toda a minha família, meus pais: Gildeth Lima e Geovani de Oliveira e a Tia Gilvânia Lima. Em especial aos meus avós, João Lima e Antônia Lima por me mostrar que a educação é o único bem que pode se dar a um filho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram ou torceram pela concretização desta pesquisa.

Obrigado!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1. <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Asteraceae).....	10
1.2. Biologia de <i>Prochilodus lineatus</i> (Prochilodontidae).....	12
1.3. Órgãos alvos em peixes.....	13
1.3.1. Brânquias.....	13
1.3.2. Fígado.....	14
1.3.3. Lipofuscina.....	14
1.3.4. Intestino.....	16
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo geral.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. METODOLOGIA GERAL	17
4.1. Material.....	17
4.2. Métodos.....	19
4.2.1. Obtenção do extrato alcoólico total.....	19
4.2.2. Amostragem e tratamentos.....	20
4.2.3. Protocolo para processamento.....	21
ARTIGO 1	23
ARTIGO 2	40
ARTIGO 3	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
7. ANEXOS	
7.1. Comitê de Ética no Uso Animal.....	67
7.2. Análise química da água.....	68
7.3. Protocolo das técnicas.....	71

RESUMO

A *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim do campo, merece destaque por apresentar promissor potencial terapêutico. Os extratos de folhas desta planta são utilizados para tratar distúrbios do fígado e digestivo, dentre outros. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos do extrato alcoólico de *B. dracunculifolia* em órgãos de peixes. Dos 60 indivíduos (*Prochilodus lineatus*), 32 foram utilizados em dois grupos experimentais em duplicatas Controle (ração sem aditivo-alecrim) e Grupo alecrim (ração com aditivo-alecrim). Após o tratamento (21 dias) realizou-se 2 coletas com 14 e 21 dias. As alterações histológicas e histoquímicas foram avaliadas pelo Valor Médio de Alteração (VMA), Índice de Alteração Histológica (IAH) e software ImageJ®. IAH e o VMA mostraram que o extrato causa danos leves no fígado e brânquias, entretanto significativos somente no fígado. A análise histoquímica nas brânquias e rastros branquiais demonstraram o aumento de diferentes tipos de muco substâncias produzidas pelas células mucosas. As análises de muco e histomorfométrica do estômago e da porção mediana do intestino posterior demonstraram um aumento na altura, altura total e largura das vilosidades da porção mediana do intestino posterior e altura total e espessura da camada muscular do estômago. Os resultados evidenciam que a ingestão do extrato da *B. dracunculifolia* pode promover alterações significativas nas brânquias, fígado, intestino e estômago da espécie estudada.

Palavra chaves: Asteraceae; teleósteo; fígado; brânquias; intestino; histologia; histoquímica.

ABSTRACT

Baccharis dracunculifolia, popularly known as field rosemary, deserves to be highlighted because it presents promising therapeutic potential. The leaf extracts of this plant are used to treat liver and digestive disorders, among others. This study aimed to evaluate the toxic effects of alcoholic extract of *B. dracunculifolia* on fish organs. Of the 60 individuals (*Prochilodus lineatus*), 32 were used in two experimental groups in duplicates Control (ration without additive-rosemary) and Group rosemary (ration with additive-rosemary). After the treatment (21 days) 2 collections were performed with 14 and 21 days. Histological and histochemical changes were evaluated by the Mean Value of Alteration (MVA), Histological Alteration Index (HAI) and ImageJ® software. HAI and MVA have shown that the extract causes mild damage to the liver and gills, however significant only in the liver. Histochemical analysis in the gills and gill tracts demonstrated the increase of different types of mucus substances by mucosal cells. The analysis of mucus and histomorphometric of the stomach and the medial portion of the posterior intestine demonstrated an increase in height, total height and width of the villi of the mid portion of the posterior intestine and total height and thickness of the muscular layer of the stomach. The results evidenced that the ingestion of the extract of *B. dracunculifolia* can promote significant alterations in the gills, liver, intestine and stomach of the studied species.

Key words: Asteraceae; teleost; liver; gills; intestine; histology; histochemistry.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae)

A família Asteraceae compreende espécies arbóreas, arbustivas, herbáceas e lianas que estão amplamente distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, particularmente na América do Sul. Expressiva em número de espécies, Asteraceae é a maior família dentre as Angiospermas, constituída por cerca de 1.540 gêneros e 23.000 espécies. Em sua quase totalidade, os gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, as quais são encontradas em todos os tipos de habitats, principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (CANCELLI et al., 2007).

O gênero *Baccharis* está representado por mais de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas (FERRONATTO et al., 2006), e a alta concentração de espécies no Brasil e nos Andes o que indica que uma dessas áreas é o provável centro de origem desse gênero (VERDI et al., 2005).

Em geral são consumidas especialmente na forma de chás com indicações para males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes, doenças na próstata, sendo também descritas para o processo de desintoxicação do organismo (TREVISAN et al., 2007). Uma visão mais detalhada cita que no Brasil e Argentina, por exemplo, a *B. crispa* e a *B. notoserghila* são usadas para curar feridas e inflamações. Em relação à *B. genistelloides*, no Brasil, cita-se seu uso para o tratamento de variadas patologias, sintomas e sinais, tais como desordens digestivas e do fígado, malária, úlceras, diabetes, anemia, diarreia, inflamações urinárias, amigdalite, verminoses, mal de Hansen, entre outras (VERDI et al., 2005).

A espécie *B. dracunculifolia* (Figura 1), é amplamente utilizada na medicina caseira. Estudos na literatura relatam o uso medicinal e religioso do “alecrim-do-campo” comercializado em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, (AZEVEDO & SILVA, 2006), assim como a utilização das folhas para feridas (FENNER et al., 2006) e o uso dos ramos, em decocto, como antifebril (RODRIGUES & CARVALHO, 2001).

É uma planta dióica com as inflorescências masculinas e femininas, cujo arbusto cresce em quase todo o Brasil, é a principal fonte botânica da própolis no sudeste do Brasil. Com relação à própolis brasileira, a mais popular e bem estudada é chamada própolis verde, que tem origem da *B. dracunculifolia*, amplamente distribuída nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil (PARK et al., 2002; SALATINO et al., 2005).

Dentre os principais metabólitos secundários já identificados na espécie, podem destacar-se terpenoides, flavonoides e compostos fenólicos prenilados derivados de ácido

cumárico (VERDI et al., 2005). O extrato de *B. dracunculifolia* mostrou a presença de germacreno-D, biciclogermacreno, assim como derivados prenilados do ácido cumarínico. Germacreno-D e o biciclogermacreno (14%) estão entre os principais compostos do óleo essencial de *B. dracunculifolia* em conjunto com o delta-cadineno (13%) e germacrona (5%) (LOAYZA, 1995).



Figura 1. *B. dracunculifolia*. Fonte elaborada pelo autor.

O óleo essencial da *B. dracunculifolia* é composto principalmente por mono e sesquiterpeno dentre eles destacam-se como componente majoritário o nerolidol, que também apresentou resultados satisfatórios, frente a vários modelos de úlceras induzidas em ratos, corroborando assim na indicação do óleo essencial de *B. dracunculifolia* frente a processos de úlceras estomacais (KLOPELL et al., 2007; QUEIROGA et al., 1990). Parreira et al., 2010 identificaram 14 compostos oxigenados do óleo essencial de *B. dracunculifolia*, sendo os principais o nerolidol (33,51%) e espatulenol (16,24%).

Na literatura também podem ser encontrados estudos que têm demonstrado que o óleo essencial dessa planta possui atividade antiulcerogênica (MASSIGNANI et al., 2009), antimicrobiana, (FERRONATTO et al., 2007), além de propriedades analgésica, antiespasmódica, calmante, sedativa, citostática (LORENZI & MATOS, 2002), antifúngica, antibacteriana e inseticida, (CARRERA, 2007; GELINSKI et al., 2007), sendo objeto de numerosos estudos entomológicos devido à riqueza de insetos herbívoros e galhadores, destacando-se, principalmente, por sua relação peculiar com as abelhas (*Apis mellifera* L.)

(BASTOS, 2001).

1.2 Biologia de *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae).

As espécies da família Prochilodontidae possuem como características comuns corpo de porte médio a grande, iliofagia (alimenta-se de detritos nos fundos lamacentos), reofílicas (dependem da correnteza do ambiente natural fluvial) e capacidade migratória durante o período de piracema (SILVA, 2006).

O gênero *Prochilodus* destaca-se por sua ampla distribuição na região neotropical e possui 13 espécies descritas até o momento. Quanto à morfologia, os representantes desse gênero possuem lábios grossos, móveis e providos de dentículos (MAGALHÃES, 1931), escamas ctenóides (CASTRO, 1990), formando o anel etário durante a época de desova (GODOY, 1975).

Espécies de *Prochilodus* são conhecidas no Brasil pelos nomes populares de curimatá, curimba, curimatã, curimatã-pioa, curimatã-pacu, papa-terra e corimatá (SILVA, 2006). A espécie *P. lineatus*, encontra-se amplamente distribuída em toda a bacia dos rios Paraná-Paraguai e no Rio Paraíba do Sul (na costa sudeste do Brasil). Entre as características diagnósticas de *P. lineatus* estão: nadadeira caudal sem manchas negras, presença de linha lateral completa com 44 a 50 escamas e presença de 42 a 44 vértebras (CASTRO, 1990). Segundo a classificação de Valenciennes (1836), a espécie ocupa a seguinte classificação sistemática:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Divisão: Teleostei

Superordem: Acanthopterygii

Ordem: Characiformes

Subordem: Characoidei

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus lineatus*

É uma espécie economicamente importante, principalmente como fonte de subsistência de populações ribeirinhas como a pesca comercial (CAZENAVE et al., 2009) e tem sido reproduzida em larga escala em pisciculturas, pois suas larvas servem de alimentos a espécies carnívoras como o dourado (*Salminus maxillosus*) (ÓRFÃO, 2006). Devido a sua importância

econômica, por ter sua biologia bem conhecida e ser sensível a poluentes, esta espécie é apropriada para testes de toxicidade (MADUENHO et al., 2008).

1.3 Órgãos alvos em peixes

1.3.1 Brânquias

As brânquias são órgãos multifuncionais que estão diretamente envolvidos nas trocas gasosas (O_2/CO_2), regulação iônica e osmótica, no equilíbrio ácido-base, na excreção de produtos nitrogenados e metabolismo de xenobióticos (FERNANDES; MORON, 2014). Na maioria dos peixes teleósteos as brânquias são constituídas por quatro arcos branquiais em cada lado da faringe, de onde estendem-se duas fileiras de filamentos branquiais ou lamelas primárias, e acima e abaixo destes filamentos, regularmente distribuídas, elevam-se as lamelas secundárias que são sítios de trocas gasosas (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

O epitélio branquial é constituído por diferentes tipos celulares: as células pavimentosas, as células ricas em mitocôndrias, as células mucosas, células indiferenciadas e células neuroepiteliais, sendo que o epitélio do filamento é estratificado, formado principalmente por células pavimentosas e células indiferenciadas (EVANS et al., 2005). As lamelas secundárias são constituídas basicamente pelas células pavimentosas apoiadas na membrana basal e pelas células pilares cujas projeções da membrana celular em contato com os prolongamentos das células pilares adjacentes formam espaços por onde circula o sangue (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; FERNANDES; MAZON, 2003).

O fato desse órgão funcionar como uma barreira entre o meio externo e interno faz com que a morfologia branquial passe por constantes modificações durante a adaptação do peixe às alterações ambientais, logo, as brânquias atuam como órgão alvo para os contaminantes, por estarem em contato permanente com o ambiente aquático e apresentarem uma extensa área superficial (FLORES-LOPES; THOMAZ, 2011). O grau de alteração em órgãos como as brânquias estão relacionados a diferentes contaminantes, suas concentrações e rotas de incorporação (ARELLANO et al., 2001) e por este motivo as alterações histopatológicas são amplamente utilizadas como biomarcadores ambientais em peixes, tanto em estudos de laboratório quanto *in situ* (PAULINO, 2011; REDDY & RAWAT, 2013).

Em estudos de toxicidade as alterações morfológicas comumente observadas são: edemas, hiperplasia epitelial das lamelas secundárias, infiltração de células epiteliais, fusão lamelar, proliferação e hipersecreção de células mucosas e de células ricas em mitocôndria (LEONARDO et al., 2001; MACHADO, 1999; MALLATT, 1985; TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

1.3.2 Fígado

Em geral, o fígado dos teleósteos não apresenta hepatócitos arranjados em cordões como nos mamíferos, mas dispostos em placas circundadas por capilares sinusóides e canaliculos biliares (VICENTINI et al., 2005), ausência de lóbulos e espaços portais clássicos (FLORES - LOPES & MALABARBA, 2007). Esse órgão é composto por 12 a 15% de sangue, porém apesar de haver uma grande quantidade de sangue no fígado, a taxa de fluxo através do tecido dos peixes é pequena em comparação com mamíferos.

Nos peixes, os nutrientes, drogas e xenobióticos absorvidos são direcionados para o fígado por meio do sangue venoso que vem do intestino (HEATH, 1995). Por ser o principal órgão responsável pelo processo de desintoxicação de xenobióticos, o fígado está sujeito a alterações, uma vez que este normalmente acumula concentrações mais elevadas de substâncias tóxicas (MADUENHO & MARTINEZ, 2008).

De forma geral, os hepatócitos realizam a metabolização de substâncias endógenas e exógenas, produção de bile, que posteriormente é direcionada para a vesícula biliar, produção de proteínas essenciais do plasma e fatores de coagulação e armazenamento de substâncias como aminoácidos, lipídios, glicogênio e ferro (MENKE et al., 2011).

Além disso, outro importante papel do fígado é que ele serve como indicador do estado nutricional e fisiológico dos peixes (BOMBONATO et al., 2007). Na presença de poluentes o fígado pode desenvolver alterações histológicas nos hepatócitos que podem ser usadas para o monitoramento de efeitos de contaminantes.

Segundo Maduenho et al., (2007) peixes da espécie *P. lineatus* quando expostos à substâncias tóxicas, apresentaram uma série de alterações histológicas no fígado como: aumento do volume nuclear e celular, degeneração citoplasmática, degeneração nuclear, vacuolização nuclear e estagnação biliar. Simonato et al., (2006), sugere que peixes expostos a poluentes como petróleo, por exemplo, podem apresentar modificações como hipertrofia do núcleo, núcleo em posição lateral, vacuolização do citoplasma, degeneração do citoplasma, entre outras. Estudos evidenciaram alterações teciduais em fígado de *Oreochromis niloticus*, *P. mesopotamicus* e *C. macropomum*, que incluem: congestão, necrose de hepatócitos, necrose do tecido pancreático, esteatose, infiltrado inflamatório mononuclear no hepatopâncreas, hepatócitos contendo bilirrubina, hialinização, hemorragia e pigmentos (SANTOS, 2009).

1.3.3 Lipofuscina

Os grânulos de lipofuscina foram observados pela primeira vez em 1842 juntamente com possibilidade de uma relação entre o seu acúmulo e o envelhecimento, e desde então,

numerosos estudos foram realizados em busca de compreender os mecanismos responsáveis pela formação destes grânulos a fim de esclarecer seu papel no processo de senescência (ARKING, 2008).

A lipofuscina, é um produto da peroxidação lipídica e uma evidência de lesão oxidativa. Ela é o resultante da glicosilação não-enzimática-celular e por degradação incompleta de mitocôndrias danificadas, que não podem ser degradados pelas hidrolases lisossomais nem ser exocitadas. Acumulando-se ao longo do tempo nas células pós-mitóticas, estes resíduos não são degradados durante a divisão celular e podem resultar no aparecimento de doenças (SILVA & SILVA, 2005; SCBUTT et al., 2003; KISHI et al., 2008).

Segundo Radu et al., (2005), um dos principais componentes da lipofuscina é a bisretinoide N-retinolidina-retinoletanolamina (A2E), que confere à lipofuscina sua autofluorescência. As propriedades biológicas da A2E têm sido extensivamente estudadas, demonstrando possuir várias propriedades citotóxicas, como por exemplo, a inibição das funções degradativas dos lisossomos, a indução de apoptose e pode agir como um detergente catiônico, dissolvendo as membranas celulares.

O principal gene relacionado à formação da lipofuscina é o gene ABCA4, cuja baixa expressão gera o acúmulo deste pigmento, o que pode ocorrer não só com o envelhecimento, mas também com o estresse oxidativo. Em peixes, a proteína que exerce esta função é CH211-195I6.3 expressa pelo gene 555506 (RADU et al. 2005). Segundo Arking (2008), a lipofuscina não parece ser muito reativa quimicamente e provavelmente não interfere no funcionamento adequado da célula no nível químico; entretanto, a obstrução mecânica e/ou a interferência com outros processos celulares é certamente uma possibilidade.

Grande parte dos poluentes despejados em ambientes aquáticos são comprovadamente formadores de radicais livres nas células. Estes radicais são geralmente combatidos e eliminados por elementos antioxidantes produzidos pela própria célula. De acordo com Cajaraville et al., (2003) diversos estudos confirmam que peixes e moluscos são sensíveis a contaminantes, como relatado por Valim (2016), que observa o aumento de lipofuscina em fígado de *P. lineatus* expostos ao LAS. Pereira (2014), também evidencia um aumento de lipofuscina em brânquias e fígado da mesma espécie quando exposta a ambientes poluídos. Estudos realizados por Au et al. (2004), demonstraram que a exposição de peixes ao benzopireno eleva a concentração de lipofuscina nos hepatócitos.

Vaschenco et al., (2011) demonstraram que moluscos quando expostos a poluentes e ambientes anóxicos, ocorre uma variação no acúmulo de lipofuscina. De acordo com Banni et al. (2009), em moluscos a lipofuscina acumula-se com a idade, mas este processo pode ser

acelerado, quando em contato com poluentes.

De acordo com Au et al., (2004) a reversibilidade do acúmulo de lipopigmentos, ainda não está bem compreendida e comprovada, entretanto estudos recentes demonstraram que em peixes até 45% do quadro de acúmulo de lipopigmentos pode ser revertido devido a recuperação da estabilidade lisossomal, sendo que quanto mais poluída a área, mais eficiente é a regeneração tecidual.

1.3.4 Intestino

Os peixes apresentam variações na estrutura básica do tubo digestório, as quais estão geralmente relacionadas ao hábito alimentar, tipo de alimento ingerido, idade, comprimento, peso do corpo e ao ambiente, que podem influenciar na presença, posição, formato e tamanho de um órgão em particular. Entretanto, diferenças morfológicas ocorrem mesmo em espécies com hábitos alimentares semelhantes (MURRAY et al., 1994; BALDISSEROTTO, 2009; MORAES & ALMEIDA, 2014).

Vários autores dividem o aparelho digestório dos peixes em: intestino cefálico (cavidade bucofaringeana), intestino anterior (esôfago e estômago), intestino médio (intestino propriamente dito) e intestino posterior (reto ou valva ileorretal) (RODRIGUES & MENIN, 2008; RODRIGUES et al., 2008). O pâncreas, vesícula biliar e fígado são órgãos acessórios ao tubo digestório (RUST, 2002).

No intestino, encontram-se as vilosidades ou vilos intestinais, que são evaginações da mucosa intestinal compostas pelo epitélio e lâmina própria, que se projetam na luz do intestino aumentando significativamente a área de superfície intestinal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). São constituídos pelos enterócitos, células caliciformes, e células enteroendócrinas (BOLELI et al., 2002). A maioria dos peixes não apresenta criptas como nos vertebrados e a proliferação celular do epitélio das vilosidades ocorre pela multiplicação mitótica de células indiferenciadas na base das vilosidades (JOBBLING, 1995).

O conhecimento da mucosa intestinal dos peixes é importante para fornecer informações aos estudos de nutrição pelo fato das vilosidades intestinais estarem relacionadas com a capacidade de absorção de nutrientes pelo animal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2012; CECHIM, 2013). De maneira geral, o número de enterócitos presentes nas vilosidades, a densidade das vilosidades, o tamanho das vilosidades, assim como a manutenção destas através da renovação celular do epitélio intestinal, também influenciam diretamente na digestão, absorção de nutrientes e conseqüentemente no ganho de peso dos animais (BOLELI et al. 2002).

2. JUSTIFICATIVA

A utilização de medicamentos naturais sem respaldo médico pela população tem impulsionado diversas pesquisas com plantas medicinais, dentre as quais destaca-se o alecrim do campo (*B. dracunculifolia*). Na medicina popular, ele é utilizado contra males do fígado, rins, intestino e processos de desintoxicação, além do que estudos já têm demonstrado potencial terapêutico em várias atividades, inclusive associadas a mecanismos cicatrizantes. Devido a esta aplicação na medicina popular e à falta de pesquisa que aponte seus efeitos tóxicos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos do extrato da *B. dracunculifolia*, nas brânquias, fígado, intestino e estômago cárdico de peixes *P. lineatus*.

A escolha da espécie *P. lineatus* (Curimatá) foi devido a sua importância econômica para a piscicultura brasileira e, sobretudo, por possuir uma biologia bem conhecida, apresentando alta suscetibilidade a poluentes e, portanto, sendo apropriada para testes de toxicidade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar os efeitos tóxicos do extrato alcoólico de *B. dracunculifolia*, utilizando órgãos de peixes.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar a morfologia hepática, branquial e intestinal após exposição ao extrato vegetal;
- Analisar as muco substâncias nas brânquias, intestino e estômago cárdico;
- Quantificar a área ocupada pelos pigmentos de lipofuscina hepática;
- Avaliar os níveis de glicogênio hepático;
- Avaliar níveis de proteínas totais no intestino e estômago cárdico.

4. METODOLOGIA GERAL

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) campus de Rio Claro, SP, Brasil.

4.1. Material

Foram obtidos 60 espécimes de *P. lineatus* (Figura 2), com cerca de 6 a 8 cm de comprimento, na Piscicultura Polletini do município de Mogi Mirim – SP, Brasil. Em laboratório, os animais foram previamente aclimatados em tanques de polietileno (500 litros)

com aeração constante e oferta de ração comercial apropriada para a espécie (35% de proteína bruta) uma vez ao dia. Durante um período de 14 dias, os animais ficaram em observação para determinar possíveis doenças ou danos físicos e recuperação ao estresse da captura e transporte.



Figura 2. Espécime juvenil de *P. lineatus*. Fonte: Elaborada pelo autor.

Os tanques de polietileno tinham capacidade de 500 litros cada (Figura 3), todos estavam equipados com filtro ultravioleta (UV) para prevenir eventuais contaminações, filtro convencional, aquecedores para manter a temperatura e fundo composto de areia para adequar ao ambiente, visto que os peixes são de fundo e raspadores. As caixas foram aeradas constantemente por bombas de água individuais localizadas em caixas de polietileno com 150 litros de capacidade.



Figura 3. Tanques de polietileno abertos e com fundo de areia. Filtro UV (círculo), filtro convencional (seta) e aquecedor (seta). Fonte: elaborada pelo autor.

Após período de aclimatação, os animais foram transferidos para aquários de vidro individualizados com capacidade para de 70 litros, estes também foram equipados com filtros convencionais, bombas para aeração, cooling e aquecedores, todos com a mesma capacidade e mesmo fabricante. Os aquários foram revestidos com material isolante de radiação UV, para evitar exposição dos peixes ao ambiente externo e estresse e não tiveram o fundo arenoso para que não houvesse interferência nas medidas de taxa alimentar (Figura 4).



Figura 4. Aquário revestido com material isolante de radiação, aquecedor e cooling. Fonte: elaborada pelo autor.

Para o processamento do material e para as análises histoquímicas e histológicas, foram utilizadas as instalações do Laboratório de Histologia, do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, SP. Microscópio de luz Leica DM 2000 provido de câmera DFC280 para captura de imagens e também microscópio de fluorescência Olympus – BX5.

4.2.Métodos

4.2.1. Obtenção do extrato alcoólico total

As folhas *B. dracunculifolia* foram coletadas em Rio Claro – SP, 22°22'30.0"S 47°28'31.5"W e transferidas para o Laboratório de Histologia da UNESP. Estas ficaram em ambiente escuro até que estivessem totalmente secas. Para extração dos componentes das folhas, foi utilizado o protocolo da ANVISA - (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para

Preparação de Tinturas-mãe a partir de plantas secas por maceração. Destas, foram separadas 33,3 gramas de folhas secas que foram colocadas para maceração em 333,3 mL de álcool de cereal a 30%, por 8 dias, e posteriormente filtrados em papel de filtro e armazenados em vidro âmbar para proteção da luz. O outro lote seguiu o mesmo processo, porém ficou em álcool de cereal a 70%. A etapa seguinte consistiu na retirada do material retido no papel filtro resultante da maceração em álcool a 30% e foi colocado em um vidro contendo o líquido do macerado em álcool 70% por mais 9 dias, enquanto que o material retido no papel de filtro resultante da maceração em álcool 70% foi colocado em um vidro contendo o líquido do macerado em 30% por mais 9 dias. Ao fim deste processo obteve-se todos os compostos presentes das folhas, aqueles solúveis em álcool 70% e os solúveis em álcool 30%. Assim totalizando 666,6 mL de extrato total. A água utilizada na preparação do álcool 70% e 30%, foi comercial mineral produzida no estado de São Paulo – Brasil, com a seguinte *COMPOSIÇÃO QUÍMICA* (mg/L): Bário 0,059; Estrôncio 0,038; Cálcio 5,600; Magnésio 2,950; Potássio 2,800; Sódio 4,090; Fosfato 0,45; Sulfato 0,38; Bicarbonato 38,00; Fluoreto 0,19; Nitrato 3,86; Cloreto 0,90; Brometo 0,01. Características *FÍSICO-QUÍMICAS*: pH 6,49; temperatura da água na fonte 23,5 °C; Condutividade elétrica a 25°C 73,6 uS/cm; Resíduo de evaporação a 180°C, calculado 94,01 mg/L; Gás Sulfídrico na fonte 0,015 mg/L. Após a obtenção do extrato, 1,5 mL foram adicionados em 1,2 g de ração e colocados em estufa a 37°C, para que o álcool fosse evaporado restando somente o princípio ativo na ração, e assim evitando possíveis danos aos órgãos dos peixes pelo álcool, após a evaporação, as porções de ração foram guardadas em vidro âmbar, até sua utilização no experimento.

4.2.2. Amostragem e tratamentos

Foram utilizados 32 animais distribuídos em dois grupos experimentais em duplicatas (Controle e Grupo alecrim), que foram distribuídos aleatoriamente em 4 aquários estocados com 70 litros de água, tendo sido cada um deles equipado com bomba para aeração, cooling, termostato (para manter a temperatura constante) e coberto com material isolante de radiação UV para reduzir o estresse. Ambos os grupos foram alimentados com ração durante o período de 21 dias, diferindo somente no tratamento com a ração, Controle (ração sem aditivo-alecrim) e Grupo alecrim (ração com aditivo-alecrim), após o tratamento, realizou-se 2 coletas com 14 e 21 dias. A cada tempo 6 animais por tratamento foram coletados e anestesiados em solução de benzocaína (0.1 g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico, para cada 100 mL de água deionizada) e eutanasiados conforme aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Unesp, Rio Claro, processo nº 10/2017. Os animais mantiveram-se em um sistema de

condução semi-estático. A cada coleta averiguou-se os parâmetros físico-químicas da água (pH, amônia, dureza e temperatura).

Alguns componentes da água podem afetar a morfologia celular e outros parâmetros biológicos. Para avaliação de toxicidade foram realizadas análises das águas, segundo as normas do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, no Laboratório de Análise de Águas do Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas da UNESP de Rio Claro – SP. Com isto foi possível identificar quais compostos químicos estavam presentes na água utilizada e, através da comparação com trabalhos realizados na área, identificar quais alterações seriam geradas pelos contaminantes previamente estudados ou pela interação com outros elementos eventualmente presentes na água. A determinação de metais se deu por ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry - Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente*) para os seguintes elementos: Mg, Ca, Sr, Ba, Cr(t), Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Si, P(t) e Pb. Os ânions F-, Cl-, NO₂, NO₃, PO₄, SO₄, ClO₂-, acetato e oxalato, e os cátions Li, Na, NH₄ e K, foram determinados por cromatografia iônica. Por fim, foram realizadas as análises de pH, condutividade, alcalinidade total e carbonatos por titulação potenciométrica.

4.2.3. Protocolo para processamento:

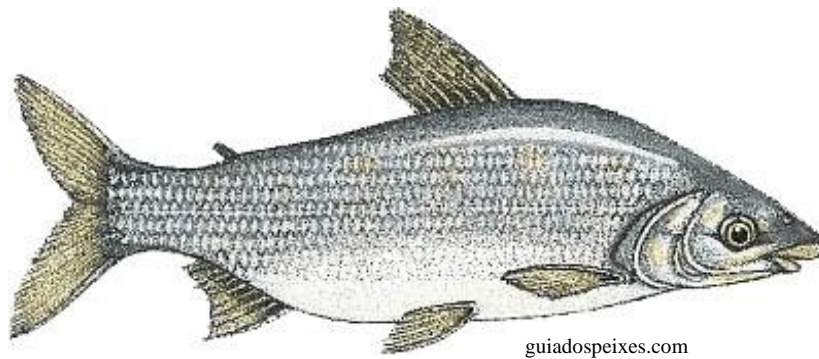
Para as análises, fragmentos das brânquias, fígado, intestino e estômago foram fixados em formalina 10%. O material foi desidratado em soluções de álcool 70%, 80%, 90% e 95% durante 40 minutos cada banho. Posteriormente, o material foi transferido para uma solução de resina de embebição Leica®, por 24 horas e mantido em geladeira. O material foi então colocado em moldes preenchidos com resina contendo catalisador. Após o endurecimento da resina, o material foi seccionado com auxílio do micrótomo Leica RM2245; as secções foram hidratadas e recolhidas em lâminas e consecutivamente coradas em hematoxilina e eosina (HE), azul de toluidina (AT), ácido periódico e Schiff (PAS), picrosirius red (PR), xylydine Ponceau (XP), Von Kossa (VK) e Gomori. Para então serem montadas em Entellan, observadas, analisadas e fotografadas com auxílio de microscópio de luz Leica DM 2000 com câmera Leica DFC280 acoplada.

Para a análise da lipofuscina, fragmentos do fígado foram fixados em formalina 10%, segundo Junqueira & Junqueira (1983) e seguiram os mesmos passos de desidratação, embebição, montagem dos blocos e cortes da mesma forma descrita acima. Entretanto, depois de secas, as lâminas foram montadas em Entellan sem coloração, pois segundo Peixoto et al., (2002) a lipofuscina possui propriedade de autofluorescência, razão pela qual secções sem

coloração foram analisadas sob microscópio de fluorescência Olympus – BX51 e fotografadas no software DP – *Controller*, sob o filtro de luz de 450 – 490 nm, segundo Peixoto et al., (2002). As metodologias específicas para cada órgão estão descritas nos artigos correspondentes. O protocolo das técnicas já referidas está descrito em anexos.

ARTIGO 1

Effects of ingested *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extract in the liver of *Prochilodus lineatus* fish



guiadospeixes.com

CURIMBATÁ (*Prochilodus lineatus*)

Effects of ingested *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extract in the liver of *Prochilodus lineatus* fish

Jeffesson de Oliveira-Lima^{a*}, Bruno Fiorelini Pereira^b, João Rodolfo Tuckumantel Valim, Thiago Gazoni^a, Dimitrius Leonardo Pitol^c, Flavio Henrique Caetano^a.

^a São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP Campus Rio Claro, Sao Paulo, Brazil;

^b Federal University of Western Bahia – UFOB Campus Barreiras, Bahia, Brazil;

^c University of Sao Paulo – USP Campus Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil.

Abstract

Baccharis dracunculifolia, popularly known in Brazil as "alecrim-do-campo", is widely recognized for its therapeutic potential. The extract of its leaves is used for liver problems, stomach disorders and others. The objective of the present study was to perform a histochemical analysis of curimbata fish livers to evaluate the potential effects and risks of the ingestion of *B. dracunculifolia*. Thirty-two animals were divided into two experimental groups in duplicate: Control group (regular food) and *B. dracunculifolia* Treated group (food added with *B. dracunculifolia*). The fishes were collected on the 14th and 21st days after the treatment period of 21 days. The histological alterations were evaluated using the semiquantitative methods Mean Value of Alterations (MVA), Histopathological Alteration Index (HAI) and ImageJ®. HAI and MAV showed that the extract caused slight but statistically significant damages, widely distributed throughout the organ. The results showed significant hepatic alterations caused by the ingestion of *B. dracunculifolia* extract.

Key words: *Baccharis dracunculifolia*, hepatotoxicity, lipofuscin, macrophages, *Prochilodus lineatus*.

1. Introduction

Asteraceae is one of the largest *angiosperm families*, with more than 1535 genera, 23000 species and 17 tribes distributed throughout the world. Among them, the genus *Baccharis* comprises about 500 known species (Abreu and Onofre, 2010) distributed throughout the Americas, from Southern United States to Southern Argentina, and Brazil, with the greatest number of species – approximately 120 (Barroso, 1976).

The species *Baccharis dracunculifolia* (popularly known in Brazil as "alecrim-do-campo") has been intensively studied due to its therapeutic uses and potentialities. It has been used by the pharmaceutical industry in the production of green propolis – produced by *Apis mellifera L.* bees - (Park et al., 2004; Alencar et al., 2005), and in food industry, as a functional food product (Ackermann, 1991). *B. dracunculifolia* and *B. trimera* have been widely used in popular medicine to treat stomach, liver and kidneys dysfunction, diabetes, prostate conditions, inflammations and detoxifications in general (Verdi et al., 2005).

Studies have demonstrated that the essential oil of *B. dracunculifolia* is mainly constituted of mono and sesquiterpene, such as nerolidol (33.51%) and spathulenol (16.24%) (Parreira et al., 2010). Nerolidol has presented satisfactory results in several treatment models analyzing rats with induced ulcer, which confirms the indication of *B. dracunculifolia* essential oil to control the disease (Klopell et al., 2007). The main secondary metabolites identified in this species are the terpenoids, flavonoids and prenylated phenolic compounds derived from coumaric acid (Verdi et al., 2005).

Studies have demonstrated that the essential oil of *B. dracunculifolia* has antiulcerogenic (Massignani et al., 2009), antimicrobial (Feronatto et al., 2007), analgesic, antispasmodic, sedative, cytostatic (Lorenzi and Matos, 2002) properties. Moreover, according to Caetano (2012), the species *B. dracunculifolia* has anti-inflammatory, anti-protozoal, anthelmintic, antioxidant, anticancer, anticariogenic, cytotoxic, mutagenic (in high concentrations) and cicatrizing potential.

Most medicinal plants have not had their toxic and mutagenic potentials thoroughly investigated (Costa et al., 2008; Grance et al., 2008; Horn and Vargas, 2008); however, it is known that *Baccharis* plants present high toxicity levels (Varaschin and Alessi, 2003; Monks et al., 2008). Therefore, this study performed the histochemistry of the livers of fish treated with *B. dracunculifolia* to evaluate the possible risks of the ingestion of this medicinal plant.

2. Material and Methods

2.1. Specimens

The *Prochilodus lineatus* juveniles used in this experiment (60.7 ± 1.3 g and 8.0 ± 1.5 cm) were purchased from Piscicultura Poletini, Mogi Mirim - SP, Brazil and transported to the Histology Laboratory of UNESP, Campus Rio Claro, Sao Paulo, Brazil. The animals were previously climatized in polyethylene boxes (**500 liters**) with constant aeration and fed with appropriate commercial food (325 g of crude protein) once a day.

2.2. *B. dracunculifolia* leaves

The *B. dracunculifolia* leaves used in this experiment were collected in Rio Claro – SP, Brazil (22°22'30.0"S 47°28'31.5" W) and, after identification, exsiccates of the vegetal material were deposited and registered in the herbarium "Herbário Rioclarense", Botany Department, UNESP, Campus Rio Claro (number 58140).

2.3. Ethanolic extract preparation

The leaf compound extraction followed the protocol established by ANVISA - (Brazilian Health Surveillance Agency) for the *Preparation mother tinctures from dry plants through maceration*. The leaves were macerated with grain alcohol, 30% and 70% for nine days. The product of the 30% maceration was mixed to the 70% and vice-versa. After nine days, all the leaf compounds were obtained, those soluble in alcohol 70% and 30%. For each treatment group, 1.5 mL (amount ingested in treatment in folk medicine) of the extract was added to 1.2 g of commercial food (http://www.poytara.com.br/tropicais_diaadia.html). The material was kept in microbiological incubator at 37 °C for alcohol evaporation and stored in amber jars.

2.4. Control and treatment groups

Sixty individuals were used, from which 32 were divided into two experimental groups in duplicate: Control group (Ctrl) and *B. dracunculifolia* Treated group (BdT). The animals were randomly distributed into four 70-liter tanks (8 animals each) with air pumps, cooling, thermostat (to maintain constant temperature) and covered with UV blocking material to reduce stress. Both groups were fed for a maximum of 21 days: Control group with regular commercial food and *B. dracunculifolia* Treated group with the food added with *B. dracunculifolia* extract. The animals were collected 14 and 21 days after the experiment (21-day feeding period), 6 individuals per treatment were collected and anesthetized with benzocaine solution (0.1 g of benzocaine in 1 mL of ethanol for each 100 mL of deionized water) and euthanized according to the procedures established by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) – UNESP, Rio

Claro, process 10/2017. The fish were kept in semi-static system (every day about 20% of the water was renewed) and the water physical and chemical parameters (pH, ammonia, hardness and temperature) were measured at each collection.

2.5. Histological processing

Fragments of the liver were fixed in formalin 10%, transferred to sodium phosphate pH = 7.4, dehydrated in crescent ethanol series, included in Leica histo-resin and sectioned (6 μ m thickness) using microtome Leica RM2245. The sections were subjected to specific reactions and mounted on slides. For lipofuscin, the slides were mounted using Entellan, without the need of specific reactions, once lipofuscin is fluorescent (Peixoto et al., 2002). The material was analyzed using fluorescence microscope Olympus – BX51 and photographed using software DP – Controller, light filter 450 – 490 nm.

2.6. Hepatic morphology analysis

The morphological alterations were evaluated through semi-quantitative methods: Mean Value of Alterations (MVA) and Histopathological Alteration Index (HAI). The MVA was calculated based on the incidence of lesions, according to Schwaiger et al. (1997) where a numeric value is attributed to each animal according to the scale: 1 (absence of histopathological alterations), 2 (localized lesions), and 3 (widely distributed lesions) and the HAI was based on the severity of each lesion. (Poleksic and Mitrovic- Tutundžic, 1994).

2.7. Hepatic collagen quantification

For collagen quantification, six liver sections of each individual were analyzed after Picrosirius red reaction, according to Pearse (1985). The collagen was isolated using software ImageJ® version 1.51p and the collagen total area was quantified.

2.8. Glycogen and bile stagnation quantification

For the glycogen and bile stagnation quantification, six sections of each individual were analyzed following PAS reaction, according to the protocol established by Paulete & Beçak (1976). Ten fields from each section were photographed, five for bile stagnation and five for glycogen. Glycogen was semi-quantitatively evaluated and bile stagnation was analyzed using software ImageJ®. The total bile stagnation area was quantified according to Campos et al. (2017).

2.9. Lipofuscin quantification

To analyze the amount of lipofuscin in the tissues, ten photographs of six liver fragments of each individual were taken, according to Pereira et al. (2014). The images were analyzed using program ImageJ®, the lipofuscin granules were isolated and the total area was quantified.

2.10. Total proteins and macrophages

Total proteins detection was performed using six sections of each animal, which were subjected to Xylidine Ponceau reaction according to Melo and Vidal, (1980). Macrophages detection was carried out subjecting the same number of sections to Gomori reaction (Gomori, 1949). Total proteins were analyzed using semi-quantitative method, and macrophages were quantified using the software ImageJ® following Pereira et al. (2014).

2.11. Statistical analysis

The data obtained through the analyses were submitted to Shapiro-Wilk to verify normality and to ANOVA/Tukey test to obtain parametric results. The groups that did not satisfy normality assumptions were submitted to Kruskal-Wallis/Dunn, with significance level $p < 0.05$. Statistic test were performed using software Bioestat 5.0® and GraphPad Prism 5.0®.

3. Results

3.1. Hepatic morphology

The water parameters remained within the acceptable levels described by Pereira et al. (2014). The liver of the specimens presented the following alterations: cytoplasmic vacuolation, nuclear hypertrophy, sinusoid capillary dilatation and congestion, and the relative frequency in which they occurred are displayed in Table 1. The most frequent alterations are displayed in Figure 3.

Table 1 – Frequency of histological alterations in the livers of *P. lineatus*. 0 = no alterations 0+ = rare alterations + = frequent ++ = very frequent +++ = extremely frequent.

Liver	Stage	Ctrl 14 d	Ctrl 21 d	BdT 14 d	BdT 21 d
Cytoplasmic vacuolation	I	+	+	+	+
Nuclear hypertrophy	I	0+	0+	0+	0+
Sinusoidal capillary dilatation	I	0+	0+	+	++
Glycogen	I	+	+	+	+
Total proteins	I	+	+	++	++
Congestion	II	0+	0+	+	++

Ctrl – Control group BdT – *B. dracunculifolia* Treated group

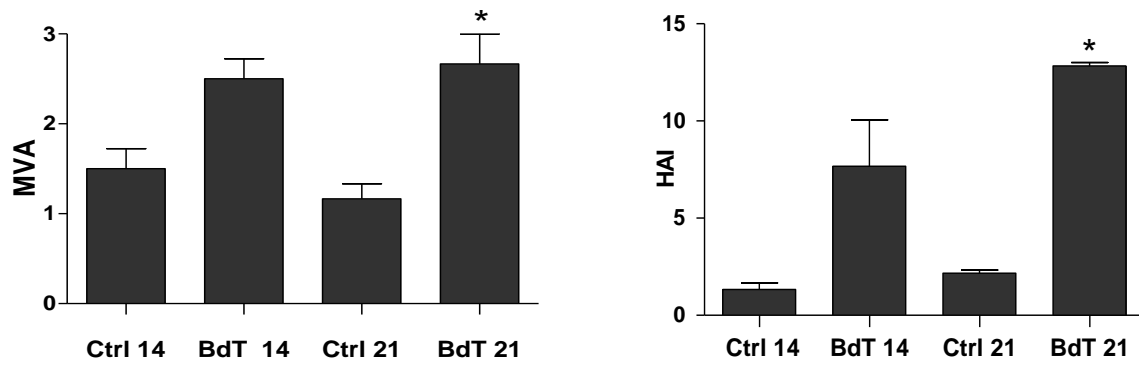


Figure 2 – Mean MAV and HAI values of *P. lineatus* liver. Data expressed in mean \pm standard error. Significant difference at $p < 0.05$. (*) significant difference in comparison with the control group.

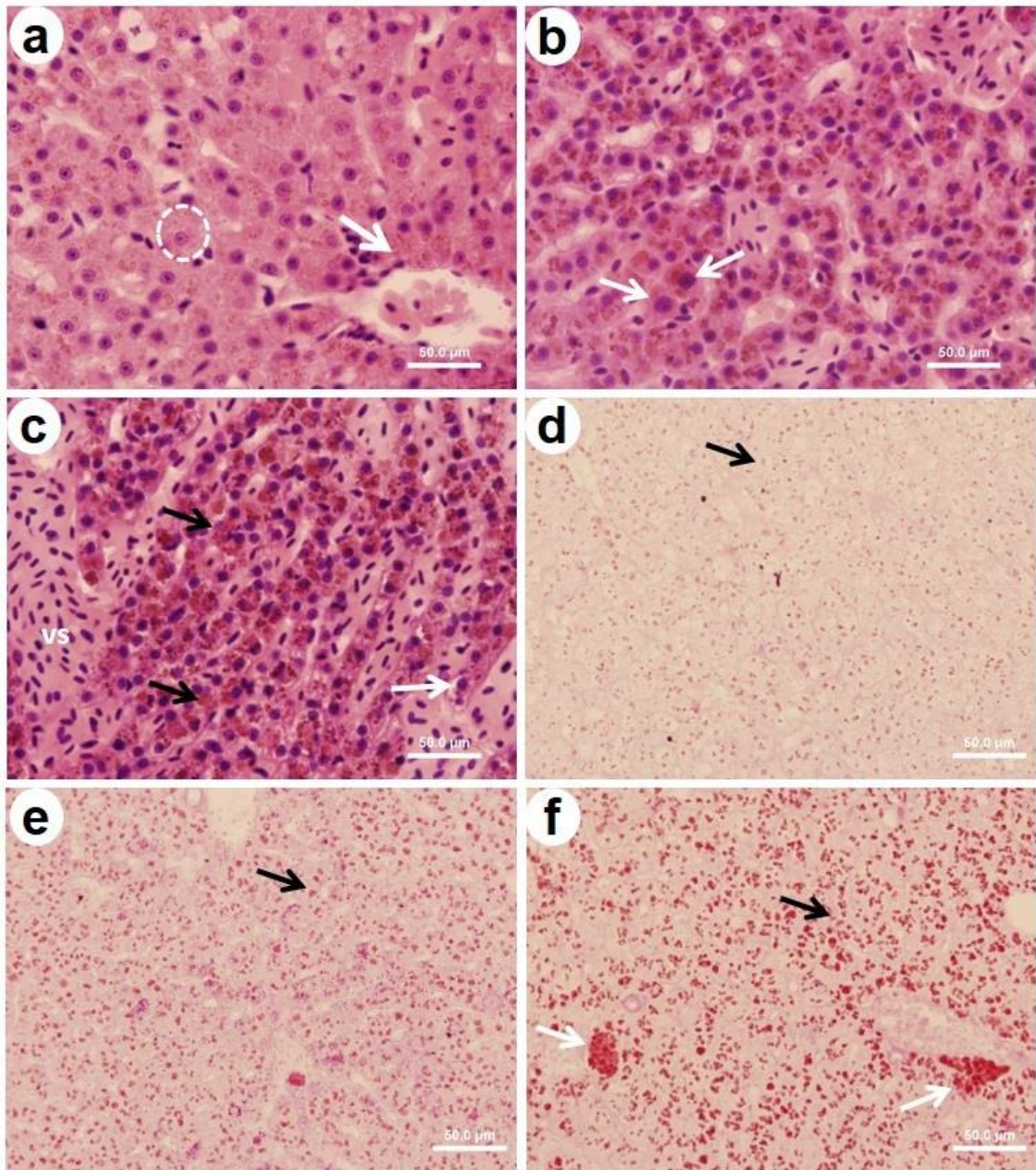


Figure 3 – Most frequent alterations in the liver of *P. lineatus*. (a) Ctrl group 14 days: regular hepatic tissue, without significant alterations – central vein (arrow), hepatocyte (circle). (b) BdT group 14 days: nuclear hypertrophy (arrows). (c) BdT group 21 days: sinusoid capillary dilatation, congestion, bile stagnation (black arrow), cytoplasmic vacuolation (white arrow) and blood vessel (bv). HE technique. (d) Ctrl group 21 days: bile stagnation (arrow). (e) BdT group 14 days: bile stagnation (arrow). (f) BdT group 21 days: bile stagnation (black arrow) and melanomacrophage centers (white arrow) – note the increase in bile stagnation. PAS technique.

The MVA and HAI obtained for the hepatic alterations were significantly higher in comparison with the control in the 21-day feeding period - ANOVA/Tukey test (Figure 2).

3.2. Hepatic collagen

Some collagen staining was observed in vessel walls, in insufficient amounts for quantification.

3.3. Bile stagnation

The animals fed for 21 days presented significant increase in bile stagnation in comparison with the control group, with $p < 0.05$ for Kruskal-Wallis/Dunn test (Table 2).

3.4. Total proteins and macrophages

The animals fed during both treatment periods presented significant difference of macrophage number, as well as of total proteins in comparison with the control group, with $p < 0.05$ for ANOVA/Tukey test.

3.5. Lipofuscin

Lipofuscin granules were identified as red punctuate cytoplasmic fluorescence. The number of granules in the liver increased in both treatments; however, not significantly in comparison with the control group (Figure 3), with $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis/Dunn) (Table 2).

LIPOFUSCIN				BILE STAGNATION				
Ctrl Group		BdT Group		Ctrl Group		BdT Group		
Mean	S±	Mean	S±	Mean	S±	Mean	S±	
14 days	914041.2	472324.5	1066679.8	642860.6	3868.1482	2321.4600	4589.1319	1145.6950
21 days	953439.2	402236.3	988093.9	530541.0	4834.8480	1158.5428	6479.3136*	2205.9563

Table 2 – Means in μm^2 of the area occupied by lipofuscin and bile stagnation. Means, standard deviation (S±) and significance (*). Note the increased levels of lipofuscin and bile stagnation in the BdT group.

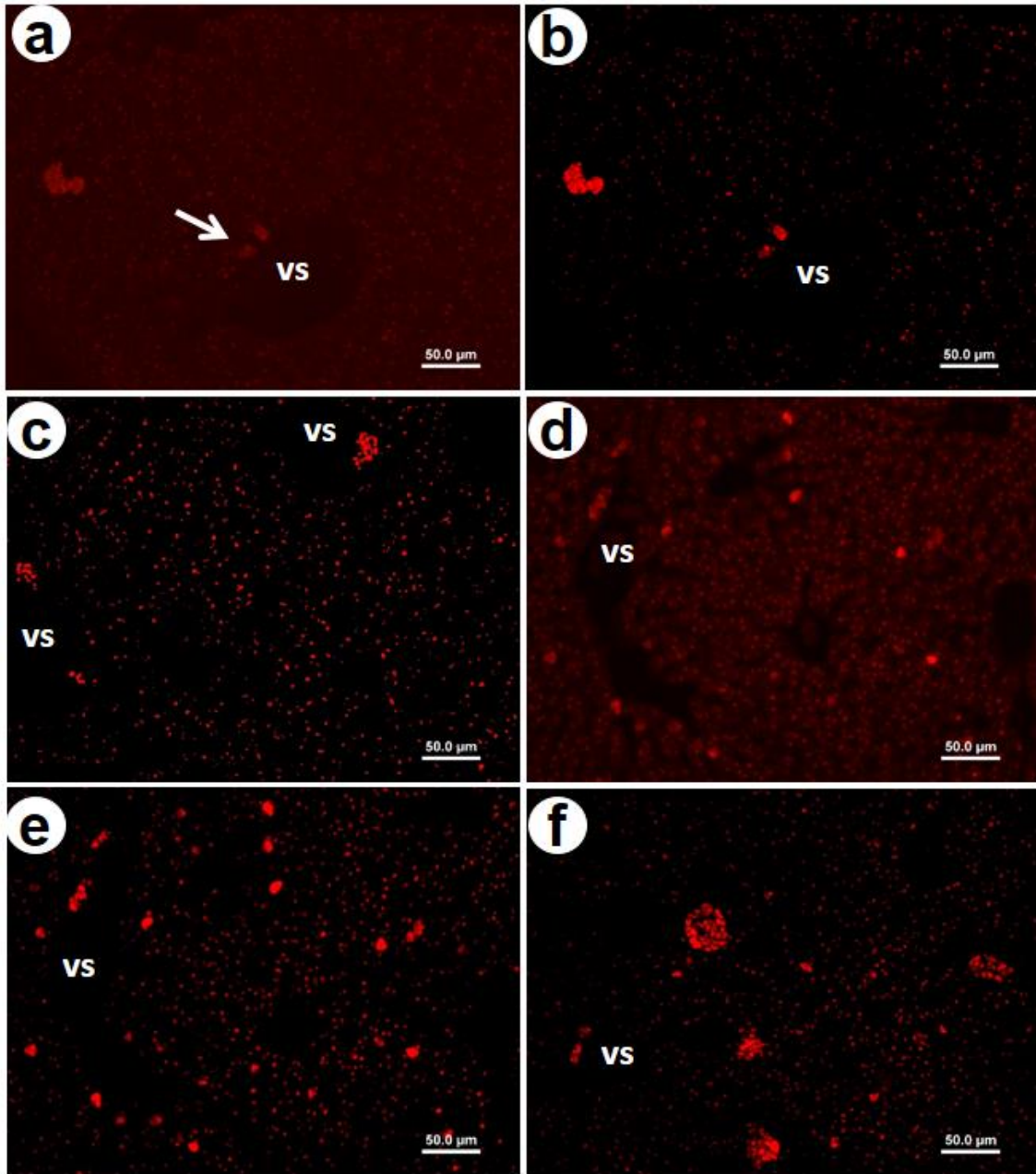


Figure 4 – (a) and (b) Ctrl group liver 14 days after treatment – lipofuscin granule (arrow). (c) Liver of the Ctrl group on the 21st day after the experiment. (d) and (e) Liver of the BdT group, on the 14th day after the experiment. (f) Liver of the BdT group, on the 21st day after the experiment. Note the increase in lipofuscin in the BdT group. Fluorescence microscopy technique.

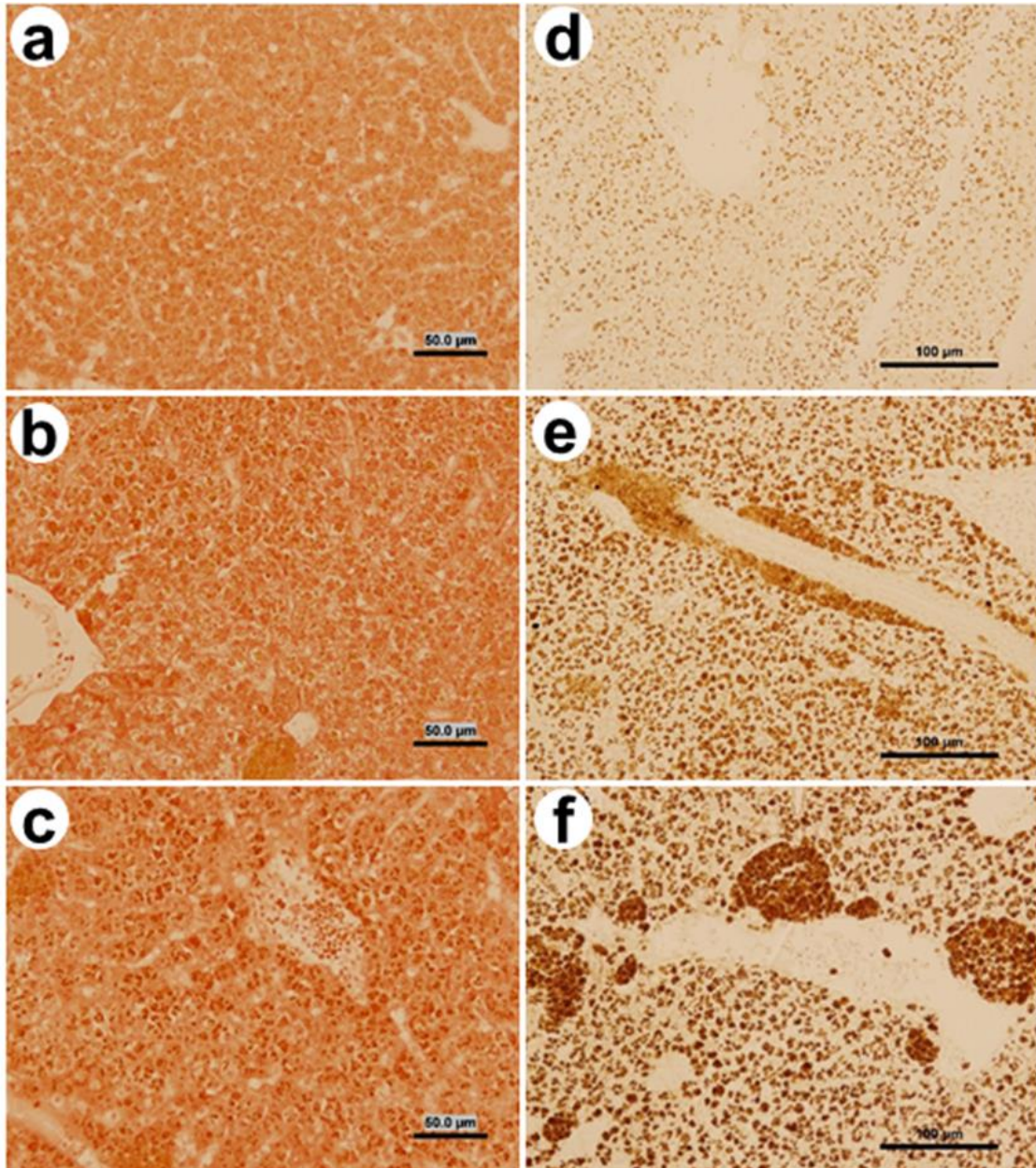


Figure 5 – Alterations in the liver of *P. lineatus*. (a) Ctrl group 14 days: regular hepatic tissue. (b) BdT group 14 days. (c) BdT group 21 days. Note increased total proteins in the treated groups. Xylidine Ponceau technique. (d) Ctrl group 21 days: regular hepatic tissue. (e) BdT group 14 days. (f) BdT group 21 days – note the increase in number of macrophages in the treated groups. Gomori technique.

4. Discussion

Histopathological analyses are important to verify the sensitivity of the organs to toxic substances. Lesion severity is associated with the pathologic potential; therefore, how the lesion affects the organ functions and the survival of the animal is taken into consideration to analyze the importance of the lesion (Bernet et al., 1999). The present study analyzed alterations stages I and II, cytoplasmic vacuolation, nuclear hypertrophy, sinusoid dilatation and congestion, the HAI revealed that the extract caused slight not statistically significant damages to the organ.

The results suggest that *B. dracunculifolia* has toxic components, once some alterations were observed in more advanced stages, making the tissue recovery slower.

Several studies have reported an increase in the amount lipofuscin (Au, 2004; Radwan et al., 2010; Vaschenko et al., 2012; Pereira et al., 2014). Despite not statistically significant, the increase in the levels of lipofuscin observed in the present study can be associated with liver damages, once the lipofuscin is a product of lipid peroxidation and indicates oxidative lesion (Kishi et al., 2008).

Alterations as nuclear hypertrophy and sinusoid dilatation, more frequent in the animals fed for 21 days, indicate an increase in the metabolic activity of the hepatocytes, probably representing a response to the presence of stressing agents. The presence of vessel congestion suggested that blood flow was obstructed, consequently causing blood to accumulate in the venous circulation. According to Jones et al., (2000), this can be caused by physical obstruction of small or large vessels or by a failure in the regular flow.

One of the consequences of the exposure to toxic products is bile stagnation, characterized by the presence of *brownish-yellow granules* in the cytoplasm of the hepatocytes (Pacheco, 2002). This alteration consists in the manifestation of a physiopathological condition caused by a lack of bile metabolism and excretion (Fanta et al., 2003). In the present study, the bile stagnation observed in the *P. lineatus* indicates that the animals were in contact with *B. dracunculifolia* metabolic products, which acted as toxic agents. Furthermore, the presence of melanomacrophage centers – which play a role in elimination of particles – may indicate inflammation Balamurugan et al., (2012), health problems and conditions of environmental stress (Hinton et al., 2008).

Alterations in number of macrophages were also observed in the liver of *P. lineatus* exposed to LAS (Pereira et al., 2014). Alterations in total proteins levels in this study could be occurred due to the health conditions of the animals (Ranzani-Paiva and Silva-Sousa, 2004). According to these authors, when total proteins are at high levels, it may represent a chronic liver disease, and when at low levels, it could be a result of liver failure and kidney disease.

The results of the present study are corroborated by Rodrigues et al., (2009), who submitted rats to high concentrations of *B. dracunculifolia*. Three days following exposure the animals presented behavioral alterations and the toxicity of the extract was confirmed by the decrease in polychromatic and monochromatic erythrocytes. Grance et al., (2008) reported that the hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* administered to pregnant rats at 8.4 mg/kg was toxic to maternal kidney and liver cells, although such alterations are reversible once administration is discontinued.

Studies have demonstrated that plant flavonoids, such as quercetin and rutin (Da Silva et al., 2002) can produce genotoxic effects in high concentrations (Ferguson, 2001; Da Silva et al., 2002; Pereira et al., 2006). The caffeic acid, a phenolic acid found in *B. dracunculifolia* extracts (Resende et al., 2007; Munari et al., 2008), induced damage to the DNA of rats at 8 mg/kg (Pereira et al., 2006). The molecular mechanisms of mutagenicity caused by flavonoids have not been clarified; however, several studies have demonstrated that they can act as pro-oxidants, overcoming nuclear antioxidant defenses and leading the DNA to oxidative damage (Sahu et al., 1996; Da Silva et al., 2002). Therefore, the liver alterations observed in the present study may have occurred due to the action of similar components present in the *B. dracunculifolia* extract.

5. Conclusion

In conclusion, the extract of *B. dracunculifolia* caused significant hepatic alterations in the species; moreover, the HAI and MAV demonstrated that the ingestion of the extract caused widely distributed damage to the liver.

6. Acknowledgments

Authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) support and to Mr. Gerson de Mello Souza for technical support.

Bibliographic reference

- Abreu, P.A.P., & Onofre, S.B. (2010). Atividade Antimicrobiana dos Extratos de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Revista de Saúde e Biologia*, 5, 1–6.
- Ackermann, T. (1991). Fast chromatographic study of propolis crudes. *Food Chemistry*, 42, 135–138. doi:[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(91\)90028-M](https://doi.org/10.1016/0308-8146(91)90028-M)
- Alencar, S.M., Aguiar, C.L. Paredes-Guzmán, J., Park, Y.K. (2005). Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural*, 35, 909–915. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000400025>
- Au, D.W.T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 817–834. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.032>
- Barroso, G.M. (1976). *Compositae – Subtribo Baccharidinae Hoffmann*. Estudo das espécies

- ocorrentes no Brasil. *Rodriguésia*, 28, 3–273.
- Balamurugan, S., Deivasigamani, B., Kumaran, S., Sakthivel, M., Rajsekar, T., Priyadharsini, P. (2012). Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bio-indicator of environmental change. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, S635–S638. doi:[https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60235-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60235-7)
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Whali, T. (1999). Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal Fish Diseases*, 22, 25–34. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- Caetano, F.H. (2012). O Estado da arte da *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) na fitopatologia. Lavras. 45 f. Monografia. Universidade Federal de Lavras, Brasil.
- Campos, V.E.W., Pereira, B.F., Pitol, D.L., da Silva Alves, R.M., Caetano, F.H. (2017). Analysis of the Liver of Fish Species *Prochilodus lineatus* Altered Environments, Analyzed with ImageJ. *Microscopy Research*, 5, 1–9. doi: <http://dx.doi.org/10.4236/mr.2017.51001>
- Costa, R.J., Diniz, A., Mantovani, M.S., Jordão, B.Q. (2008). In vitro study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. *Journal Ethnopharmacology*, 118, 86–93. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.03.014>
- Da Silva, J., Herrmann, S.M., Heuser, V., Peres, W., Possa Marroni, N., González-Gallego, J., Erdtmann, B. (2002). Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chemistry Toxicology*, 40, 941–947. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00015-7](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00015-7)
- Fanta, E., Rios, F.S., Romão, S., Vianna, A.C.C., Freiburger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 54, 119–130. doi: [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00044-1)
- Ferguson, L.R. (2010). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475, 89–111. doi: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00073-2)
- Ferronato, R., Marchesan, E.D., Pezenti, E., Bednarski, F., Onofre, S.B. (2007). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 224–230. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200016>.
- Grance, S.R.M., Teixeira, M.A., Leite, R.S., Guimarães, E.B., de Siqueira, J.M., de Filii,

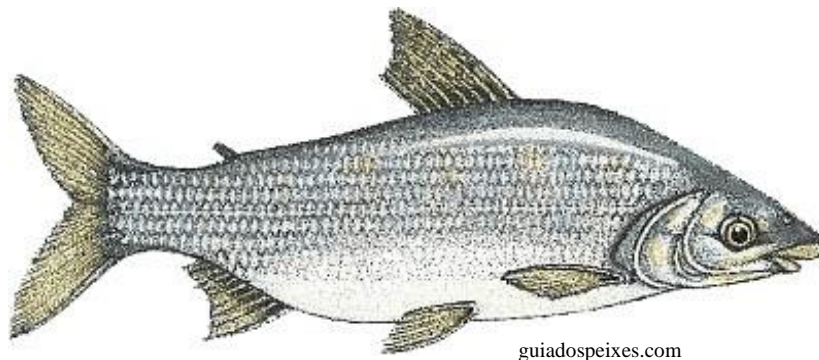
- W.F.O., Vasconcelos, S.B.S., Vieira, M. do C. (2008). *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. *Journal Ethnopharmacology*, 117, 28–33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.12.020>
- Gomori, G. (1949). An Improved Histochemical Technic for Acid Phosphatase. *Stain Technology*, 25, 81–85. doi: <https://doi.org/10.3109/10520295009110962>
- Hinton, D.E., Segner, H., AU, D.W., Kullman, S. W., Hardman, R. C. (2008). Liver toxicity. In: DI Giulio, R. T.; Hinton, D. E. Toxicology of fishes. USA: CRC press.
- Horn, R.C., Vargas, V.M.F., 2008. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the *Salmonella*/microsome assay. *Toxicology in Vitro*, 22, 1043–1049. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.12.014>
- Jones, T.C., Hunt, R. D., King, N. W. (2000). Patologia Veterinária. 6 ed. São Paulo: Manole LTDA.
- Kishi, S., Bayliss, P.E., Uchiyama, J., Koshimizu, E., Qi, J., Nanjappa, P., Imamura, S., Islam, A., Neuberg, D., Amsterdam, A., Roberts, T.M. (2008). The identification of zebrafish mutants showing alterations in senescence-associated biomarkers. *PLoS Genetic*, 4, e1000152. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000152>
- Klopell, F.C., Lemos, M., Sousa, J.P.B., Comunello, E., Maistro, E.L., Bastos, J.K., Andrade, S.F. (2007). Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Zeitschrift fur Naturforsch. - A Journal of Biosciences*, 62, 537–542. doi: <https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-812>
- Lorenzi, H. & Matos, F.J. (2002). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Massignani, J.J., Lemos, M., Maistro, E.L., Schaphauser, H.P., Jorge, R.F., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Andrade, S.F. (2009). Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. *Phytotherapy Research*, 23, 1355-1360. doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.2624>
- Mello, M.L.S. & Vidal, B.C. (1980) .Praticas de Biologia Celular. Campinas. Editora: Edigard Blucher, 71pp.
- Monks, N.R., Bordignon, S.A.L., Ferraz, A., Machado, K.R., Faria, D.H., Lopes, R.M., Mondin, C.A., Souza, I.C.C., Lima, M.F.S., Rocha, A.B., Schwartzmann, G. (2002). Anti-tumour Screening of Brazilian Plants. *Pharmaceutical Biology*, 40, 603–616. doi: <https://doi.org/10.1076/phbi.40.8.603.14658>
- Munari, C.C., Resende, F.A., Alves, J.M., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Tavares, D.C. (2008). Mutagenicity and antimutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* extract in chromosomal

- aberration assays in Chinese hamster ovary cells. *Planta Medica*, 74, 1363–1367. doi: 10.1055/s-2008-1081306
- Pacheco, M., Santos, M. A. (2002). Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology Environmental Safety*, 53, 331 – 347. doi: [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00017-9)
- Park, Y.K., Paredes-Guzman, J.F., Aguiar, C.L., Alencar, S.M., Fujiwara, F.Y. (2004). Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1100–1103. doi: 10.1021/jf021060m
- Parreira, N.A., Magalhaes, L.G., Morais, D.R., Caixeta, S.C., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Cunha, W.R., Silva, M.L.A., Nanayakkara, N.P.D., Rodrigues, V., Filho, A. (2010). Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chemistry Biodiversity*, 7, 993–1001. doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900292>
- Paulete, J. & Beçak, W. (1976). Técnicas de Citologia e Histologia. Livros Técnicos e Científicos, São Paulo, 2.
- Pearse, A.G.E. (1985). Histochemistry: Theoretical and Applied. 4 ed. Churchill Livingstone: Edinburgh, London, Melbourne and New York.
- Peixoto, S., Aguado, N., D’Incao, F., Wasielesky, W., Cousin, J.C. (2002). Preliminary identification and quantification of the age-pigment lipofuscin in the brain of *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda). *Brazilian Journal. Biology*, 62, 871–876. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842002000500017>.
- Pereira, B.F., Alves, A.L., Senhorini, J.A., Rocha, R.C.G.A., Pitol, D.L., Caetano, F.H. (2014). Effects of Biodegradable Detergents in the Accumulation of Lipofuscin (Age Pigment) in Gill and Liver of Two Neotropical Fish Species. *International Journal Morphology*, 32, 773–781. doi: 10.4067/S0717-95022014000300005
- Pereira, B.F., Alves, R.M.S., Alves, A.L.; Senhorini, J.A., Rocha, R.C.G.A., Scalize, P.H., Pitol, D.L., Caetano, F.H. (2014). Effects of Biodegradable Detergents in Morphological Parameters of Liver in Two Neotropical Fish Species (*Prochilodus lineatus* and *Astyanax altiparanae*). *Microscopy Research*, 2, 39–49. doi: 10.4236/mr.2014.22006
- Pereira, P., Oliveira, P.A., Ardenghi, P., Rotta, L., Henriques, J.A.P., Picada, J.N. (2006). Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 99, 374–378. doi: https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_533.x

- Poleksic V., & Mitrovic-Tutundzic V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Muller R., Lloyd R., editors. *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Oxford, Fishing News Books; Osney, England: 339–352.
- Radwan, M.A., El-Gendy, K.S., Gad, A.F. (2010). Oxidative stress biomarkers in the digestive gland of *theba pisana* exposed to heavy metals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 828–835. doi: <http://doi.org/10.1007/s00244-009-9380-1>
- Ranzani-Paiva, M.J. & Silva-Sousa, A.T. (2004). Hematologia de peixes brasileiros. São Paulo. Varela, 120p.
- Resende, F.A., Alves, J.M., Munari, C.C., Senedese, J.M., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Tavares, D.C. (2007). Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 634, 112–118. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.06.008>
- Rodrigues, C.R.F., Dias, J.H., Semedo, J.G., da Silva, J., Ferraz, A.B.F., Picada, J.N. (2009). Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (D.C.). *Journal Ethnopharmacology*, 124, 321–324. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.022>
- Sahu, S.C., Gray, G.C. (1996). Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Letters*, 104, 193–196. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(96\)04251-6](https://doi.org/10.1016/0304-3835(96)04251-6)
- Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R. (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6, 75–86. doi: 10.1023/A:1008212000208
- Varaschin, M.S. & Alessi, A.C. (2003). Poisoning of mice by *Baccharis coridifolia*: an experimental model. *Veterinary and human toxicology*, 45, 42–44.
- Vaschenko, M.A., Zhadan, P.M., Aminin, D.L., Almyashova, T.N. (2012). Lipofuscin-like pigment in gonads of sea urchin *strongylocentrotus intermedius* as a potential biomarker of marine pollution: A field study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 599–613. doi: <http://doi.org/10.1007/s00244-011-9733-4>
- Verdi, L.G., Brighente, I.M.C., Pizzolatti, M.G. (2005). Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*, 28, 85–94. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000100017>

X - métodos de preparação da tintura mãe

http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/cp38_2010/x_metodos_preparacao_tintura.pdf/ (accessed 12 March 2018).

ARTIGO 2**Morphological changes in gills and gill rakers of *Prochilodus lineatus* treated with *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae)**

guiadospeixes.com

CURIMBATÁ (*Prochilodus lineatus*)



Research Paper

Morphological changes in gills and gill rakers of *Prochilodus lineatus* treated with *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae)

Accepted 19th July, 2018

ABSTRACT

Jeffesson de Oliveira-Lima^{1*}, Bruno Fiorelini Pereira², João Rodolfo Tuckumantel Valim, Thiago Gazoni¹, Dimitrius Leonardo Pitol³ and Flavio Henrique Caetano¹

¹Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil.

²Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB Campus de Barreiras, Bahia, Brasil.

³Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo – USP Campus de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brasil.

*Corresponding author. E-mail: jeffessonbiologia@mail.uft.edu.br. Tel: +55-193-526-4141.

The leaves of *Baccharis dracunculifolia* are used to treat gastric disorders and febrile conditions, besides their use in the treatment of wounds and inflammatory processes, among others. The objective of this study was to evaluate the toxic effects of the alcoholic extract of *B. dracunculifolia* by means of morphological analyzes of the gills and gill rakers of *Prochilodus lineatus* fish. Of the 60 subjects, 32 were used in two experimental groups in duplicates: Control group and treated group. After the treatment (21 days), 2 collections were done at 14 and 21 days. The histological and histochemical changes were evaluated by the Mean Value of Change (MVC), Histological Alteration Index (HAI) and ImageJ®. HAI and MVC indicated normal functioning, with changes localized in the organ. The results showed that the ingestion of the extract of *B. dracunculifolia* can affect the branchial epithelium and gill rakers, causing morphological alterations and an increase of mucous substances, as well as the number of lysosomes in the species studied.

Key words: Asteraceae; mucus; lysosomes; *P. lineatus*, gill.

INTRODUCTION

The Asteraceae family is the most numerous group within the Angiosperms, comprising about 1,100 genera and 25,000 species. About 98% of the genera are small plants and are found in several habitat types, but mainly in the tropical mountainous regions of South America (Joly, 1987).

Species of this genus are economically important to man as they help in the fight against erosion and can be used as ornamental plants. Although, they may also present as pests that are difficult to combat in pastures. However, they are majorly use in medicine, where several species are known (Simões-Pires et al., 2005).

B. dracunculifolia, native to Brazil, is considered an invasive pasture plant and has been eradicated from many regions. Its leaves have tectorial and glandular trichomes that, besides acting as a protective barrier to attack by predators, help in the interaction of this species with the bees that collect their resinous material (Sforcin et al., 2012). In addition, it has been shown to be the most

important botanical source for the production of green propolis (Park et al., 2002).

In medicine, the use of the branches and leaves of *B. dracunculifolia* to combat gastric disorders, febrile conditions and inflammatory processes has been reported (dos Santos et al., 2010). In its phytochemistry, there is an existence of flavonoid compounds, lipid diterpenes and clerodane (Verdi et al., 2005).

Recent studies have shown several biological activities, such as antiulcerogenic, immunomodulatory (Missima et al., 2007), cytotoxic, and anticariogenic effects (Leitão et al., 2004). Both green propolis and *B. dracunculifolia*, in the forms of ethanolic extract, were able to inhibit the oxidative metabolism of stimulated neutrophils, a concentration-dependent inhibition not related to toxic events (Simões-Ambrosio et al., 2010; Figueiredo-Rinhel et al., 2013).

However, it should be noted that species of the genus *Baccharis* have toxicity (Grance et al., 2008; Costa et al., 2008). Due to contact with water, it is possible that the

components of *B. dracunculifolia* present in the extract dissociate and affect the gills, since they have a large surface area and are in direct and permanent contact with agents diluted in water (Bernet et al., 1999). The aim of this study was to evaluate the toxic effects of the alcohol extract of *B. dracunculifolia*, by means of morphological analyzes of the gills and gill rakers of the fish (curimbatá).

MATERIALS AND METHODS

Specimens

The *Prochilodus lineatus* juveniles used in this experiment (60.7 ± 1.3 g and 8.0 ± 1.5 cm) were purchased from Piscicultura Poletini, Mogi Mirim/SP, Brazil and transported to the Histology Laboratory of UNESP, Campus Rio Claro, Sao Paulo, Brazil. The animals were previously climatized in polyethylene boxes (500 L) with constant aeration and fed with appropriate commercial food (325 g of crude protein) once a day.

B. dracunculifolia leaves

The *B. dracunculifolia* leaves used in this experiment were collected in Rio Claro – SP, Brazil ($22^{\circ}22'30.0''S$ $47^{\circ}28'31.5''W$) and identified by Ms. Daniela de Oliveira, technician of “Herbário Rioclarense”. Exsiccates of the vegetal material was deposited and registered in the herbarium under number 58140. The nomenclature used herein is according to Joly (1987) and Dr. Marco Antonio Assis of the Botany Department of UNESP, campus Rio Claro.

Ethanolic extract preparation

The leaf compound extraction followed the protocol established by ANVISA - (Brazilian Health Surveillance Agency) for the preparation of mother tinctures from dry plants through maceration (http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/cp38_2010/x_metodos_preparacao_tintura.pdf). The leaves were macerated with grain alcohol, 30 and 70%, for nine days. The product of the 30% maceration was mixed to the 70% and vice-versa. After nine days, all the leaf compounds were obtained, those soluble in alcohol of 70 and 30%. For each treatment group, 1.5 mL of the extract was added to 1.2 g of commercial food (http://www.poytara.com.br/tropicais_diaadia.html). The material was kept in microbiological incubator at 37°C for alcohol evaporation and stored in amber jars.

Control and treatment groups

Sixty individuals were used, of which 32 were divided into two experimental groups in duplicate: Control group and

B. dracunculifolia treated group. The animals were randomly distributed into four 70-L tanks (8 animals each) with air pumps, cooling, thermostat (to maintain a constant temperature) and covered with UV blocking material to reduce stress. Both groups were fed for a maximum of 21 days: Control group with regular commercial food and *B. dracunculifolia* treated group with the food comprising *B. dracunculifolia* extract. The animals were collected 14 and 21 days after the experiment (21-day feeding period), 6 individuals per treatment were collected and anesthetized with benzocaine solution (0.1 g of benzocaine in 1 mL of ethanol for each 100 mL of deionized water) and euthanized according to the procedures established by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) – UNESP, Rio Claro, process 10/2017. The fish were kept in the semi- static system and the water physical and chemical parameters (ph, ammonia, hardness and temperature) were measured at each collection.

Histological processing

After treatment, fragments of the gills and gill rakers were fixed in 10% formalin. Subsequently, the material was buffered in sodium phosphate solution with pH = 7.4, dehydrated in increasing concentrations of alcohols, included in Leica historesin and sectioned in the Leica RM2245 microtome. The sections with 6 μ m thickness were subjected to the specific reactions and consecutively produce the assembly of the slides.

Gill morphology analysis

Morphological changes were evaluated semi-quantitatively by the Calculation of the Mean Value of Change (VMC), based on the incidence of lesions, according to Schwaiger et al. (1997), in which a numerical value for each animal is assigned according to the scale: grade 1 (absence of histopathological alteration), grade 2 (occurrence of localized lesions) and grade 3 (lesions widely distributed by the organ) and Histological Alteration Index (HAI), based on the severity of each lesion. Stage I alterations (do not compromise the functioning of the organ), stage II (more severe and impair the normal functioning of the organ), and stage III, (very severe and irreversible) (Poleksic and Mitrovic-Tutundzic, 1994). For each animal, the AHI was calculated using the formula: $IAH = (1 \times \Sigma I) + (10 \times \Sigma II) + (100 \times \Sigma III)$, where I, II and III equal the number of stages I, II and III changes, respectively.

The mean AHI was divided into 5 categories according to Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994): 0-10 = normal tissue functioning; 11-20 = slight to moderate tissue damage; 21-50 = moderate to severe modification of tissue; 51-100 = severe tissue modification; greater than 100 irreparable tissue damages.

Table 1: Frequency of histological changes found in the gills of *P. lineatus*.

Gill	Stage	Control 14 days	Control 21 days	Treated 14 days	Treated 21 days
Lamellar hyperplasia	I	+	+	+	++
Epithelial detachment	I	0+	0+	+	+
Vascular congestion	I	0+	0+	+	+
Secondary lamellae fusion	I	0+	0+	+	+
Lamellae aneurysm	II	0+	0	0+	0+

0 = no change 0+ = rarely frequent + = frequent ++ = very frequent +++ = extremely frequent.

Quantification of mucous substances

For the analysis of the mucus substances, five fields of six cuts in each animal were analyzed. In each field were counted the markings of mucus substances between regions of 10 secondary lamellae. The cuts were submitted to Alcian Blue pH 1.0 + PAS reaction for the identification of mucus sulfated substances, hexoses, and sialic acids. Mucus neutral substances were evidenced by the periodic acid method Schiff (PAS) (Gustavo et al., 2014). The mucus substances in the gill rakers were quantified with the aid of ImageJ® software, with the plug-ins -Threshold Color.

Quantification of lysosomes

For this analysis, 6 cuts of 6 µm were obtained from each individual and subjected to the technique adapted from Gomori (1950). Of these six cuts, five fields were photographed and the lysosome markings present were counted with the aid of ImageJ®.

Statistical analyzes

The data obtained in the analyzes were subjected to Shapiro-Wilk test to verify the normality of the groups and later to the ANOVA / Tukey test, for parametric data and those that did not present Kruskal-Wallis / Dunn normality, considering the significance of $p < 0.05$. Statistical tests were performed with Bioestat 5.0® software and GraphPad Prism 5.0® software.

RESULTS

Gill morphology

The gills of the specimens presented the following changes: lamellar hyperplasia, epithelial detachment, vascular congestion, lamellar aneurysm and partial fusion of secondary lamellae. The frequency of histological changes in the gills is shown in Table 1.

The VMC and AHI obtained in the gill analyzed were not significantly higher than the control in the ANOVA / Tukey test (Figure 1).

Mucus

In the gills, the mucus sulfated substances, hexoses, and sialic acids did not present significant differences during treatment and a reduction was observed during 21 days of treatment. However, the mucus sulfate, hexoses, sialic and neutral acids presented significant elevation with $p < 0.05$ for the Kruskal-Wallis / Dunn test (Figures 2 and 3, and Table 2).

Lysosomes

The animals treated for 21 days showed a significant increase in the number of lysosomes as compared with the control group with $p < 0.05$ for the ANOVA / Tukey test (Table 2).

Morphology of gill rakers and mitochondrial rich cells

The gill rakers of *P. lineatus* fed with ration enriched with *B. dracunculifolia* extract showed blood cell infiltration (congestion) and epithelial decharacterization (Figure 4-B and C). Cells rich in mitochondria were not observed in using Von Kossa's technique, however, the presence of calcium in the light brown mucous cells along the epithelium was observed (Figure 4-E and F).

In the gill rakes, the mucus sulfate substances, hexoses and sialic acids presented significant differences with only 14 days of treatment. The mucus sulfated acidic substances, hexoses, sialic acids and neutrally presented significant differences for the ANOVA / Tukey test, during 14 and 21 days of treatment (Table 3) (Figure 5).

DISCUSSION

Histopathological analyzes are important for assessing organ sensitivity to xenobiotics. The degree of the lesions is directly related to their pathological potential, thus, the way the lesion affects the function of the organ and the survival capacity of the animal is taken into account when it comes to the importance of the lesions (Bernet et al., 1999). In this study, the occurrence of localized lesions such as lamellar hyperplasia, epithelial detachment, vascular congestion,

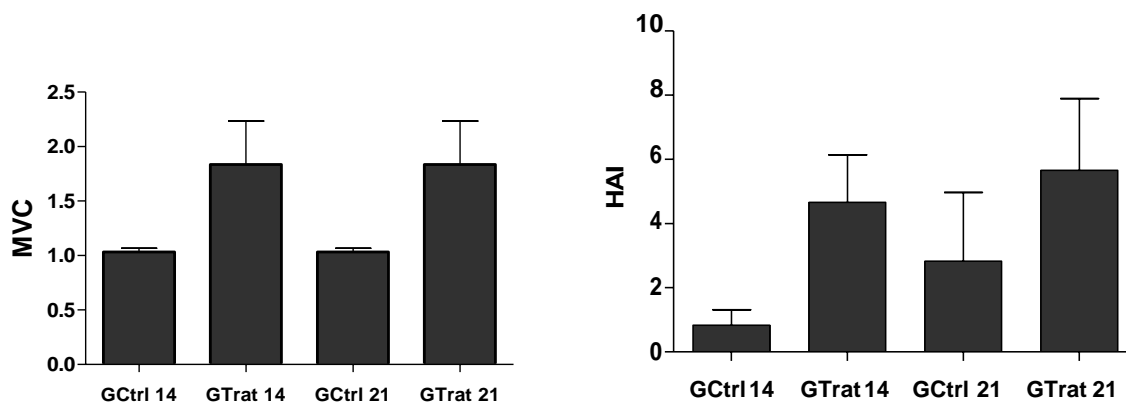


Figure 1: Mean values of VMC and AHI in the gills of *P. lineatus*. A significant difference was considered at $p < 0.05$. (*) significant difference in relation to the control group.

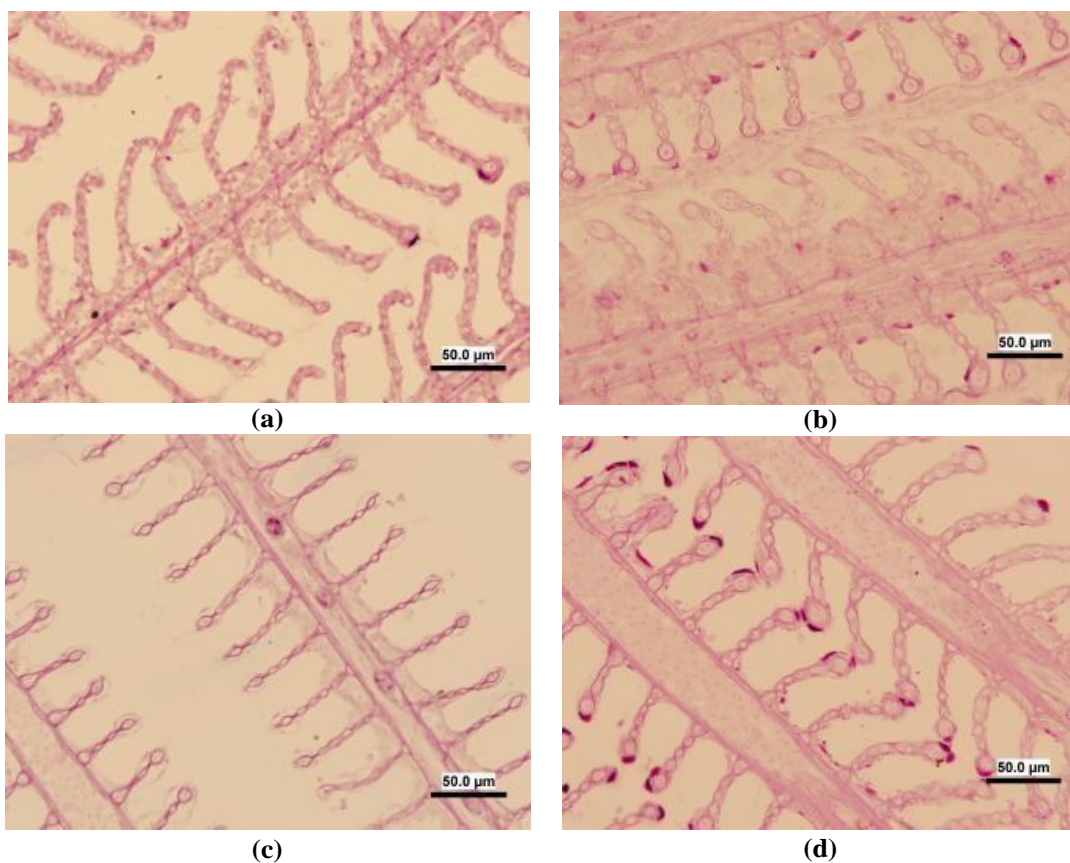


Figure 2: Changes in the gills of *P. lineatus*. (A) Control group 14 days. (B) Group treated 14 days. (C) Control group 21 days. (D) Group treated 21 days. PAS technique. Note the higher amounts of neutral polysaccharides in the group treated with *B. dracunculifolia*.

lamellar aneurysm and partial fusion of secondary lamellae (AHI) showed the normal functioning of the organ. With localized lesions, all of these changes are reversible characteristics.

Lamellar epithelial detachment, hyperplasia and partial or total fusion of the secondary lamellae, observed in the gills of *P. lineatus*, are alterations that decrease the surface area of the gills and increase the diffusion barrier to the

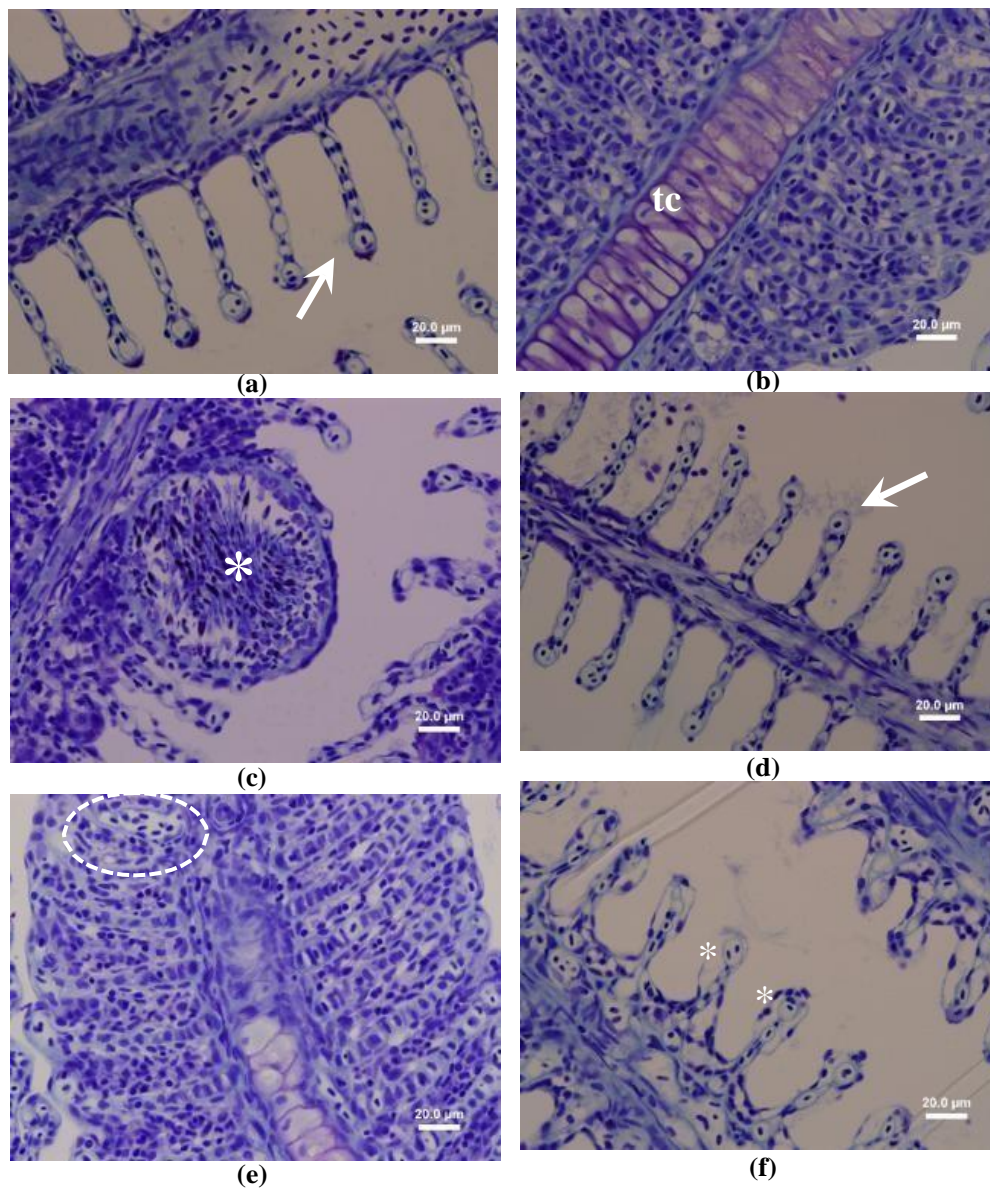


Figure 3: Most frequent histological changes in the gills of *P. lineatus*. (A) control 14 days: gill filament without significant changes - secondary lamella (arrow). (B) *B. dracunculifolia* 14 days: lamellar hyperplasia and fusion of secondary lamellae, (tc) cartilaginous tissue. (C) *B. dracunculifolia* 14 days: aneurysm (asterisk). (D) control 21 days: gill filament without significant changes - secondary lamella (arrow). (E) *B. dracunculifolia* 21 days: congestion (circle), lamellar hyperplasia and fusion of secondary lamellae. (F) *B. dracunculifolia* 21 days: epithelial detachment (asterisk). Blue toluidine technique.

Table 2: Mean in μm^2 of the area occupied by the mucous substances and lysosomes of the gills of *P. lineatus*.

Gill	Control 14 days	Treated 14 days	Control 21 days	Treated 21 days
AB pH 1.0 + PAS	4.684± 0.6355	7.474± 1.678	7.000± 1.591	5.316± 1.087
AB pH 2.5 + PAS	8.000± 1.051	17.26± 2.733*	5.632± 1.269	20.37± 3.112*
PAS	8.300± 4.772	12.83 ± 5.879*	5.867± 4.718	12.27 ± 3.591*
Lysosomes	184.5 ± 13.49	216.5 ± 15.44	144.6± 12.44	201.0 ± 18.30*

Averages, standard deviation (\pm) and significance (*). Note the higher presence of mucous substances, lysosomes in the group treated with *B. dracunculifolia*.

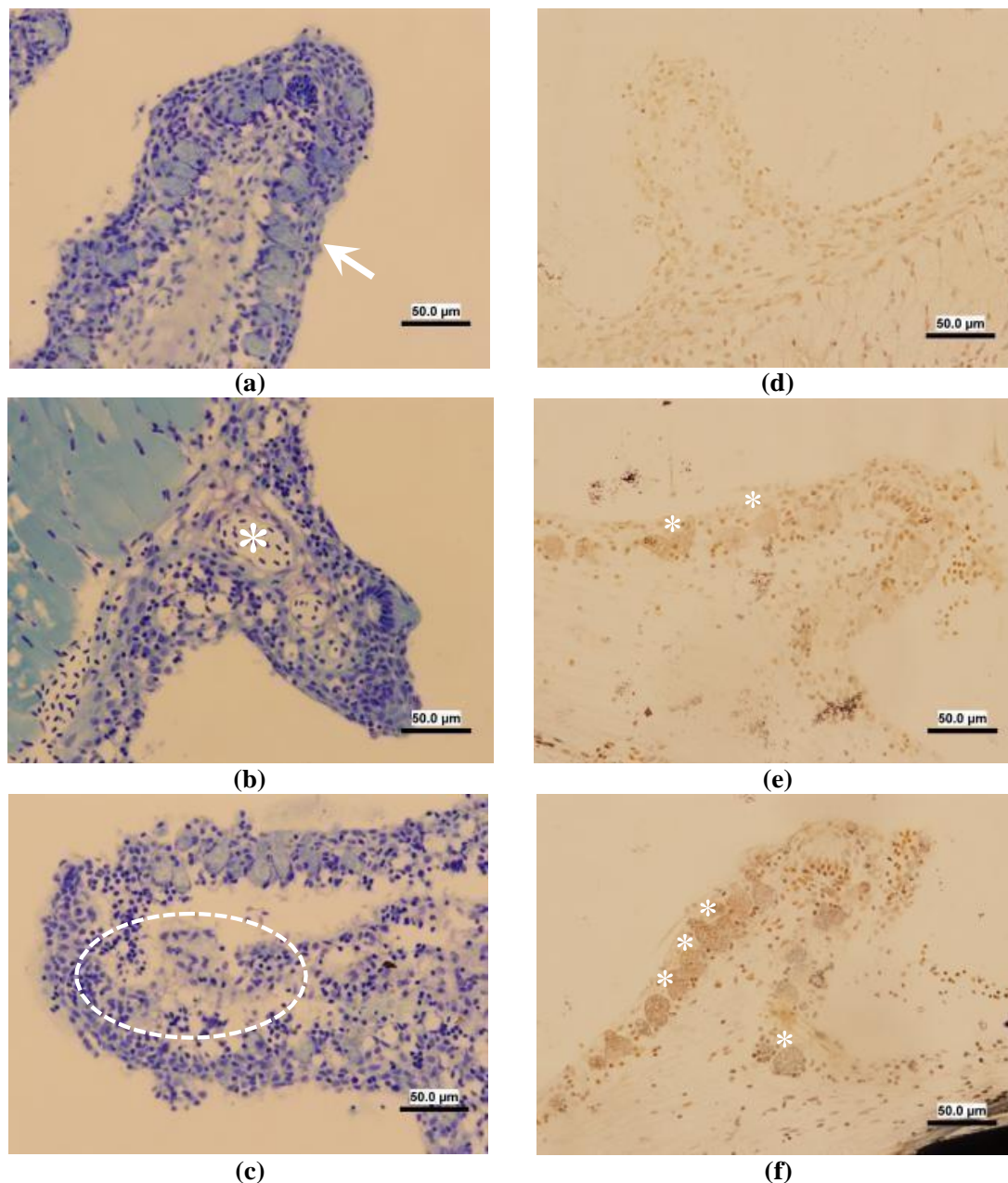


Figure 4: Changes in gill rakers of *P. lineatus*. (A) Control group 14 days without changes: mucosal cell (arrow). (B) Treated group 14 days: Blood cell infiltrates or congestion (asterisk). (C) Decomposition of the gill raker structure (circle): Treated group 21 days. Toluidine blue technique. (D) Control group 21 days: no change. (E) Treated group 14 days: mucus cells with the positive reaction to calcium (asterisk). (F) Treated group 21 days: mucus cells with the positive reaction to calcium (asterisk). Von Kossa Technique.

Table 3: Means in μm^2 of the area occupied by mucous.

Gill rakers	Control 14 days	Treated 14 days	Control 21 days	Treated 21 days
Alcian Blue pH 1.0 + PAS	206.8 \pm 25.27	485.3 \pm 128.7*	262.0 \pm 26.48	368.3 \pm 54.39
Alcian Blue pH 2.5 + PAS	188.2 \pm 31.82	374.2 \pm 45.08*	262.4 \pm 36.16	435.1 \pm 55.60*
PAS	754500 \pm 76370	1431000 \pm 17840*	617100 \pm 73420	1427000 \pm 192900*

Means, standard deviation (\pm) and significance (*). Note the higher presence of mucus in the treated group *B. dracunculifolia*.

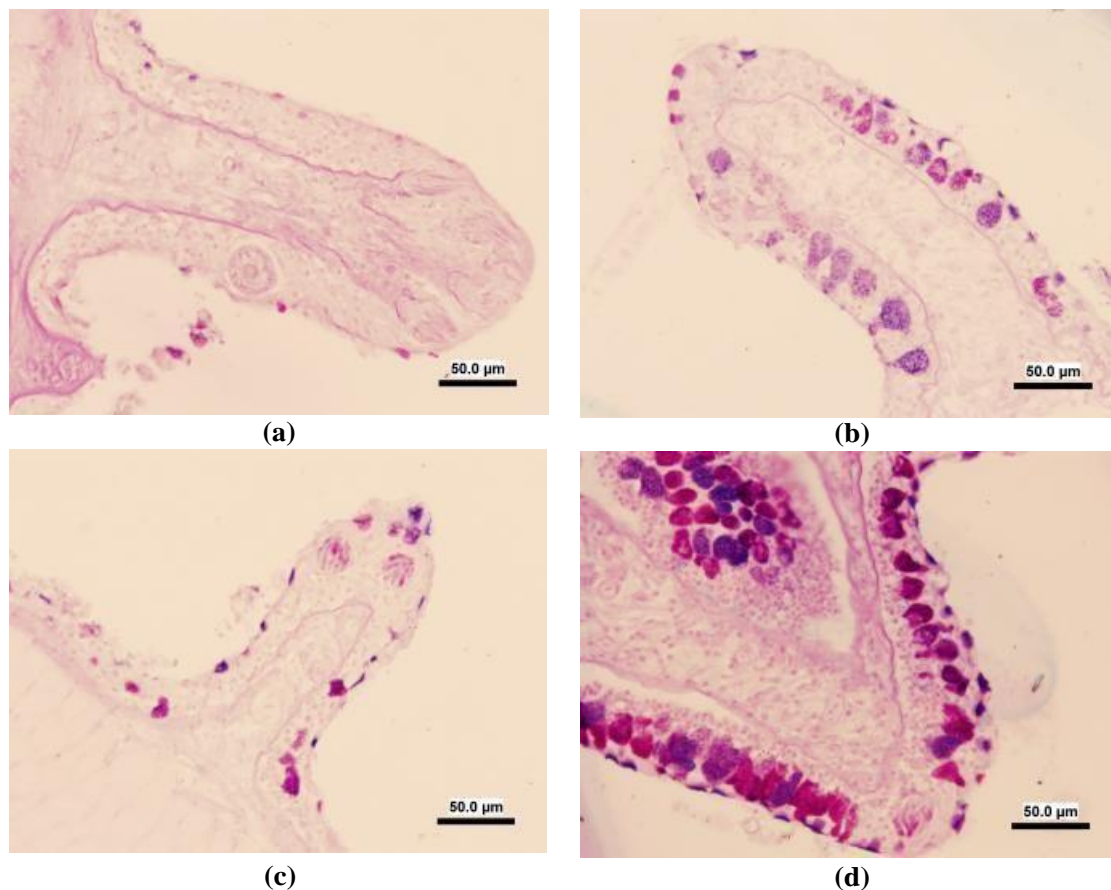


Figure 5: Changes in gill ratios of *P. lineatus*. (A) Control group 14 days. (B) Treated group 14 days. (C) Control group 21 days. (D) Treated group 21 days. Alcian Blue pH 2.5 + PAS technique. Note the highest amounts of sulfated acidic mucus in the group treated with *B. dracunculifolia*.

pollutant; however, it hinders the process of exchange of gases, showing that animals are exposed to substances that compromise their health (Fernandes and Mazon, 2003).

An aneurysm on the gill lamellae are lesions resulting from ruptures of the pillar cells caused by contaminants (Winkaler et al., 2007). This can cause the interruption/reduction of the gas exchange capacity and consequently the weakening of the fish.

Studies on the effects of plants on fish have been carried out by several researchers. Taiwo et al. (2008) tested the effect of the aqueous extract of Aloe vera leaves on various organs of the fish, including the gills, and concluded that this plant contains substances toxic to these animals. In gills of Nilotic tilapia exposed to the aqueous extract of *Carica papaya* filament and lamella degeneration, vacuolization of the gill arches and total removal of the lamellae were observed (Ayotunde and Ofem, 2008).

In rats, the toxicity of *B. dracunculifolia* has been confirmed through behavioral alterations and a decrease in polychromatic and monochromatic erythrocytes (Rodrigues et al., 2009).

Our study also confirms the toxicity of *B. dracunculifolia*, with a significant increase in the number of mucus cells and lysosomes. Exposure to pollutants can influence the proliferation of mucus cells with different types of mucus substances that proliferated after fish exposure to stressors (Alberto et al., 2005). Studies in Germany's rivers have found a fusion of secondary lamellae, the proliferation of mucus cells and mitochondria-rich cells and lysosomal proliferation in gills (Gernhöfere et al., 2001). According to Bernet et al. (1999), the neutral polysaccharides play important roles, acting as a barrier in the protection against particles, pathogens, and compounds toxic to fish.

The acidic mucus presents a higher viscosity and plays the role of fixing the organic and inorganic material of small size, besides defending the organ, against lesions and proliferation of pathogens. The increase of the acid mucus in the gill and branchial rakers indicates the possible defense response against toxic compounds present in *B. dracunculifolia*, as well as the number of lysosomes, possibly due to the need to combat the toxic agents present the extract. Pereira et al. (2017) observed a reduction in

the number of lysosomes, which it was associated with severe metabolic dysfunction because it prevents organelles and defective structures from being recycled.

In addition to changes in the number of mucous substances in the mucosal cells, there were also changes in the morphology of the gill rakers. This is in agreement with the finding of Valim (2017), who observed the loss of the integrity of the gill rakers, indicating that it is characterized by the detachment of superficial cells.

It should be noted that flavonoids found in plants demonstrated genotoxic effect at high concentrations (Ferguson, 2001; Pereira et al., 2006). The caffeic acid found in extracts of *B. dracunculifolia* (Resende et al., 2007; Munari et al., 2008) induced DNA damage in rats (Pereira et al., 2006). In this regard, we believe that the parameters affected in curimatás may have occurred by components that are the same or similar to those previously mentioned.

CONCLUSIONS

During feeding with the extract of *B. dracunculifolia*, ration compounds dissociated and after reaching the gills and the gill rakers, alters their morphology, causing mucus and morphological changes. Therefore, the gill and gill rakers of *P. lineatus* are sensitive indicator in determining the toxic effects of *B. dracunculifolia* extract.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support and to Mr. Gerson de Mello Souza for technical support.

REFERENCES

- Alberto A, Camargo AFM, Verani JR, Costa OFT, Fernandes MN (2005). Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61(2): 247-55.
- Ayotunde EO, Ofem BO (2008). Acute and chronic toxicity of pawpaw (*Carica papaya*) seed powder to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linne 1757). *Afr. J. Biotechnol.* 7(13): 2265-2274
- Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Whali T (1999). Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22(1):25-34.
- Costa RJ, Diniz A, Mantovani MS, Jordão BQ (2008). *In vitro* study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. *J. Ethnopharmacol.* 118(1): 86-93.
- dos Santos DA, Fukui MDJ, Nanayakkara ND, Khan SI, Sousa JPB, Bastos JK Quintão NL (2010). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. *J. Ethnopharmacol.* 127(2): 543-550.
- Ferguson LR (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 475(1-2): 89-111.
- Fernandes MN, Mazon AF (2003). Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val., A. L., KAPOOR, B. G. (Eds.), *Fish Adaptations*. Science Publishers, Inc. Enfield, USA. pp. 203-231.
- Figueiredo-Rinhel AS, Kabeya LM, Bueno PC, Jorge-Tiossi RF, Azzolini AE, Bastos JK, Lucisano-Valim YM (2013). Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. *J. Ethnopharmacol.* 150(2): 655-664.
- Gernhöfer M, Pawert M, Schramm M, Müller E, Triebkorn R (2001). Ultrastructural Biomarkers as Tools to Characterize the Health Status of Fish in Contaminated Streams. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover.* 8(2-4): 241-260.
- Gomori G (1950). An improved histochemical technic for acid phosphatase. *Stain Technol.* 25(2): 81-85.
- Grance SRM, Teixeira MA, Leite RS, Guimarães EB, Siqueira JM, Filii WFO, Vasconcelos SBS, Vieira MC (2008). *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. *J. Ethnopharmacol.* 117(1): 28-33.
- Gustavo M, Paschoaletti T, Sadauskas-henrique H, Sakuragui M, Batista J, Fernandes MN (2014). The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. *Sci. Total. Environ.* 498: 293-306.
- Joly AB (1987). *Botânica. Introdução à taxonomia vegetal*. 8 ed.; São Paulo: Editora Nacional, 777pp.
- Leitão DPS, Da Silva Filho AA, Polizello ACM, Bastos JK, Spadaro ACC (2004). Comparative Evolution OF IN VITRO Barsilian green propolis na *Baccharis dracunculifolia* extratricsa on cariogenic fator os *Streptococcus mutans*. *Biol. Pharm. Bull.* 27(11): 1834-1839.
- Métodos de preparação da tintura mãe. Available online: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/cp3_8_2010/x_metodos_preparacao_tintura.pdf/ (accessed 12 March 2018).
- Missima F, Da Silva Filho AA, Nunes GA, Bueno PCP, Sousa JPB, Bastos JK, Sforcini JM (2007). Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. *J. Pharm. Pharmacol.* 59(3): 463-468.
- Munari CC, Resende FA, Alves JM, De Sousa JPB, Bastos JK, Tavares DC (2008). Mutagenicity and antimutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* extract in chromosomal aberration assays in Chinese hamster ovary cells. *Plant. Med.* 74(11):1363-1367.
- Park YK, Alencar SM, Aguiar CL (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 50(9): 2502- 2506.
- Pereira BF, Alves AL, Senhorini JA, Scalize PH, Augusto F, Figueiredo T, Pitol L, Caetano FH (2017). Quantifying structural modifications of gills of two fish species *Astyanax altiparanae* (Lambari) and *Prochilodus lineatus* (Curimatá) after exposure to biodegradable detergents in urban lake water. *J Toxicol Environ Health A.* 80(6): 338-348
- Pereira P, De Oliveira PA, Ardenghi P, Rotta L, Henriques JAP, Picada JN (2006). Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 99(5): 374-378.
- Poleksic V, Mitrovic-Tutundzic V (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Muller R., Lloyd R., editors. *Sblethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Oxford, Fishing News Books; Osney, England. pp.339-352.
- Resende FA, Alves JM, Munari CC, Senedese JM, Sousa JPB, Bastos JK, Tavares DC (2007). Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 634(1-2): 112-118.
- Rodrigues CRF, Dias JH, Semedo JG, da Silva J, Ferraz ABF, Picada JN (2009). Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (D.C.). *J. Ethnopharmacol.* 124(2): 321-324.
- Schwaiger J, Wanke R, Adam S, Pawert M, Honnen W, Triebkorn R (1997). The Use of Histopathological Indicators to Evaluate Contaminant- Related Stress in Fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover.* 6(1): 75-86.
- Sforcini JM, Sousa JPB, Filho AA, Bastos JK, Búfalo MC, Tonuci LRS (2012). *Baccharis dracunculifolia*: Uma das principais fontes vegetais da propolis brasileira. Fundação Editora da UNESP, São Paulo, Brazil, 103pp.
- Simões-Ambrosio LMC, Gregorio LE, Sousa JPB, Figueiredo-Rinhel ASG, Azzolini A, Bastos JK, Lucisano-Valim YM (2010). The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia.* 81(8): 1102-1108.
- Simões-Pires CA, Queiroz EF, Henriques AT, Hostettmann K (2005). Isolation, and On-line Identification of Anti- oxidant Compounds from

- Three *Baccharis* Species by HPLC-UV-MS / MS with Post-column Derivatisation. *Phytochem. Anal.* 16(5): 307-314.
- Taiwo VO, Olukunle OA, Ozor IC, Oyejobi AT (2008). Consumption of Aqueous Extract of Raw Aloe Vera Leaves: Histopathological and Biochemical Studies in Rat and Tilapia. *Group.* 8(3): 169-178.
- Valim JRT (2017). Análise morfofisiológica de rastros branquiais e fígado de *Prochilodus lineatus* (Curimbatá) após exposição a alquilbenzeno sulfonato linear (LAS). Dissertação. Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” – UNESP, São Paulo.
- Verdi LG, Brighente IMC, Pizzolatti MG (2005). Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim. Nova.* 28(1): 85-94.
- Winkaler EU, Santos TRM, Machado-Neto JG, Martinez CBR (2007). Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physio. (Part C).* 145(2): 236-244

Cite this article as:

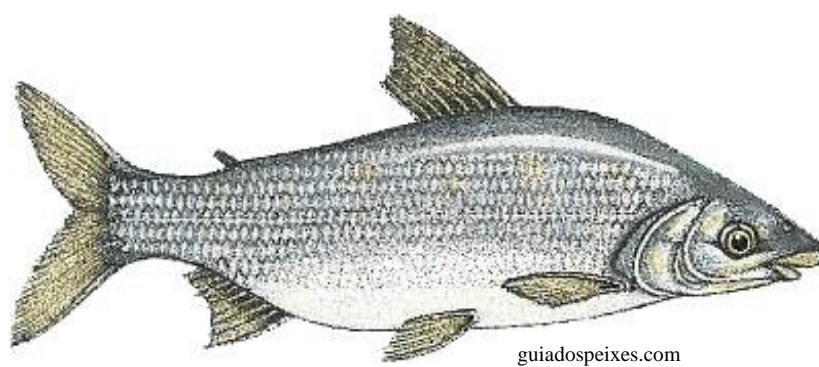
Oliveira-Lima J, Pereira BF, Valim JRT, Gazoni T, Pitol DL, Caetano FH (2018). Morphological changes in gills and gill rakers of *Prochilodus lineatus* treated with *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *Acad. J. Environ. Sci.* 6(7): 156-164.

Submit your manuscript at:

<http://www.academiapublishing.org/ajes>

ARTIGO 3

Analysis of cardiac stomach and medial portion of the posterior intestine of *Prochilodus lineatus* fed with extract of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae)



guiadospeixes.com

CURIMBATÁ (*Prochilodus lineatus*)



Research Paper

Analysis of cardiac stomach and medial portion of the posterior intestine of *Prochilodus lineatus* fed with extract of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae)

Accepted 16th July, 2018

ABSTRACT

The leaves extract of *Baccharis dracunculifolia* is used in the treatment of diverse disorders, mainly digestive problems. This study aimed to use the histochemistry and morphometry of cardiac stomach and posterior intestine of *Prochilodus lineatus* to evaluate the effects of ingestion of the alcoholic extract of *B. dracunculifolia*. Sixty individuals were used, of which 32 were divided into two experimental groups in duplicate. These were randomly distributed in four 70-L aquariums (eight animals each). Both groups were fed for a maximum period of 21 days: control group (fed with regular commercial feed) and *B. dracunculifolia* group (fed with the feed enriched with extract of *B. dracunculifolia*). After treatment, 6 animals per aquarium were collected at 14 and 21 days and submitted to routine laboratory procedures. Histochemical and histomorphometric changes were evaluated with ImageJ® software. The results showed that the extract of *B. dracunculifolia*, added in the diet of curimatás, can affect the morphometry of the villi of the middle portion of posterior gut and cardiac stomach, as well as increase the secretion by the caliciform cells of the studied regions.

Key words: Asteraceae; *Prochilodus lineatus*, cardiac stomach, posterior intestine, histochemistry; morphometric.

Jefferson de Oliveira-Lima¹, Bruno Fiorelini Pereira², João Rodolfo Tuckumantel Valim, Thiago Gazoni¹, Dimitrios Leonardo Pitol³ and Flavio Henrique Caetano¹

¹Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil.

²Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB, Campus de Barreiras, Bahia, Brasil.

³Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo – USP, Campus de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brasil.

*Corresponding author. E-mail: brunofp22@hotmail.com.

INTRODUCTION

Phytotherapy is a common form of treatment of a variety of health conditions across the globe (Lewith, 2000). Some of these compounds have potentially harmful side effects: recent examples include the use of ephedra linked to cardiovascular problems (Andraws et al., 2005).

Medicinal plant according to ANVISA is any plant or parts of it that contain substances or classes of substances responsible for therapeutic action (Resolução – RDC n° 10, de 09 de março, Brasília, 2018). According to WHO (World Health Organization), 65 to 80% of the world's population, especially in developing countries, rely on herbal products to treat their diseases (Rahman and Singhal, 2002). The use of these herbs is most often done by adults to supplement the treatment of a chronic disease (bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ResumoExecutivoM

edNatPratComp11402052.pdf, 2018).

At present, we can find the commercialization of medicinal plants in free markets, popular markets, and other establishments in large and small Brazilian cities (Maciel and Constantin, 2002).

The uses of indiscriminate teas in children with hepatic, renal, or other diseases can pose serious consequences to their health without medical follow-up (Rang et al., 2007). The indiscriminate use of medicines and drug combinations increases the risk of mortality caused by the adverse effects and toxicity of these products (Wong, 2003).

The genus *Baccharis* includes more than 500 species, distributed from the United States to Argentina, with predominance in South America (Budel et al., 2005). *B. dracunculifolia* is traditionally used in the form of teas, to

combat gastric disorders and febrile conditions, besides being used in the treatment of wounds and inflammatory processes (Carvalho et al, 2011).

B. dracunculifolia is considered the main botanical source of green propolis, a product highly valued and commercialized in various pharmaceutical and cosmetic preparations, such as tablets, lozenges, dentifrices, lotions, facial creams, dyes, ointments, etc. (Bankova et al., 2000, Park et al., 2002).

Bacteriology, antimicrobial (Feronatto et al., 2007), analgesic, antispasmodic, sedative, and cytostatic (Lorenzi and Matos, 2002) properties have been found in the essential oils of *B. dracunculifolia*. Moreover, according to Caetano (2012), the species *B. dracunculifolia* has anti-inflammatory, anti-protozoal, anthelmintic, antioxidant, anticancer, anticariogenic, cytotoxic, mutagenic (in high concentrations) and cicatrizing potentials. The intestine is an organ involved in important physiological functions, being the place of food digestion and absorption of nutrients (Caballero et al., 2003). The intestinal mucosa is fundamental in the digestive, absorptive and metabolic processes in teleostean fish and the increase in villus length implies an increase of the surface area for greater absorption of available nutrients (Caspary, 1992). This study aims to describe the effects of the extract of *B. dracunculifolia* on the cardiac stomach and medial portion of the posterior intestine of *Prochilodus lineatus* using histological approaches, as well as possible effects on fish in case of industrial dumps from *B. dracunculifolia*.

MATERIALS AND METHODS

Specimens

The *P. lineatus* juveniles used in this experiment (60.7 ± 1.3 g and 8.0 ± 1.5 cm) were purchased from Piscicultura Polettini, Mogi Mirim/SP, Brazil and transported to the Histology Laboratory of UNESP, Campus Rio Claro, Sao Paulo, Brazil. The animals were previously acclimatized in polyethylene boxes (500 liters) with constant aeration and fed with appropriate commercial food (325 g of crude protein) once a day.

B. dracunculifolia leaves

The *B. dracunculifolia* leaves used in this experiment were collected from Rio Claro – SP, Brazil ($22^{\circ}22'30.0''S$ $47^{\circ}28'31.5''W$) and identified by Ms. Daniela de Oliveira, technician of “Herbário Rioclarense”. Exsiccates of the vegetal material was deposited and registered in the herbarium under number 58140. The nomenclature used herein is according to Joly (1987) and Dr. Marco Antonio Assis of the Botany Department of UNESP, campus Rio Claro.

Ethanolic extract preparation

The leaf compound extraction followed the protocol established by ANVISA - (Brazilian Health Surveillance Agency) for the *Preparation mother tinctures from dry plants through maceration* (http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/cp38_2010/x_metodos_preparacao_tintura.pdf/). For each treatment group, 1.5 mL (amount ingested in treatment in folk medicine) of the extract was added to 1.2 g of commercial food (http://www.poytara.com.br/tropicais_diaadia.html). The material was kept in microbiological incubator at 37°C for alcohol evaporation and stored in amber jars.

Control and treatment groups

Sixty individuals were used, of which 32 were divided into two experimental groups in duplicate: Control group and *B. dracunculifolia* Treated group. The animals were randomly distributed into four 70-L aquarium (8 animals each) with air pumps, cooled with thermostat and covered with UV blocking material to reduce stress. Both groups were fed for a maximum of 21 days: Control group treated (with regular commercial food) and treated group (food added with *B. dracunculifolia* extract). The animals were collected 14 and 21 days after the experiment (21-day feeding period), 6 individuals per treatment were collected and anesthetized with benzocaine solution (0.1 g of benzocaine in 1 mL of ethanol for each 100 mL of deionized water) and euthanized according to the procedures established by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) – UNESP, Rio Claro, process 10/2017. The fish were kept in the semi-static system and the water physical and chemical parameters (ph, ammonia, hardness, and temperature) were measured at each collection.

Histological processing

After treatment, fragments of the cardiac stomach and medial portion of the posterior intestine were fixed in bouin. Subsequently, the material was buffered in sodium phosphate solution pH = 7.4, dehydrated in increasing concentrations of alcohols, included in Leica historesin and sectioned in the Leica RM2245 microtome. The sections with 5 µm thickness, cross-section, were subjected to the specific reactions and consecutively form the assembly of the slides.

Histomorphometric analysis of intestinal villi and portions of the cardiac stomach

For histomorphometric analysis, the slides of the cardiac stomach and the medial portion of the posterior intestine

were stained with hematoxylin-eosin (HE) reaction. For the medial portion of the posterior intestine, 10 villi were measured per animal, totaling 120 villi per treatment, from which the height and total height of the villi were measured, corresponding to the distance from the apex of the villi to the beginning of the muscular layer and apex of the villi to the end of the serosa, respectively. The width of the villi and the thickness of their epithelium were also measured. For the cardiac stomach, there were also 10 regions in each analysis totaling 120 regions in each treatment, which included the total height of the apex of the mucosa up to the beginning of the muscular layer, respectively. The thickness of the muscular layer and mucosa were analyzed using the program ImageJ®.

Mucus quantification

For analysis of mucosal cells, eight sections from each individual were subjected to Alcian Blue pH 1.0 reaction for the identification of mucus sulfated acid substances; Alcian Blue pH 2.5 was used for the identification of sulfated and carboxylated acidic mucus and mucus neutral substances, evidenced by the periodic acid method Schiff (PAS) according to Paulete and Beçak (1976). From each cross section, 5 images (area corresponding to every fraction of the cut) and mucus present were isolated using ImageJ® software.

Quantification of total proteins and macrophages

For detection of total proteins, eight sections, in cross-section, of the cardiac stomach and medial portion of the posterior intestine of each animal were submitted to Xylidine Ponceau reaction according to Mello and Vidal (1980). For detection of macrophages, the same amount of cut was submitted to reaction (Gomori, 1949). For the analysis of total proteins of the medial portion of the posterior intestine, from each cross-section, 5 images were obtained (area corresponding to each fraction of the total cut) and the total proteins present were isolated using ImageJ® software. The macrophages of the cardiac stomach and the medial portion of the posterior intestine were analyzed qualitatively and as the total proteins of the cardiac stomach.

Statistical analyzes

The data for analyzes were submitted to the Shapiro-Wilk test to verify the normality of the data and later to the ANOVA / Tukey test, while the parametric and non-parametric data to the Kruskal-Wallis / Dunn test, considering the significance of $p < 0, 05$. Statistical tests were performed with Biostat 5.0® software and GraphPad Prism 5.0® software.

RESULTS

Intestinal histomorphometry

The water quality parameters (pH, ammonia, hardness, and temperature) were kept within acceptable levels by the species as described by Pereira et al. (2014). No behavioral change was observed between the control and treated groups.

The histomorphometric analysis of the cardiac stomach and medial portion of the posterior intestine demonstrated that at the 14 day, there was a significant increase in total villus height, villus height and villus width of the medial portion of the posterior intestine, and total height and thickness of the cardiac stomach muscle layer (Figure 1). After 21 days, a significant reduction in the height and width of the villi in the medial portion of the posterior intestine was observed (Table 1).

Mucus

It was observed a variation in the intensity secretion of mucus by caliciform cells (Figure 2). In the animals fed for 14 days, there was a significant increase of it in the medial portion of the posterior intestine (Figure 2a and b), whereas the cardiac stomach showed an increase, but not significant (Figure 3). At 21 day, there was a significant reduction in the medial portion of the posterior intestine (Figure 2c and d) and for the cardiac stomach, the increase was not significant with $p < 0.05$ for the ANOVA / Tukey test. No secretory labeling of acid mucus (AB pH 1.0; 2.5) was found in the cardiac stomach (Table 2).

Total proteins and macrophages

Total proteins in the medial portion of the posterior gut reduced ($p < 0.05$) after 21 days (ANOVA / Tukey test). In the cardiac stomach, there was an increase in both times. The results of the number of macrophages in the medial portion of the posterior intestine were not significant. In the cardiac stomach, there was an increase in the number of macrophages during 14 and 21 days of treatment (Figure 4). Lymphocytes were also observed in the villi of the mid portion of the posterior intestine.

DISCUSSION

Histomorphometric results was explained by Junqueira and Carneiro (2005), who postulate that the larger the intestinal villus size, the greater the nutrients absorption capacity. This confirms the results obtained the present study since the reduction of villi was observed during 21 days. This can be attributed to the decrease in the area of nutrient absorption, resulting from the addition of *B. dracunculifolia*.

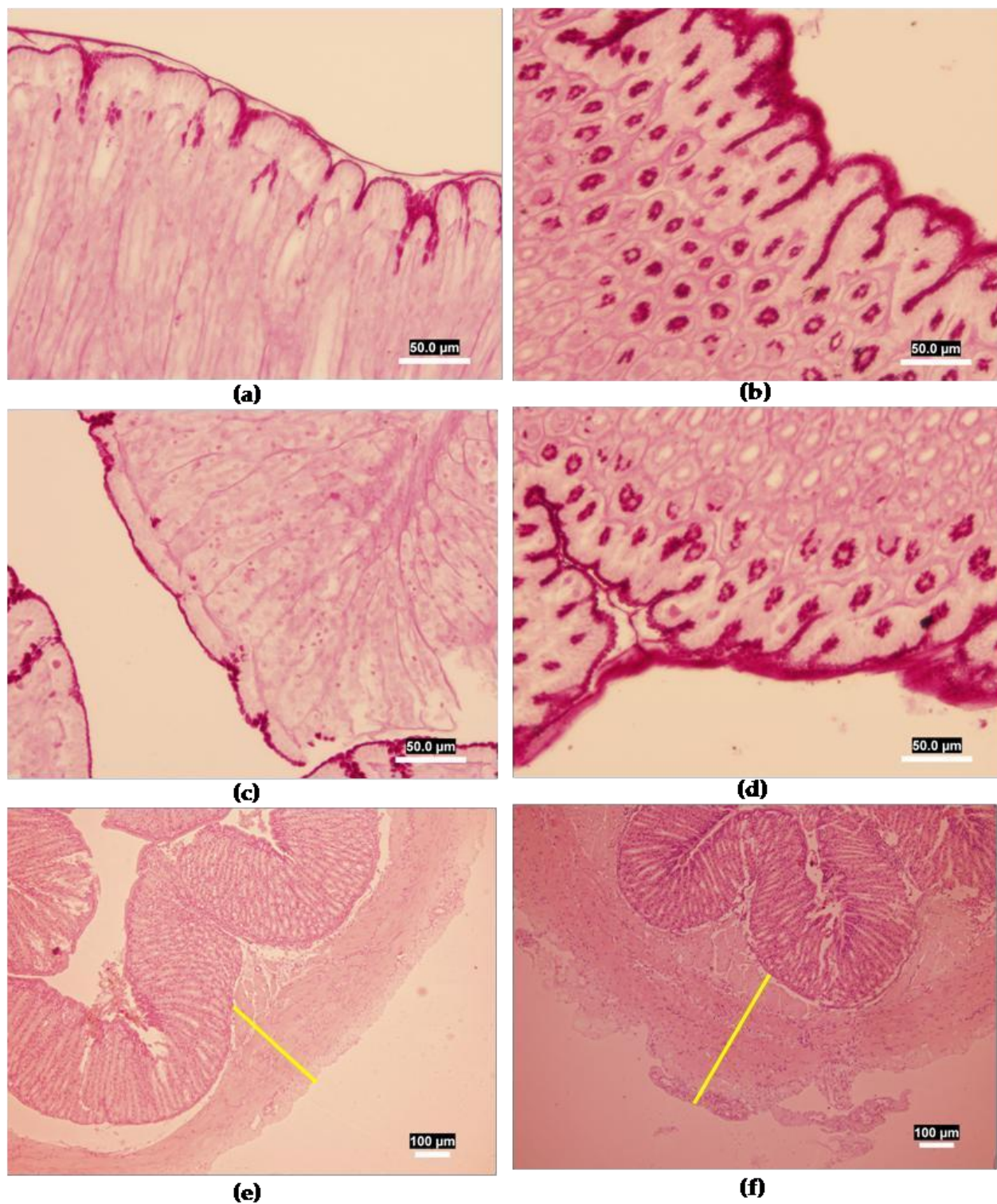


Figure 1: Changes in the levels of neutral mucus is morphometry of the cardiac stomach of *P. lineatus*. (A) Control 14 days. (B) Treated 14 days. (C) Control 21 days. (D) Treated 21 days. PAS technique. (E) Control 14 days. (F) Treated 14 days. Note the increase in mucus during 14 and 21 days of treatment and increase of the muscular layer in 14 days of treatment. HE technique.

Caliciform cells proliferate to increase mucus production when aggression due to pathogens occurs (Schwarz et al,

2011). This study demonstrated the increase in the area occupied by the mucus after 14 days of feeding. This

Table 1: Means in μm of the morphometry of the medial portion of the posterior intestine and cardiac stomach. Averages, standard deviation ($S \pm$) and significance (*).

Histomorphometric	Control 14 days	Treated 14 days	Control 21 days	Treated 21 days
Posterior intestine				
Total villus height	601.4 \pm 24.80	731.4 \pm 21.77*	720.9 \pm 27.14	635.8 \pm 17.79
Height of villi	500.7 \pm 20.94	611.2 \pm 20.85*	615.0 \pm 26.61	512.6 \pm 15.59*
Width of villi	132.0 \pm 6.509	157.0 \pm 6.360*	158.4 \pm 7.843	120.9 \pm 4.019*
Thickness of villus epithelium	65.24 \pm 3.999	69.37 \pm 2.687	67.06 \pm 3.619	56.71 \pm 1.874
Cardiac stomach				
Thickness of the mucosa	333.8 \pm 39.56	329.9 \pm 36.90	270.3 \pm 26.07	313.7 \pm 20.18
Thickness of muscle layer	348.6 \pm 16.92	592.2 \pm 47.11*	360.9 \pm 11.97	441.3 \pm 42.93
Total height	687.5 \pm 37.00	888.9 \pm 38.20*	659.5 \pm 32.83	768.0 \pm 48.86

Table 2: Mean in μm of the area occupied by glycoproteins and total proteins of the medial portion of the posterior intestine and cardiac stomach of *P. lineatus*. Averages, standard deviation (\pm) and significance (*).

Histochemistry	Control 14 days	Treated 14 days	Control 21 days	Treated 21 days
Posterior intestine				
Acid	9.120 \pm 0.9153	18.48 \pm 2.458*	13.28 \pm 1,452	7.640 \pm 1.923
Sulphated acid	8.320 \pm 1.092	23.16 \pm 3.065*	14.20 \pm 1,998	8.320 \pm 1.876
Neutral	798000 \pm 86810	1257000 \pm 157900*	1021000 \pm 105200	583600 \pm 59330*
Total Proteins	2576000 \pm 256900	2910000 \pm 346300	3019000 \pm 370200	1816000 \pm 309200*
Cardiac stomach				
Neutral	4714000 \pm 564300	5225000 \pm 802700	4298000 \pm 796400	4817000 \pm 688500
Acid	-	-	-	-
Sulphated acid	-	-	-	-

suggests that the increasing mucus secretion avoid the absorption of toxic substances present in *B. dracunculifolia* extract. The glycoproteins secreted by caliciform cells have important functions in protection against infections, because it prevents the contact of microorganisms with epithelial cells and has a bactericidal effect due to the presence of lysozyme and low molecular weight fatty acids (Noga, 1996).

However, when fed for 21 days, a significant secretion reduction was observed, suggesting that *B. dracunculifolia* may compromise the intestinal epithelium, since the release of these polysaccharides protects fish health, by acting on the immune system and preventing colonization of pathogenic bacteria in the gastrointestinal tract (Spring, 2001; Refstie et al., 2010).

The Xylidine Ponceau technique demonstrated the reduction in total protein levels. This reduction must have occurred due to the action of *B. dracunculifolia* on glycoproteins in the gut, confirming its toxicity. According to Kopoor et al. (2005), intestinal digestion depends on the secretion of glycoprotein substances from goblet cells, the

proteolytic action of pancreatic secretion and also on intracellular digestion which is associated with the presence of gastric glands.

Other researchers also reported intestinal damage in fish fed with ingredients of plant origin, in rainbow trout, as soy consumption caused changes in the posterior intestine, with a decrease in height of the simple fold (Sørensen et al., 2011). Bureau et al. (1998) reported irregularities in the form of enterocytes, the presence of large vacuoles in the apical cytoplasm of enterocytes, among other changes in the intestinal epithelium of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* and *Oncorhynchus tshawytscha*), after the consumption of diets containing soybean meal and quinoa saponin.

When *Corydoras paleatus* was exposed to organophosphorus, the occurrence of alterations in the intestinal mucosa with disorganized villi, an inflammatory process and lipid vacuolization of enterocytes, were observed. In addition, epithelial cell necrosis, desquamation, lymphocyte infiltration and enterocyte hyperplasia were also observed. Such modifications were only described

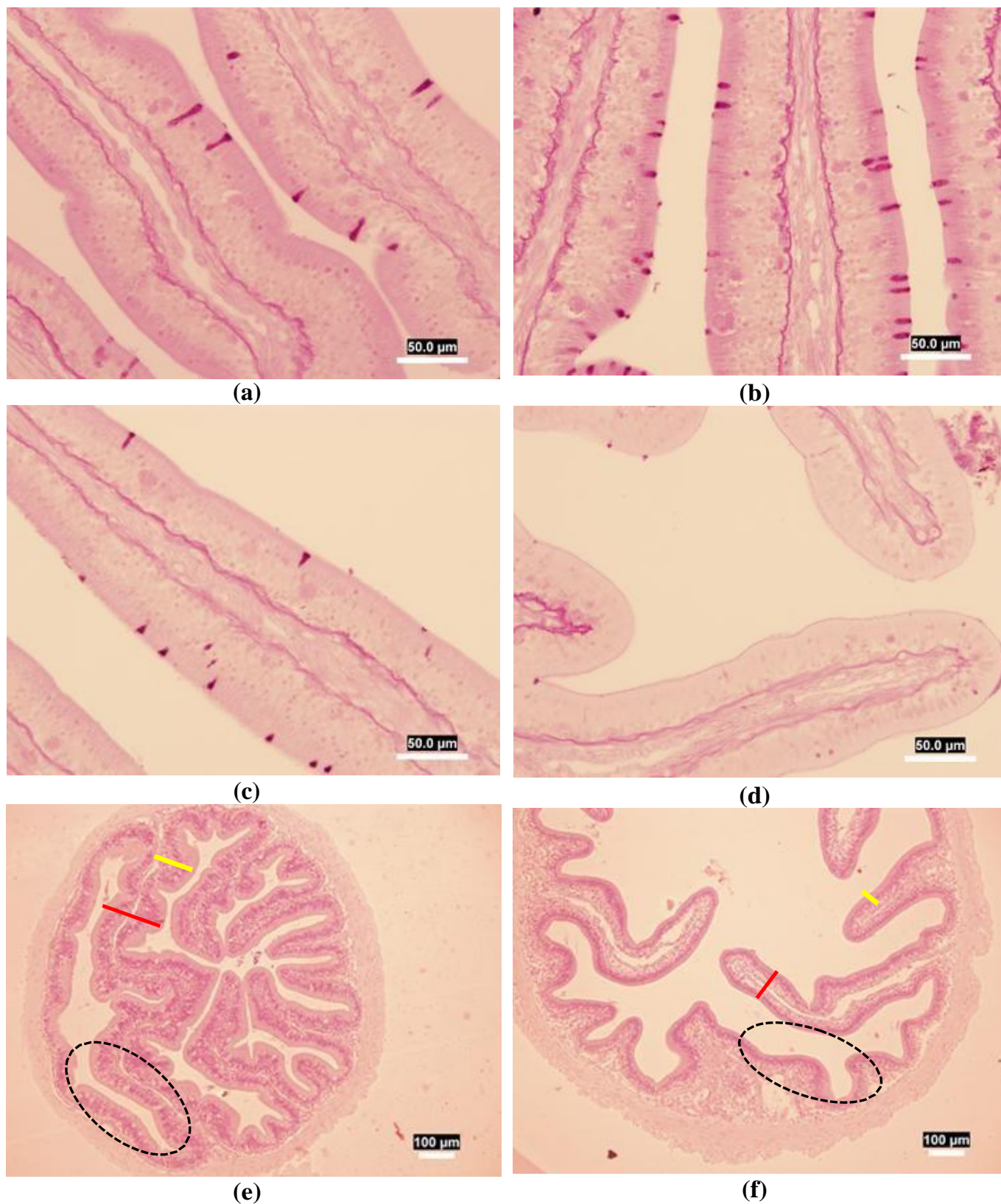


Figure 2: Changes in the neutral polysaccharide levels of the villi of the medial portion of the posterior gut of *P. lineatus*. (A) Control 14 days. (B) Treated 14 days. (C) Control 21 days. (D) Treated 21 days. Note the increase in treated animals for 14 days and a drastic reduction after 21 days of treatment. PAS technique. (E) Control 21 days. (F) Treated 21 days. Note the reduction in epithelial thickness (yellow dash) and villus width (red dash) and a decrease of caliciform cells (circle). HE technique.

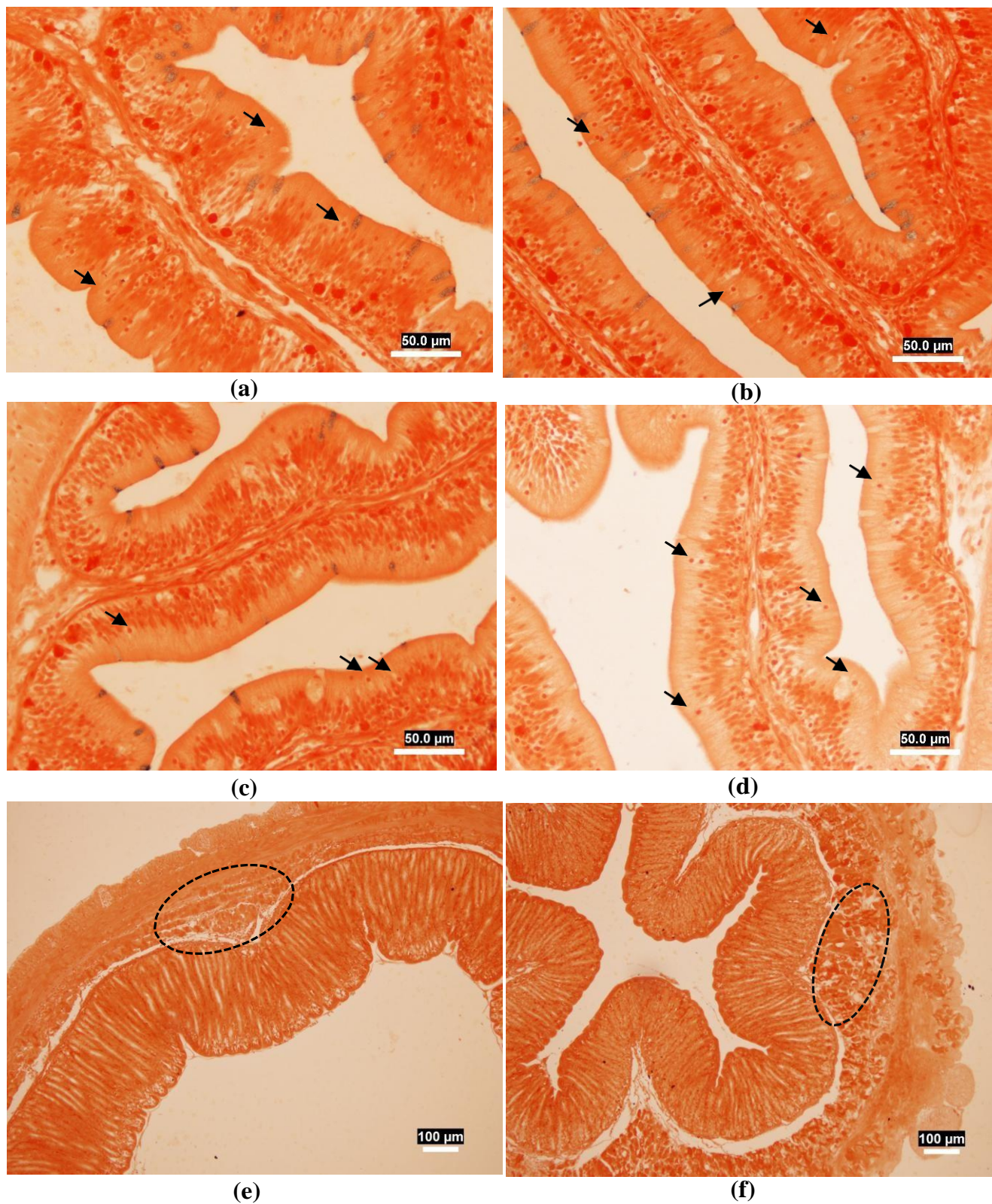


Figure 3: Changes in total protein levels of villi of the medial portion of the posterior gut of *P. lineatus*. (A) Control for 14 days. (B) Treated 14 days. (C) Control 21 days. (D) Treated 21 days. (E) Control 14 days: Portion of the cardiac stomach-areas with protein concentration (circle). (F) Treated 14 days: Portion of the cardiac stomach-areas with protein concentration (circle). Note the increase of protein concentration in treated animals in 14 days and a reduction after 21 days of treatment. Note the presence of lymphocytes (arrows). Xylidine Ponceau Technique.

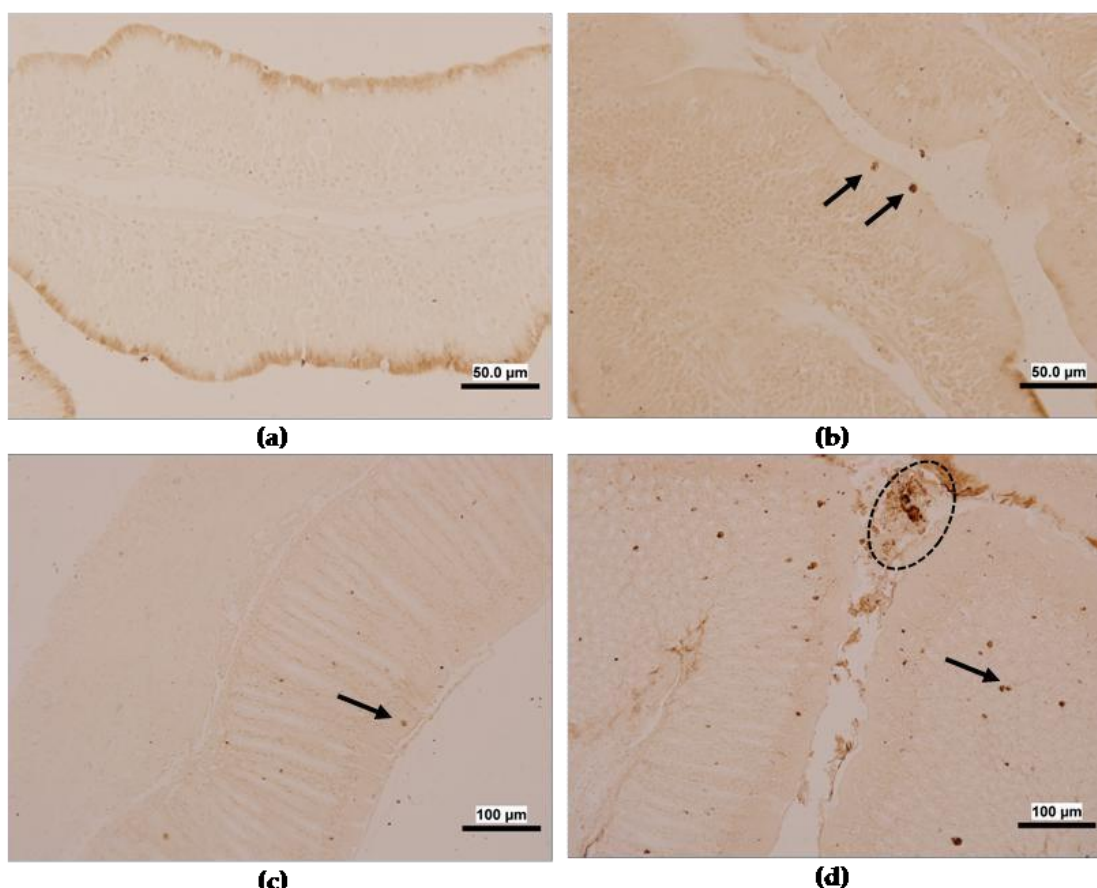


Figure 4: Changes in the number of macrophages of the cardiac stomach and medial portion of the posterior intestine of *P. lineatus*. (A) Control for 14 days. (B) Treated 14 days - Maghage (arrow). (C) Control 21 days. (D) Treated 21 days - macrophage (arrow) and mucus (circle). Note the increase in macrophages in the cardiac stomach after 21 days of treatment. Gomori technique.

after administration of the insecticide through contaminated food.

In this study, we observed an increase in the number of macrophages that is possibly due to the need to combat the toxic agents present in *B. dracunculifolia*. For *Platichthys flesus*, collected from disturbed environments, Köhler et al. (2002) observed that the liver had a decrease in glycogen, accumulation of cytoplasmic lipids, elevation in the number of apoptotic cells and large aggregates of macrophages. For lysosomes, it was found that both number increase and decrease due to lysosomal fusion. Pereira et al. (2014) evidenced that groups exposed to contaminants, presented mobilization of macrophages, however, the number of lysosomes decreased.

In addition, among the enterocytes of *P. lineatus*, the presence of lymphocytes was observed in this study, indicating a possible immunological defense cell barrier. Intraepithelial lymphocytes (cytotoxic T cells) may be involved in oral immunological tolerance and also in the immune response of the intestinal mucosa in fish (Eto et al., 2013). B lymphocytes appear late in the intestinal mucosa,

whereas the early onset of T lymphocytes in this organ suggests that it may be a site of extra-thymic differentiation of these leukocytes (Cain et al., 2000; Rombout et al., 2010).

Conclusions

The extract of *B. dracunculifolia* added in the diet of *P. lineatus* can affect the histomorphometry of the villi of the medial portion of posterior gut and cardiac stomach, as well as increase the secretion by the caliciform cells of the studied regions. In the case of contamination of the aquatic environment by industrial dumps linked to by-products produced by *B. dracunculifolia*, it will possibly result in toxicity to the species.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and to Mr. Gerson de Mello Souza for their technical support.

REFERENCES

- Andraws R, Chawla P, Brown DL (2005). Cardiovascular effects of *Ephedra alkaloids*: A comprehensive review. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 47(4): 217- 225.
- Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 31: 3-15.
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Política Nacional de medicina e Prática complementares. Available online: bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ResumoExecutivoMedNatPratCotmpl1402052.pdf (accessed 12 March 2018).
- Brasil, Ministério da Saúde: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 10, de 09 de março, Brasília. Available online: 189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao10_09_03_10.pdf (accessed 12 March 2018).
- Budel JM, Duarte MR, Santos CAM, Farago PV, Matzenbacher NI (2005). O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I - estudos botânicos. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15(3): 268-271.
- Bureau DP, Harris AM, Young cho, C (1998). The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 161(1-4):27-43.
- Caballero MJ, Izquierdo MS, Kjörsvik E, Socorro DJM, Fernandez AJ, Rosenlund G (2003). Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture.* 225(1-4): 325-340.
- Caetano FH (2012). O Estado da arte da *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) na fitopatologia. Lavras. 45 f. Monografia. Universidade Federal de Lavras, Brasil.
- Cain KD, Jones DR, Raison RL (2000). Characterization of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance. *Fish Shellfish Immunol.* 10(8): 651-666.
- Carvalho AA, Finger D, Machado CS, Schmidt EM, Da costa PM, Alves APNN, Morais TMF, De Queiroz MGR, Quináia SP, Da Rosa MR, Dos Santos JMT, Pessoa C, De Moraes MO, Costa-lotufo LV, Sawaya ACHF, Eberlin MN, Torres YR (2011). *In vivo* antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chem.* 126(3): 1239-1245.
- Caspary WF (1992). Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 55(Suppl 1):299-308.
- Eto SF, Claudiano GS, Fernandes DC, Marcusso PF, Silva VO, Saccom TFM, Salvador R (2013). Biologia do Sistema Imune dos Teleosteos. *Rev. Científica da Fac. Dom Bosco.* 1: 28-38.
- Ferronato R, Marchesan ED, Pezenti E, Bednarski F, Onofre SB (2007). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Rev. Bras. Pharmacognosia.* 17(2): 224-230.
- Gomori G (1949). An Improved Histochemical Technique for Acid Phosphatase. *Stain Technol.* 25(2): 81-85.
- Joly AB (1987). Botânica. Introdução à taxonomia vegetal. 8 ed.; São Paulo: Editora Nacional. 777pp.
- Junqueira LC, Carneiro J (2005). *Biologia celular.* 8ª ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 302pp.
- Köhler A, Wahl E, Söffker K (2002). Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L.)). *Environ. Toxicol. Chem.* 21(11): 2434-2444.
- Kopoor BG, Smith H, Verighina IA (1975). The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. Mar. Biol.* 13: 109-139.
- Lewith GT (2000). Complementary and alternative medicine: an educational, attitudinal and research challenge. *Med. J. Aust.* 172(3): 102-103.
- Lorenzi H, Matos FJ (2002). *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.* Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2: 484.
- Maciel CDG, Constantin J (2002). Misturas de flumioxazin com glyphosate e sulfosate para o manejo de plantas daninhas em citros. *Rev. Bras. Herbic.* 3: 109-116.
- Mello MLS, Vidal BC (1980). *Práticas de Biologia Celular.* Campinas. Editora: Edigard Blucher. 71pp.
- Métodos de preparação da tintura mãe. Available online: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/cp3_8_2010/x_metodos_preparacao_tintura.pdf/ (accessed 12 March 2018).
- Noga EJ (1996). *Fish disease: diagnosis and treatment.* 2ª ed.; St. Louis: Mosby Year Book. 367pp.
- Park YK, Alencar SM, Aguiar CL (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 50(9): 2502- 2506.
- Paulete J, Beçã W (1976) *Técnicas de Citologia e Histologia.* Livros Técnicos e Científicos, São Paulo. p. 2.
- Pereira BF, Alves AL, Senhorini JA, Rocha RCGA, Pitol DL, Caetano FH (2014). Effects of Biodegradable Detergents in the Accumulation of Lipofuscin (Age Pigment) in Gill and Liver of Two Neotropical Fish Species. *Int. J. Morphol.* 32: 773-781.
- Pereira BF, Alves RMS, Alves AL, Senhorini JA, Rocha RCGA, Scalize PH, Pitol DL, Caetano FH (2014). Effects of Biodegradable Detergents in Morphological Parameters of Liver in Two Neotropical Fish Species (*Prochilodus lineatus* and *Astyanax altiparanae*). *Microsc. Res.* 2(2): 39-49.
- Rahman SZ, Singhal KC (2002). Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. *Uppsala Rep.* 17: 1-4.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM (2007). *Farmacologia.* 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 848pp.
- Refstie S, Baeverfjord G, Seim RR, Elvebø O (2010). Effects of dietary yeasty cell wall β -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. *Aquaculture.* 305: 109-116.
- Rombout JH, Van de wal JW, Companjen A, Taverne N, Taverne-thiele JJ (2010). Characterization of T cell lineage marker in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 21(1): 35-46.
- Schwarz, KK, Furuya WM, Raquel M, Natali M, Gaudezi C, Alves P, Lima GD (2011). Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. *Rev. Bras. Zootec.* 40(12): 2634-2640.
- Sørensen M, Penn M, El-mowafi A, Storebakken T, Chunfang C, Øverland M, Krogdahl A (2011). Effect of stachyose, raffinose and soya-saponins supplementation on nutrient digestibility, digestive enzymes, gut morphology and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Aquaculture.* 314(1-4): 145–152.
- Spring P (2001). Yeast's secret wear on aids animal production. *Feed Mix.* 22: 32.
- Wong A (2003). Os usos inadequados e os efeitos adversos de medicamentos na prática clínica. *J. Pediatr.* 79(5): 379-380.

Cite this article as:

Oliveira-Lima J, Pereira BF, Valim JRT, Gazoni T, Pitol DL, Caetano FH (2018). Analysis of cardiac stomach and medial portion of the posterior intestine of *Prochilodus lineatus* fed with extract of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *Acad. J. Environ. Sci.* 6(7): 165-173.

Submit your manuscript at:

<http://www.academiapublishing.org/ajes>

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O extrato de *B. dracunculifolia* causou alterações hepáticas significativas na espécie. O Índice de Alteração Histológica (IAH) e o Valor Médio de Alteração (VMA) demonstraram que a ingestão do extrato causou danos amplamente distribuídos pelo fígado.
- Durante a alimentação com o extrato da *B. dracunculifolia*, compostos da ração dissociaram e possivelmente ao atingirem as brânquias e rastros branquiais alteraram suas morfofisiologia que incluíram alterações na produção de muco e patológicas, desta forma as brânquias de *P. lineatus* mostraram-se um indicador sensível para determinar os efeitos tóxicos do extrato da *B. dracunculifolia*.
- O extrato da *B. dracunculifolia* adicionados na alimentação de curimatás pode afetar a histomorfometria das vilosidades da porção mediana do intestino posterior e estômago cárdico, assim como aumentar a secreção por parte das células caliciformes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARELLANO, J.M. Histopathological alterations and induction of cytochrome P-450 1^a in the liver and gills of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **The Histochemical Journal**. v. 33, p. 663 – 674, 2001.
- ARKING, R. Biologia do Envelhecimento. **Editora FUNPEC**, Ribeirão Preto – SP, 2^a edição, 2008.
- AU, D.W.; CHEN, P.; POLLINO, C.A. Cytological Changes In Association With Ethoxyresorufin O-Deethylase Induction In Fish Upon Dietary Exposure To Benzo[a]Pyrene. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 23, p. 1043–1050, 2004.
- AZEVEDO, S.K.S.; SILVA, I.M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro – RJ, Brasil. **Acta botânica brasílica**. v. 20, p. 185 – 194. 2006.
- BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. **Editora UFSM**, Rio Grande do Sul – RS, 3^a edição, 2009.
- BANNI, M.; BOURAOU, Z.; GHEDIRA, J.; CLEARANDEAU, C.; JEBALI, J.; BOUSSETTA, H. Seasonal variation of oxidative stress biomarkers in clams *Ruditapes decussatus* sampled from Tunisian coastal areas. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 155, p. 119 – 128, 2009.
- BASTOS, E. M.A.F. **Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no Estado de Minas Gerais, Brasil**. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto, 2001.
- BOLELI, C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI M.; FURLAN RL.; GONZALES E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. **Editora FUNEP**, Jaboticabal – SP, p. 75 – 96, 2002.
- BOMBONATO, M.T.S.; ROCHEL, S.S.; VINCENTINI, C.A.; VICENTINI, I.B.F. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. v. 29, 81 – 85, 2007.
- CAJARAVILLE, M.P., CANCIO, I.; IBABE, A.; ORBEA, A. Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. **Microscopy Research and Technique**. v. 61, p. 191 – 202, 2003.
- CANCELLI, R.R.; EVADT, A. C. P.; BAUERMAN, S.G. Contribuição a Morfologia Polínica da Família Asteraceae Martino no Rio Grande do SUL– RS. **Pesquisas Botânica**. v. 58, p.347 – 374, 2007.
- CARRERA, R. C. ***Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas do Cerrado e Mata Atlântica**. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo – SP, 2007.

CASTRO, R.M.C. **Revisão Taxonômica da Família Prochilodontidae (Ostariophysii:Characiformes)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 1990.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M.J.; SCARABOTTI, P.A.; WUNDERLIN, D.A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**. v. 157, p. 3025–3033, 2009.

CECHIM, F.E. **Características morfológicas do epitélio intestinal e desempenho de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* suplementada com mananoligossacarídeo (mos)**. Dissertação de mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTEP, Paraná – PR, 2013.

EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste." **Physiology Reviews**. v. 85, p. 97–177, 2005.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, p. 369–394, 2006.

FERNANDES; M.N.; MORON, S.E. Respiração e Adaptações Respiratórias. In: BALDISSEROTTO; B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. *Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*. Editora FUNEP, Jaboticabal - São Paulo – SP, v. 1, 2014.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E.D.; BEDNARSKI, F.; RIBAS, T.T Z.; ONOFRE, S.B. Efeitos do óleo essencial produzido por *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae) sobre bactérias cariogênicas. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. v. 11, p. 15–18, 2006.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E.D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, p. 224–230, 2007.

FLORES-LOPES, F.; MALABARA, L.R. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambari *Astyanax jacuhiensis* (COPE, 1894) (Teleostei, Characidae) sob influência de efluentes petroquímicos. **Biociências**. v. 15, p. 166–72, 2007.

FLORES-LOPES, F.; THOMAZ, A.T. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. **Brazilian Journal of Biology**. v. 71, p. 179–88, 2011.

GELINSKI, J.M.L.N.; ROSA, J.C.D.; DUQUESNE, E.F.A.P.; BARATTO, C.M. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. e de seu composto ativo nerolidol em combinação ao EDTA ou lisozima. **Evidência**, v. 7, p. 131–144, 2007.

GODOY, M.P. Peixes do Brasil, sub-ordem Characoidei da bacia do rio Mogi- Guaçu.

Editora Franciscana, Piracicaba – São Paulo, v. 4, 1975.

GOMORI, G. An Improved Histochemical Technique for Acid Phosphatase. **Stain Technology**. v. 25, p. 81–85, 1949.

HEATH, A.G. Water pollution and fish physiology. **Editors Lewis Publishers**, Boca Raton, 1995.

JOBLING, M. Environmental biology of fishes. Fish and Fisheries Series 16. **Editors London: Chapman & Hall**, 455p, 1995.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. Técnicas básicas de citologia e histologia. **Editora Livraria Editora Santos**, São Paulo – SP, 1ª edição, 1983.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. **Editora Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro – RJ, 9ª edição, 2012.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. **Editora Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro – RJ, 12ª edição, 2013.

KISHI, S.; BAYLISS, P.E.; UCHIYAMA, J.; KOSHIMIZU, E.; QI, J.; NANJAPPA, P.; IMAMURA, S.; ISLAM, A.; NEUBERG, D.; AMSTERDAM, A.; ROBERTS, T.M. The Identification of Zebrafish Mutants Showing Alterations in Senescence-Associated Biomarkers. **PLOS Genetics**. v. 4, p. e1000152, 2008.

KLOPELL, F.C.; LEMOS, M.; SOUSA, J.P.; COMUNELLO, E.; MAISTRO, E.L.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung. C. Journal of Biosciences**. v. 62, p. 537–542, 2007.

LEONARDO, J.M.L.O.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; MOREIRA, H.L.M.; NATALI, M.R.M.; VOLSKI, T.; CAVICHIOLO, F. Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum**. v. 23, p. 863–870, 2001.

LOAYZA, I.; DAVID, A.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**. v. 38, p. 381–389, 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Editora Nova Odessa: Instituto Plantarum**, São Paulo – SP, 2ª edição, 2002.

MACHADO, M.R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e Saúde**. v. 1, p. 63–76, 1999.

MADUENHO, L.P.; MENDES, J.P.; MARTINEZ, C.B.R. Efeitos agudos do inseticida dimilin em parâmetros histológicos do peixe *Prochilodus lineatus*. In CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL. Caxambu. Anais... Caxambu. v. 8, p. 1–2, 2007.

MADUENHO, L.P.; MARTINEZ, C.B.R. Acute Effects of Diflubenzuron on the Neotropical

- Freshwater Fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 148, p. 265–272, 2008.
- MAGALHÃES, A.C. **Monografia Brasileira de Peixes Fluviais**. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo – SP. p. 1–262, 1931.
- MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and others irritants: A statistical review. **Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences**. v. 42, p. 630–648, 1985.
- MELLO M.L.S.; VIDAL, B.C. Práticas de Biologia Celular. **Editora: Edigard Blucher**, São Paulo, 1980.
- MENKE, A.L.; SPITSBERGEN, J.M.; WOLTERBEEK, A.P.; WOUTERSEN, R.A. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. **Toxicologic Pathology**. v. 39, 759–775, 2011.
- MORAES, G., ALMEIDA, L.C. Nutrição e aspectos funcionais da digestão de peixes. in: BALDISSEROTTO, B. Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. **Editora FUNEP**, Jaboticabal – SP, v. 1, 2014.
- MURRAY, H.M.; WRIGHT, G.M.; GOFF, G.P. A comparative histological and histochemical study of the stomach from three species of Pleuronectid, the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferruginea*, and the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Canadian Journal of Zoology**. v. 72, p. 1199–1210, 1994.
- ORFÃO, L.H. **Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2006.
- MASSIGNANI, J.J.; LEMOS, M.; MAISTRO, E.L.; SCHAPHAUSER, H.P.; JORGE, R.F.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Antiulcerogenic Activity of the Essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on Different Experimental Models in Rats. **Phytotherapy Research**. v. 23, p. 1355–1360, 2009.
- PARK, K.Y.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 2502–2506, 2002.
- PAULINO, M.G. Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleosteo, Prochilodontidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos – SP, 2011.
- PEARSE, A.G.E. Histochemistry: Theoretical and Applied. 4 ed. Churchill Livingstone: Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1985.
- PEIXOTO, S.A.N.; D’INCAO, F.; WASIELESKY, W.; COUSIN, J.C. Preliminary Identification and Quantification of the Age-Pigment Lipofuscin in the brain of *Farfantepenaeus paulensis* (CRUSTACEA: DECAPODA). **Brazilian Journal Biology**. v.

62, p. 871–876, 2002.

PEREIRA, B. F.; CAETANO, F. H. Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish. **Micron Oxford**. v. 40, p. 783–786, 2009.

PEREIRA, B.F.; ALVES, A.L.; SENHORINI, J.A.; ROCHA, R.C.G.A.; PITOL, D.L.; Caetano, F.H. (2014). Effects of Biodegradable Detergents in the Accumulation of Lipofuscin (Age Pigment) in Gill and Liver of Two Neotropical Fish Species. **International Journal Morphology**, v. 32, p. 773–781, 2014.

QUEIROGA, C. L.; FUKAI, A. E.; MARSAIOLI, A. Composition of the essential oil of vassoura. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.1, p.105– 109, 1990.

RADU, R.A.; HAN, Y.; BUI, T.V.; NUSINOWITZ, S.; BOK, D.; LICHTER, J.; WIDDER, K.; TRAVIS, G.H.; MATA, N.L. Reductions in Serum Vitamin A Arrest Accumulation of Toxic Retinal Fluorophores: A Potential Therapy for Treatment of Lipofuscin-Based Retinal Diseases. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. v. 46, 4393– 4401, 2005.

REDDY, P.B.; RAWAT, S.S. Assessment of aquatic pollution using histopathology in fish as a protocol. **International Research Journal of Environmental Sciences**. v. 2, p. 79–82, 2013.

RODRIGUES, V.E.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciências Agrotecnicas**. v. 25, p. 102–123, 2001.

RODRIGUES, S.S.; NAVARRO, R.D.; MENIN, E. Anatomia do tubo digestório de *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae) em relação ao seu hábito alimentar. **Bioscience Journal**. v. 24, p. 86–95, 2008.

RODRIGUES, S.S.; MENIN, E. Anatomia do tubo digestivo de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**. v. 21, p. 65–75, 2008.

RUST, M.B. Nutritional physiology. In: HALVER, J.E., HARDY, R.W. **Editors, Fish Nutrition**. Academic Press, Florida – USA, p. 368–446, 2002.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** v. 2, p. 33– 38, 2005.

SANTOS, D.C.M. **Toxidez aguda do zinco em *Lambaris Astyanax aff. bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa – MG, 2009.

SILVA, M.M.; SILVA, V.H. Envelhecimento: importante fator de risco para o câncer. **Arquivos Medicos do ABC**, v.30, p. 11– 18, 2005.

SILVA, R.G.D.A. **Análise da estrutura genética populacional do curimbatá (*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae) na região da bacia do Rio Grande, SP**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado de São Paulo – UNESP, São Paulo – SP,

2006.

SIMONATO, J.D.; ALBINATI, A.C.L.; MARTINEZ, C.B.R. Effects of the water-soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 76, p. 505– 511. 2006.

SCBUTT, F.; BERGMANN, M.; HOLZ, F.G; KOPITZ, J. Proteins Modified By Malondialdehyde, 4-Hydroxynonenal, Or Advanced Glycation End Products In Lipofuscin Of Human Retinal Pigment Epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 44, p. 3663– 3668, 2003.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An Atlas of fish histology: Normal and pathological features. **Editors Kodanska**, Tóquio – Japão, 2^a edição, 1995.

TREVISAN, M.M.W. **Abordagem Fitoquímica de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae)**. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade Paranaense – UNIPAR, Paraná – PR, 2007.

VALIM, J. R. T. **Análise morfofisiologia de rastros branquiais e fígado de *Prochilodus lineatus* (Curimbatá) após exposição a alquilbenzeno sulfonato linear (LAS)**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro – SP, 2016.

VASCHENKO, M.A. ZHADAN, P.M.; AMININ, D.L.; ALMYASHOVA, T.N. Lipofuscin-Like Pigment in Gonads of Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius* as a Potential Biomarker of Marine Pollution: A Field Study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 62, p. 599–613, 2011.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. O gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**. v. 28, p. 85– 94, 2005.

VICENTINI, C.A.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I.B.; BOMBONATO, M.T.S.; BERTOLUCCI, B.; LIMA, S.G.; SANTOS, A.S. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Morphology**. v. 23, p.211–216, 2005.

7. ANEXOS

7.1. Decisão do Comitê de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAL
CEUA – IB – UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 10/2017

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Biologia
Data de Registro CEUA: 06.04.2017	
CERTIFICADO	
<p>Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Ação do extrato alcoólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Asteraceae) na recuperação de Hepatócitos de peixes <i>Prochilodus lineatus</i> (curimbatá)", protocolo nº 2927, sob responsabilidade de Jefferson de Oliveira Lima (Pesquisador Responsável) e Flávio Henrique Caetano (Orientador) que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).</p>	

Colaboradores: João Rodolfo Tuckumantel Valim	
A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua 32º reunião ordinária , realizada em 07.06.2017 .	
<input checked="" type="checkbox"/>	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
<input type="checkbox"/>	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
<input type="checkbox"/>	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
<input type="checkbox"/>	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
<input type="checkbox"/>	Não Aprovou .
<input type="checkbox"/>	Retirou , devido à permanência das pendências.

Vigência da autorização: 01/08/2017 a 03/03/2019	
Finalidade: <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica	
Espécie/linhagem/raça: Prochilodus lineatus (Curimbatá pisces) Número de animais: 112	
Peso: 20 g Idade: 5 meses Sexo: não informado	
Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): Piscicultura Poletini – Município de Mogi Mirim.	

Objetivo Acadêmico:	<input type="checkbox"/> TCC
	<input checked="" type="checkbox"/> Mestrado
	<input type="checkbox"/> Doutorado
	<input type="checkbox"/> Outros – (Iniciação Científica)
	<input type="checkbox"/> Pós- Graduação

Rio Claro, 07/06/2017

Prof. Dr. José Paulo Leite Guadanucci
Coordenador

7.2. Análise química da água utilizada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"



INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS E CIÊNCIAS

EXATAS

Laboratório de Hidrogeologia e Hidrogeoquímica – H₂L

RELATÓRIO DE ANÁLISES QUÍMICAS

Interessado: Prof. Dr. Flavio Henrique Caetano

Material Entregue Declarado: Água

Natureza do Trabalho: Diversas Determinações

Referência: 03 amostras entregues por Rebeca, abaixo identificadas

RESULTADOS:

H ₂ L	Amostra	Temp.	Cond.	pH	Alcalinidade	
No.	Identif.	°C	µS/cm		HCO ₃ ⁻	CO ₃ ²⁻
					mg/L	mg/L
6594	DZ	25	339	8,15	131	ND
6595	DI	25	399	8,38	145	15,2
6596	Controle	25	412	8,05	103	ND

H ₂ L	Amostra	F-	Cl-	NO ₂ -	NO ₃ -	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	C ₂ O ₄ ²⁻	Acetato	Br -
No.	Identif.	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
6594	DZ	0,19	13,5	0,37	41,8	2,57	6,91	< 0,10	3,13	< 0,030
6595	DI	0,24	11,9	0,45	45,7	3,70	13,7	< 0,10	3,23	< 0,030
6596	Controle	0,17	44,2	0,45	49,8	3,77	6,40	< 0,10	3,81	< 0,030

H ₂ L	Amostra	Li	Na	NH ₄	K	Al	Ba	Be	Ca
No.	Identif.	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
6594	DZ	< 0,010	42,8	< 0,050	3,06	0,052	0,051	< 0,005	24,8
6595	DI	< 0,010	52,2	< 0,050	2,91	0,080	0,063	< 0,005	29,1

6596	Controle	< 0,010	58,4	< 0,050	3,28	0,017	0,057	< 0,005	22,2
------	----------	------------	------	------------	------	-------	-------	------------	------

H2L No.	Amostra Identif.	Cd mg/L	Co mg/L	Cr mg/L	Cu mg/L	Fe mg/L	Mg mg/L	Mn mg/L
6594	DZ	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	< 0,005	4,05	< 0,001
6595	DI	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	< 0,005	4,68	< 0,001
6596	Controle	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	< 0,005	3,78	< 0,001

H2L No.	Amostra Identif.	Mo mg/L	Ni mg/L	P mg/L	Pb mg/L	Si mg/L	Sn mg/L	Sr mg/L	V mg/L	Zn mg/L
6594	DZ	< 0,005	< 0,003	1,64	< 0,005	0,43	< 0,005	0,11	0,014	0,009
6595	DI	< 0,005	< 0,003	2,07	< 0,005	0,82	< 0,005	0,13	0,016	0,007
6596	Controle	< 0,005	< 0,003	2,24	< 0,005	0,63	< 0,005	0,098	0,016	0,010

ND: valor não detectado

- O Laboratório de Hidrogeologia e Hidrogeoquímica foi proficiente nos Programas de Ensaio de Proficiência PEP 005/2011 e PEP 006/2011 para os analitos Ca, Pb, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Ni, Sb, Al, Ba, Mo, Sn, Li, Sr, Cl, F, SO₄, NO₃, P_{total}, NO₂+NO₃, Dureza Total. Os Programas de Ensaio de Proficiência foram organizados pelo CETIND – Centro de Tecnologia Pedro Ribeiro (FIEB-SENAI) Provedor de Ensaio de Proficiência Habilitado pela ANVISA.

- Os cátions Na, K, Li, NH₄ e os ânions acetato e oxalato foram analisados por Cromatografia Iônica (IC).

Parâmetro Analítico	Método Analítico
Alumínio, Bário, Berílio, Cálcio, Cádmiu, Cobalto, Crômio, Cobre, Ferro, Magnésio, Manganês, Molibdênio, Níquel, Fósforo, Chumbo, Silício, Estanho, Estrôncio, Vanádio, Zinco.	SMEWW 3120B
Fluoreto, Cloreto, Nitrito, Nitrato, Fosfato, Sulfato, Brometo	EPA 300.0 – 300.1
pH (a 25°C)	SMEWW 4500 H B
Alcalinidade	SMEWW 2320B
Dureza	SMEWW 2340B
Cor	SMEWW 2120C
Turbidez	SMEWW 2130B
Condutividade	SMEWW 2510B

Parâmetro	LQ H ₂ L (mg L ⁻¹)	VMP		Parâmetro	LQ H ₂ L (mg L ⁻¹)	VMP	
		RDC 274 (mg L ⁻¹)	Portaria 2914 (mg L ⁻¹)			RDC 274 (mg L ⁻¹)	Portaria 2914 (mg L ⁻¹)
Cátions				Ânions			
Alumínio	0,005	---	0,2	Acetato	0,10	---	---
Bário	0,001	0,7	0,7	Bicarbonato	2,00	---	---
Cádmiu	0,005	0,003	0,005	Bromato	0,015	---	0,025
Cálcio	0,003	---	---	Brometo	0,030	---	---
Chumbo	0,005	0,010	0,01	Carbonato	2,00	---	---
Cobalto	0,003	---	---	Cloreto	0,010	---	250
Cobre	0,004	1	2	Clorito	0,015	---	0,2
Cromo	0,003	0,05	0,05	Fluoreto	0,010	---	1,5
Estrôncio	0,005	---	---	Fosfato	0,040	---	---
Ferro	0,005	---	0,3	Nitrato	0,040	50	10*
Lítio	0,010	---	---	Nitrito	0,020	0,02	1*
Magnésio	0,002	---	---	Oxalato	0,10	---	---
Manganês	0,001	0,5	0,1	Sulfato	0,020	---	250
Níquel	0,003	0,02	---				
Potássio	0,030	---	---				
Silício	0,06	---	---				
Sódio	0,015	---	200				
Vanádio	0,003	---	---				
Zinco	0,005	---	5				

Observações: * Calculado como N; VMP – valor máximo permitido; LQ – limite de quantificação

Quím. Responsável: MSc. Mirtis I. Ariza Malagutti - CRQ: Pr. 23.478/81

Rio Claro, 11 de maio de 2014.

MSc. Mirtis Irene Ariza Malagutti

7.3. Protocolo das técnicas

- Hematoxilina e Eosina: segundo Paulete & Beçak (1976), a técnica é composta de dois reagentes principais; a hematoxilina, que possui características basófilas, cora o núcleo da célula de azul, e a eosina, com características acidófilas, cora o citoplasma da célula de rosa. Na realização da técnica, as lâminas foram deixadas em água destilada por 1 minuto, depois reagiram com hematoxilina por 10 minutos, então reagiram com água por 4 minutos, foram lavadas em água corrente, imersas em eosina por 5 minutos e por fim, lavadas em água corrente.
- Azul de toluidina: Segundo Junqueira & Junqueira (1983), o método cora estruturas ácidas das células (RNA, DNA e mucopolissacarídeos), formando ligações eletrostáticas com os radicais ácidos nos tecidos. Na realização da técnica as lâminas foram imersas no corante pH 3.5 pré-aquecido a 60° C por 1 hora em estufa, depois lavadas em água destilada e imersas em solução aquosa de molibdato de sódio ou potássio.
- PAS (Ácido Periódico e Schiff): segundo Paulete & Beçak (1976), o ácido periódico quando atua nos polissacarídeos, oxida-os e dá lugar à formação de aldeídos, que podem ser detectados pelo reativo de Schiff. Para a realização desta técnica, as lâminas foram imersas em Ácido Periódico 0,4% por 10 minutos, lavadas em água destilada, colocadas no Reativo de Schiff por 1 hora no escuro, lavadas em 3 banhos de 1 minuto em água sulfurosa e em água corrente por 10 minutos.
- Picrosirius red: Segundo Pearse (1985), a técnica é utilizada para diferenciar fibras colágenas do tipo I, daquelas do tipo III. O colágeno tipo I é marcado de vermelho, e o tipo III, de verde. Na realização da técnica, as lâminas são coradas com Picrosirius durante 1 hora em estufa a 60°C (o corante já pré-aquecido a 60°C), depois lavadas em água destilada, coradas com hematoxilina por 8 minutos e lavadas em água corrente.
- Xylidine Ponceau: Mello e Vidal (1980), a técnica é utilizada para detectar radicais catiônicos totais, tais como aqueles presentes nas proteínas, possibilitando a identificação de corpos proteicos. A solução de Xylidine Ponceau foi preparada a 0,1% em ácido acético glacial a 2%, sendo o pH ajustado para 2,5. A coloração com XP foi realizada durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se de lavagem em solução de ácido acético 3% por 1 minuto e duas lavagens rápidas em água destilada, secagem ao ar e montagem em Entellan.

- Von Kossa: Segundo Pereira & Caetano (2009) este método depende da presença de fosfato e carbonato. Em tecidos animais, entretanto fosfatos insolúveis e carbonatos estão sempre perto do cálcio, com isso este teste é bastante específico para este elemento. Para a realização desta técnica as lâminas foram coradas por 20 minutos com nitrato de prata, lavadas rapidamente em água, reveladas com D-72 por 1 minuto, tratadas com tiosulfato 5% por 30 minutos, lavadas em água destilada e contracoradas com hematoxilina por 2 minutos.