

Análise tecidual e celular das brânquias de *Oreochromis niloticus* L. tratadas com extrato etanólico bruto e frações das folhas da pitanga (*Eugenia uniflora* L.) - Myrtaceae

FIUZA, T.S.¹; SILVA, P.C.²; PAULA, J.R.³; TRESVENZOL, L.M.F.³; SOUTO, M.E.D.¹; SABÓIA-MORAIS, S.M.T.¹

¹Instituto de Ciências Biológicas III *tatianaanatomia@gmail.com, ²Escola de Veterinária, ³Laboratório em Pesquisa de Produtos Naturais, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, s/n, Caixa Postal 131, CEP: 74001-970, Goiânia-Brasil

RESUMO: *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) é uma planta que ocorre no bioma Cerrado e é utilizada popularmente no tratamento de diarreias, inflamações, hiperglicemia e hipertensão. Estudos prévios revelaram atividade antimicrobiana da *E. uniflora in vitro*. Tendo em vista o uso popular, este trabalho objetivou avaliar as possíveis atividades celulares e teciduais sistêmicas do extrato bruto e das frações das folhas dessa planta em brânquias de *Oreochromis niloticus* L. (tilápia nilótica). Para isso, o extrato etanólico e as frações das folhas dessa planta foram administrados no peixe, por via oral, adicionadas à ração. Após um período de 24 horas, os peixes foram sacrificados e o segundo arco branquial de cada peixe foi dissecado, fixado em formalina neutra, desidratado, incluído em parafina e cortado. Nas análises histológicas, utilizaram-se tricômico de Masson e hematoxilina e eosina (HE). Pelas análises qualitativas na microscopia de luz, concluiu-se que o extrato etanólico bruto e as frações das folhas da *E. uniflora* apresentaram efeito sistêmico nas tilápias nilóticas atingindo as brânquias. As ações tóxicas como destacamento e descamação do epitélio respiratório e hiperplasia das células do epitélio interlamelar, foram mais pronunciadas nas tilápias que ingeriram maiores concentrações. Este trabalho colaborou para identificar o efeito vasodilatador dessa planta, e contribuiu para estabelecer a tilápia nilótica como sistema-modelo para testes com princípios ativos de plantas. Espera-se, com esses testes, viabilizar o uso de plantas como medicamentos para tratamentos de peixes, a manutenção da saúde de animais em cultivo intensivo e extensivo, a partir do qual se possibilite emprego alternativo aos medicamentos sintéticos.

Palavras-chave: piscicultura, plantas medicinais, tilápia nilótica

ABSTRACT: *Tissue and cell analysis of Oreochromis niloticus* L. gill treated with crude ethanol extract and fractions from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves – Myrtaceae. *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) is a plant found in the Cerrado biome and traditionally used in the treatment of diarrheas, inflammations, hyperglycemia and hypertension. Previous studies have revealed *in vitro* antimicrobial activity of *E. uniflora*. Considering its popular use, this study aimed to assess possible systemic cellular and tissue activities of the crude extract and the fractions from the leaves of this plant on *Oreochromis niloticus* L. (Nile tilapia) gill. Thus, ethanol extract and fractions from the leaves of this plant were orally administered to the fish in their rations. After 24 hours, the fish were sacrificed and the second gill arch of each fish was dissected, fixed in neutral formalin, dehydrated, embedded in paraffin and sectioned. Masson's trichome and hematoxylin and eosin (HE) were used in the histological analyses. Qualitative analyses using a light microscope led to the conclusion that the crude ethanol extract and the fractions from *E. uniflora* leaves presented systemic effect on Nile tilapias, affecting the gills. Toxic actions such as respiratory epithelium detachment and lifting, and hyperplasia of interlamellar epithelial cells were more pronounced in the tilapias that ingested higher concentrations. This study helped to identify the vasodilator effect of this plant and contributed to the definition of the Nile tilapia as a model system for testing plant active principles. These tests are expected to make feasible not only the use of plants as fish medication but also the maintenance of the health of animals in intensive and extensive cultures through the possible use of alternatives to synthetic medication.

Key words: pisciculture, medicinal plants, Nile tilapia

INTRODUÇÃO

No mundo ocidental, principalmente nas últimas décadas, observa-se crescente interesse pelo uso de plantas medicinais e dos respectivos extratos na terapêutica constituindo em certas circunstâncias, ajuda nos cuidados primários de saúde e excelente complemento terapêutico, compatível com a medicina clássica (Cunha, 2005).

As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos com diversas propriedades. Esses metabólitos podem ser usados de várias maneiras, entre elas como promotores de crescimento para espécies de peixes e como fármacos em piscicultura, entre outros (Makkar et al., 2007). Dessa maneira, o estudo dos produtos vegetais, além de agregar valor à flora de biomas ameaçados de extinção, como o Cerrado brasileiro, ainda pode fornecer alternativas válidas aos compostos sintéticos, para serem utilizados em aquicultura.

A *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) é planta que ocorre no bioma Cerrado e vem sendo estudada quanto às propriedades farmacológicas, por ser utilizada popularmente no tratamento de diarreias (Almeida et al., 1995), inflamações (Schapoval et al., 1994), hiperglicemia (Arrai et al., 1999) e hipertensão (Consolini et al., 1999). Ensaio farmacológico realizados com os extratos das folhas da *Eugenia uniflora* permitiram evidenciar atividade inibitória da enzima xantina-oxidase por ação dos flavonóides presentes nas folhas (Schmeda-Hirschmann et al., 1987), a diminuição da pressão sanguínea mediada pela vasodilatação direta e fraca ação diurética (Consolini et al., 1999). Observou-se a atividade antibacteriana dessa planta contra alguns germes patogênicos (Fadéy & Akpan, 1989), a atividade moderada tanto para *S. aureus* quanto para *E. coli* e a atividade contra algumas leveduras (Holetz et al., 2002).

As atividades de pesquisa que visam ao desenvolvimento de novas metodologias abrem perspectivas para aplicações de produtos naturais, como fármacos ou suplementos nutricionais em piscicultura. A produção de pescado e o uso como fonte de proteína animal têm aumentado no Brasil e no mundo. O Brasil apresenta grande potencial para a aquicultura, pois possui recursos hídricos abundantes e grande extensão territorial. Três quartos da área encontram-se na zona tropical, onde recebe energia solar abundante durante o ano todo (Castagnolli, 1992). Os cultivos de tilápia intensificaram-se particularmente no Nordeste e Sudeste do país, aumentando de 35 mil toneladas em 2001 para 68 mil toneladas em 2005. A produção mundial de tilápias cultivadas ultrapassou 2 milhões de toneladas, dessa produção, a tilápia do Nilo, sozinha, respondeu pela oferta de 1,7 milhão de toneladas em 2005. O Brasil é, hoje, o 6º maior produtor de tilápia cultivada no mundo. Em 2005, a

China foi o maior produtor, com cerca de 980 mil toneladas (Kubitza, 2007).

Em razão desse crescimento na produção de peixes, é cada vez mais importante que o bem-estar dos animais em ambientes de cultivo seja monitorado. Para isso, é necessário entender as respostas celulares, teciduais e orgânicas de peixes quando alimentados com rações variadas, suplementos alimentares e fármacos no tratamento e prevenção de doenças desses animais, bem como de melhoria da produtividade. Entre estas alternativas está o uso de fitofármacos na piscicultura.

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi o peixe escolhido por ser, de acordo com Fontainhas-Fernandes (1998), um bom modelo para estudos toxicológicos. Isso se deve a diversas características, como a alta taxa de crescimento, eficiência na adaptação a dietas diversificadas, alta resistência a doenças e, para práticas de manuseio, fácil reprodução em cativeiro e boa tolerância a ampla variedade de condições ambientais.

Ainda, as brânquias foram escolhidas para a avaliação biológica do extrato etanólico bruto e das frações da *E. uniflora* por serem órgãos envolvidos nas trocas gasosas, no balanço ácido-base e no transporte e excreção de compostos azotados (Perry, 1997). Nesse sentido, as alterações histológicas da brânquia são reconhecidas como método rápido e válido para determinar os danos causados nos peixes pela exposição a diferentes poluentes (Arellano et al., 1999). Entre elas, podem-se citar o edema e a hiperplasia epitelial das lamelas secundárias, a infiltração de células epiteliais, a fusão lamelar, como também a morte de células mucosas, devido a longos períodos de hipersecreção de muco (Leonardo et al., 2001). A organização geral das brânquias de teleósteos baseia-se em sistema de subdivisões sucessivas, e o epitélio é constituído por diversos tipos celulares, em particular, por células pavimentosas de revestimento, células de cloro e mucosas (Garcia-Santos et al., 2007).

Tendo em vista o uso popular da *Eugenia uniflora* e a possibilidade do uso na prevenção e no tratamento de doenças de peixes na piscicultura, esse trabalho objetivou avaliar o efeito do extrato bruto e frações das folhas dessa planta na morfologia celular e tecidual das brânquias da tilápia nilótica.

MATERIAL E MÉTODO

Material botânico

Este material, constituído de folhas da *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) foi coletado na área rural do município de Goiânia-GO, Brasil (16°36'15,1"S e 49°16'0,70" W, a 778m de altitude) no período de fevereiro a abril de 2005 e identificado por especialista

(Professor Doutor José Realino de Paula), da Universidade Federal de Goiás. As excisatas foram depositadas no herbário dessa instituição, sob registro UFG/29859.

Para a preparação prévia dos extratos e das frações, as folhas da *Eugenia uniflora* foram dessecadas em estufa com circulação de ar a 40°C e, após secas, moídas em moinho de facas.

Obtenção do extrato bruto, das frações e do perfil cromatográfico em Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O extrato bruto foi extraído do pó das folhas da *Eugenia uniflora* com etanol 95%, à temperatura ambiente, até a exaustão. O extrato foi concentrado em rotaevaporador à temperatura de 40°C, constituindo o extrato etanólico bruto.

Para a obtenção das frações, o extrato etanólico bruto foi solubilizado em metanol, ao qual foi adicionada água destilada, até obtenção da solução MeOH/H₂O 7:3. A solução resultante foi extraída, sucessivamente, três vezes com hexano, clorofórmio e acetato de etila. As frações hexânica, clorofórmica, e acetato de etila foram concentradas em rotaevaporador, à temperatura de 40°C (Ferri, 1996).

Para a realização da CCD, as três frações foram redissolvidas em etanol absoluto e aplicadas na cromatofolha de alumínio contendo silicagel 60 F254 (MERCK).

As análises cromatográficas foram realizadas tendo como fase móvel as seguintes misturas de solventes: acetona/tolueno/ácido fórmico (3:3:1), acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água (100:11:11:27), acetato de etila/metanol/água (100:13,5:10), clorofórmio/ácido acético glacial/metanol/água (64:32:12:8) e acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5). Para a revelação dos cromatogramas, utilizaram-se FeCl₃/HCl, vanilina/H₂SO₄, KOH a 10%, NP 1% (ácido difenilbórico a 1% em metanol)/PEG (polietilenoglicol) 4000 a 5% em etanol, UV. As cromatoplasmas, após a aplicação dos reveladores, foram observadas em luz visível e UV (254 nm e 365 nm) e analisadas de acordo com as descrições de Wagner & Bladt (2001).

Modelo experimental

O experimento foi realizado no período de março a junho de 2007 no Setor de Piscicultura da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. Semanalmente, foram medidos o pH, a temperatura, o teor de amônia e a quantidade de oxigênio na água dos tanques de 100 L com o Card Kit da Alfakit (Brasil).

As tilápias nilóticas machos com comprimento de 18 cm a 26 cm e peso médio de 243 g ± 67,4 g foram mantidas em tanques de 100 L supridos com água bem aerada, na proporção de 100 L hora⁻¹ (sistema *raceway*), e alimentadas diariamente

às 9 h e às 16 h com ração extrusada flutuante Cardume 32 (VB, Brasil) com diâmetro de 4mm a 6 mm e 32% de proteína. Cada peixe ficou em uma caixa com dois peixes menores por uma semana antes do experimento, para adaptação ao novo ambiente.

Um dia antes do experimento, a quantidade dos extratos e das frações foi calculada de acordo com o peso do animal e, posteriormente, diluída em etanol a 96% e embebida em ração, previamente pesada. O etanol foi totalmente evaporado à temperatura ambiente e a ração novamente pesada. O número de péletes contendo o extrato bruto e as frações foi calculado com base no consumo de péletes diário dos peixes durante a semana de adaptação. No dia do experimento, administraram-se, em média, dois a três pelets contendo o material na dosagem adequada para cada peixe. Após a ingestão dos péletes que continham o extrato etanólico ou as frações, os animais foram alimentados normalmente.

Para a análise experimental, foram formados 11 grupos com cinco peixes cada. Ao grupo um administrou-se 280 mg kg⁻¹ do extrato etanólico bruto; aos grupos dois, três, quatro administrou-se a fração hexano; aos grupos cinco, seis e sete, a fração clorofórmio; aos grupos oito, nove e dez, a fração acetato de etila. Administraram-se às tilápias três concentrações de cada fração, 70 mg kg⁻¹, 140 mg kg⁻¹ e 280 mg kg⁻¹. Cada experimento teve um grupo controle (grupo 11). As tilápias receberam os tratamentos após período de 18 horas em jejum.

Os peixes foram insensibilizados por hipotermia em água e gelo na proporção 1:1 e, depois, foram decapitados rapidamente [método recomendado pelo Ministério da Agricultura do Brasil (Brasil, 1995)] 24 horas após o tratamento. Para a microscopia de luz, o segundo arco branquial foi dissecado, fixado em formalina neutra, desidratado, incluído em parafina e cortado com espessura de 3 µm. Os métodos gerais de análise utilizados foram o tricômico de Masson e a HE. Posteriormente, os cortes foram desidratados, as lâminas montadas em Entellan (Merck-USA) e fez-se a análise qualitativa do material ao microscópio de luz. O registro fotográfico desse material foi realizado no fotomicroscópio Olympus CH-30.

Os experimentos descritos foram realizados de acordo com os princípios éticos para a pesquisa animal determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

RESULTADO

O rendimento do extrato etanólico bruto das folhas da *E. uniflora* foi de 25,78% e o das frações foi de 13,8% para a fração hexano, 11,7% para a fração clorofórmio e 9% para a acetato de etila. A análise em

CCD indicou a presença de flavonóides nas frações acetato de etila e clorofórmio, de taninos na fração acetato de etila e de terpenos nas frações hexano e clorofórmio.

No experimento realizado, o teor de amônia na água permaneceu constante em um valor de 0,5 mg L⁻¹, o teor de O₂ variou de 5,9 mg O₂ L⁻¹ a 6,5 mg O₂ L⁻¹; o pH foi de 6,5 e a temperatura da água ficou em média a 23°C. Nenhum peixe morreu durante o período do experimento.

As brânquias do grupo controle apresentaram epitélio com altura normal, distribuição lamelar padrão com curvatura normal e a presença de muco no espaço interlamelar. Neste espaço, observaram-se células do cloro claras e escuras e várias células mucosas. As lamelas estavam revestidas por células pavimentosas e, no interior, foi possível detectar a presença de capilares sinusóides revestidos com o endotélio e células em pilastra (Figura 1A).

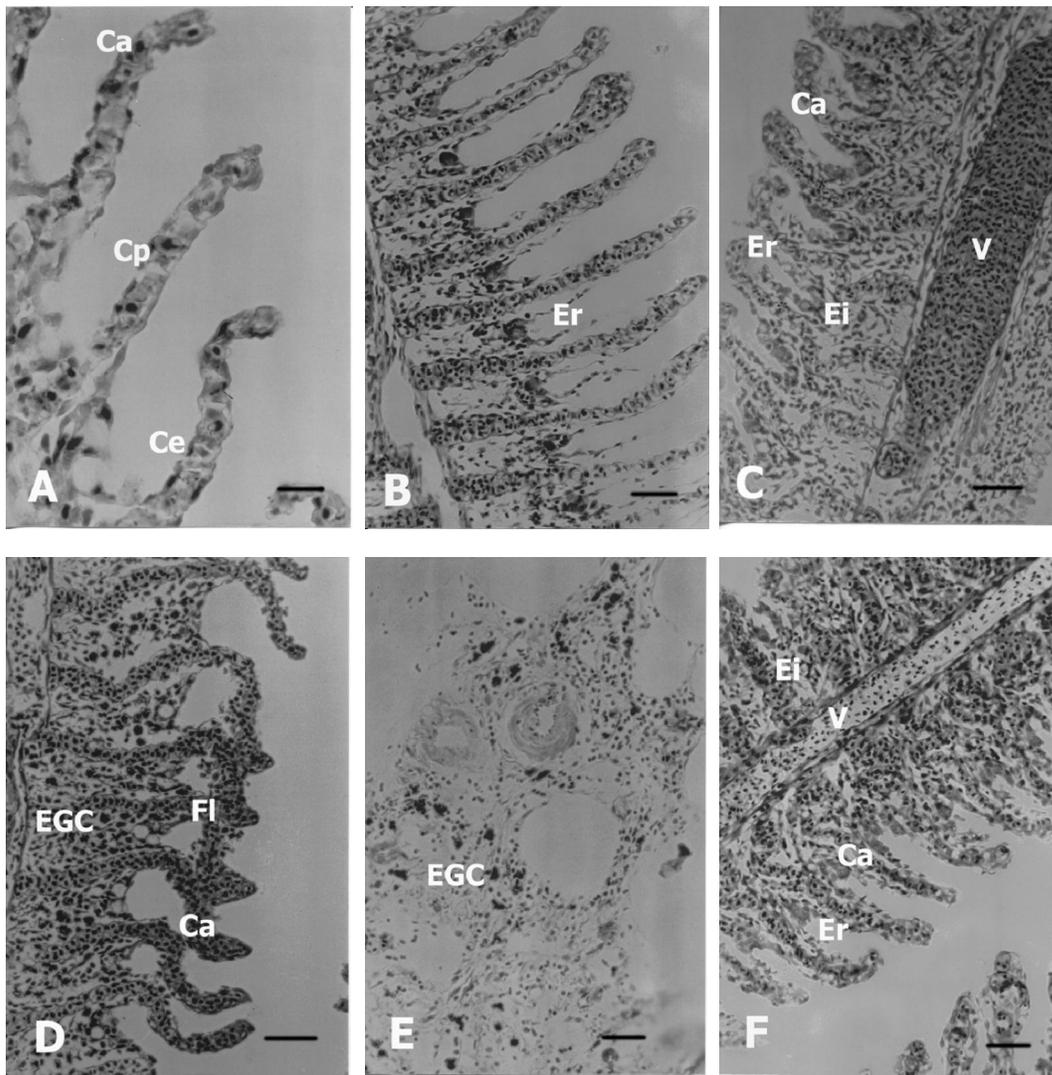


FIGURA 1. Brânquias de tilápias nilóticas do grupo controle e tratadas com extrato etanólico bruto, fração hexano, fração clorofórmio e fração acetato de etila da *E. uniflora*. **A.** Grupo controle (Masson). Presença de capilares sinusóides revestidos com o endotélio e células em pilastra (Cp). **B.** Extrato etanólico bruto 280 mg kg⁻¹ (HE). Nota-se destacamento do epitélio respiratório em toda a superfície das lamelas. **C.** Fração hexano 280 mg kg⁻¹ (HE). Observam-se intensa dilatação e congestão vascular no vaso central do filamento, desarranjo da região interlamelar e hiperplasia das células da região interlamelar. **D.** Fração clorofórmio 140 mg kg⁻¹. Filamento intermediário de brânquias. (HE). Lamelas com seus capilares congestionados, com intensa alteração em sua curvatura e aparente fusão lamelar. **E.** Fração clorofórmio 70 mg kg⁻¹ (Masson). EGCs no conjuntivo do rastelo. **F.** Fração acetato de etila 280 mg kg⁻¹ (HE). Hiperplasia das células do epitélio interlamelar, descamação do epitélio respiratório. **Ca** = capilar sanguíneo; **Ce** = Célula epilelial; **Cp** = Célula em pilastra; **EGC** = célula granular eosinofílica; **Ei** = epitélio interlamelar; **Er** = epitélio respiratório; **FI** = fusão lamelar; **V** = vaso central do filamento. Barra = 40 μm (**B, C, D, E e F**). Barra = 100 μm (**A**).

O rastelo era composto por um epitélio estratificado, lâmina basal evidente, células mucosas, algumas com disposição superficial. Foi possível observar, no arco branquial músculo estriado esquelético, células adiposas, artérias e veias.

Nos peixes que receberam 280 mg kg⁻¹ do extrato etanólico bruto da *E. uniflora*, observaram-se rastelo branquial com a presença de células mucosas volumosas liberando produto de secreção, lâmina basal bem definida e infiltrado celular rico em células granulares eosinofílicas (EGCs) no conjuntivo e invadindo o tecido epitelial.

Detectaram-se aparente dilatação e congestão vascular no vaso central do filamento e nos capilares das lamelas. O espaço interlamelar apresentou-se desorganizado e com a presença de células mucosas liberando produto de secreção. Em algumas regiões, detectou-se aparente hiperplasia das células do epitélio interlamelar. Também se verificou destacamento do epitélio respiratório em toda a superfície das lamelas (Figura 1B).

Observaram-se no arco branquial dos peixes tratados com a fração hexano da *E. uniflora* na concentração de 70 mg kg⁻¹, tecido ósseo, vaso sanguíneo, tecido muscular esquelético com infiltrado celular rico em EGCs, algumas degranulando-se. O rastelo branquial apresentou-se com muitas células mucosas e observaram-se algumas EGCs no conjuntivo. Nas tilápias que receberam 140 mg kg⁻¹ e 280 mg kg⁻¹ dessa fração, as EGCs estavam no arco branquial e no conjuntivo, invadindo o epitélio de revestimento do rastelo e migrando para a superfície do epitélio.

Nos peixes que receberam a menor concentração, detectaram-se a dilatação e congestão vascular no ápice das lamelas e a hiperplasia das células do epitélio interlamelar. Visualizou-se grande distribuição de células mucosas no espaço interlamelar nas tilápias que receberam as três concentrações. Verificaram-se, nas lamelas das brânquias dos animais que ingeriram 140 mg kg⁻¹ e 280 mg kg⁻¹, destacamento total do epitélio respiratório, congestão sanguínea, dilatação dos capilares, descamação superficial do epitélio e desordem das células que constituem essas estruturas. Observaram-se desarranjo e hiperplasia das células do epitélio interlamelar nos peixes que receberam as concentrações de 140 mg kg⁻¹ e 280 mg kg⁻¹ e perda do eixo de organização das lamelas dos que receberam a maior concentração (Figura 1C). Nas tilápias tratadas com 280 mg kg⁻¹, verificaram-se a existência de muitas células do cloro do tipo claras no espaço interlamelar, intensa dilatação e congestão vascular no vaso central do filamento (Figura 1C).

As tilápias que receberam 70 mg kg⁻¹ da fração clorofórmio da *E. uniflora* apresentaram lamelas com curvatura normal, vasos intumescidos, congestos de sangue e descamação intensa do epitélio de

revestimento. Observou-se, nos peixes que receberam as três concentrações, epitélio interlamelar rico em células mucosas na superfície.

Nos animais tratados com 140 mg kg⁻¹ dessa fração, observaram-se, no epitélio interlamelar, células ricas do cloro claras e escuras e EGCs distribuídas no tecido conjuntivo interlamelar. Em algumas regiões, as lamelas estavam com os capilares congestos, com intensa alteração na curvatura e aparente fusão lamelar iniciada da superfície mais externa para a mais interna; em outras regiões, notou-se rigidez das lamelas com perda de curvatura e descamação das células pavimentosas das lamelas. Também se detectou epitélio interlamelar com regiões vacuolizadas (Figura 1D).

No grupo tratado com 280 mg kg⁻¹, observaram-se alteração da curvatura, dilatação e congestão dos vasos e desorganização das lamelas. Verificaram-se hiperplasia das células do epitélio interlamelar, descamação das células pavimentosas e pequeno destacamento do epitélio respiratório. Nesse grupo, o epitélio interlamelar apresentou-se com várias células do cloro claras e escuras.

Nos grupos tratados com 70 mg kg⁻¹, 140 mg kg⁻¹ e 280 mg kg⁻¹, verificaram-se, na região do arco branquial, arteríolas e veias e, no rastelo, células mucosas. EGCs foram encontradas no arco branquial, no conjuntivo e no epitélio do rastelo (Figura 1E).

Os animais que receberam 70 mg kg⁻¹ da fração acetato de etila da *E. uniflora* apresentaram congestão vascular e vasodilatação no vaso central do filamento e nos capilares das lamelas e, em algumas regiões, esta dilatação foi mais acentuada na porção basal dessas estruturas. Observaram-se descamação do epitélio pavimentoso, destacamento do epitélio respiratório das lamelas, hiperplasia das células do epitélio interlamelar e presença de EGCs no espaço interlamelar e de neutrófilo na região subepitelial das lamelas.

Notaram-se, nos peixes que receberam 140 mg kg⁻¹ da fração acetato de etila, epitélio interlamelar com presença de EGCs, células mucosas e células do cloro. Observaram-se alterações da curvatura das lamelas, algumas apresentando aspecto rígido, com descamação e destacamento do epitélio respiratório da base até a região intermédia, pequena congestão vascular e dilatação de capilares. Essa dilatação foi mais acentuada na região apical. Também se verificaram dilatação e congestão vascular no vaso do filamento.

Os animais tratados com 280 mg kg⁻¹ dessa fração apresentaram intensa desorganização do epitélio interlamelar e perda do eixo de organização das lamelas. Foram detectadas hiperplasia das células do epitélio interlamelar, intensa descamação do epitélio respiratório (Figura 1F), grande quantidade de células mucosas e presença de células do cloro escuras no espaço interlamelar. Também se verificaram dilatação e congestão vascular no vaso

do filamento e nos capilares das lamelas.

Observaram-se grande quantidade de células mucosas e EGCs, algumas degranulando-se na região do rastelo branquial e do conjuntivo das tilápias que receberam a fração acetato de etila nas três concentrações. Verificaram-se arco branquial com tecido osteóide, feixes de fibras musculares, tecido adiposo e vaso sanguíneo de grande calibre.

Percebe-se que em todos os tratamentos, houve relação direta entre o aumento das concentrações das frações e as reações e alterações mais severas em nível celular e tecidual nas brânquias das tilápias.

DISCUSSÃO

Observou-se, no arco branquial e no rastelo, a presença de EGCs, com algumas migrando do conjuntivo para o epitélio do rastelo, e de grande quantidade de células mucosas volumosas no rastelo em todos os peixes tratados. EGCs também foram identificadas no tecido interlamelar nos animais tratados com 140 mg kg⁻¹ e 280 mg kg⁻¹ da fração clorofórmio e nas três concentrações da fração acetato de etila. As EGCs são mononucleares e contêm grânulos eosinofílicos proeminentes. Características citoquímicas e o envolvimento em reações patológicas levaram a sugerir que as EGCs dos teleostes são análogas aos mastócitos dos mamíferos e estão envolvidas nos mecanismos de defesa. A degranulação das EGCs precede a migração dos neutrófilos no sítio inflamatório (Matsuyama & Iida, 1999). Supõe-se, portanto, que o extrato bruto e as frações, em especial a fração clorofórmio nas maiores concentrações e a fração acetato de etila, possuem substâncias irritantes que desencadeiam processo inflamatório com maior intensidade no rastelo e com menor intensidade nos filamentos branquiais.

Verificaram-se dilatação e congestão vascular com intensidades diferentes nos capilares das lamelas nos peixes que receberam o extrato etanólico bruto e as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila nas três concentrações. Observou-se dilatação no vaso central do filamento apenas nos peixes que receberam o extrato bruto, a concentração de 280 mg kg⁻¹ da fração hexano e todas as concentrações da fração acetato de etila. Resultados semelhantes, como vasodilatação do seio venoso central e da região basal do eixo vascular das lamelas foram observados por Garcia-Santos et al. (2007) em tilápias nilóticas expostas ao cádmio e por Figueiredo-Fernandes et al. (2007) em brânquias de tilápias nilóticas expostas a diferentes concentrações de cobre. Sugere-se que a vasodilatação promovida por essa planta seja pela ação local no vaso, provavelmente por irritação das paredes, pois essa ação também foi observada nos vasos das brânquias

expostas aos agentes tóxicos, como o cádmio e o cobre.

Notaram-se hiperplasia das células do epitélio interlamelar nas brânquias dos peixes que receberam o 280 mg kg⁻¹ do extrato bruto da *E. uniflora*, todas as concentrações das frações hexano e acetato de etila e 280 mg kg⁻¹ da fração clorofórmio; e desorganização do epitélio interlamelar nos que receberam o extrato bruto, a fração hexano, 140 mg kg⁻¹ e 280 mg kg⁻¹ da fração clorofórmio e 280 mg kg⁻¹ da fração acetato de etila. Detectaram-se alteração da curvatura das lamelas nas tilápias que ingeriram 140 mg kg⁻¹ e 280 mg kg⁻¹ das frações clorofórmio e acetato de etila; descamação do epitélio em todos os tratamentos, com exceção do tratamento com extrato bruto e da fração hexano na menor concentração; elevação do epitélio respiratório nos peixes tratados com extrato bruto, com 140 mg kg⁻¹ e 280 mg kg⁻¹ da fração hexano, com 280 mg kg⁻¹ da fração clorofórmio e com todas as concentrações da fração acetato de etila. Alterações similares foram encontradas por Garcia-Santos et al. (2007) em tilápias nilóticas expostas ao cádmio, como proliferação do epitélio filamental, destacamento do epitélio lamelar associado a edema intersticial pronunciado; por Jiraungkoorskul et al. (2002) em brânquias de tilápias nilóticas expostas ao herbicida Roundup, como espessamento do epitélio lamelar primário, fusão da lamela secundária, edema e elevação epitelial; por Figueiredo-Fernandes et al. (2007) em brânquias de tilápias nilóticas expostas a diferentes concentrações de sulfato de cobre como edema, elevação do epitélio lamelar. Supõe-se, portanto, que o extrato bruto e as frações, principalmente nas maiores concentrações, são tóxicos para as células e os tecidos branquiais da tilápia nilótica.

A análise em CCD indicou a presença de flavonóides nas frações acetato de etila e clorofórmio, de taninos na fração acetato de etila e de terpenos nas frações hexano e clorofórmio. Alguns medicamentos são elaborados com base em flavonóides, em particular para o tratamento de doenças circulatórias e da hipertensão arterial, agindo como cofator da vitamina C. Outras pesquisas sugerem que alguns flavonóides são responsáveis por ação antitumoral considerável e podem agir como antivirais, anti-hemorragicos, hormonais, antiinflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes (Zuanase & Montana, 2004; Cunha, 2005). Plantas ricas em taninos são empregadas pela medicina tradicional no tratamento da diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e do sistema urinário, processos inflamatórios em geral (Santos & Melo, 2004) e como antissépticos (ação antibacteriana e antifúngica) (Cunha et al., 2003; Cunha, 2005). A presença desses compostos pode justificar o uso popular da *E. uniflora* no tratamento de diarreias (Almeida et al., 1995),

inflamações (Schapoval et al., 1994), hiperglicemia (Arrai et al., 1999) e hipertensão (Consolini et al., 1999), como antisséptico, além de explicar a ação vasodilatadora encontrada no presente estudo, principalmente nas tilápias tratadas com a fração acetato de etila.

O extrato etanólico bruto e as frações das folhas da *E. uniflora* apresentaram efeito sistêmico nas tilápias nilóticas e atingiram as brânquias. As ações tóxicas foram mais pronunciadas nas que receberam maiores concentrações e reduzidas nas que receberam concentrações menores.

Este trabalho contribuiu para estabelecer a tilápia nilótica como sistema-modelo para testes de princípios ativos de plantas. Espera-se, em um futuro próximo, viabilizar o uso de plantas como medicamentos para o tratamento de peixes, a manutenção da saúde de animais em cultivo intensivo e extensivo, a partir do qual se possibilite emprego alternativo aos medicamentos sintéticos.

REFERÊNCIA

- ALMEIDA, C.E. et al. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista de Saúde Pública**, v.29, n.6, p.428-33, 1995.
- ARRAI, J. et al. Improving effects of the extract from *Eugenia uniflora* on hiperglicemia and hipertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.68, n.1-3, p.307-14, 1999.
- ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, n.1, p.62-72, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Sistema de análise de riscos e pontos críticos na indústria da pesca**: manual de procedimentos. Rio de Janeiro: SENA/DN/DET, 1995. 46p.
- CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189p.
- CONSOLINI, A.E.; BALDINI, O.A.; AMAT, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, n.1, p.33-9, 1999.
- CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. 701p.
- CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. 670p.
- FADEY, M.O.; AKPAN, U.E. Antibacterial activities of the leaf extracts of *Eugenia uniflora* Linn. (synonym, *Stenocalyx michelii* Linn.), Myrtaceae. **Phytotherapy Research**, v.3, n.4, p.154-5, 1989.
- FERRI, P.H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DISTASI, L.C. (Ed.) **Plantas medicinais arte e ciência**: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. p.129-56.
- FIGUEIREDO-FERNANDES, A. et al. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.3, p.103-9, 2007.
- FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.A. Tilápia production. In: REIS-HENRIQUES, M.A. (Ed.). **Aquaculture handbook**. California: Academic Press, 1998. p.135-50.
- GARCIA-SANTOS, S. et al. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p.376-81, 2007.
- HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-31, 2002.
- JIRAUNGKOORSKUL, W. et al. Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**, v.28, p.121-7, 2002.
- KUBITZA, F.A. Produção de pescado no mundo e a aqüicultura. **Revista Panorama da Aqüicultura**, v.17, n.100, p.14-23, 2007.
- LEONARDO, J.M.L.O. et al. 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, n.4, p.863-70, 2001.
- MAKKAR, H.P.S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-kow plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal**, v.1, n.9, p.1371-91, 2007.
- MATSUYAMA, T.; IIDA, T. Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. **Developmental and Comparative Immunology**, v.23, n.6, p.451-7, 1999.
- PERRY, S.F. The chloride cell: structure and functions in the gills of freshwater fishes. **Annual Review of Physiology**, v.59, n.1, p.325-47, 1997.
- SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS,UFSC, 2004. p.616-56.
- SCHAPOVAL, E.E.S. et al. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.44, n.3, p.137-42, 1994.
- SCHMEDA-HIRSCHMAN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.21, n.2, p.183-6, 1987.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. A thin layer chromatography atlas. 2.ed. New York: Springer, 2001. 384p.
- ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS,UFSC, 2004. p.577-614.