

Análise morfométrica das células de cloro de *Poecilia vivipara* expostas a frações da folha e da casca do caule de *Caryocar brasiliensis*

Luciana Damacena Silva¹, Valdirene do Nascimento¹, Suzana Costa Santos², José Oscar Rodrigues de Moraes¹ e Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais¹

¹Laboratório de Comportamento Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

²Laboratório de Produtos Naturais, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, C. P. 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: saboias@terra.com.br

RESUMO. Frações da folha e casca de pequi (*Caryocar brasiliensis*), testadas como moluscicidas, combateram o hospedeiro intermediário da esquistossomose. O nicho ecológico desse molusco está associado a mananciais de água. Além disso foi verificada a ação fungitóxica da fração acetato de etila (folha), que apresentou elevada atividade frente ao fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Utilizou-se o epitélio branquial de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae), para testar a toxicidade dessas frações para células animais. Análises quantitativas demonstraram redução da densidade numérica das células de cloro expostas às frações da folha e aumento das expostas à casca. A folha e a casca causaram a redução da área das células de cloro (CC) no filamento branquial. O perímetro das CC não sofreu alteração significativa perante tais frações. A fração aquosa da folha foi mais tóxica ao guaru. Frações da casca são menos prejudiciais, podendo ser empregadas no controle de populações celulares, pois se mostraram muito eficazes.

Palavras-chave: célula de cloro, guaru, moluscicida, morfometria, pequi.

ABSTRACT. Morphometric analysis of *Poecilia vivipara* chloride cells exposed to fractions of *Caryocar brasiliensis* leaf and bark. Fractions of *Caryocar brasiliensis* leaf and bark, tested as molluscicidal, fought the intermediary host of schistosomiasis. The ecological niche of this mollusk is related to water sources. Besides this, a fungitoxic action of the ethyl-acetate fraction (leaf) was verified, exhibiting high activity towards *Paracoccidioides brasiliensis*. The gill epithelium of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) was used to test the toxicity of these fractions to animal cells. Quantitative analyses demonstrated a decrease in the density of chloride cells exposed to the leaf fractions and an increase in those exposed to bark fractions. The leaf and bark fractions induced a decrease in the area of the chloride cells (CC) in the gill filament. The perimeter of the CC did not suffer significant changes in face of these fractions. The aqueous fraction of the leaf is more toxic to the guaru. Bark fractions are less debilitating, and can be employed in the control of cell populations, showing high efficacy at it.

Key words: chloride cell, guaru, molluscicidal, morphometry, pequi.

Introdução

As plantas nativas do Brasil estão ligadas à história e ao desenvolvimento socioeconômico do nosso país. A grande maioria das espécies de plantas encontradas no território brasileiro são utilizadas pelos seus habitantes (Pires, 1997). Grande parte dessa composição florística encontra-se no Bioma Cerrado. Muitos estudos têm demonstrado que a avaliação da bioatividade de plantas medicinais do Cerrado fornece subsídios para utilizá-las como fármacos pelo homem e como matéria-prima

industrial (Almeida *et al.*, 1998; Vieira e Martins, 1998). Dentre as diversas espécies desse Bioma brasileiro, pode-se citar o pequi (*Caryocar brasiliensis*), que é muito utilizado para alimentação e para o tratamento de várias enfermidades, devido aos seus diferentes efeitos medicinais (Lisboa, 1931; Silva, 1939; Hidltch, 1941; Joly, 1970; Helou *et al.*, 1975).

Estudos recentes têm demonstrado que extratos da folha e da casca do caule de pequi têm ação antimitótica e moluscicidas (Bezerra *et al.*, 2002; Passos *et al.*, 2002). Sugere-se que princípios ativos presentes em frações de acetato de etila da folha de

pequi inibAm a proliferação dos fungos *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Passos et al., 2002). Esses extratos também foram testados contra o molusco *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do parasito *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose. O combate ao molusco constitui parte relevante na interrupção do ciclo biológico desse verme (Bezerra et al., 2002).

Como o molusco supracitado habita principalmente as proximidades das fontes aquáticas (Boffi, 1979), e como resíduos de frações do pequi poderão ser eliminados, sem tratamento adequado, em mananciais de água, especula-se sobre o impacto ambiental dessas substâncias sobre a vida aquática.

No intuito de testar a toxicidade de algumas substâncias para células animais de ambiente aquático, as brânquias do peixe eurialino *Poecilia vivipara* têm sido utilizadas (Araújo et al., 1997, 1999 2001; Sabóia-Morais et al., 1999a; Souza et al., 1999). Esses autores, sugerem respostas adaptativas das células presentes nesse epitélio a modificações físicas e químicas do meio externo.

Carneiro (2002) demonstrou alterações do epitélio de revestimento branquial de *Poecilia vivipara* exposto a extratos da folha e da casca do caule de pequi.

Um dos tipos celulares presente no epitélio branquial do guaru é a célula de cloro. Essa célula é responsável pelo balanço iônico entre a água e o plasma sanguíneo do animal (Smith, 1929; Randall et al., 2000). Alterações físico-químicas da água podem estimular a hipertrofia e/ou hiperplasia desse tipo celular (Araújo et al., 1997, 1999; Souza et al., 1999).

Nesse sentido, objetivou-se investigar, de forma qualitativa e quantitativa, o comportamento das células de cloro de guarus frente a frações dos extratos da folha e da casca do caule de pequi.

Material e métodos

Utilizaram-se 30 peixes, de ambos os sexos, adultos, pertencentes à ordem Cyprinodontiformes, família Poeciliidae e espécie *Poecilia vivipara*. Os animais foram coletados em uma chácara localizada na cidade de Goiânia, Estado de Goiás (S16° 34' 24"/W48° 56' 17"; 769m), em 2001, e transportados em caixa de isopor, com capacidade para 14 litros de água, ao laboratório de comportamento celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG). Foram readaptados em água mineral e destilada na proporção 1:1 e mantidos de acordo com as normas de conduta ética em experimentação animal (Brasil, 1979). Os animais foram divididos em 6 grupos:

- grupo 1: 5 animais que permaneceram em condições físico-químicas padrões para o cultivo da espécie (Pires, 2002);
- grupo 2: 5 animais expostos à fração aquosa da folha de pequi (*Caryocar brasiliensis*) a 20ppm;
- grupo 3: 5 animais expostos à fração acetato de etila da folha de pequi a 20 ppm;
- grupo 4: 5 animais expostos à fração etérea da folha de pequi a 20 ppm;
- grupo 5: 5 animais expostos à fração aquosa da casca do caule de pequi a 20 ppm;
- grupo 6: 5 animais expostos à fração acetato de etila da casca do caule de pequi a 20 ppm.

O material botânico foi coletado na cidade de Goiânia (GO) (S16° 34' 24"/W48° 56' 17"; 769 m), em 2000. As frações utilizadas foram obtidas no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da UFG. Para tanto, as folhas foram expostas à temperatura ambiente por 2 a 3 dias para secar; enquanto a casca do caule foi colocada para secar em estufa a 40°C, com ventilação forçada. A moagem do material botânico foi efetuada em moinho de faca com granulação definida. Na sequência, sofreram percolação a frio em etanol 96%, sob agitação. A filtração do sobrenadante e a evaporação do solvente à pressão reduzida, conduziram ao extrato bruto etanólico. Parte do extrato bruto foi diluído em água destilada; no funil de separação, acrescentou-se éter etílico, resultando em uma proporção 1:1. A separação por polaridade conduziu à fração etérea, enquanto a porção aquosa, livre de graxas e clorofilas, foi transferida para outro funil de separação, onde acrescentou-se acetato de etila (1:1), o que resultou na fração acetato de etila. As frações etérea, acetato e aquosa foram evaporadas, submetidas ao congelamento e, finalmente, liofilizadas.

Após a exposição de todos os animais durante 24h, eles foram decapitados, e os arcos branquiais de cada animal foram dissecados e fixados em McDowell (Brancroft e Stevens, 1982), durante 2 horas. Todas as peças anatômicas coletadas foram desidratadas e incluídas em historresina (Leica, LKB 2218, Alemanha). Cortes de 4µm foram corados com azul de toluidina a 1%.

Imagens de 15 filamentos branquiais, de cada espécime, foram capturadas por uma câmera de vídeo acoplada a um microscópio Leica. Devido ao grande comprimento dos filamentos branquiais, eles foram divididos em três regiões distintas: basal, intermediária e apical, de acordo com Sabóia-Morais et al (1996) (Figura 1), perfazendo um total de 45 imagens para cada animal. Dessa forma, para cada

grupo testado tínhamos 45 (imagens) x 5 (animais), perfazendo 225 imagens por grupo. Uma vez que tivemos seis grupos no total, foram obtidas e analisadas 1.350 imagens. De cada campo capturado, que tinha área total $7.405 \mu\text{m}^2$, o número de células de cloro foi quantificado no intuito de se obter a densidade populacional da referida célula. Dessa forma, o número de células para cada grupo foi:

- grupo 1: 1198
- grupo 2: 149
- grupo 3: 621
- grupo 4: 544
- grupo 5: 1243
- grupo 6: 1843

Além disso, medidas de área e perímetro das células de cloro nas regiões supracitadas dos filamentos branquiais foram obtidas através de um analisador de imagens (Imagelab versão 2.3), considerando somente as que apresentavam núcleo com nucléolo evidente, garantindo assim que o corte histológico atingiu o maior eixo da célula. Esses dados foram analisados quantitativamente, utilizando os testes estatísticos: Análise de Variância (Anova) e o teste de comparação de médias de Duncan ($p < 0,05$), por meio do programa

computacional Mstact (Fred, 1990). O registro fotográfico foi feito num microscópio Zeiss Axioplan (Germany).

Resultados

A média da densidade numérica, da área e do perímetro das células de cloro nas regiões basal, intermediária e apical dos filamentos branquiais utilizados nesse experimento, bem como o resultado da análise estatística estão representados nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1. Média da densidade numérica de células do cloro numa área de $7405,14 \mu\text{m}^2$ de três regiões do filamento branquial de guaru (*Poecilia vivipara*) expostas a frações da folha ou da casca do caule de pequi (*Caryocar brasiliensis*)

Região	Grupo Controle	Grupo Experimental				
		Folha			Casca	
		Aquosa	Acetato de etila	Etérea	Aquosa	Acetato de etila
Apical	4,15 ^a	2,20 ^a	2,02 ^a	1,81 ^a	4,76	6,96 ^a
Interm.	7,58 ^{ab}	4,27 ^a	3,48 ^a	2,92 ^a	6,04	8,22
Basal	4,24 ^b	3,47	2,78	2,56	5,77	9,40 ^a

Médias seguidas de asterisco (*) numa mesma linha diferem estatisticamente do controle para um nível de significância de 5%; Médias seguidas de letras iguais numa mesma coluna diferem estatisticamente para um nível de significância de 5%

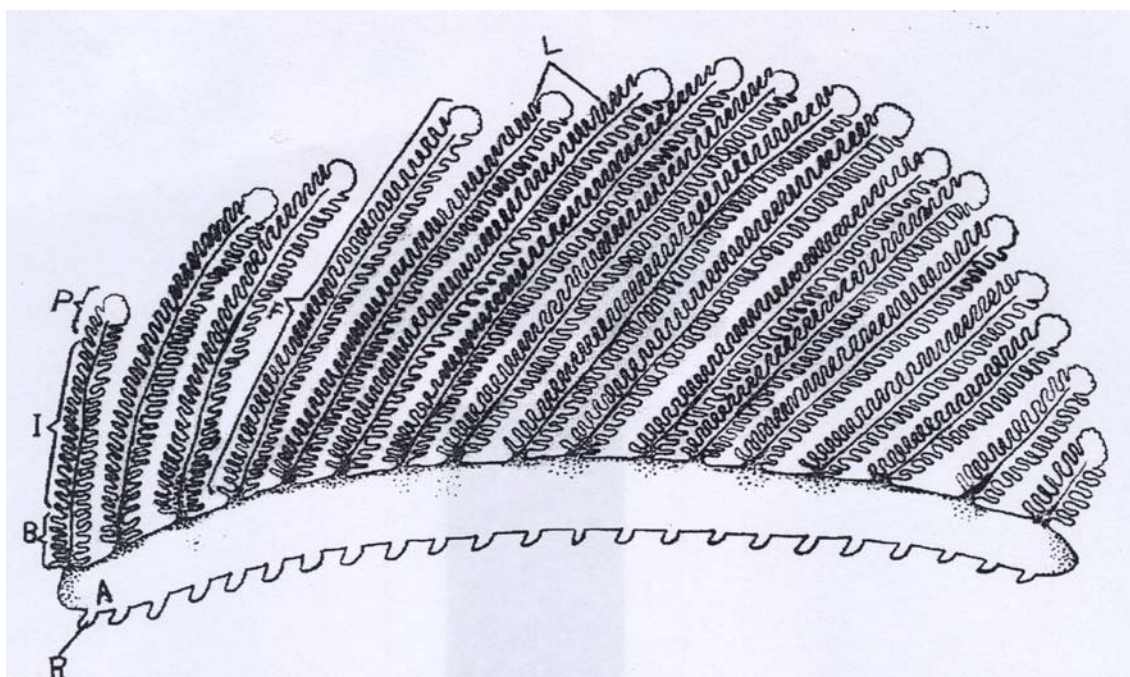


Figura 1. Esquema evidenciando arco branquial do guaru (*Poecilia vivipara*). Observar rastelo (R); arco (A) dos filamentos branquiais, onde são encontradas as regiões: basal (B), intermediária (I) e apical (P) dos filamentos branquiais (F); ao longo dos filamentos são encontradas projeções curtas: lamelas branquiais (L)

Tabela 2. Média da área (μm^2) das células do cloro em três regiões do filamento branquial de guaru (*Poecilia vivipara*) expostas a frações da folha ou da casca do caule de pequi (*Caryocarpus brasiliensis*)

Região	Grupo Controle	Grupo Experimental				
		Folha			Casca	
		Aquosa	Acetato de etila	Etérea	Aquosa	Acetato de etila
Apical	100,29	56,51*	49,28*	95,57	65,69*	80,61*
Interm.	107,63	69,87*	79,48*	110,69	58,37*	76,81*
Basal	96,81	56,38*	59,17*	94,97	53,44*	58,44*

Médias seguidas de asterisco (*) numa mesma linha diferem estatisticamente do controle para um nível de significância de 5%; Médias seguidas de letras iguais numa mesma coluna diferem estatisticamente para um nível de significância de 5%

Tabela 3. Média do perímetro (μm) das células do cloro em três regiões do filamento branquial de guaru (*Poecilia vivipara*) expostas a frações da folha ou da casca do caule de pequi (*Caryocarpus brasiliensis*)

Região	Grupo Controle	Grupo Experimental				
		Folha			Casca	
		Aquosa	Acetato de etila	Etérea	Aquosa	Acetato de etila
Apical	39,28	24,38*	25,31*	40,86	31,85	34,95
Interm.	43,07	35,31*	36,28*	46,16	30,93*	35,52
Basal	39,97	30,84	30,28	42,12	29,28*	30,66

Médias seguidas de asterisco (*) numa mesma linha diferem estatisticamente do controle para um nível de significância de 5%; Médias seguidas de letras iguais numa mesma coluna diferem estatisticamente para um nível de significância de 5%

No epitélio branquial dos animais do grupo 1 (controle), verificou-se a presença de células de cloro na região interlamelar do filamento branquial. Essas células apresentaram-se volumosas, com núcleo único e menos basófilo, em relação às células vizinhas, e nucléolo evidente (Figura 2-A). No grupo 4 (fração etérea da folha), contudo, as células de cloro ocuparam parte do epitélio respiratório branquial presente nas lamelas, que se apresentam mais curtas e dilatadas em relação ao grupo 1 (Figura 2-B). Já as células de cloro do grupo 6 (fração acetato de etila da casca do caule) estavam dispostas na região interlamelar e base das lamelas, que se apresentam longas e moderadamente dilatadas (Figura 2-C). Analisando brânquias de animais expostos à fração aquosa (grupo 2) e acetato de etila (grupo 3) em ambas as frações da folha, verificou-se freqüentes vasodilatações no filamento branquial; o mesmo foi observado nos grupos 4 e 6, e as células de cloro permaneceram no epitélio interlamelar e na base das lamelas. No grupo 5 (fração aquosa da casca), a disposição dessas células foi semelhante às do grupo 1 (Controle).

Discussão

Considerações gerais sobre os aspectos qualitativos

Considerando a importância do epitélio branquial na osmorregulação dos peixes, há de se

destacar o papel das células de cloro como reguladoras do equilíbrio iônico nessa série animal (Mallatt, 1985; Sabóia-Morais et al., 1996b; Zadunaisk, 1996). Essas células apresentavam citoplasma abundante, equiparando-se ao descrito por Sabóia-Morais et al. (1996) para essa mesma espécie. Tais características são evidenciadas por outros autores em outras espécies de organismos aquáticos (Smith, 1929; Keys e Willmer, 1932; Copeland, 1948; Pisam, 1981; Randall et al., 2000). Ocupam a região interlamelar e a base das lamelas, juntamente com células pavimentosas de volume consideravelmente menor, aspecto este bem destacado nos espécimes por nós analisados e confirmado em outros animais (Boyd et al., 1980; Pisam, 1981; Mallatt, 1985). Referindo-se ao desenvolvimento ontogenético branquial nessa mesma espécie, Araújo et al. (2001) destacaram esse grupo celular como o primeiro que começa a se diferenciar, assumindo essa posição basal precocemente.

Em relação ao grupo experimental que trabalhamos, verificamos que ocorreram significativas alterações no posicionamento das células de cloro, tendo estas ocupado parte do epitélio respiratório, notadamente na região intermediária dos filamentos branquiais dos animais do grupo 4 (fração etérea da folha). Sugere-se que essa mudança ocorra em razão das modificações do meio, pois o espaço ocupado por tal célula fez o epitélio lamelar se tornar mais espesso, o que conseqüentemente constituiu mais uma barreira para substâncias do meio externo não atingirem o leito capilar. Sob a ação de poluentes, essas células investigadas por outros autores apresentaram comportamento aproximador dos nossos achados (Hughes e Perry, 1976; Hinton et al., 1987; Araújo et al., 1998; Melo et al., 1998; Sabóia-Morais et al., 1999b; Souza et al., 1999).

Os animais submetidos à ação da fração acetato de etila da casca mantiveram estável a posição das células de cloro em relação ao controle. No entanto, observou-se uma expressiva dilatação dos vasos sanguíneos com conseqüente aumento de volume nas lamelas, o que sugere outras bioatividades, tais como: a vasodilatação para essa fração testada.

Considerações sobre a quantificação celular Sobre a densidade celular

O método estatístico utilizado na metodologia evidenciou que o grupo controle apresentou maior densidade numérica das células de cloro no epitélio da região intermediária do filamento branquial, enquanto as regiões basal e apical apresentaram

equivalentes quantitativos (Tabela 1). Considerando que foram analisadas áreas iguais, nas três regiões do filamento branquial, esse dado indica que a região intermediária apresentou maior atividade metabólica. Trabalhando com trutas, Hughes e Perry (1976) determinaram áreas branquiais e relacionaram isso à maior capacidade de difusão, entre outros aspectos.

De um modo geral, as frações da folha apresentaram menor densidade numérica das células de cloro nas três regiões. Isso foi mais expressivo nos espécimes submetidos à exposição da fração etérea; Carneiro (2002) obteve resultados semelhantes testando extrato bruto. É interessante notar que a densidade celular da região intermediária exposta à fração aquosa da folha se equiparou à da região basal, diferindo do grupo controle. É importante relatar que, nesse caso, os animais foram a óbito até a décima segunda hora de exposição. Passos *et al.* (2002) trabalhando com a fração acetato de etila de folha de pequi, demonstrou uma elevada atividade fungiotóxica.

A análise da fração acetato de etila da casca permitiu interpretar que houve aumento da densidade numérica de células de cloro nas regiões apical e basal do filamento branquial, McDonald *et al.* (1991), trabalhando com *Perca flavescens* submetidos à adaptação em um meio com concentração iônica abaixo daquela verificada em seu ambiente natural, mostraram um aumento da densidade das células de cloro com proliferação dessas células também para o epitélio lamelar; em outras espécies de peixes, tais como *Oreochromis aureus* e *O. niloticus*, observaram que a 20 ppm de salinidade ocorreu um aumento significativo no número das células de cloro com conseqüente aumento da atividade Na^+ , K^+ -ATPase (Avella *et al.*, 1993). Uchida *et al.* (1996) analisaram em *Oncorhynchus nerka* e *O. mykiss* atividades enzimáticas para trocas iônicas nas células de cloro, concluindo que a população celular ampliou suas atividades enzimáticas em meio hipertônico.

Confrontado com os animais-controles, ficou evidenciada uma inversão de densidade celular, uma vez que a região basal passou a ser a zona de maior concentração celular. A ação da fração aquosa da casca não interferiu na densidade numérica de célula do cloro, sendo, portanto, indicativo de que dentre as frações analisadas essa é a menos prejudicial ao *Poecilia vivipara*.

Sobre a área celular

A leitura da área celular se equivale nas três regiões investigadas do grupo controle que

analisamos. Quando os animais foram expostos às frações de folha de pequi, a fração etérea não interferiu na área das células do cloro. Isso pode ser interpretado como uma forma de compensação, visto que essa foi a fração que mais reduziu a densidade de células de cloro nas três regiões estudadas. O mesmo não se pode considerar em relação às frações aquosa e de acetato de etila. Sob a ação dessas frações, ficou evidente uma relativa redução da área celular. O caso específico do acetato de etila provocou redução de 50,86% da área das células de cloro da região apical. Na região intermediária, a redução foi de 26,15%; e de 38,88% na região basal. A análise da significância nos permitiu considerar que na região apical a área celular sofreu perdas importantes em relação à região intermediária, confrontadas entre si. É importante considerar que a fração aquosa da folha, na qual os animais expostos foram a óbito em 80% dos casos, causou nas três regiões analisadas a maior diferença de redução em área celular em relação às outras frações da folha, o que é um indicador do grau de morbidade dessa fração.

Pode-se considerar que as frações da casca de pequi provocaram também redução de área celular. Os testes de significância nos permitem afirmar que na fração aquosa, todas as regiões tiveram suas células de cloro com áreas reduzidas. Isso não aconteceu com a região apical da fração acetato de etila, sendo que as outras duas regiões comportaram-se de modo semelhante às da fração aquosa, quando comparadas ao grupo controle. É interessante destacar que, na região basal dos filamentos expostos à fração acetato de etila, a área celular sofreu o maior impacto reducional em relação às porções apical e intermediária. Confrontados os dados das Tabelas 1 e 2, ficou também evidente que na região supracitada ocorreu um significativo aumento de densidade numérica das células de cloro. Isso permite sugerir que o animal buscou uma compensação morfofisiológica na tentativa de combate à agressão ambiental. Goss *et al.* (1994) verificaram alterações no epitélio branquial de *Ictalurus nebulosus* exposto em água tratada com cortizol e demonstraram aumento de 170% na fração de área ocupada por células de cloro no epitélio branquial.

Se frações semelhantes testadas como moluscidas interferiram na sanidade de moluscos (Marston e Hostettmann, 1985; Bezerra *et al.*, 2002), causando mortalidade e, conseqüentemente, a diminuição da população desses animais e ainda controlando o crescimento fúngico, pode-se afirmar que no *Poecilia vivipara* os extratos de casca causaram perturbações fisiológicas. Isso reforça a posição dos

autores ao recomendarem cuidado no uso de moluscicida, para não causar danos a outros organismos aquáticos (Hecker, 1981, 1985; Liu et al., 1997).

Sobre o perímetro celular

Animais-controle demonstraram perímetros equivalentes das células de cloro nas três regiões analisadas. Expostos às frações aquosa e acetato de etila da folha de pequi, observou-se que o perímetro de suas células de cloro da região apical foi reduzido (tabela 3), com níveis de significância positivos em relação à região intermediária.

A fração etérea apresentou-se inócua em relação ao perímetro celular. Quando relacionou-se alterações do perímetro celular *versus* frações da casca, pôde-se constatar que a fração acetato de etila não interferiu no comportamento da célula do cloro. O mesmo não se pôde dizer da fração aquosa, visto que esta provocou a diminuição do perímetro celular nas regiões intermediária e basal.

Bezerra et al. (2002), testando extrato da casca de pequi, demonstraram que esta tem propriedades mais moluscicidas do que o extrato das folhas nas primeiras 12 horas de exposição. Para nossos espécimes, pode-se afirmar o contrário: as frações de folha apresentaram-se mais nocivas, causando inclusive mortalidade (fração aquosa) nas 12 primeiras horas. Isso indica que o extrato de casca causaria menos impacto ambiental para peixes.

De maneira geral, percebe-se que as frações da folha comprometem com maior intensidade a morfologia das células de cloro em relação às frações da casca utilizadas neste experimento. Como as alterações morfológicas interferem diretamente nos processos fisiológicos, ainda é implícito o verdadeiro impacto ambiental dessas substâncias, necessitando realizar-se estudos interdisciplinares para garantir o real bem-estar da nossa fauna aquática.

Referências

- ALMEIDA, S.P.A. et al. *Cerrado*: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1998.
- ARAÚJO, E.J.A. Efeito do mercúrio acima do limite permitido pela OMS no epitélio branquial e intestinal de guarus (*Poecilia vivipara*) em 1998. In: 4º CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 10., 1998, Belém. *Anais...* Belém: Sociedade Brasileira de Ecologia, 1998. p. 28.
- ARAÚJO, E.J.A. et al. Effects so irritants agents on surface ultrastructure of gill rays and a filaments of guppy (*Poecilia vivipara*). *Acta Microsc.*, Rio de Janeiro, v. 6 (B), p. 700-701, 1997.
- ARAÚJO, E.J.A. et al. Toxic action of heavy metals on the branchial epithelium of guppies (*Poecilia vivipara*). *Acta Microsc.*, Rio de Janeiro, v. 8 (B), p. 355-356, 1999.
- ARAÚJO, E.J.A. et al. Efeitos de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogênico de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 2, p. 391-399, 2001.
- AVELLA, M. et al. Salinity tolerance of two tropical fish, *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. I. Biochemical and morphological changes in the gill epithelium. *J. Fish Biol.*, Honolulu, v. 42, p. 243-254, 1993.
- BEZERRA J.C.B. et al. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Rev. Fitoterapia*, Dublin, v. 73 n. 5, p. 428-430, 2002.
- BOFFI, A.V. *Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico*. São Paulo: Hucitec, 1979.
- BOYD, R.B. et al. The secondary lamellae of the gills of the cold water (high latitude) Teleosts. A comparative light and electron microscopic study. *Cell Tis. Res.*, London, v. 213, p. 361-367, 1980.
- BRANCKOFT, J.D.; STEVENS, A. *Theory and practice of histological techniques*. 2. ed. London: Churchill Livingstone, 1982.
- BRASIL. Normas para a prática didático - científica da vivisseção de animais e determinação de outras providências. *Lei nº. 6.638, 8 de maio de 1979*. Lex, v. 43, p. 416, 1979.
- CARNEIRO, C.E.A. *Efeitos de extratos de plantas do Cerrado com comprovada ação moluscicida testados em peixes (Poecilia vivipara) para diagnosticar suas ações e as respostas celulares*. 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2002.
- COPELAND, D.E. The cytological basis of chloride transfer in the gills of *Fundulus heteroclitus*. *J. Morphol.*, Sylva, v. 82, p. 201-228, 1948.
- FRED, R.D. Mstact. Crop and soil sciences departament. Version 2.10. Michigan: State University, 1990.
- GOSS, G.G. et al. Gill morphology during hipercapnia in brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*): role the chloride cells and pavement cells in the acid-base regulation. *J. Fish Biol.*, Honolulu, v. 45, p. 705-718, 1994.
- HECKER, E. Cocarcinogenesis and tumor promoters of the diterpene ester type as possible carcinogenic risk factors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, Heidelberg, v. 99, p. 103-124, 1981.
- HECKER, E. Cell membrane associated protein kinase C as receptor of diterpene ester co-carcinogens of He tumor promoter type and the phenotypic expression of tumors. *Arzneimittel-Forschung*, Aulendorf, v. 35, p. 1890-1903, 1985.
- HELOU, J.H. et al. *Farmacotécnica*. São Paulo: Artppress, 1975.
- HILDLTCH, T.P. *The chemical constitution of natural fats*. New York: John Wiley, 1941.
- HINTON, D.E. et al. Normal versus abnormal struture: considerations in morphologic responses of

- teleosts to pollutants. *J. Environ Health Perspect.*, New York, v. 71, p. 139-146, 1987.
- HUGHES, G.M.; PERRY, S.F. Morphometric study of trout gills: a light-microscopic method suitable for the evaluation of pollutant action. *J. Exp. Biol.*, Cambridge, v. 64, n. 2, p. 447-460, 1976.
- JOLY, A.B. *Conheça a vegetação brasileira*. São Paulo: Polígono, 1970.
- KEYS, A.B.; WILLMER, E.N. "Chloride secreting cells" in the gills of fishes, with special reference to common eel. *J. Physiol.*, London, v. 76, p. 368-378, 1932.
- LISBOA, A.O. O pequiizeiro. *Bol. Agric. Zootec. Vet.*, Belo Horizonte, v. 4, n. 4/6, p. 51-55, 1931.
- LIU, S.Y. et al. Anthraquinones in *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* (Polygonaceae), and phorbol esters in *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) with molluscicidal activity against the schistosome vector snail *Oncomelania*, *Biomphalaria* and *Bulinus*. *Trop. Med. Int. Health*, Oxford, v. 2, n. 2, p. 179-188, 1997.
- MALLATT, J. Fish structural changes induced by toxicants and others irritants: a statistic review. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, Ottawa, v. 42, p. 630-647, 1985.
- MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides *Phytochemistry*, Dublin, v. 24, p. 639-652, 1985.
- MCDONALD, G.D. et al. Interspecific difference in gill morphology of fresh water fish in relation to tolerance of low-pH environments. *Physiol Zoo.*, New York, v. 64, p. 124-144, 1991.
- MELO, M.S. et al. Modificações no comportamento celular das brânquias de guaru (*Poecilia vivipara*-Poeciliidae) submetidos a poluentes. Análises histológicas e ao microscópio eletrônico de varredura. In: 22 CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 1998, Recife. *Anais...* Recife: Sociedade Brasileira de Zoologia, 1998. p. 204-205.
- PASSOS, X.P. et al. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.*, São Paulo, (no prelo).
- PIRES, D.R. *Estudo citotóxico do fígado e do intestino do guaru (Poecilia vivipara) frente a extrato de plantas do Cerrado de Goiás*. 2002. Monografia (Conclusão de curso – Biomedicina) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2000.
- PIRES, M. O. Cerrado: Sociedade e Biodiversidade. In: *Plantas do Cerrado*. Goiás: Mineiros, 1997. cap. 08, p. 155-173.
- PISAM, M. Membrane system of the "chloride cell" of teleostean fish environment. *Anat. Rec.*, New York, v. 200, p. 401-414, 1981.
- RANDALL, D. et al. Equilíbrio Osmótico e Iônico. In: *Fisiologia Animal: mecanismos e adaptações*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 14, p. 569-571.
- SABÓIA-MORAIS, S.M.T. et al. Evaluation of the effect of extracts of Cerrado plants of gill cells of guppies (*Poecilia vivipara*) used as biomonitors. *Acta Microsc.*, Rio de Janeiro, v. 8 (B), p. 357-358, 1999.
- SABÓIA-MORAIS, S.M.T. et al. Ultrastructure of reticular-tubular in chloride cells in gills fish. In: 9 CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOLOGIA CELULAR, 1996 (a), Águas de São Pedro. *Anais...* Águas de São Pedro, 1996a. p. 151.
- SABÓIA-MORAIS, S.M.T. et al. Gills of fish submitted to experimental pollution. A histochemical and histological study. In: 17 CONGRESSO BRASILEIRO DE ANATOMIA, 1996, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza, 1996b. p. 700.
- SILVA, R.D. O pequi: contribuição ao conhecimento das plantas úteis do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMÁCIA, 1939, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte.
- SMITH, H.W. The excretion of ammonia and urea by the gills of the fish. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 81, p. 727-742, 1929.
- SOUZA, P.R. et al. Cytochemical and morphometric study of chloride cell modulation behavior in the presence of changes in salinity guppies. *Acta Microsc.*, Rio de Janeiro, v. 8 (B), p. 351-352, 1999.
- UCHIDA, K. et al. Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in Na⁺, K⁺-ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. *J. Exp. Zool.*, New York, v. 276, p. 193-200, 1996.
- VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no cerrado. In: SAVANA SIMPOSIUM, 1998, Brasília. *Anais...* Brasília: Embrapa-CPAC, 1998. p. 169-171.
- ZADUNAISKY, J.A. Chloride cells and osmoregulation. *Kidney Intv.* New York, v. 49, n. 6, p. 1563-1567, 1996.

Received on November 25, 2002.

Accepted on February 20, 2003.