

ISABEL GERTRUDES ARRIGHI DE ARAÚJO NEVES

**POTENCIAL DO ÓLEO DE ORÉGANO COMO ATENUADOR DOS DANOS
CAUSADOS PELO ARSÊNIO EM LAMBARIS-DO-RABO-AMARELO, *Astyanax aff.*
*bimaculatus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

N514p
2017

Neves, Isabel Gertrudes Arrighi de Araújo, 1987-
Potencial do óleo de orégano como atenuador dos danos
causados pelo arsênio em lambaris-do-rabo-amarelo, *Astyanax*
aff. bimaculatus / Isabel Gertrudes Arrighi de Araújo Neves. –
Viçosa, MG, 2017.
xv, 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.28-32.

1. Peixes - Alimentação e rações. 2. *Astyanax aff.*
bimaculatus. 3. Orégano. 4. Antioxidante. 5. Arsênio.
6. Alimentos - Toxicologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação
em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22 ed. 597.48

ISABEL GERTRUDES ARRIGHI DE ARAÚJO NEVES

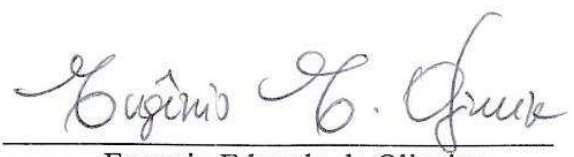
**POTENCIAL DO ÓLEO DE ORÉGANO COMO ATENUADOR DOS DANOS
CAUSADOS PELO ARSÊNIO EM LAMBARIS-DO-RABO-AMARELO, *Astyanax aff.*
*bimaculatus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 02 de março de 2017.



Pollyanna de Moraes França Ferreira



Eugenio Eduardo de Oliveira



Jener Alexandre Sampaio Zuanon
(Orientador)

“Não há problema em não saber todas as respostas. É melhor admitir nossa ignorância do que acreditar em respostas que podem estar erradas. Fingir que sabe tudo fecha a porta para a descoberta do que realmente estava lá”

Neil deGrasse Tyson

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho em primeiro lugar A **Deus e a Meishu Sama**;*

*Dedico a minha família, meus avós **Doninho e Maria** (in memorian), pelos valores ensinados, por todos os anos que tive o privilégio que estar ao lado de vocês em vida, pelos exemplos de amor, união, respeito, ternura, perseverança e garra que aprendi com vocês, jamais encontrarei nesta vida seres humanos que sejam como vocês. Não há nada que preencha o vazio da ausência que vocês deixaram. Serei feliz no dia em que nos reencontrarmos e espero que até que este dia chegue que eu possa ter realizado todos os sonhos que planejamos e que eu possa chegar a vocês e dizer com orgulho, missão cumprida!!!*

*Dedico aos meus pais **Isaias e Ezilma**, pois cada um vocês dentro das suas possibilidades contribuíram para eu me tornar a profissional que sou hoje e estiveram ao meu lado me dando todo apoio e incentivo. Em especial a minha mãe, pois ela foi pai e mãe, foi sempre a pessoa que jamais mediu esforços para me proporcionar tudo de melhor, que reza por mim todos os dias, que torce por mim, que acredita em mim até mesmo quando eu não acredito, mãe você é meu maior exemplo, o melhor presente que Deus poderia ter me concedido, não há “obrigados” suficientes que possam suprir tudo que eu tenho e tudo que eu construí até aqui.*

*Dedico a minha tia **Léa** (in memorian) que me disse que todos os sonhos podem se realizar, de que QUERER É PODER! De ter me proporcionado estudar em boas escolas por alguns anos, por ter contribuído durante muitos anos para minha formação como pessoa, tenho certeza de que se as circunstancia fossem outras, você teria contribuído ainda mais, mas aos menos eu tenho minha consciência tranquila de que tudo que você fez, não foi em vão. De que todos os seus esforços e todos os seus investimentos foram levados com muita responsabilidade e com muito comprometimento.*

*Dedico aos meus irmãos **Marcela e Hugo**;*

*Dedico ao **Renato** pelo amor, amizade e companheirismo. Meu melhor amigo, meu companheiro, meu amor. Dizem que nessa vida tudo tem um tempo certo e eu acredito nisso.*

Você chegou à minha vida para me mostrar que tudo vale a pena. Foram dois anos muito difíceis, mas em todos os momentos você estava literalmente ao meu lado, perdi a conta de quantos domingos, feriados, fora os demais dias em que você estava me ajudando a limpar os aquários, carregando baldes e mais baldes de água, quantas vezes passamos dias e quase noites no laboratório, eu jamais vi um amor assim que está presente nas alegrias e nas tristezas, nos dias bons e nos dias de dificuldades, nos dias de “estresse oxidativo”, nos dias de “micrótomo”, nos dias de desmonte e por aí vai... sem dúvida a pessoa mais presente na minha vida e que mais me deu a mão, literalmente foi você Renato e jamais terei como agradecer a você todo seu apoio e toda sua ajuda. Amor, obrigada por TUDO, principalmente por não ter desistido de mim ainda, por estar superando todos nossos problemas junto comigo. Essa dedicatória a você é muito mais do que merecida. Amo muito você.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Foi fácil? Eu diria que depois de caminhar até aqui, realmente não foi nada fácil. Mas ao mesmo tempo, poderia ter sido muito mais difícil, e não foi. Sabe porquê? Porque você, **Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, permitiu que fosse mais leve, que fosse mais humano e que fosse mais motivador.*

Confesso que não teve um único dia em que eu não tenha pensado em desistir, mas em todos eles o motivo que me fez continuar foi você. Passei a entender que as escolhas que fazemos sempre virão com um preço a se pagar, além disso, para cada uma delas, pode haver inúmeras consequências, e talvez a maior lição que você me ensinou foi encarar as situações de frente ao invés de desistir mediante os obstáculos que se impõe ao longo do tempo.

E foi isso que eu aprendi de mais valioso com você, a não desistir de um sonho, seja ele qual for, independente das dificuldades, pois sempre haverá alguém para nos encorajar.

Hoje, Jener, este agradecimento especial dedico de todo meu coração a você, que acreditou que eu seria capaz e que não permitiu que eu desistisse no meio do caminho. Eu quero lhe agradecer por cada dia nos últimos anos, por cada conversa, por cada vez em que você dedicou seu tempo para me ensinar, para me corrigir, para me fazer crescer como pessoa possibilitando me tornar uma profissional mais qualificada e uma pessoa melhor.

Desculpe me se eu não sou e não fui o “modelo de aluna exemplar”, mas quero que você saiba que procurei fazer o meu melhor. O trecho de uma música reflete com perfeição o que hoje eu sinto, pois nem tudo na vida...

“...não é sobre chegar no topo do mundo

E saber que venceu” e nem: “é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu.”

“É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações

E assim ter amigos contigo

Em todas as situações

A gente não pode ter tudo

Qual seria a graça do mundo se fosse assim?

Por isso, eu prefiro sorrisos

E os presentes que a vida trouxe

Pra perto de mim” E realmente a vida me deu muitos presentes ao longa desta jornada, me mostrou o que é ter amigos e o que é ter pessoas que mesmo não sendo amigos, estiveram ao meu lado para me ajudar de coração aberto. A gratidão é um dos maiores sentimentos que eu

tenho por você Jener. Meu avô dizia que gratidão é a maior riqueza que Deus nos proporciona.

Hoje meu sentimento é de alívio, e se foi possível encerrar mais este ciclo na minha vida é graças a você. Quero poder levar comigo o seu exemplo, e que a nossa relação de aluna e professor persista assim como nossa amizade, que pretendo levar para a vida toda.

Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal de Viçosa (UFV)** por intermédio do Departamento de Biologia Animal, pela oportunidade de realização deste curso;

Ao programa de **Pós-Graduação em Biologia Animal** pela oportunidade de cursar o mestrado;

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa durante a realização deste curso;

Ao meu orientador **Prof. Dr. Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, pela sua disponibilidade em me orientar, por ter acreditado que eu era capaz e por não me deixando desistir de concluir este curso. O aprendizado e as experiências adquiridas ao longo do curso foram muito além de conhecimentos acadêmicos e que levarei comigo por toda a vida.

Ao meu Coorientador **Prof. Dr. Juraci Alves de Oliveira**, pelas orientações, conversas, suporte estrutural e emocional e pela grande amizade. Obrigada também pela disponibilização de recursos e reagentes, para que eu pudesse executar este trabalho da melhor maneira possível, sem você isso não teria sido possível.

A minha coorientadora, amiga e companheira, **Suellen da Silva Condessa**, pelos dias e noites sem dormir. A gratidão a você Suellen é imensurável.

Ao professor **Prof. Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta**, que apesar de não ser meu coorientador sempre me ajudou a resolver vários problemas que surgiram ao longo do curso, que disponibilizou o laboratório de histologia para meu uso em tempo integral, inclusive nos finais de semana de modo a me proporcionar concluir com êxito algumas etapas das análises histológicas, pela disponibilização de materiais e pelas orientações, por tirar muitas vezes minhas dúvidas, por estar sempre disponível a me ajudar, meus sinceros agradecimentos.

A professora **Eveline Mantovani Alvarenga**, a você o sentimento de gratidão é de filha, tantas vezes me deu colo, conselhos, suporte, substituiu com louvor a distância e ausência da minha mãe, e por muitas e muitas vezes me orientou academicamente e profissionalmente

com todo amor e atenção. Que sorte eu tive por ter uma pessoa como você durante minha graduação e durante a pós-graduação também.

A professora **Gisele Lessa**, por todo suporte, pelos diálogos, por todos os momentos difíceis que passei durante o curso e em todos, ela esteve do meu lado, meu muito obrigada.

A professora **Prof^a. Dr.^a Mariella Bontempo Duca de Freitas** por disponibilizar o laboratório para execução das análises de estresse oxidativo, pela doação de alguns reagentes e materiais e por contribuir para a finalização deste trabalho, meu muito obrigada.

A doutoranda **Jerusa Maria Oliveira** por todo suporte e toda paciência em me ensinar e me auxiliar na execução das análises de estresse oxidativo, por estar sempre disponível durante todas as etapas e tirando minhas dúvidas, contribuindo assim para que eu pudesse concluir este trabalho. Que a vida possa lhe proporcionar em dobro todo apoio que você me deu e que surjam no seu caminho pessoas também que lhe apoiem e lhe auxiliem como você fez isso por mim ao longo dos últimos meses. Meu muito obrigada.

Ao **Marcos Rodrigo de Oliveira**, farmacêutico bioquímico, responsável pelo laboratório de análises clínica da Divisão de Saúde da UFV, por me receber e por contribuir para a realização das análises das transaminases no plasma.

Ao **Rafael Alves Vianna**, por me ajudar com materiais e por me fornecer alguns ingredientes para a elaboração das rações do experimento, pelas vezes em que esteve comigo no laboratório sendo um ombro amigo ou um ombro forte na limpeza das caixas de 250 e 500 litros, pois se tem dias que jamais vou esquecer decorrentes do mestrado, sem dúvidas são os dias de troca de água, serão inesquecíveis e únicos, pois pretendo nunca mais limpar uma caixa d'água na minha vida, a não ser que seja caso de vida ou morte. Meu muito obrigada a você Rafael.

Aos meus colegas do **LAFAP – Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura**, **Pollyanna de Moraes França Ferreira**, **David Silva Souza**, **Karina Ventura Boechat Martins**, **Débora Werneck Caldas**, **Juliana Rodrigues Gomes**, **Luana Belique Ruy** e **Matheus Ferreira Grossi** que estiveram comigo nesta caminhada. **Em especial a Sendy Moreira Reis**, **Alex Junio da Silva Cardoso**, **Suellen Silva Condessa**, **Wanderson Valente**

dos Santos, Jhenese Guimarães Pereira Rocha, Maria Tatiana Soares Martins e André Luis Fialho Ladeira, a todos vocês meu agradecimento mais que merecido, vocês estiveram comigo durante meses, auxiliando na manutenção e adaptação dos peixes, na montagem e desmontagem das estruturas do experimento, antes, durante e após o experimento, sem a ajuda e apoio de cada um de vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

Aos ex-alunos do programa de mestrado em Biologia Animal (DBA/UFV), **Rodrigo Kasai, Daniel Abreu Vasconcelos Campelo, Luiz Thiago Versiani Miranda, Frederico Werneck Lima, Alfredo Rubén Palomino, Márcio Yoshiyuki Kanashiro, Renato Barbosa Ferraz, Mariana Molica Silveira e Marcelo Duarte Pontes**, em primeiro lugar pela amizade e companheiro por todos os anos em que convivi com cada uma de vocês, mais que amigos, cada um de vocês tem um espaço mais que especial no meu coração, vocês foram minha família por anos aqui em Viçosa, tornando meus dias mais alegres e mais suaves, obrigada também pelos ensinamentos, pelas trocas de experiências durante a graduação e durante a pós também. Uma saudade imensa de muitos de vocês que hoje já não estão mais aqui em Viçosa.

A **Renata Cristina Barbosa**, por todas as vezes que paramos nos corredores e você meu ouviu, me deu seu ombro amigo e me escutou. E claro, obrigada pela disponibilidade em me fornecer o nitrogênio líquido nas vezes em que precisei, sem seu suporte e boa vontade não teria conseguido executar todas as minhas coletas. Obrigada a você pela amizade, pela torcida e pelo carinho.

Agradeço aos meus familiares e amigos

Aos meus pais, **Isaias e Ezilma**, aos meus irmãos **Marcela e Hugo**, ao meu namorado **Renato**.

Aos meus amigos do **Johrei Center**, uma segunda família aqui em Viçosa, em especial a Ministra **Maria Aparecida Pinheiro Paes**, que por tantas e tantas vezes me deu maior carinho, atenção e amor.

A **Thais Gornati Gonçalves**, por toda amizade, por estar tão presente, mesmo estando tão longe, por me ouvir, apoiar e por ter estado ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida nos últimos três anos, desde que ingressei no mestrado.

A **Maria Anita Silva de Paiva** e a **Camila Ferreira Azevedo**, não sei o que dizer a vocês duas, que possa ser suficiente para expressar o quanto as quero bem e como foi confortante ter o ombro amigo e o apoio de ambas durante vários momentos ao longo dos últimos dois anos. Realmente Deus coloca anjos no caminho da gente, e é o que vocês são na minha vida, amizade que superou o vínculo profissional que nos uniu um dia. Obrigada a cada uma pelo caminho e pela torcida, sei o quanto vocês torceram para que eu conseguisse.

Ao **Ângelo Chequer** e aos meus ex colegas de trabalho da Prefeitura Municipal de Viçosa, em especial àqueles que trabalhei diretamente no Setor de Planejamento do Município de Viçosa - IPLAM pelas amizades feitas, pelo tempo de convivência, parceira que tivemos juntos e principalmente pela compreensão e flexibilidade nos meus horários para que eu conseguisse cumprir minhas responsabilidades e obrigações do curso de mestrado.

A **Patrícia Magalhães, Priscila Magalhães, Jaqueline Carvalho e Sabrina Isabel** por terem me acolhido, por terem feito que eu me sentisse como parte da “Família Carisma”, a você em especial Patrícia, pois, se eu consegui manter minhas despesas em dia, se eu e Renato tivemos o que comer e condições de nos manter nos últimos meses, sem dúvida foi pela ajuda imensa que você me proporcionou. Pouquíssimas pessoas nesta vida fariam pelo seu próximo o que você fez e ainda faz por mim, e tenho certeza de que Deus está reservando dias ainda mais abençoados na vida de cada uma de vocês. Obrigada a todas, de todo meu coração, pelo que vocês fazem por mim.

A todos meus amigos e colegas de Viçosa, Rio Pomba e Rio de Janeiro pela parceria, pela amizade e pelo companheirismo.

A todas as pessoas que de alguma forma fizeram com que eu me tornasse uma pessoa melhor ao longo dessa jornada e que colaboraram para que este dia fosse possível, meu muito obrigada.

BIOGRAFIA

Isabel Gertrudes. Arrighi de Araújo Neves, filha de Isaias de Oliveira Neves e Ezilma Sueli Arrighi de Araújo, nasceu em 29 de julho de 1987 em Guarani, Minas Gerais, Brasil.

Concluiu o ensino médio em dezembro de 2005 pelo Colégio Anglo de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Graduou se em Engenharia Agrônômica, em janeiro de 2012 pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, Brasil.

Pós graduou-se em Proteção de Plantas em agosto de 2014, pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, Brasil.

Ingressou no programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, em nível de Mestrado em março de 2014, pelo Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa (UFV) – Viçosa, Minas Gerais, defendendo a dissertação em 02 de março de 2017.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências bibliográficas.....	3
ARTIGO: <u>P</u> POTENCIAL DO ÓLEO DE ORÉGANO COMO ATENUADOR DOS DANOS CAUSADOS PELO ARSÊNIO EM LAMBARIS-DO-RABO-AMARELO, <i>Astyanax aff. bimaculatus</i>	5
RESUMO.....	6
INTRODUÇÃO	7
MATERIAL E MÉTODOS	9
<i>Pré-experimento: Segurança do uso de óleo de orégano em dietas para peixes</i>	9
Animais e condições experimentais.....	9
Histopatologia das brânquias e do fígado	11
Estresse oxidativo	12
Enzimas transaminases	13
Análise estatística	14
<i>Óleo de orégano como atenuador dos danos causados pelo arsênio</i>	14
Análise estatística	15
<i>Pré-experimento: Segurança do uso de óleo de orégano em dietas para peixes</i>	16
<i>Experimento I: Óleo de orégano como atenuador dos danos causados pelo arsênio</i>	19
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÕES.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXO 1.....	33

RESUMO

NEVES, Isabel Gertrudes Arrighi de Araújo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **Potencial do óleo de orégano como atenuador dos danos causados pelo arsênio em lambaris-do-rabo-amarelo, *Astyanax aff. bimaculatus*.** Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Coorientadores: Juraci Alves de Oliveira e Suellen da Silva Condessa.

A utilização de águas públicas para a criação de peixes pode resultar em menor desempenho produtivo quando estas águas estão poluídas por compostos tóxicos, como o arsênio. A toxicidade do arsênio ocorre principalmente pela geração de espécies reativas de oxigênio. A contaminação pelo arsênio pode acumular nos tecidos e prejudicar a saúde dos seres humanos que consomem estes peixes. Dessa forma, são necessárias técnicas para reduzir a acumulação e a toxidade do arsênio em peixes. Uma possibilidade de redução/prevenção destes danos é a utilização de aditivos nas dietas, como o orégano, em função de sua alta capacidade antioxidante. Com o presente estudo objetivamos avaliar o potencial do óleo de orégano como atenuador dos danos causados pela exposição ao arsênio em *Astyanax aff. bimaculatus*. Após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleo de orégano (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg de óleo de orégano), os peixes foram expostos a uma solução de arsenato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) na concentração de 5,0 mg/L de arsênio durante sete dias. Previamente foi realizado um pré-experimento que mostrou que o uso de óleo de orégano em dietas para *A. aff. bimaculatus* é seguro e que o mesmo é capaz de neutralizar espécies reativas de nitrogênio. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três níveis de óleo de orégano na dieta (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg de óleo de orégano) e quatro repetições. Fêmeas adultas de *A. aff. bimaculatus* ($6,42 \text{ g} \pm 0,89$) foram alimentadas três vezes ao dia durante 30 dias com as dietas experimentais. Ao final desse período, os peixes foram eutanasiados para coleta de amostras. Foram avaliadas as concentrações das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no plasma e alterações histopatológicas e estresse oxidativo nas brânquias e no fígado. Nos peixes expostos ao arsênio não foi observada mortalidade em nenhum dos tratamentos avaliados. A atividade da enzima SOD nas brânquias dos peixes alimentados com óleo de orégano (1,5 e 2,5 g/kg) foi maior que no grupo controle, indicando que o orégano tem efeito protetor contra o estresse oxidativo. Nas brânquias dos peixes alimentados com óleo de orégano foi observada maior frequência de hipertrofia de células mucosas (1,5 e 2,5 g/kg) e de necrose (2,5 g/kg) em relação ao tratamento controle. A atividade da enzima ALT no plasma foi maior nos peixes alimentados com 2,5 g/kg de óleo de orégano, indicando dano hepático. Apesar de o orégano apresentar efeito redutor do estresse oxidativo em brânquias, tanto na presença como na ausência de arsênio, não é

recomendado seu uso como atenuador dos danos causados pelo arsênio em *A. aff bimaculatus* devido este causar danos hepáticos e necrose branquial de forma dose dependente. Danos hepáticos e branquiais causados pelo orégano (2,5 g/kg), apenas na presença de arsênio indicam efeito sinérgico entre eles.

ABSTRACT

NEVES, Isabel Gertrudes Arrighi de Araújo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Potential of oregano oil as attenuator of arsenic damage in yellowtail lambaris, *Astyanax aff. bimaculatus***. Advisor: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Co-advisors: Juraci Alves de Oliveira and Suellen da Silva Condessa.

The use of public waters for fish farming may result in lower productive performance when these waters are polluted by toxic compounds such as arsenic. The toxicity of arsenic occurs mainly by the generation of reactive oxygen species. Arsenic contamination can accumulate in tissues and harm the health of humans who consume these fish. Thus, techniques are needed to reduce the accumulation and toxicity of arsenic in fish. One possibility of reduction/prevention of damages is the use of additives in diets, such as oregano, due to its high antioxidant capacity. With the present study we aimed to evaluate the potential of oregano oil as an attenuator of the damages caused by exposure to arsenic in *Astyanax aff. bimaculatus*. After 30 days of feeding with the diets with oregano oil (0.0, 1.5 and 2.5 g / kg of oregano oil), fish were exposed to a solution of sodium arsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in the concentration 5.0 mg/L arsenic for seven days. A preliminary experiment was carried out which showed that the use of oregano oil in diets for *A. aff. bimaculatus* is safe and that it is capable of neutralizing reactive nitrogen species. The experiment was conducted in a completely randomized design with three levels of dietary oregano oil (0.0, 1.5 and 2.5 g/kg of oregano oil) and four replicates. Adult females of *A. aff. bimaculatus* ($6.42 \text{ g} \pm 0.89$) were fed three times a day for 30 days with the experimental diets. At the end of this period fish were euthanized for sample collection. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) enzymes and histopathological and oxidative stress in gills and liver were evaluated. In fish exposed to arsenic, no mortality was observed in any of the evaluated treatments. Activity of SOD enzyme in the gills of fish fed with oregano oil (1.5 and 2.5 g/kg) was higher than control group, indicating that the oregano has protective effect against oxidative stress. In the fish gills fed oregano oil, a higher frequency of mucous cells hypertrophy (1.5 and 2.5 g/kg) and necrosis (2.5 g/kg) was observed in relation to control treatment. Plasma ALT activity was higher in fish fed with 2.5 g/kg of oregano oil, indicating liver damage. Although oregano has a reducing effect on oxidative stress in gills, both in the presence and absence of arsenic, its use as an attenuator of arsenic damage in *A. aff. bimaculatus* is not recommended because it causes liver damage and gill necrosis in a dosage form dependent. Liver and gill damage caused by oregano (2.5 g/kg), only in the presence of arsenic indicate a synergistic effect between them.

INTRODUÇÃO GERAL

Os metais pesados, por não possuírem biodegradabilidade geram grande impacto ambiental, permanecem em ciclos biogeoquímicos globais causando acumulação e por isso, representam sério risco para a humanidade (Akthar & Moham, 1995). Os efluentes de mineradoras e indústrias têxteis contribuem consideravelmente para a contaminação das águas públicas fazendo com que os organismos aquáticos sejam susceptíveis à bioacumulação de metais pesados.

Os metais que apresentam os maiores riscos ambientais em função de sua toxicidade e ampla distribuição são: mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e arsênio (As) (IGAM, 2013). Os efeitos tóxicos dos metais podem incluir alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, patologias em geral, respostas farmacocinéticas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (Rand e Petrocelli, 1985).

Considerando que a maior parte das bacias hidrográficas apresenta metais pesados em concentrações acima das permitidas pelos órgãos de monitoramento de qualidade de água (IGAM, 2013), boa parte das águas utilizadas para o cultivo de peixes está contaminada por estes metais. O cultivo de peixes nestas águas pode causar danos à saúde destes animais e dos seres humanos que os consomem, bem como prejuízos econômicos na criação.

Dentre as formas de reduzir a disponibilidade de metais pesados no ambiente aquático e seus efeitos tóxicos, destacam-se os métodos químicos, a fitorremediação e a remediação microbiológica (Akpore & Muchie, 2010). Entretanto, a maioria destes métodos apresenta limitações quanto ao custo de implantação e manutenção, ao tipo e concentração do metal pesado presente na água, tempo necessário para remediação e complexidade de sua utilização (Kurniawan et al., 2006; Akpor & Muchie, 2010; Fu & Wang, 2011). Frente a estas limitações torna-se necessário avaliar formas de prevenção/redução da contaminação por metais pesados em peixes cultivados, como por exemplo, a utilização de aditivos em dietas. Dentre estes, o óleo de orégano destaca-se por sua alta capacidade antioxidante (Fukayama et al., 2005). Além disso, o óleo de orégano também apresenta propriedades antibacteriana (Sivropoulou et al., 1996, Burt & Reinders, 2003) antifúngica (Sartoratto et al., 2004), anti-inflamatória (Azuma et al., 1986), anti-helmíntica (Force et al., 2000) e digestiva (Çabuk et al., 2003). Suas propriedades são atribuídas à presença dos fenóis carvacrol e timol e os monoterpenos γ -terpineno e *p*-cimeno (Bampidis et al., 2005; Zheng et al., 2009), dentre outros.

O uso do orégano e seus princípios ativos em dietas para peixes tem mostrado efeitos positivos na capacidade antioxidante, na atividade do sistema imune, no crescimento, na

eficiência de utilização dos nutrientes da dieta e nas reservas energéticas (Zheng et al., 2009; Ahmadifar et al., 2011; Ferreira et al., 2011).

O lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax aff. bimaculatus*) pode ser considerado uma espécie adequada para avaliação dos efeitos da intoxicação por metais pesados por ser bom indicador biológico devido à sensibilidade à degradação do meio ambiente (Matsumoto & Cólus, 2000; Silva et al., 2010; Corredor-Santamaría et al., 2012). Apesar da falta de dados estatísticos que demonstrem a importância econômica da criação de lambaris, estes vem sendo cultivados na América do Sul como isca viva para a pesca esportiva, além de serem comercializados como petisco frito. Os lambaris ainda apresentam potencial para serem comercializados enlatados (Dutra et al. 2012).

Referências bibliográficas

- Ahmadifar, E., Falahatkar, B., Akrami, R. (2011). Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Ichthyology*. Vol.1(4), p.1-4.
- Akthar, N., Mohan, M. (1995). Biorremediation of toxic metal ions from polluted lake waters and industrial effluents by fungal biosorbent. *Current Science*. Vol.69, no 12.
- Akpor, O.B., Muchie, M. (2010). Remediation of heavy metals in drinking water and wastewater treatment systems: Processes and applications. *International Journal of the Physical Sciences*. Vol. 5(12), p. 1807-1817, 4.
- Al Rmalli, S. W., Haris, P. I., Harrington, C. F., & Ayub, M. (2005). A survey of arsenicin foodstuffs on sale in the United Kingdom and imported from Bangladesh. *Science of the Total Environment*, 337, 23–30.
- Azuma Y., Ozasa N., Ueda Y., Takagia N., (1986). Pharmacological studies on the antiinflammatory action of phenolic compounds. *J. Dent. Res*. Vol. 65, p. 53-56.
- BAMPIDIS, V.A., CHRISTODOULOU, V., FLOROU-PANERI, P., CHRISTAKI, E., SPAIS, A.B., CHATZOPOULOU, P.S. (2005). Effect of dietary orégano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*. Vol. 121, p. 285-295.
- Brasil. Instituto Mineiro de Gestão das Águas – IGAM. Monitoramento da qualidade das águas superficiais no estado de Minas Gerais. 2º trimestre de 2013. http://www.igam.mg.gov.br/images/stories/qualidade_aguas/2014/relatorio-aguas-superficiais-do-2o-trimestre-de-2013-minas-gerais-1o-parte.pdf. Acessado em 20/08/2015.
- Brasil. Instituto Mineiro de Gestão das Águas – IGAM. RESOLUÇÃO CONAMA nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005; Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63 • Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> Acessado em 06/10/2015.
- BURT, S.A. & REINDERS, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* 0157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. n. 36, p. 162-167.
- Çabuk, M., A. Alçiçek, M. Bozkurt and N. Imre, (2003). Antimicrobial properties of the essential oils isolated from aromatic plants and using possibility as alternative feed additives. II. *National Animal Nutrition Congress*. Vol. 18-20 September, p. 184-187.
- Corredor-Santamaría, W., Mora-Romero, C.C., Escobar-Buitrago, P.S., Cruz-Casallas, P.E., Velasco-Santamaría, Y.M. (2012). Inducción de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en *Astyanax* gr. *bimaculatus* (Pisces: Characidae) expuestas a fenantreno. *ORINOQUIA SUPLEMENTO - Meta. Colombia*. Vol. 16 (2).

- DUTRA, F.M., MACHADO, W.J., CAETANO, M.S., AND GOBBO, D.A. (2012). Avaliação sensorial do processamento em conserva, utilizando-se as espécies: tilápia (*Oreochromis niloticus*), lambari (*Astianax* spp) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Rev. Bras. Prod. Agroind.* Vol. 14(3), p. 239-244.
- Ferreira, P. D. M. F., Barbosa, J. M., Santos, E. L., de Souza, R. N., & de Souza, S. R. (2011). AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO DA TILÁPIA DO NILO SUBMETIDAS A DIFERENTES ESTRESSORES. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*. Vol.6(1), p. 56-62.
- Force, M., Sparks, W. S., & Ronzio, R. A. (2000). Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano in vivo. *Phytotherapy Research*. Vol. 14(3), p. 213-214.
- Fu, F., Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*. Vol .92, p. 407-418.
- Fukayama, E.H., Bertechini, A.G., Geraldo, A., Kato, R.K., Murgas, L.D.S. (2005). Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. *R. Bras. Zootec.* Vol. 34, n.6, p. 2316-2326.
- Kurniawan, T.A., Chan, G.Y.S., Lo, W.H., Babel, S., (2006). Physicochemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chem. Eng. J.* Vol.118, p. 83-98.
- Matsumoto, F.E., Cólus, I.M.S. (2000). Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetics and Molecular Biology*. Vol. 23, p. 489-492.
- Rand, G. M., & Petrocelli, S. R. (1985). Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. FMC Corp., Princeton, NJ.
- Sartoratto, A., Machado. A.L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., Rehder, V.L.G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 35, p. 275-280.
- Silva, R.R.P.D., Pires Junior, O.R., Grisolia, C.K. (2010). Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp. *Genetics and Molecular Biology*. Vol. 33, p.750-755.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. (1996). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 44, No. 5.
- Zheng, Z. I., J. Y. W. Tan, H. Y. Liu, X. H. Zhou, X. Xiang, and K. Y. Wang. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*. Vol. 292, p. 214–218.

**POTENCIAL DO ÓLEO DE ORÉGANO COMO ATENUADOR DOS DANOS
CAUSADOS PELO ARSÊNIO EM LAMBARIS-DO-RABO-AMARELO, *Astyanax aff.*
*bimaculatus***

Manuscrito redigido com base nas normas do periódico *Environmental Toxicology*, fator de
impacto 2.868 (Anexo 1)

RESUMO

Com o presente estudo objetivamos avaliar o potencial do óleo de orégano como atenuador dos danos causados pelo arsênio em *Astyanax aff. bimaculatus*. Após 30 dias de alimentação com dietas contendo óleo de orégano (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg de óleo de orégano), os peixes foram expostos a uma solução de arsenato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) na concentração de 5,0 mg/L de arsênio durante sete dias. Previamente foi realizado um pré-experimento que mostrou que o uso de óleo de orégano em dietas para *A. aff bimaculatus* é seguro e que o mesmo é capaz de neutralizar espécies reativas de nitrogênio. Nos peixes expostos ao arsênio, não foi observada mortalidade em nenhum dos tratamentos avaliados. A atividade da enzima SOD nas brânquias dos peixes alimentados com óleo de orégano (1,5 e 2,5 g/kg) foi maior que no grupo controle, indicando que o orégano tem efeito protetor contra o estresse oxidativo. Nas brânquias dos peixes alimentados com óleo de orégano foi observada maior frequência de hipertrofia de células mucosas (1,5 e 2,5 g/kg) e de necrose (2,5 g/kg) em relação ao tratamento controle. A atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) no plasma foi maior nos peixes alimentados com 2,5 g/kg de óleo de orégano, indicando dano hepático. Apesar de o orégano apresentar efeito redutor do estresse oxidativo em brânquias, tanto na presença como na ausência de arsênio, não é recomendado seu uso como atenuador dos danos causados pelo arsênio em *A. aff bimaculatus* devido este causar danos hepáticos e necrose branquial de forma dose dependente. Danos hepáticos e branquiais causados pelo orégano (2,5 g/kg), apenas na presença de arsênio indicam efeito sinérgico entre eles.

Palavras-chave: antioxidante, metais pesados, óleos essenciais, peixes, toxicidade aguda.

INTRODUÇÃO

A poluição decorrente das atividades agrícolas, industriais e de mineração geram grande impacto ambiental em função da toxicidade dos metais pesados presentes em seus efluentes (De Aguiar et al, 2002). Como os metais pesados não apresentam biodegradabilidade, eles permanecem em ciclos biogeoquímicos globais causando acumulação (Akthar & Moham, 1995). Para alguns metais pesados, a maioria dos tratamentos biológicos dos efluentes não é eficaz (De Aguiar et al, 2002).

Os metais que apresentam os maiores riscos ambientais em função de sua toxicidade e ampla distribuição são: mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e arsênio (As) (IGAM, 2013). Dentre estes, o arsênio pode causar estresse oxidativo, danos hepáticos, diabetes, degeneração renal, encefalopatia, lesões na pele, alterações na proliferação de células, alterações no DNA, câncer e compromete a síntese de ATP (Hughes, 2002).

Boa parte das bacias hidrográficas apresenta metais pesados em concentrações acima das permitidas pelos órgãos de monitoramento de qualidade de água (Al Rmalli et al., 2005; Das et al., 2004; Hall et al., 2006; Lin & Liao, 2008; IGAM, 2013). Portanto, a utilização dessas águas para o cultivo de peixes pode causar danos a estes organismos e aos seres humanos que os consomem. Deste modo, são necessárias medidas para reduzir a acumulação e a toxicidade do arsênio em peixes. Tais medidas podem contribuir para a redução dos danos causados pelos metais pesados e assim evitar prejuízos no desempenho produtivo de peixes.

Entre as espécies de peixes cultivados, o lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax aff. Bimaculatus*, pode ser considerado uma espécie adequada para avaliação dos efeitos da intoxicação por metais pesados por ser bom indicador biológico devido à sensibilidade à degradação do meio ambiente (Matsumoto & Cólus, 2000; Silva et al., 2010; Corredor-Santamaría et al., 2012).

Uma possibilidade de redução/prevenção destes danos aos peixes cultivados é a utilização de aditivos em suas dietas. Biswas et al. (2016) observaram que cúrcuma e gengibre apresentaram efeito protetor contra os danos causados pelo arsênio, bem como maior eficiência na eliminação do metal do corpo de vacas. Como o arsênio causa estresse oxidativo, o uso de aditivos antioxidantes em dietas para peixes pode atenuar os efeitos tóxicos do arsênio. Dentre os extratos vegetais com potencial para serem usados em dietas, o orégano destaca-se em função de sua alta capacidade antioxidante (Fukayama et al., 2005; Simitzis et al. 2008; Zheng et al. 2009). Portanto, com o presente estudo objetivamos avaliar o

potencial do óleo de orégano como atenuador dos danos causados pela exposição ao arsênio em *Astyanax aff. bimaculatus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Previamente à realização do experimento para avaliar o potencial do óleo de orégano como atenuador dos danos causados pelo arsênio, foi realizado um pré-experimento para avaliar a segurança do uso do óleo de orégano em dietas para peixes.

Pré-experimento: Segurança do uso de óleo de orégano em dietas para peixes

Animais e condições experimentais

O pré-experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg de óleo de orégano) e 4 repetições, sendo cada aquário considerado uma unidade experimental. Fêmeas adultas de *A. aff. bimaculatus* ($6,46\text{g} \pm 0,89$) foram mantidas em aquários de 34 L (20 peixes/aquário) dotados de aeração e temperatura controlada ($27 \pm 0,5$ °C) por meio de aquecedores e termostatos. Foi estabelecido o fotoperíodo de 12 horas luz /12 horas escuro, controlado por temporizador. A cada 48h cerca de 50% da água dos aquários foi sifonada.

Foi formulada uma ração basal prática e o óleo de orégano foi incluído em substituição ao caulim (tabela 1). Os peixes foram alimentados três vezes ao dia com as dietas teste durante 30 dias. Após esse período, os peixes foram eutanasiados por excesso de anestésico (400 mg de óleo de cravo por 5 min.). Foram coletadas amostras de brânquias e de fígado para avaliar estresse oxidativo e alterações histopatológicas. Nas amostras de plasma foram avaliadas a atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

Tabela 1: Formulação e composição química das dietas experimentais contendo diferentes níveis de óleo de orégano.

Ingredientes (g/kg)	Níveis de óleo de orégano na dieta (g/kg)		
	0,0	1,5	2,5
Farelo soja	375,0	375,0	375,0
Farinha peixe	200,0	200,0	200,0
Fubá milho	190,7	190,7	190,7
Farelo trigo	120,0	120,0	120,0
Caulim	2,5	1,0	0,0
Óleo de orégano	0,0	1,5	2,5
L – Lisina	2,4	2,4	2,4
DL – Metionina	6,7	6,7	6,7
Óleo de soja	75,0	75,0	75,0
Fosfato bicálcico	21,0	21,0	21,0
Sal comum	2,5	2,5	2,5
Suplemento vitamínico e mineral ¹	4,0	4,0	4,0
BHT ²	0,2	0,2	0,2
Composição química			
Energia bruta (kcal/kg)	4399,52	4399,52	4399,52
Proteína bruta (%)	32,09	32,09	32,09
Fibra bruta (%)	3,74	3,74	3,74
Lipídeos totais (%)	10,18	10,18	10,18
Cálcio total (%)	1,56	1,56	1,56
Fósforo disponível ³ (%)	0,76	0,76	0,76
Metionina (%)	1,04	1,04	1,04
Lisina (%)	1,74	1,74	1,74

¹ Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.200.000UI ; Vit. D3 ; 200.000UI ; Vit. E, 12.000mg ; Vit. K3, 2.400mg ; Vit. B1, 4.800mg ; Vit. B2, 4.800mg ; Vit. B6, 4.000mg; Vit. B12, 4.800mg; Ac. Fólico, 1.200mg; Pantotenato Ca, 12.000mg; Vit. C, 48.000mg; Biotina, 48mg; Colina, 65.000mg; Niacina, 24.000mg; Ferro, 10.000mg; Cobre, 6.000mg; Manganês, 4.000mg; Zinco, 6.000mg; Iodo, 20mg; Cobalto, 2mg; Selênio, 20mg.

² Butil hidroxi tolueno (antioxidante)

³ Valores calculados para tilapia do Nilo conforme Miranda et al., (2000).

Histopatologia das brânquias e do fígado

As brânquias e o fígado de três peixes de cada unidade experimental (doze peixes/tratamento) foram fixados por inteiro em solução fixadora Karnovsky (Karnovsky, 1965), durante 24 horas, em temperatura ambiente e transferidos para álcool 70%. Foram utilizados o fígado inteiro e fragmentos da região mediana do segundo arco branquial, que foram desidratados em série crescente de etanol e incluídos em glicol metacrilato (Historesin®, Leica, Alemanha). Foram realizados cortes semisseriados de 3 µm de espessura, com intervalo de 30 µm, obtidos com o auxílio de micrótomo rotativo (Leica, Alemanha), utilizando-se navalhas de vidro. As preparações de brânquias foram coradas com azul de toluidina e borato de sódio 1%, e as de fígado foram coradas com hematoxilina de Mayer e floxina B, montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha) e analisadas sob microscopia de luz (Olympus BX-50). Imagens digitais deste material foram obtidas utilizando fotomicroscópio Olympus CX30.

As análises histopatológicas das brânquias e do fígado foram conduzidas utilizando-se as imagens digitais obtidas a partir de cinco secções de cada órgão supracitado, observando-se cinco campos aleatórios por animal. Para cada órgão foi calculado o índice de órgão (I_{ORG}) descrito por Bernet et al. (1999) modificado por Ferreira et al. (2017), o qual é baseado na severidade (ω) e no fator de importância patológica (α) das lesões, que expressa a qualidade das lesões no órgão.

Para cada alteração histológica encontrada foi atribuído um fator de importância patológica (α) entre 1 e 3, determinado por Bernet et al. (1999), que classificam as lesões desde reversíveis a irreversíveis. Além disso, foi atribuído para cada alteração histológica um valor de severidade (ω) variando de 1 a 6, o qual é classificado desde alterações leves a graves, com base nas porcentagens das patologias, proposto por Corbett et al. (2015) (Tabela 2).

Tabela 2: Fator de importância patológica e grau da severidade das lesões (Bernet et al. 1999; Corbett et al. 2015)

Fator de importância patológica (α)	Classificação		
	1	2	3
	Reversíveis	Moderadas	Irreversíveis
Severidade das lesões (ω)	Valor de severidade		
	1 ou 2	3 ou 4	5 ou 6
	Alterações leves	Alterações moderadas	Alterações graves

Com base nos valores de severidade das lesões e nos fatores de importância atribuídos a cada patologia foi calculado um índice de órgão (I_{ORG}) para o fígado (I_{FIG}) e um índice de órgão para as brânquias (I_{BRA}), por meio da fórmula:

$$I_{ORG} = \sum (a \times \omega),$$

onde I_{ORG} é o índice de órgão, a é o valor do fator de importância e ω é o valor de severidade da lesão. O I_{ORG} é um índice qualitativo de todas as patologias observadas no órgão (Bernet et al., 1999). Quanto maior o I_{ORG} , pior é a condição de saúde do órgão.

Os valores de I_{ORG} foram enquadrados em uma classificação proposta por Zimmerli et al. (2007), modificado por Van Dyk et al. (2009) (Tabela 3) e determinados os valores do índice de saúde histológica (HHI) do órgão. Quanto menor o valor de HHI, melhor é a condição de saúde do órgão.

Tabela 3: Classificação dos índices de órgãos segundo Zimmerli et al. (2007), modificado por Van Dyk et al. (2009)

HHI	Descrição do tecido
< 10	Estrutura normal do tecido com alterações histológicas leves
10 – 20	Estrutura normal do tecido com alterações histológicas moderadas
21 – 30	Alterações histológicas pronunciadas
> 30	Alterações histológicas severas

A frequência de alterações patológicas (FQ %) foi calculada, por tipo de lesão, por peixe por meio da expressão:

$$FQ \% = \frac{n_{lesões}}{n_{total}} \times 100$$

onde $n_{lesões}$ é o número de vezes que a lesão foi detectada e n_{total} é o número total de animais avaliados.

Estresse oxidativo

Para avaliar o estresse oxidativo foi analisada a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e as concentrações de óxido nítrico (NO) e do malondialdeído (MDA) no fígado e nas brânquias. Foi formado um pool de fígados de seis

peixes/repetição para alcançar a quantidade de amostra necessária para as análises. Para as brânquias foram coletadas amostras de três peixes/repetição.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm, baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^- em peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto oxidação do pirogalol (Dieterich et al., 2000 modificado). A atividade da SOD foi expressa em U SOD/ mg de tecido.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada com base na taxa de queda do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (10 mmol/L) em espectrofotômetro a 240 nm durante 60 s (Aebi, 1984). A atividade da CAT foi expressa em $\mu\text{mol/g/min}$.

Para determinação da concentração de malondialdeído (MDA) foi adicionado ao sobrenadante solução TBARS (ácido tricloroacético 15% e 0,375% de ácido tiobarbitúrico, e HCL 0,25 N) em banho-maria por 15 minutos, resfriado e centrifugado a 10000 g por 10 minutos. A concentração de MDA foi mensurada em espectrofotômetro a 535 nm (Buege e Aust, 1978). Os cálculos foram feitos utilizando-se o coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^{-5} \text{ M/cm}$ e a concentração do MDA foi expressa em $\mu\text{M/g}$ tecido.

Para avaliar a concentração de NO, o nitrito foi usado como indicador da síntese de óxido nítrico. O nitrito é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1 % de sulfanilamida e 0.1 % naftil-etileno-diamina em 2.5 % H_3PO_4 . Desta forma, 50 μL do sobrenadante das amostras foi adicionado em microplacas com igual volume do Reativo de Griess e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida foi feita a leitura a $\lambda = 540\text{nm}$. A concentração do óxido nítrico das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressas em μM .

Enzimas transaminases

Para avaliar as alterações hepáticas foram mensuradas a atividade das enzimas transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no plasma. Para a coleta de sangue, o pedúnculo caudal foi cortado com bisturi e o sangue coletado por meio de seringa heparinizada. Foi formado um pool de sangue de cerca de 10 peixes/repetição para alcançar a quantidade de amostra necessária. As análises das transaminases ALT e AST foram realizadas pelo princípio da metodologia cinética (UV) de acordo com as metodologias recomendadas pelo fabricante dos kits utilizados (Transaminase AST (TGO) cinética K048®, Bioclin e Transaminase ALT (TGP) cinética K049®, Bioclin). A ALT catalisa a transferência do grupamento amina da alanina para α - cetoglutarato, levando à formação de piruvato e

glutamato. O piruvato em presença da desidrogenase láctica (LDH) reage com o NADH, reduzindo-se a lactato e o NADH oxida-se a NAD⁺. A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da ALT na amostra (Bioclin, transaminase ALT (TGP) cinética K049®, 2017). A AST catalisa a transferência de grupos amina do aspartato para o α - cetoglutarato, levando à formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato em presença da malato desidrogenase (MDH) reage com o NADH, reduzindo-se a Malato e o NADH oxida-se a NAD⁺. A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da AST na amostra. (Bioclin, transaminase AST (TGO) cinética K048®, 2017). A atividade de ambas as enzimas foi expressa em U/L. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 340 nm.

Análise estatística

Para avaliar os efeitos do óleo de orégano sobre as variáveis de estresse oxidativo, alterações histopatológicas e atividade das enzimas transaminases foi realizada análise de variância a 5% de probabilidade. Para a comparação dos efeitos do óleo de orégano em relação ao controle utilizou-se o Teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade. Para verificar o pressuposto de normalidade dos erros foi aplicado o teste de Lilliefors.

Óleo de orégano como atenuador dos danos causados pelo arsênio

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg de óleo de orégano) e 4 repetições, sendo cada aquário considerado uma unidade experimental. Fêmeas adultas de *A. aff. bimaculatus* (6,42g $\pm$ 0,89) foram mantidas nas mesmas condições estabelecidas no pré-experimento e alimentadas com as mesmas dietas durante 30 dias. Após esse período, os peixes foram expostos ao a uma solução de arsenato de sódio (Na₂HAsO₄.7H₂O) na concentração de 5,0 mg/L de arsênio durante sete dias. Durante a exposição ao arsênio, os peixes continuaram a ser alimentados com as mesmas dietas. Após esse período, os peixes foram eutanasiados por excesso de anestésico (400 mg de óleo de cravo por 5 min.). Foram coletadas amostras de brânquias e de fígado para avaliar estresse oxidativo e alterações histopatológicas. Nas amostras de plasma foram avaliadas a atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), seguindo as metodologias descritas anteriormente.

Análise estatística

Para avaliar o potencial do óleo de orégano como atenuador dos danos causados pelo arsênio foi realizada análise de variância a 5% de probabilidade. Para a comparação dos efeitos do óleo de orégano em relação ao controle utilizou-se o Teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade. Para verificar o pressuposto de normalidade dos erros foi aplicado o teste de Lilliefors.

RESULTADOS

Pré-experimento: Segurança do uso de óleo de orégano em dietas para peixes

Os resultados do pré-experimento mostraram que o uso de óleo de orégano em dietas para *A. aff bimaculatus* é seguro, uma vez que a taxa de mortalidade dos peixes foi negligenciável e não foram observados efeitos significativos ($p>0,05$) da suplementação de óleo de orégano para as enzimas transaminases no plasma (tabela 4). Para as frequências de alterações histopatológicas nas brânquias e no fígado (tabelas 5 e 6) e para a maioria das variáveis de estresse oxidativo avaliadas no fígado e nas brânquias (tabela 7) não houve efeito do orégano. Os peixes alimentados com a dieta contendo 2,5 g/kg de óleo de orégano apresentaram menor valor da concentração de óxido nítrico ($p<0,05$) nas brânquias que os peixes do tratamento controle (0,0 g/kg de óleo de orégano) (tabela 7; Fig. 1), indicando que o óleo de orégano neutraliza espécies reativas de nitrogênio. Não foram observadas alterações significativas nos índices de brânquias e fígado (tabela 8).

Tabela 4: Valores médios da atividade das enzimas AST e ALT no plasma de *Astyanax aff. bimaculatus* não expostos ao arsênio e alimentados com as dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg)

	Níveis de óleo de orégano (g/kg)			p valor	CV (%)
	0,0,	1,5	2,5		
AST	1666,00	1541,25	1683,00	ns	24,50
ALT	109,25	53,75	75,5	ns	74,28

AST – aspartato aminotransferase; ALT alanina aminotransferase; CV – coeficiente de variação.
ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5: Frequência de alterações patológicas (FQ) nas brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* não expostos ao arsênio e alimentados com as dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg)

Frequência de alterações patológicas nas brânquias (%)	Níveis de óleo de orégano (g/kg)			p valor	CV (%)
	0,0	1,5	2,5		
FQ _E	100,00	100,00	91,67	0,4053	9,90
FQ _{DVL}	100,00	100,00	91,67	0,4053	9,90
FQ _N	25,00	0,00	25,00	Ns	244,95
FQ _{HE}	33,33	25,00	25,00	Ns	123,29
FQ _{HpE}	66,67	58,33	75,00	Ns	73,60
FQ _{HCC}	0,00	8,33	0,00	0,4053	346,41
FQ _{HpCC}	0,00	8,33	0,00	0,4053	346,41
FQ _{HCM}	50,00	75,00	83,34	Ns	65,48
FQ _{HpCM}	41,67	75,00	33,34	0,3544	81,65
FQ _{IL}	0,00	0,00	0,00	Ns	0,00

FQ_E – frequência de edema; FQ_{DVL} – frequência de dilatação dos vasos lamelares; FQ_N – frequência de necrose; FQ_{HE} – frequência de hipertrofia de células epiteliais; FQ_{HpE} – frequência de hiperplasia de células epiteliais; FQ_{HCC} – frequência de hipertrofia de células de cloro; FQ_{HpCC} – frequência de hiperplasia de células de cloro; FQ_{HCM} – frequência de hipertrofia de células mucosas; FQ_{HpCM} – frequência de hiperplasia de células mucosas; FQ_{IL} – frequência de infiltrado leucocitário; CV – coeficiente de variação; ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6: Frequência de alterações patológicas (FQ) no fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* não expostos ao arsênio e alimentados com as dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg)

Frequência de alterações patológicas no fígado (%)	Níveis de óleo de orégano (g/kg)			p valor	CV (%)
	0,0	1,5	2,5		
FQ _H	0,00	8,33	0,00	0,4053	346,41
FQ _{DCH}	33,33	0,00	8,33	0,2857	207,85
FQ _V	75,00	66,67	91,67	ns	39,12
FQ _{DC}	91,67	58,33	83,34	0,3600	41,65
FQ _{EST}	0,00	0,00	0,00	ns	0,00
FQ _N	75,00	50,00	75,00	ns	71,69
FQ _{Np}	58,34	50,00	66,67	ns	75,60
FQ _{HH}	33,33	8,33	25,00	ns	183,71
FQ _{IL}	0,00	8,33	0,00	0,4053	346,41

FQ_H – frequência de hemorragia; FQ_{DCH} – frequência de desorganização dos cordões de hepatócitos; FQ_V – frequência de vacúolos; FQ_{DC} – frequência de degeneração celular; FQ_{EST} – frequência de esteatose; FQ_N – necrose; FQ_{Np} – frequência de núcleo picnótico; FQ_{HH} – frequência de hipertrofia de hepatócito; FQ_{IL} – frequência de infiltrado leucocitário; CV – coeficiente de variação. ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7: Valores médios de MDA, NO, CAT, e SOD nas brânquias e no fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* não expostos ao arsênio e alimentados com as dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg)

Órgão		Níveis de óleo de orégano (g/kg)			p valor	CV (%)
		0,0	1,5	2,5		
Brânquias	MDA	17,37a	23,02a	20,31a	Ns	28,18
	NO	40,68a	48,42a	20,15b	0,0408	32,34
	CAT	2,4036a	1,4057a	0,7518a	0,3360	98,50
	SOD	0,0431a	0,0414a	0,0394a	Ns	11,84
Fígado	MDA	6,31a	6,23a	6,38a	Ns	34,65
	NO	6,28 ^a	10,56a	15,35a	0,0997	48,72
	CAT	252,78a	313,53a	298,17a	Ns	23,05
	SOD	0,0098a	0,0092a	0,0096a	Ns	11,05

MDA – malondialdeído; NO – óxido nítrico; CAT – catalase; SOD – superóxido dismutase; CV – coeficiente de variação; ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

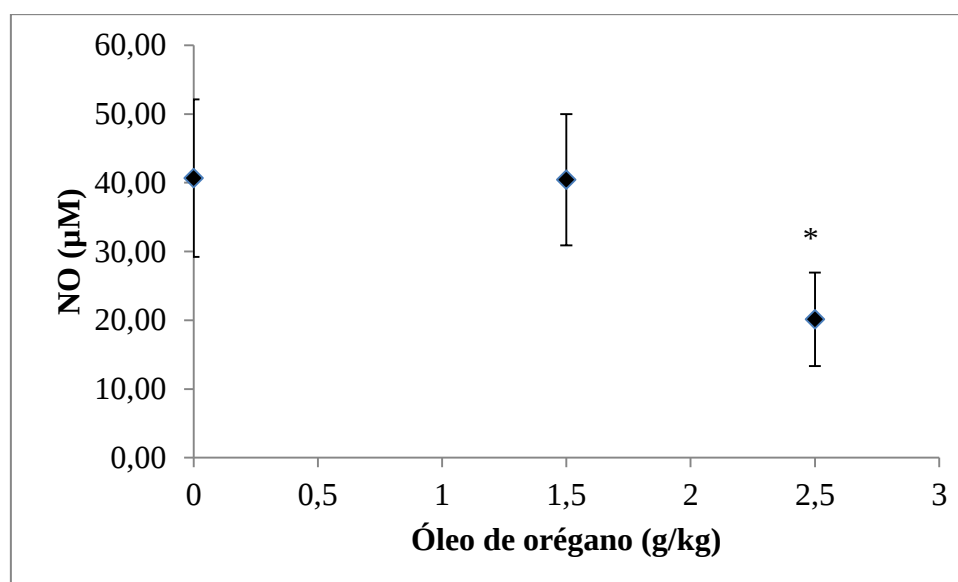


Fig 1. Óxido nítrico (NO) nas brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados durante 30 dias com diferentes níveis de óleo de orégano. * difere estatisticamente do controle pelo Teste de Dunnett (p = 0,0408).

Tabela 8: Índice de órgão das brânquias (I_{BRA}) e do fígado (I_{FIG}) em *Astyanax aff. bimaculatus* não expostos ao arsênio e alimentados com as dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg)

Índice de órgão	Níveis de óleo de orégano (g/kg)			p valor	CV (%)
	0,0	1,5	2,5		
I _{BRA}	14,67	16,58	16,84	ns	27,09
I _{FIG}	8,0025	5,92	7,42	ns	64,43

CV – coeficiente de variação; ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Experimento I: Óleo de orégano como atenuador dos danos causados pelo arsênio

Nos peixes expostos ao arsênio, não foi observada mortalidade em nenhum dos tratamentos avaliados. A atividade da enzima SOD nas brânquias dos peixes alimentados com óleo de orégano (1,5 e 2,5 g/kg) foi maior que no grupo controle ($p < 0,01$) (tabela 9; Fig. 2). Para as demais variáveis de estresse oxidativo avaliadas nas brânquias e no fígado, não houve efeito significativo do óleo de orégano (tabela 9).

Tabela 9: Valores médios de MDA, NO, CAT, e SOD nas brânquias e no fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao arsênio e alimentados com as dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg)

Órgão		Níveis de óleo de orégano (g/kg)			p valor	CV (%)
		0,0	1,5	2,5		
Brânquias	MDA	25,38a	34,62a	18,73a	0,2583	48,40
	NO	49,73a	56,23a	49,83a	0,3442	13,07
	CAT	1,1900a	1,7275a	1,0150a	0,0992	32,60
	SOD	0,0023a	0,0248b	0,0254b	0,0001	7,54
Fígado	MDA	4,19a	4,84a	7,14a	0,2326	43,79
	NO	7,89a	11,69a	15,64a	0,2145	48,70
	CAT	317,34a	325,32a	255,72a	0,1564	16,79
	SOD	0,01013a	0,0102a	0,0114a	ns	13,65

MDA – malondialdeído; NO – óxido nítrico; CAT – catalase; SOD – superóxido dismutase; CV – coeficiente de variação; ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

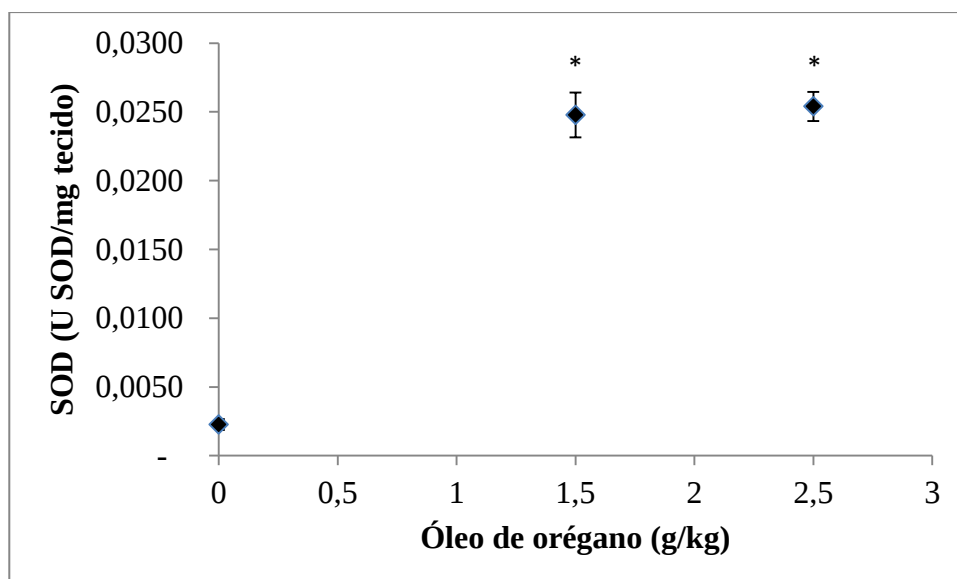


Fig. 2. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nas brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados durante 30 dias com diferentes níveis de óleo de orégano e expostos ao arsênio durante sete dias. * difere estatisticamente do controle pelo Teste de Dunnett ($p = 0,0001$).

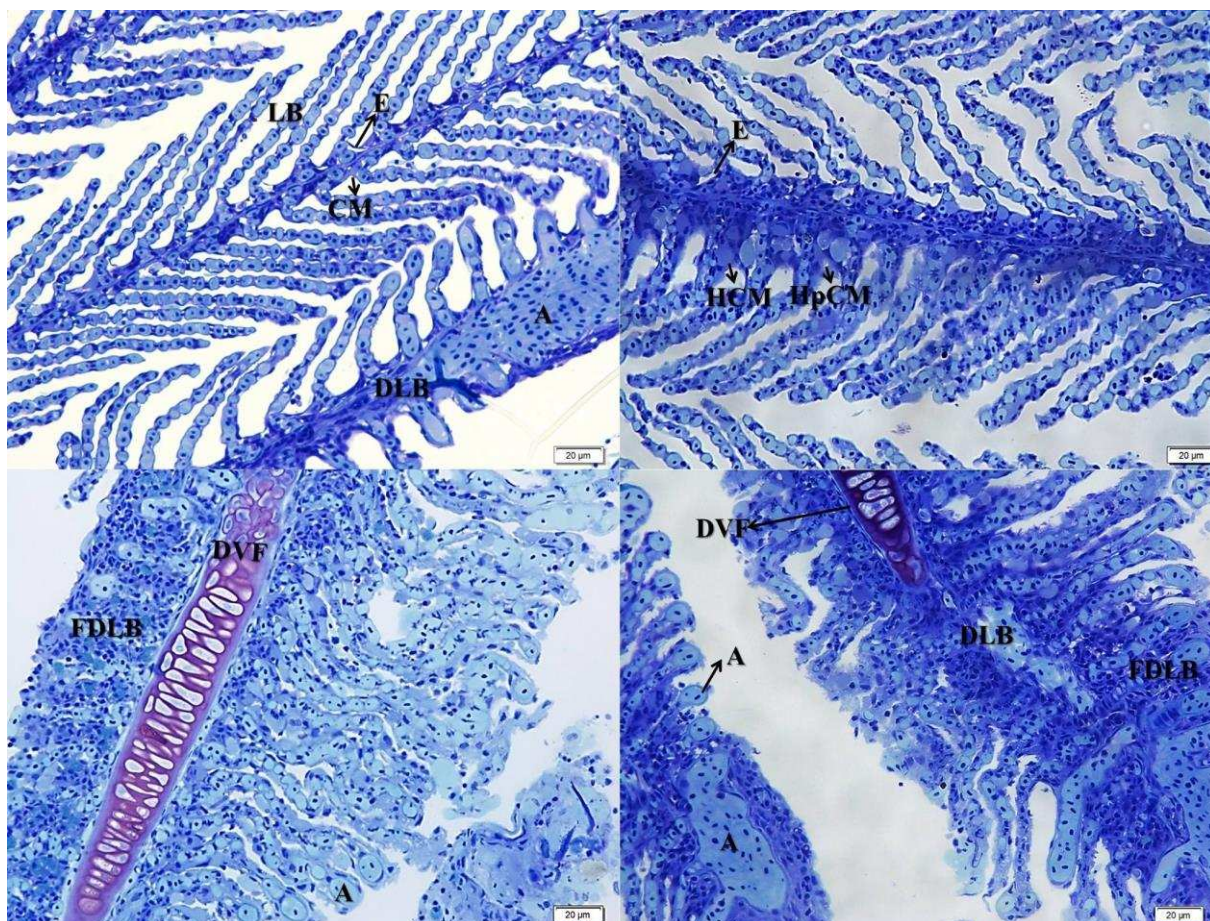


Figura 3: LB: lamela branquial; E: edema; CM: células mucosas; DLB: deformação das lamelas branquiais; A: aneurisma; HCM: hipertrofia de células mucosas; HpCM: hiperplasia de células mucosas; DVF: dilatação dos vasos nos filamentos; FDLB: fusão e deformação de lamelas branquiais.

Foram observadas as seguintes alterações histopatológicas nas brânquias de *Astyanax aff bimaculatus*: aneurisma, fusão e deformação de lamelas branquiais, deformação de lamelas branquiais, edema, dilatação de vasos nos filamentos branquiais, necrose, infiltrado leucocitário, hipertrofia e hiperplasia de células epiteliais, mucosas e ricas em mitocôndrias (Fig. 3). Nos peixes alimentados com óleo de orégano (1,5 e 2,5 g/kg) foi observada maior frequência de hipertrofia nas células mucosas ($p < 0,01$) (tabela 10; Fig. 4) e de necrose nas brânquias ($p < 0,05$) apenas para os peixes alimentados com 2,5 g/kg (tabela 10; Fig. 5). Para as demais patologias não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) do óleo de orégano (tabela 10).

Tabela 10: Frequência de alterações patológicas nas brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao arsênio e alimentados com as dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg)

Frequência de alterações patológicas nas brânquias (%)	Níveis de óleo de orégano (g/kg)			p valor	CV (%)
	0,0	1,5	2,5		
FQ _E	100,00a	100,00a	100,00a		0,00
FQ _{DVL}	100,00a	100,00a	100,00a		0,00
FQ _N	0,00a	25,00a	58,33b	0,0339	93,81
FQ _{HE}	8,33a	41,67a	58,33a	0,0813	76,93
FQ _{HP_E}	16,67a	25,00a	50,00a	ns	139,66
FQ _{HCC}	0,00a	0,00a	25,00a	0,1410	221,12
FQ _{HP_{CC}}	0,00a	0,00a	16,67a	0,1004	200,00
FQ _{HCM}	16,67a	100,00b	100,00b	0,0001	15,38
FQ _{HP_{CM}}	16,67a	25,00a	33,33a	ns	176,38
FQ _{IL}	0,00a	0,00a	8,33a	0,4053	346,41

FQ_E – frequência de edema; FQ_{DVL} – frequência de dilatação dos vasos lamelares; FQ_N – frequência de necrose; FQ_{HE} – frequência de hipertrofia de células epiteliais; FQ_{HP_E} – frequência de hiperplasia de células epiteliais; FQ_{HCC} – frequência de hipertrofia de células de cloro; FQ_{HP_{CC}} – frequência de hiperplasia de células de cloro; FQ_{HCM} – frequência de hipertrofia de células mucosas; FQ_{HP_{CM}} – frequência de hiperplasia de células mucosas; FQ_{IL} – frequência de infiltrado leucocitário; CV – coeficiente de variação; ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade

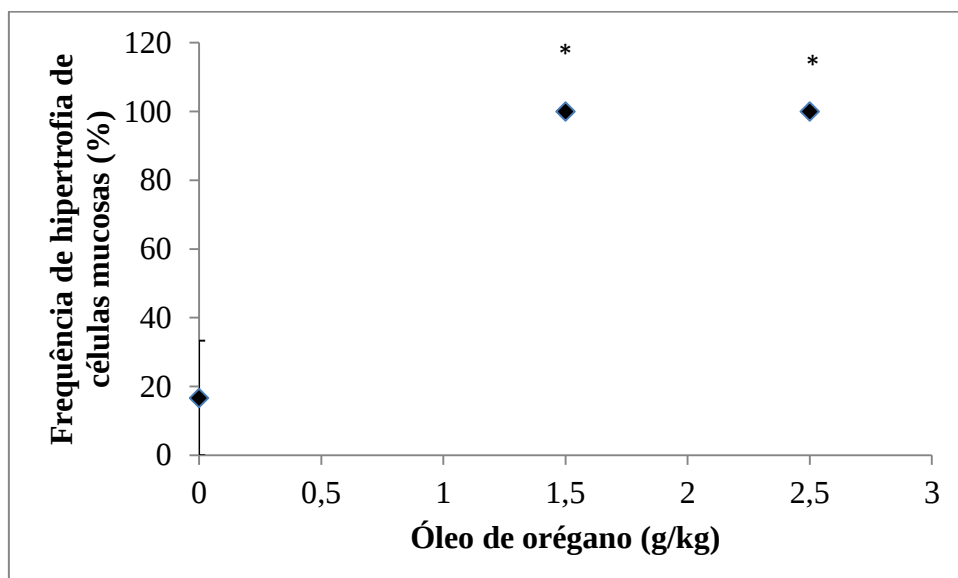


Fig. 4. Frequência de hipertrofia de células mucosas nas brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados durante 30 dias com diferentes níveis de óleo de orégano e expostos ao arsênio durante sete dias. * Difere estatisticamente do controle pelo Teste de Dunnett ($p = 0,0001$).

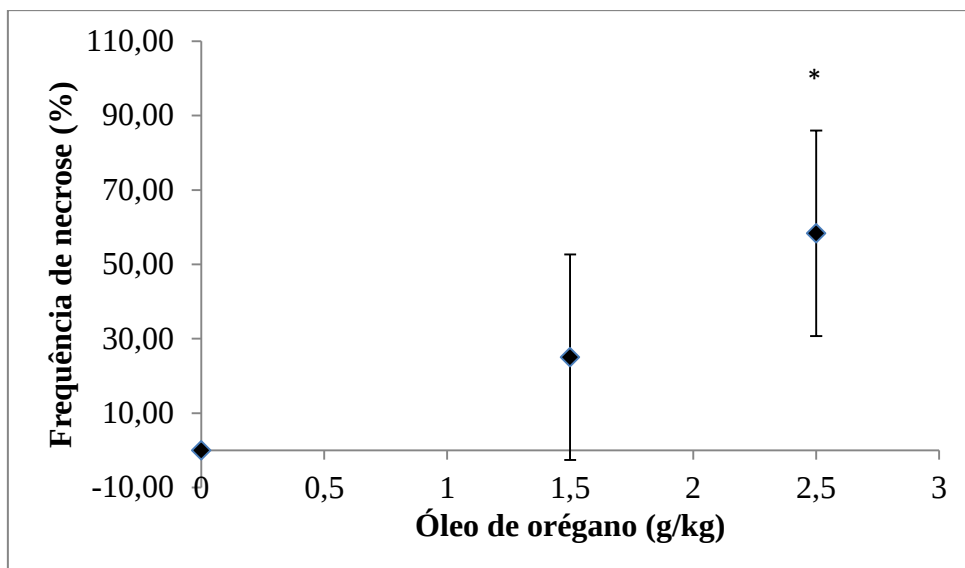


Fig. 5. Frequência de necrose nas brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados durante 30 dias com diferentes níveis de óleo de orégano e expostos ao arsênio durante sete dias. * Difere estatisticamente do controle pelo Teste de Dunnett ($p = 0,0339$).

No fígado foram observadas as seguintes alterações histopatológicas: desorganização dos cordões de hepatócitos, vacúolos, degeneração celular, esteatose, hemorragia, necrose, núcleo picnótico e infiltrado leucocitário (Fig. 6), porém, sem efeito significativo ($p > 0,05$) do óleo de orégano (tabela 11). Também não foram observados efeitos significativos ($p > 0,05$) do óleo de orégano para os índices de órgão I_{BRA} e I_{FIG} (tabela 12).

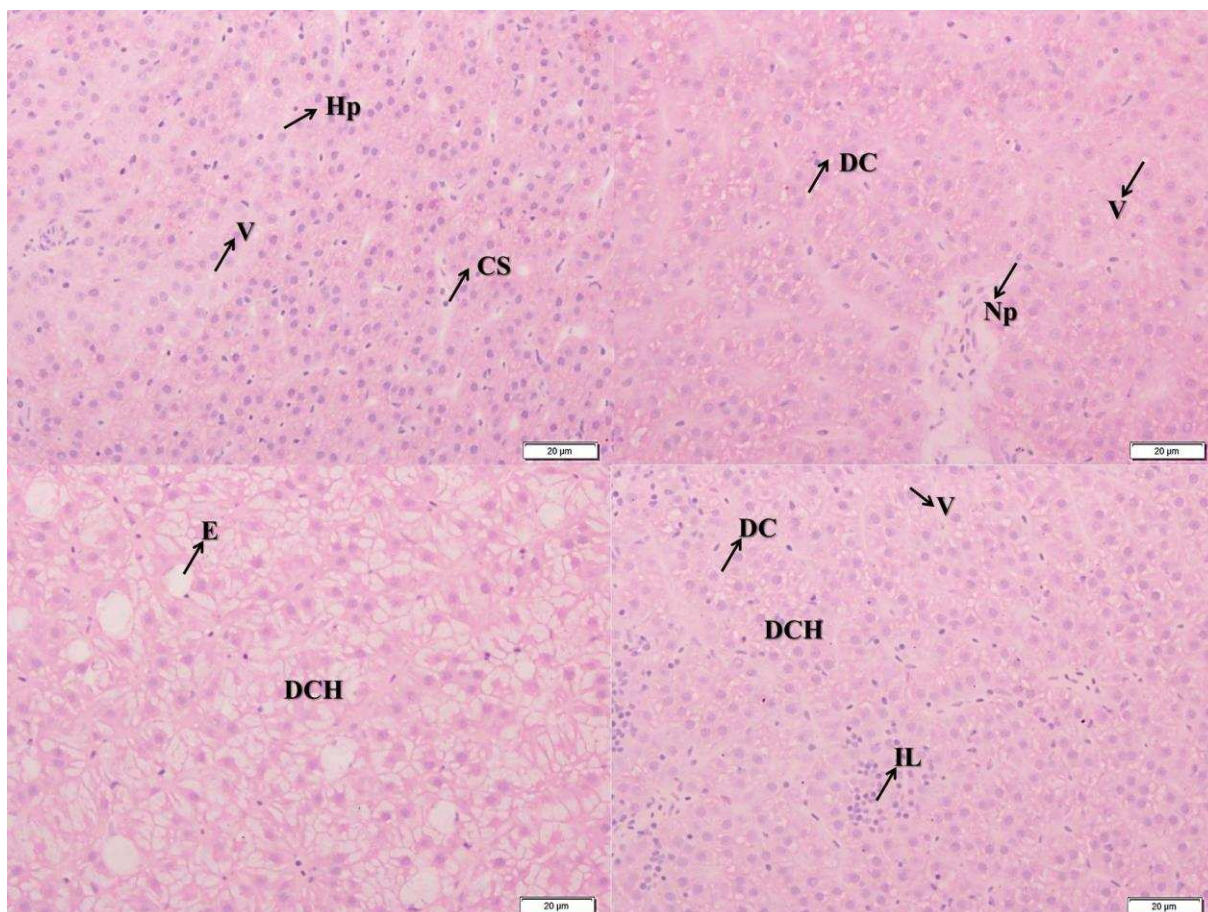


Figura 6: Hp: hepatócito; V: vacúolos; CS: capilar sinusoides; E:esteatose; DCH: desorganização dos cordões de hepatócitos; DC: degeneração celular; Np: núcleo picnótico; IL: infiltrado leucocitário.

Tabela 11: Frequência de alterações patológicas no fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao arsênio e alimentados com as dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg).

Frequência de alterações patológicas no fígado (%)	Níveis de óleo de orégano (g/kg)			p valor	CV (%)
	0,0	1,5	2,5		
FQ _H	0,00	0,00	8,33	0,4053	346,41
FQ _{DCH}	25,00	33,33	25,00	ns	135,65
FQ _V	91,67	50,00	66,67	ns	63,50
FQ _{DC}	91,67	100,00	91,67	ns	14,41
FQ _{EST}	0,00	0,00	8,33	0,4053	346,41
FQ _N	91,67	83,33	83,33	ns	33,52
FQ _{NP}	91,67	83,33	58,33	ns	46,30
FQ _{HH}	33,33	58,33	41,67	ns	91,86
FQ _{IL}	0,00	0,00	8,33	0,4053	346,41

FQ_H – frequência de hemorragia; FQ_{DCH} – frequência de desorganização dos cordões de hepatócitos; FQ_V – frequência de vacúolos; FQ_{DC} – frequência de degeneração celular; FQ_{EST} – frequência de esteatose; FQ_N – frequência de necrose; FQ_{NP} – frequência de núcleo picnótico; FQ_{HH} – frequência de hipertrofia de hepatócito; FQ_{IL} – frequência de infiltrado leucocitário; CV – coeficiente de variação; ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 12: Índice de órgão das brânquias (I_{BRA}) e do fígado (I_{FIG}) em *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao arsênio e alimentados com as dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg)

	Níveis de óleo de orégano (g/kg)			p valor	CV (%)
	0,0	1,5	2,5		
I_{BRA}	14,17	19,67	23,67	0,1214	30,36
I_{FIG}	11,58	13,67	10,92	ns	34,39

CV – coeficiente de variação; ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Para a atividade da enzima transaminase aspartato aminotransferase (AST) no plasma, não houve efeito significativo ($p > 0,05$) do óleo de orégano. Houve efeito significativo ($p < 0,01$) do óleo de orégano para a enzima transaminase alanina aminotransferase (ALT) no plasma, com maior valor nos peixes alimentados com 2,5 g/kg de óleo de orégano (tabela 13; Fig. 7).

Tabela 13: Valores médios para a atividade das enzimas AST e ALT no plasma de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao arsênio e alimentados com as dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0; 1,5 e 2,5 g/kg)

	Níveis de óleo de orégano (g/kg)			p valor	CV (%)
	0,0	1,5	2,5		
AST	2363,00a	2252,50a	1970,00a	0,1872	12,96
ALT	98,25a	51,00a	269,75b	0,0002	32,21

AST – aspartato aminotransferase; ALT alanina aminotransferase; CV – coeficiente de variação.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

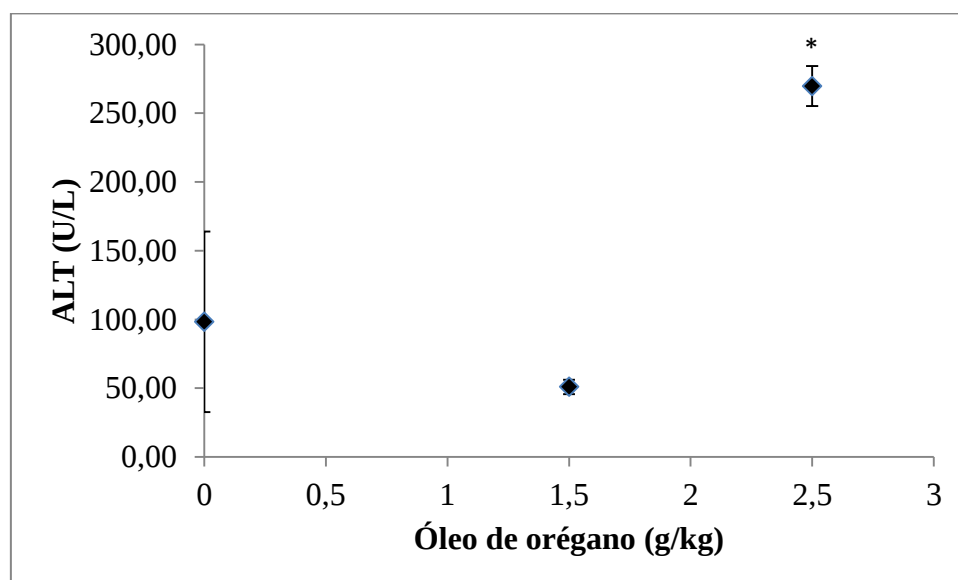


Fig. 7. Atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) no plasma de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados durante 30 dias com diferentes níveis de óleo de orégano e expostos ao arsênio durante sete dias. * Difere estatisticamente do controle pelo Teste de Dunnett ($p = 0,0002$).

DISCUSSÃO

O arsênio exerce seus efeitos tóxicos pela geração de espécies reativas de oxigênio (Liu et al. 2000) e espécies reativas de nitrogênio (Shi et al. 2004), levando ao aumento da peroxidação lipídica (Ramos et al 1995; Ramanathan et al, 2002; Sharma et al. 2009). Além disso, o arsênio pode diminuir as defesas antioxidantes naturais pela inibição das enzimas SOD, CAT e GST (Ramanathan et al. 2002; Sharma et al. 2007; Sharma et al. 2009), apesar de alguns estudos mostrarem aumento na atividade destas enzimas (Liu et al., 2000; Maiti & Chatterjee 2001; Bhattacharya & Bhattacharya, 2007). O aumento na atividade da SOD observada nas brânquias dos peixes alimentados com orégano (1,5 e 2,5 g/kg) indica que este apresenta efeito protetor contra os danos oxidativos causados pelo arsênio. Possivelmente o óleo de orégano estimula diretamente a SOD, atuando de maneira semelhante a outras plantas com atividade antioxidante, como camomila, *Chamaemelum nobile*, chá verde, *Camellia sinensis*, limão verbena, *Aloysia triphylla*, espinheiro branco, *Crataegus monogyna*, e roseira brava, *Rosa rubiginosa* (Yoo et al., 2008). Os referidos autores observaram que estas plantas atuam por dois mecanismos de ação: pela ação antioxidante direta, promovendo a neutralização de radicais livres e indireta, pela estimulação da atividade das enzimas antioxidantes. A capacidade do orégano de neutralizar radicais livres diretamente tem sido demonstrada em diversos estudos (Kim and Cho 2001; Bendini et al., 2002; Puertas-Mejía et al. 2002; Nakatani 2003; Amarowicz et al. 2009; Hernandez-Hernandez et al. 2009) devido principalmente à presença do ácido rosmarínico, do timol e do carvacrol.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula relativamente instável (Burney et al. 1999) que em concentrações relativamente altas causa danos às células e tecidos (Szabo & Thiemeermann, 1994). Os danos causados pelo NO são mediados principalmente pela produção de peroxinitrito (ONOO⁻) e ácido peroxidonitroso (ONOOH). O NO é sintetizado por diferentes isoformas da óxido nítrico sintase, como a óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS), a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS) (Soneja et al. 2005). Assim, a diminuição na produção de NO e a inibição da NO sintase podem contribuir para a redução dos danos causados pelo estresse oxidativo. No primeiro experimento foi demonstrada a capacidade do óleo de orégano em reduzir a formação de NO. O mesmo foi observado por Conforti et al. (2011). Entretanto, na presença de arsênio o orégano não promoveu a redução de NO em *A. aff. bimaculatus*. A maior quantidade de espécies reativas de nitrogênio (Shi et al. 2004) causadas pelo arsênio pode ser o motivo da ausência de efeito do orégano na redução da produção de NO.

A maior frequência de necrose nas brânquias dos peixes alimentados com a dieta contendo 2,5 g kg⁻¹ de óleo de orégano mostrou uma resposta dose-dependente. Provavelmente apenas a concentração de 2,5 g kg⁻¹ de óleo de orégano causou danos brânquias devido a maior dose de carvacrol, uma vez que Llana-Ruiz-Cabello et al. (2015) observaram que o carvacrol ou a mistura de carvacrol e timol, em altas concentrações, tiveram ação pró oxidante. Tem sido demonstrado que o óleo de orégano pode causar apoptose e necrose em vários tipos celulares como em células Caco-2 (Dusan et al., 2006; Savini et al., 2009, Llana-Ruiz-Cabello et al., 2014), em células RATEC (Bostancioglu et al., 2012) e em células CO25 (Akalin & Incesu, 2011). Entretanto, como não foi observada necrose, ou qualquer outra alteração morfológica nas brânquias dos peixes alimentados com óleo de orégano, sem a exposição ao arsênio, tal alteração histopatológica parece ter ocorrido devido a um efeito sinérgico entre o orégano e o arsênio.

As enzimas ALT e AST ocorrem em diversos órgãos como o fígado, rins, brânquias e músculos (Bell, 1968; Gaudet et al. 1975), e o aumento de suas concentrações no plasma indicam danos a estes órgãos (Casillas et al. 1983; Wells et al. 1986). Aumentos da ALT no plasma são mais específicos para caracterizar danos hepáticos do que aumentos na atividade da AST (Shahsavani et al. 2010). Porém, aumentos na atividade de ambas as enzimas tem sido relacionados com danos hepáticos agudos (Shahsavani et al. 2010). Portanto, o aumento na atividade da enzima ALT no plasma em *A. aff bimaculatus* indica danos no fígado, como observado em *Clarias gariepinus* expostos ao mercúrio (Zaki et al. 2011). A maior atividade da enzima ALT no plasma dos peixes alimentados com a dieta contendo 2,5 g kg⁻¹ de óleo de orégano também evidencia uma resposta dose-dependente e provável efeito sinérgico com o arsênio, uma vez que tal alteração não foi observada nos peixes não expostos ao arsênio.

A maior frequência de hipertrofia das células mucosas observada nos peixes alimentados com óleo de orégano indica que ocorreram adaptações morfológicas (Fernandes e Moron, 2014) que permitem a redução da absorção de arsênio da água. A hipertrofia de células do epitélio branquial e o aumento na produção de muco aumentam a distância para difusão, reduzindo a taxa de absorção de xenobióticos. Porém, também reduz a difusão de oxigênio e dióxido de carbono (Fernandes e Mazon, 2003). A liberação do muco das brânquias pode facilitar a remoção de patógenos, tóxicos e materiais estranhos aderidos às brânquias (Powell et al., 1992).

CONCLUSÕES

Apesar de o orégano apresentar efeito redutor do estresse oxidativo em brânquias de *A. aff bimaculatus* e atenuador dos danos causados pela exposição ao arsênio, não é recomendada sua utilização em função de também causar danos branquiais e hepáticos de forma dose dependente. Os danos hepáticos e branquiais na dose de 2,5 g kg⁻¹ de óleo de orégano, apenas na presença de arsênio indicam efeito sinérgico entre o orégano e o arsênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Sharma, M.K. Sharma, M. Kumar, Protective effect of *Mentha piperita* against arsenic-induced toxicity in liver of Swiss albino mice, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 100 (2007) 249–257.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* Vol.105, p.121–126.
- Akalin, G., _Incesu, Z., 2011. The effects of carvacrol on apoptosis of H-ras and N-ras transformed cell lines. *Turk. J. Pharm. Sci.* 8 (2), 105–116.
- Akthar,N.; Mohan, M. Biorremediation of toxic metal ions from polluted lake waters and industrial effluents by fungal biosorbent. *Current Science*, v.69, no 12, 1995.
- Amarowicz, R., Żegarska, Z., Rafałowski, R., Pegg, R. B., Karamać, M., & Kosińska, A. (2009). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(11), 1111-1117.
- Bell, G. R. (1968). Distribution of transaminases (aminotransferases) in the tissues of pacific salmon (*Oncorhynchus*), with emphasis on the properties and diagnostic use of glutamic-oxalacetic transaminase. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 25(6), 1247-1268.
- Bendini A, Toschi TG, Lercker G. 2002. Antioxidant activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) leaves. *Italian J Food Sci* 14(1):17–24.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt- Holm, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases*. Vol. 22(1), p. 25-34.
- Bhattacharya, A., & Bhattacharya, S. (2007). Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 66(2), 178-187.
- Bioclin, transaminase ALT (TGP) cinética K049, 2017.
http://www.bioclin.com.br/sitebioclin/wordpress/wp-content/uploads/arquivos/instrucoes/INSTRUcoes_TRANSAMINASE_ALT_TGP_CINETICA.pdf. Acessado em 18 de fevereiro de 2017.
- Bioclin, transaminase AST (TGO) cinética K048, 2017.
http://www.bioclin.com.br/sitebioclin/wordpress/wp-content/uploads/arquivos/instrucoes/INSTRUcoes_TRANSAMINASE_AST_TGO_CINETICA.pdf. Acessado em 18 de fevereiro de 2017.
- Biswas, S., Maji, C., Sarkar, P. K., Sarkar, S., Chattopadhyay, A., & Mandal, T. K. (2016). Ameliorative effect of two Ayurvedic herbs on experimentally induced arsenic toxicity in calves. *Journal of Ethnopharmacology*.

Bostancioglu, R.B., Kürkçüoglu, M., Baser, K.H.C., Koparal, A.T., 2012. Assessment of anti-angiogenic and anti-tumoral potentials of *Origanum onites* L. essential oil. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2002–2008.

Brasil. Instituto Mineiro de Gestão das Águas – IGAM. Monitoramento da qualidade das águas superficiais no estado de Minas Gerais. 2º trimestre de 2013. http://www.igam.mg.gov.br/images/stories/qualidade_aguas/2014/relatorio-aguas-superficiais-do-2o-trimestre-de-2013-minas-gerais-1o-parte.pdf. Acessado em 20/08/2015.

Brasil. Instituto Mineiro de Gestão das Águas – IGAM. RESOLUÇÃO CONAMA nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005; Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63 • Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> Acessado em 06/10/2015.

Buege, J.A., Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*. p.302-310.

Burney, S., Caulfield, J. L., Niles, J. C., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1999). The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1), 37-49.

C. Szabo, C. Thiemermann Invited opinion: Role of nitric oxide in hemorrhagic, traumatic, and anaphylactic shock and thermal injury *Shock*, 145 (1994), p. 155

Casillas, E., Myers, M., & Ames, W. E. (1983). Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in English sole (*Parophrys vetulus*) after acute exposure to carbon tetrachloride. *Aquatic Toxicology*, 3(1), 61-78.

Conforti, F., Marrelli, M., Carmela, C., Menichini, F., Valentina, P., Uzunov, D., ... & Menichini, F. (2011). Bioactive phytonutrients (omega fatty acids, tocopherols, polyphenols), in vitro inhibition of nitric oxide production and free radical scavenging activity of non-cultivated Mediterranean vegetables. *Food chemistry*, 129(4), 1413-1419.

Corredor-Santamaría, W.; Mora-Romero, C.C.; Escobar-Buitrago, P.S.; Cruz-Casallas, P.E.; Velasco-Santamaría, Y.M. Inducción de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en *Astyanax* gr. *bimaculatus* (Pisces: Characidae) expuestas a fenantreno. *ORINOQUIA SUPLEMENTO - Meta*. Colombia. v.16 (2), 2012.

Corbett, P. A., King, C. K., & Mondon, J. A. (2015). Application of a quantitative histological health index for Antarctic rock cod (*Trematomus bernacchii*) from Davis Station, East Antarctica. *Marine environmental research*. Vol. 109, p. 28-40.

De Aguiar, M. R. M. P., Novaes, A. C., & Guarino, A. W. S. (2002). Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. *Química Nova*, 25(6/B), 1145-1154.

Dieterich, S., Bieligg, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., Prestle, J., 2000. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 101: 33-9.

Dusan, F., Marián, S., Katarína, D., Dobroslava, B., 2006. Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol. in Vitro* 20, 1435–1445.

Fernandes, M. N., & Mazon, A. D. F. (2003). Environmental pollution and fish gill morphology. *Fish adaptations. Enfield, Science Publishers*, 203-231.

Fernandes, Marisa Narciso; Moron, Sandro Estevan. Respiração e Adaptações Respiratórias. In: BALDISSEROTO, Bernardo; CYRINO, José Eurico Possebon; URBINATI, Elisabeth Crisciolo. Orgs. *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP; UNESP, 2014. pp. 203- 232.

Ferreira, P. D. M. F., Martins, M. T. S., Caldas, D. W., Gomes, J. R., de Oliveira, J. M., Salaro, A. L., Rocha, J.S.; Zuanon, J. A. S. Curcuma longa as additive in the diet for *Astyanax aff. bimaculatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, (2017) 43: 691.

Fukayama, E.H.; Bertechini, A.G.; Geraldo, A.; Kato, R.K.; Murgas, L.D.S. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. *R. Bras. Zootec.*, v.34, n.6, p.2316-2326, 2005 (supl.).

Gaudet, M., Racicot, J. G., & Leray, C. (1975). Enzyme activities of plasma and selected tissues in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 7(4), 505-512.

Hall, M., Chen, Y., Ahsan, H., Slavkovich, V., Geen, A., & Parvez, F. (2006). Blood arsenic as a biomarker of arsenic exposure: Results from a prospective study. *Toxicology*, 225, 225–233.

Hernandez-Hernandez E, Ponce-Alquicira E, Jaramillo-Flores ME, Guerrero-Legarreta I. 2009. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Sci* 81(2):410–17.

Hughes, M. F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology letters*, 133(1), 1-16.

Karnovsky, M.J. (1965). A formaldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol. Vol.* 27, p.137.

K. Ramanathan, B.S. Balakumar, C. Panneerselvam, Effects of ascorbic acid and alpha tocopherol on arsenic induced oxidative stress, *Human Exp. Toxicol.* 21 (2002) 675–680.

Kim K, Cho HY. 2001. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. *Food Chem* 75(4):439–44.

Lin, M. C., & Liao, C. M. (2008). Assessing the risk on human health associated with inorganic arsenic from ground water-cultured milkfish in Southern Taiwan. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 701–709.

Liu, M. Kaduska, Y. Liu,W. Qu, R.P.Mason, M.P.Walker, Acute arsenic induced free radical production and oxidative stress related gene expression in mice, *Toxicologists* 54 (2000) 280–281.

- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Moreno, F. J., Bermúdez, J. M., Aucejo, S., & Cameán, A. M. (2014). Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 281-290.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., & Cameán, A. M. (2015). In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in Vitro*, 29(4), 647-656.
- Maiti, S., & Chatterjee, A. K. (2001). Effects on levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency. *Archives of toxicology*, 75(9), 531-537.
- Matsumoto, F.E.; Cólus, I.M.S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetics and Molecular Biology*. v. 23, p. 489-492, 2000.
- Nakatani N. 2003. Biologically functional constituents of spices and herbs. *J Jpn Soc Nut Food Sci* 56(6):389–95.
- O. Ramos, L. Carrizales, L. Yanez, J. Mejia, L. Batres, D. Ortiz, F. Barriga, Arsenic increased lipid peroxidation in rat tissues by a mechanism independent of glutathione levels, *Environ. Health Perspect.* 103 (1995) 85–88.
- Powell, M. D., Speare, D. J., & Burka, J. F. (1992). Fixation of mucus on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) gills for light and electron microscopy. *Journal of Fish Biology*, 41(5), 813-824.
- Puertas-Mejía, M., Hillebrand, S., Stashenko, E., & Winterhalter, P. (2002). In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(5), 380-384.
- Savini, I., Arnone, R., Catani, M.V., Avigliano, L., 2009. *Origanum vulgare* induces apoptosis in human colon cancer Caco2 cells. *Nutr. Cancer* 61 (3), 381–389.
- Shahsavani, D., Mohri, M., & Kanani, H. G. (2010). Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. *Fish physiology and biochemistry*, 36(1), 39-43.
- Shi, H., Shi, X., & Liu, K. J. (2004). Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Molecular and cellular biochemistry*, 255(1-2), 67-78.
- Silva, R.R.P.D.; Pires Junior, O.R.; Grisolia CK. Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp. *Genetics and Molecular Biology*. v.33, p.750-755, 2010.
- Simitzis, P. E., S. G. Deligeorgis, J. A. Bizelis, A. Dardamani, I. Theodosiou, and K. Fegeros. 2008. Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Science* 79(2):217–223.

- Soneja, A., Drews, M., & Malinski, T. (2005). Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological Reports*, 57, 108.
- Van Dyk, J.C., Marchand, M.J., Smit, N.J., Pieterse, G.M., (2009). A histology-based fish health assessment of four commercially and ecologically important species from the Okavango Delta panhandle, Botswana. *Afr. J. Aquatic Sci.* Vol. 34, p. 273-282.
- Wells, R. M. G., McIntyre, R. H., Morgan, A. K., & Davie, P. S. (1986). Physiological stress responses in big gamefish after capture: observations on plasma chemistry and blood factors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 84(3), 565-571.
- Yoo, K. M., Lee, C. H., Lee, H., Moon, B., & Lee, C. Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food chemistry*, 106(3), 929-936.
- Zaki MS, Elbattrawy N, Fawzi OM, Awad I, Atta NS (2011) Effect of mercuric oxide toxicity on some biochemical parameters on African cat fish *Clarias gariepinus* present in the River Nile. *Life Sci J* 8: 363-368.
- Zimmerli, S., Bernet, D., Burkhardt-Holm, P., Schmidt-Posthaus, H., Vonlanthen, P., Wahli, T., Segner, H., (2007). Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. *Aquat. Sci.* Vol. 69, p. 11-25.
- Zheng, Z. I., J. Y. W. Tan, H. Y. Liu, X. H. Zhou, X. Xiang, and K. Y. Wang. 2009. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 292:214–218.

ANEXO 1

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1522-7278/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1522-7278/homepage/ForAuthors.html) acessado em 18 de dezembro de 2016

ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY

You have full text access to this content

Environmental Toxicology

© Wiley Periodicals, Inc.



Edited By: PAUL B. TCHOUNWOU

Impact Factor: 2.868

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2015: 7/85 (Water Resources); 27/90 (Toxicology); 62/225 (Environmental Sciences)

Online ISSN: 1522-7278

Author Guidelines

NIH Public Access Mandate

For those interested in the Wiley-Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, [please visit our policy statement](#)

Author Services – Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated emails at key stages of production. The author will receive an email with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete email address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

- [Permission Request Form](#)

Author Guidelines

Submission of Manuscripts

Environmental Toxicology is now receiving submitted manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/tox>. All manuscripts should now be submitted online. To submit a manuscript, launch your web browser and go to <http://mc.manuscriptcentral.com/tox>. Check for an existing user account by entering your email address in the space beneath the box that reads "Password Help." If you are submitting for the first time, and you do not find an existing account, create a new account by clicking on the words "Create Account" in the top right corner of the screen. Instructions are posted under the heading "Resources" on the login page and also within the site itself. Please be sure to read them carefully. If you experience difficulty during the submission process, contact technical support at support@scholarone.com.

For other submission questions, contact the Editor, Prof. Paul B. Tchounwou (paul.b.tchounwou@jsums.edu). Postal address: 1400 Lynch Street, Box 18540, Jackson, MS 39217, U.S.A.

File Format Instructions for Online Submission

Manuscript file, tables, and figures must be submitted separately.

TEXT

Submit your text in DOC, DOCX, or RTF format. Do not embed figures or tables in this document; these should be submitted as separate files.

TABLES

Tables should be created with a word processor and saved in DOC, DOCX, or RTF format. Do not embed tables in your text.

FIGURES

To ensure the highest print quality, your figures must be submitted in TIF format according to the following minimum resolutions:

- 1200 dpi (dots per inch) for black and white line art (simple bar graphs, charts, etc.)
- 300 dpi for halftones (black and white photographs)
- 600 dpi for combination halftones (photographs that also contain line art such as labeling or thin lines)

Vector-based figures (e.g. figures created in Adobe Illustrator) should be submitted in EPS format.

COLOR FIGURES

In addition to the above resolution guidelines, color figures must be submitted in a CMYK colorspace. Do not submit color figures as RGB.

UNACCEPTABLE FIGURE FORMATS

Do not submit figures in any of the following formats: JPG, GIF, PSD, CRD, PCT, PPT, PDF, XLS, DOC, BMP, 123 (or other Lotus formats).

At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support at support@scholarone.com.

Manuscript Preparation

Papers will be considered for publication as normal research publications, the details for which are below, as Reviews, Short Communications, and as Technical Methods. For these formats, refer to earlier issues of the Journal. All pages must be numbered consecutively. Figures and tables should be clearly labeled. A manuscript should include a title, abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, and references.

Title Page

The title page must state the names and full addresses of all authors. Telephone and fax numbers, as well as e-mail address must be provided for the corresponding author to whom galley proofs will be sent. A short running head with less than ten words should also be included. If any of the authors have a commercial interest in the methods or results of this research, it is to be declared.

Abstract

The abstract should give concise information about the objectives of the work, the methods used, and the results and conclusions obtained. A length of approximately 250 words is sufficient.

Keywords

Keywords have become increasingly important for information retrieval. Consequently, authors must be careful to select up to 10 keywords.

Editorial Style

Be guided by the *Council of Biology Editors (CBE) Style Manual*. Follow *Webster's International Unabridged Dictionary* as the authority for spelling and hyphenation of words. Avoid breaking words at the end of lines. Système Internationale (SI) or modern metric units are used. Non-standard abbreviations should be defined at first mention. Standard abbreviations (refer to *CBE Manual*) do not require definition.

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Figures

Graphs and charts should be prepared in a consistent style, including lettering and numbering. The lettering should be large enough to be legible when reduced. Whenever appropriate, indicate magnification or size of a photograph with a scale line; otherwise, give the magnification in the legend. Legends for figures should be listed on a separate sheet, quadruple-spaced between legends. Abbreviation Fig.

To ensure that your digital graphics are suitable for print purposes, please go to RapidInspector™ at <http://rapidinspector.cadmus.com/wi/index.jsp>. This free, stand-alone software application will help you to inspect and verify illustrations right on your computer.

All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print. Authors are encouraged to submit color illustrations that highlight the text and convey essential scientific information. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible. Color proofs will be sent to the contributor for approval prior to printing.

Tables

Each table should have a brief descriptive title. Do not include explanatory material in titles; use footnotes, keyed with lower case letters, at the bottom of the table. Use no vertical rules. Only use underlining for italic print. Horizontal rules should be placed one-half space or more below a typed line. Define all data in column heads with appropriate units or descriptions. Explanations can be given in footnotes keyed with lower case letters. Plan your tables to be no wider than 66 characters, including spaces, or 11 cm wide when printed.

References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow:

Reference List Examples: Journal article (1-6 authors):

1. Hu P, Reuben DB. Effects of managed care on the length of time that elderly patients spend with physicians during ambulatory visits. *Med Care*. 2002;40(7):606-613.

Journal article with more than 6 authors:

2. Geller AC, Venna S, Prout M, et al. Should the skin cancer examination be taught in medical school? *Arch Dermatol*. 2002;138(9):1201-1203.

Journal article with no named author or group name:

3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Licensure of a meningococcal conjugate vaccine (Menveo) and guidance for use--Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2010;59(9):273.

Electronic Journal article:

If you have a doi (preferred):

4. Gage BF, Fihn SD, White RH. Management and dosing of warfarin therapy. *Am J Med*. 2000;109(6):481-488. doi:10.1016/S0002-9343(00)00545-3.

If you do not have a doi:

5. Aggleton JP. Understanding anterograde amnesia: disconnections and hidden lesions. *Q J Exp Psychol*. 2008;61(10):1441-1471. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=pbh&AN=34168185&site=ehost-live>. Accessed March 18, 2010.

Journal article published online ahead of print:

6. Chau NG, Haddad RI. Antiangiogenic agents in head and neck squamous cell carcinoma: tired of going solo [published online ahead of print September 20, 2016]. *Cancer*. doi: 10.1002/cncr.30352.

Entire Book:

6. McKenzie BC. *Medicine and the Internet: Introducing Online Resources and Terminology*. 2nd ed. New York, NY: Oxford University Press; 1997.

Book Chapter:

7. Guyton JL, Crockarell JR. Fractures of acetabulum and pelvis. In: Canale ST, ed. *Campbell's Operative Orthopaedics*. 10th ed. Philadelphia, PA: Mosby, Inc; 2003:2939-2984.

Electronic Book:

8. Rudolph CD, Rudolph AM. *Rudolph's Pediatrics*. 21st ed. New York, NY: McGraw-Hill Companies; 2002. <http://online.statref.com/Document/Document.aspx?DocID=1&StartDoc=1&EndDoc=1882&FxlD=13&offset=7&SessionId=A3F279FQVVFXXSXQ> . Accessed August 22, 2007.

Internet Document:

9. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2003.
<http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2003PWSecured.pdf>. Accessed March 3, 2003.

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. Japanese author can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Correspondence All other correspondence should be addressed to the Publisher, c/o John Wiley & Sons, Inc., 111 River Street, Hoboken, NJ 07030.

Guidelines for Cover Submissions

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please [follow these general guidelines](#).