

Análise dos efeitos do ácido *p*-cumárico de *eugenia catharinensis* em embriões de *G. Domesticus* tratados com acetato de chumbo**Analysis of effects of *eugenia catharinensis p*-cumaric acid in embryos of *G. Domesticus* treated with lead acetate**

DOI:10.34117/bjdv5n8-051

Recebimento dos originais: 10/07/2019

Aceitação para publicação: 20/08/2019

Claudia Almeida Coelho de Albuquerque

Doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Instituição: Universidade de Blumenau (FURB).

Endereço: Rua Gottlieb Reif, 77 – Escola Agrícola, Blumenau – SC, Brasil

E-mail: albuqueclaudia@gmail.com

Carolina Bevervanço Veiga

Acadêmica de Medicina.

Instituição: Universidade de Blumenau (FURB).

Endereço: Rua João Pessoa, 2801 – Velha, Blumenau – SC, Brasil.

E-mail: carolinaveigg@gmail.com

Ângela Wernke

Acadêmica de Medicina.

Instituição: Universidade de Blumenau (FURB).

Endereço: Rua Lydia Zwicker, 80 – Garcia, Blumenau – SC, Brasil.

E-mail: angelawernke@hotmail.com

RESUMO

Os metais pesados podem danificar toda e qualquer atividade biológica e com isso gerar respostas celulares distintas. Estudos têm demonstrado que, uma única exposição ao chumbo durante o período embrionário de aves, resulta em significativas alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais em indivíduos adultos e principalmente jovens. Com a ação do acetato de chumbo durante o desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus*, pode-se analisar possíveis alterações nos padrões morfológico e bioquímico. Para reduzir as ações tóxicas dos metais pesados e conseqüentemente os efeitos que estes causam nos diversos organismos estudados, tem-se as plantas como uma forma natural de proteção. A presença de compostos fenólicos, como por exemplo o ácido *p*-cumárico, desta espécie parece ser o principal responsável pela sua atividade protetora. Desta forma busca-se com este projeto avaliar os efeitos do composto ácido *p*-cumárico de *Eugenia catharinensis*, sobre embriões tratados com acetato de chumbo.

Palavras-Chave: Chumbo; Ácido P-Cumárico; Embriotoxicidade; *Gallus domesticus*; Metal pesado.

ABSTRACT

Heavy metals can damage any biological activity and thus generate distinct cellular responses. Studies have shown that a single exposure to lead during the embryonic period of birds results in significant morphological, physiological and behavioral changes in adult and mainly young individuals. With the action of lead acetate in the development of *Gallus domesticus* embryos, it is possible to analyze possible changes in morphological and biochemical patterns. In order to reduce the toxic actions of heavy metals and consequently the effects they cause on the various organisms studied, we have plants as a natural form of protection. The presence of phenolic compounds, such as *p*-coumaric acid, of this species seems to be mainly responsible for its protective activity. This project aims to evaluate the effects of *Eugenia catharinensis p*-coumaric acid compound on embryos treated with lead acetate.

KEY-WORDS: Lead; *P*-Coumaric Acid; Embryotoxicity; *Gallus domesticus*; Heavy metal.

Keywords: Complications. The umbilical cord. Prolapse.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação por metais pesado é uma das formas mais graves de poluição, por apresentarem efeitos tóxicos ambientais e aos seres vivos, devido seu poder cumulativo (ROSA et al., 2003).

Os maiores responsáveis por tal contaminação são os resíduos de origem urbana e industrial que apresentam compostos tóxicos. No entanto, a contaminação por chumbo (Pb) tem sua origem nas emissões atmosféricas, tendo o ar como o principal meio de transporte e distribuição deste metal. Grandes quantidades de chumbo tendem a localizar-se na vizinhança de fontes geradoras como indústrias de baterias (ARAÚJO; PIVETTA; MOREIRA. 1999). A gestão inadequada de efluentes e resíduos sólidos oriundos de atividades industriais minerometalúrgicas podem proporcionar significativos impactos negativos a diferentes compartimentos ambientais (biota, ar, solo, sedimentos, águas superficiais e subterrâneas) e à saúde humana. Indubitavelmente, inúmeros são os casos relatados no Brasil e no mundo a respeito dos danos causados pela existência de passivos ambientais gerados durante a operação ou após o encerramento de atividades industriais (SANTOS, 2017).

Considerado um metal tóxico para homens e animais, o chumbo não possui nenhuma função fisiológica conhecida no organismo e pode provocar sérios danos à saúde (UEBEK, 2017) tendo ação carcinogênica, teratogênica e tóxica em aves (NARBAITZ, et al, 1995) e humanos (ZAREMBSKI, et al, 1983; ROTHEMBERG, et al, 1999). A contaminação se dá por inalação ou ingestão, tanto que os tratos gastrointestinais e respiratórios são os principais sítios de absorção do chumbo e que, quando absorvido é encontrado no sangue, tecidos moles e mineralizados (UEBEK, 2017).

Segundo Lima (2017), o acetato de chumbo é considerado como um agente teratogênico multipotente, capaz de causar alterações no desenvolvimento embrionário. Além disto, interfere nos mecanismos de morfogênese, como atraso no desenvolvimento, alterações no padrão do sistema nervoso e malformações, podendo levar à morte.

Os agentes teratogênicos podem causar graves anomalias congênitas em embriões. Tais distúrbios são causados em períodos críticos do desenvolvimento, durante a diferenciação ativa de um tecido ou órgão. Os órgãos têm diferentes períodos críticos durante o seu desenvolvimento, sendo que o cérebro e o esqueleto se destacam por serem mais sensíveis, desde começo da sua formação até o nascimento (LIMA, 2017).

Dessa forma, o chumbo é um conhecido agente neurotóxico que pode causar sérios danos ao tecido do sistema nervoso, em particular durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, provocando alterações neurocognitivas e neurofisiológicas (ALVARENGA, 2015). Por conta da grande interação do chumbo com as células nervosas, muitos são os estudos a respeito dessa toxicidade. Savolainen e colaboradores (1998), por exemplo, perceberam que o chumbo provoca a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), induzindo o estresse oxidativo em células do sistema nervoso. Estes eventos parecem estar associados com aumento da letalidade neuronal, através de mecanismos necróticos e apoptóticos. A citotoxicidade parece depender da dose que é administrada.

Durante a fase embrionária, período alvo do presente estudo, os eventos de proliferação e diferenciação celular e o processo de sinaptogênese são muito intensos, de modo que a intoxicação pelo chumbo nesse período acarretará graves consequências ao padrão estrutural e funcional do corpo dos indivíduos (RIVERO, et al, 2006).

Os embriões de aves e, em especial, o de galinha, são utilizados frequentemente como modelo em embriologia experimental. Isso ocorre devido ao fato de os ovos serem de fácil manuseio, volumosos e ricos em vitelo; de os embriões desenvolverem-se apenas na região superior do ovo; e de o processo ser relativamente curto e poder ser acompanhado diariamente em laboratório, permitindo avaliar a ação de agentes exógenos, como o acetato de chumbo, e as alterações induzidas por eles durante o período embrionário. No entanto, os metais pesados quando bioacumulados interferem na formação da casca dos ovos das aves, o que pode levar a uma diminuição na densidade populacional, alterando a estrutura da comunidade além de poderem levar a alterações danosas no sistema nervoso central (SILVA, 2018). Tais deformidades puderam ser vistas no estudo de Rivero *et al*, 2006, em que os embriões que foram expostos ao chumbo no sétimo dia de desenvolvimento e analisados no vigésimo dia

apresentavam microftalmia, hidrocefalia e deformidades no bico, membros e tronco, além de hemorragias intra e extraembrionárias e necrose cefálica.

Para reduzir as ações tóxicas dos metais pesados e conseqüentemente os efeitos que estes causam nos diversos organismos estudados, tem-se as plantas como uma forma natural de proteção.

Neste sentido, através de vários estudos, diversas espécies da família Myrtaceae são utilizadas popularmente. Tem-se, por exemplo, a *Eugenia uniflora* que tem finalidade antirreumática, antidiabética, antifebrífuga, adstringente, analgésica, hipoglicemiante, diurética e reguladora do sistema digestório (SERAFIN, 2006; SAHA, et al., 2013). Ou até mesmo a *Eugenia jambolana*, *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia caryophyllata*, com sua atividade antimicrobiana, antiviral, hipoglicemiante, antioxidante anticancerígena, antinoceptiva e antidepressiva (SERAFIN, 2006; COLLA et al., 2012; SAHA et al., 2013). A presença de compostos fenólicos, como por exemplo o ácido *p*-cumárico, desta espécie parece ser o principal responsável pela sua atividade protetora (GARMUS et al., 2014)

Portanto, sabe-se que a principal causa de danos neurotóxicos promovidos pelo chumbo estão relacionados com a sua citotoxicidade. Desta forma busca-se com este projeto avaliar os efeitos do composto ácido *p*-cumárico de *Eugenia catharinensis*, sobre embriões tratados com acetato de chumbo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MODELO BIOLÓGICO

Para a execução do projeto foram utilizados 60 embriões de *Gallus domesticus* provenientes da doação de ovos embrionados da Avícola Polastri, Ltda, com inspeção sanitária (INSTRUÇÃO DE SERVIÇO Nº 014/2007- CIDASC) para obtenção de embriões do 4º ao 9º dia de incubação ou dias embrionários (E4 e E9). A amostra consistiu de ovos homogêneos, de coloração bege e peso médio de 65g, que foram transportados ao Laboratório de Histotécnica/DCN/CCEN em bandejas apropriadas, confeccionadas com papel reciclável, que possuem acomodações individuais, o que dificulta a movimentação dos ovos durante o trajeto.

2.2 TRATAMENTOS

Os ovos foram limpos com algodão umedecido em água destilada e posteriormente foram numerados, pesados e incubados a uma temperatura constante de 37,5°C a 38°C. A

umidade atmosférica foi mantida em 65% através do uso de reservatório de água externo com reposição espontânea.

Os ovos foram inicialmente incubados por 2h, tempo necessário para reiniciar o processo de desenvolvimento, já que a fertilização em *G. domesticus* ocorre antes da postura dos ovos. Decorrido este período, adotou-se como critério de estagiamento o dia embrionário (E), o qual estabelece que cada 24h equivale a 1 dia de desenvolvimento (GREENER; KOCHEN, 1983).

Embriões em E4 foram retirados da incubadora, colocados na posição horizontal, sendo efetuados os procedimentos de (1) abertura de orifício com agulha calibre nº16, na região da câmara de ar para aspiração do albúmen, visando o descolamento da membrana interna na face onde está o embrião; (2) abertura (1 cm²) na parte superior do ovo, com tesoura ponta fina, para a administração da solução de tratamento, realizada com agulha hipodérmica ultrafina, calibre nº24. Ambas as aberturas foram seladas com fita adesiva atóxica e os ovos retornaram à incubadora por 5 dias, com acompanhamento diário da temperatura e umidade.

O tratamento in ovo foi realizado através de uma abertura na parede lateral do ovo, na qual administrou-se chumbo e o extrato vegetal de ácido p-cumárico da *Eugenia* sp., entre os vasos vitelínicos, diretamente no vitelo.

O embrião neste estágio do desenvolvimento apresenta relativamente pouca vascularização extraembrionária, o que permite a abertura do ovo sem prejuízo do desenvolvimento. Uma vez analisada a viabilidade do embrião, foi, então, injetado a solução de tratamento no saco vitelínico, entre os grandes vasos vitelínicos (TAKAMATSU e FUJITA, 1987).

Após o tratamento, os ovos foram recolocados na estufa, onde permaneceu até completar 9 dias (E9 - 35HH) de incubação. O desenvolvimento foi monitorado através da abertura na casca e as características externas avaliadas de acordo com o descrito por Hamburger e Hamilton (1951).

Manipularam-se 60 embriões que formaram 4 grupos experimentais divididos conforme a administração e o dia que foram tratados e analisados (Tabela 1). O grupo controle recebeu apenas salina; grupo tratado apenas com chumbo, com dosagem preestabelecida (SCHATZ, 2003); grupo tratado com o extrato vegetal de ácido p-cumárico e um grupo com ácido p-cumárico e chumbo.

Tabela 1: Quatro grupos experimentais conforme o tratamento.

Tratamento	Dia de Tratamento	Dia de Análise	n amostral
Grupo Controle (0,1ml salina)	E4	E9	15
Grupo Chumbo (150µg/ de Chumbo em 0,1 ml salina)	E4	E9	15
Grupo Extrato vegetal (1,6µg/g).	E4	E9	15
Grupo Chumbo + Extrato (150µg/ de Chumbo em 0,1 ml salina + 1,6µg/g de extrato)	E4	E9	15
TOTAL			60

Fonte: do autor.

Os embriões em E9 foram retirados da estufa e em seguida colocados a temperatura de 4°C por 15 minutos (crioanestesia para reduzir o metabolismo, dessensibilizando o embrião) e decapitados para utilização do encéfalo.

Com o uso de uma colher pequena e tesoura cirúrgica, o embrião foi separado do saco vitelínico e colocado em placa de Petri contendo solução salina. Este foi então analisado ao estereomicroscópio (20X), para determinação do estágio de desenvolvimento embrionário conforme Hamburger e Hamilton (1951) e para a detecção das alterações morfológicas visíveis. Após, seguiu para os demais procedimentos morfológicos e bioquímicos.

As amostras foram conduzidas para a avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT e análise morfológica externa, para o estagiamento e posterior dissecação para exposição do encéfalo no período embrionário de E9.

2.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA EXTERNA:

A análise da morfologia externa dos embriões foi realizada através do uso do estereomicroscópio (20X) a fim de identificar alterações e fazer as medições das estruturas estudadas na pesquisa. Para realizar uma análise mais detalhada do padrão morfológico dos embriões e verificar se o chumbo e o ácido p-cumárico interferiram no desenvolvimento das estruturas embrionárias, foram estabelecidas mensurações feitas com auxílio da gráticula milimetrada acoplada ao estereomicroscópio.

a) Altura cefálica (1): distância medida do ápice (topo do mesencéfalo) até a altura do IV arco faríngeo, passando pela vesícula óptica.

b) Distância cefálica ântero-posterior (2): medida desde a extremidade anterior do telencéfalo à extremidade posterior do mielencéfalo passando pela vesícula óptica.

c) Diagonal cefálica (3): medida desde a extremidade anterior do telencéfalo ao ápice (topo do mesencéfalo).

d) Distância ântero-posterior na base do mesencéfalo (4): medida horizontal ântero-posterior na base do mesencéfalo.

e) Diâmetro da vesícula óptica (5): medida horizontal no centro da vesícula óptica. (KOBUS, 2007).

Além disso, também foi realizada a análise das estruturas externas que sofreram alterações, como membros superiores e inferiores, mandíbula e olhos, e ectopia do coração e tubo digestório.

2.4 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

Embriões a fresco foram utilizados para o ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT (brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio). Os encéfalos foram dissecados, separando-se os hemisférios cerebrais, os quais foram pesados e mecanicamente fragmentados. Cada amostra, com peso médio de 20mg foi lavada com PBS (phosphate buffered saline) 0,1M (pH 7,6) por 10 min, centrifugada a 640 X g durante 10 min à temperatura ambiente. Em seguida foi coletado 50 ml da fração das células em suspensão para distribuí-las em placas de 96-poços, (em triplicata), adicionando-se 150 µl de MTT a uma concentração final de 0,5 mg/ml, e incubadas a 37°C durante 30 min. Os cristais de formazan foram solubilizados em 1500 µl de DMSO (sulfóxido de dimetilo) e quantificadas por espectrofotometria a 540 nm. Os resultados foram comparados com amostras de tecido nervoso dos embriões controle, os tratados com chumbo e os tratados com chumbo e ácido p-cumárico, para o qual foram analisados os valores de absorbância.

2.5 ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram expressos em média e erro padrão para cada grupo e analisados no programa estatístico Statistica® versão 6.0 para Windows, verificando a existência de diferenças significativas entre os grupos, através do teste de análise de variância de duas vias (Two-Way ANOVA), $p \leq 0,05$, seguido de teste post hoc de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE DO PESO DOS EMBRIÕES.

O período embrionário é o mais susceptível a intoxicação por metais pesados como acetato de chumbo e mercúrio (HEINZ et al., 2006; SCHEUHAMMER, 2007), uma vez que estes tecidos estão passando por mudanças significativas no ambiente intracelular e extracelular, cujo maquinário enzimático e componentes proteicos podem ser alvos da toxicidade do metal pesado.

O tratamento diretamente no saco vitelínico, favorece a absorção lenta e gradual do vitelo, via circulação sanguínea, distribuindo, portanto, as substâncias por todo o corpo do embrião (CORNFORD; CORNFORD, 1986; EK et al., 2012), sendo facilmente transportado pelos componentes da barreira hematoencefálica (BHE) (CLARKSON, 2006).

O SNC em desenvolvimento, parece ser mais sensível aos efeitos dos metais, pois sua organização estrutural apresenta-se imatura, como BHE, que se caracteriza como uma estrutura que exerce uma função importante na manutenção da homeostase do SNC (ALBUQUERQUE, 2016). Esta, associada aos mecanismos de transporte serem mais permeáveis ao metal, apresenta-se como sítios de acúmulo de metais e as injúrias nele provocadas podem causar danos irreparáveis no neonato, tanto a nível celular, como fisiológico e cognitivo (CLARKSON, 2002, DOMOWICZ et al., 2011).

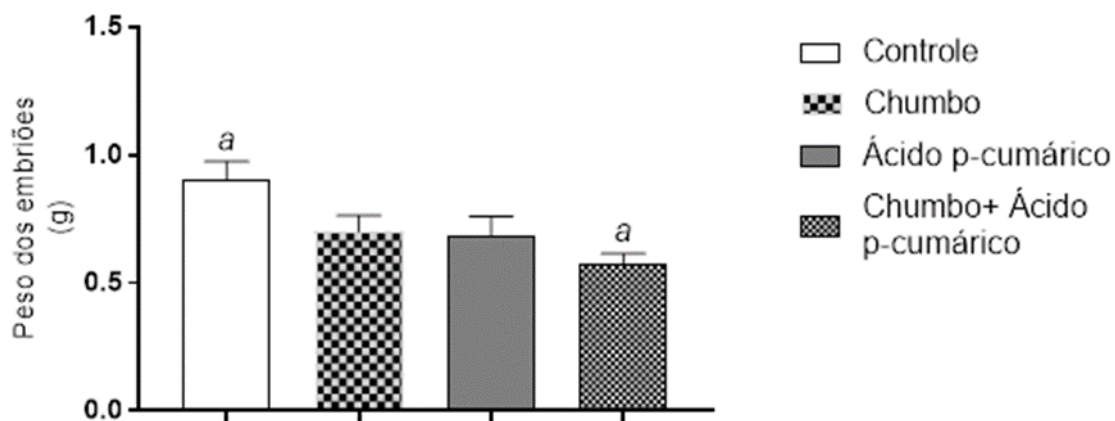
Ao avaliarmos o peso médio corporal dos embriões (Figura 1) observou-se que os embriões tratados apresentaram menor peso corporal quando comparado aos embriões controle, caracterizando os efeitos deletérios do acetato de chumbo e da fração vegetal testada sobre o ganho de massa corporal, sobretudo quando as duas substâncias (*p*-cumárico e chumbo) foram analisadas conjuntamente.

Estudos realizados com embriões de galinhas domésticas, patos e faisão, tratados com metal pesado (chumbo) demonstraram perdas de 15% do peso corporal (HEINZ et al., 2006). Tal redução pode ser observada também por Albuquerque (2016), onde reduziu-se 34,32% do peso total de embriões de *Gallus domesticus* tratados com metal pesado em comparação com o grupo controle.

Os estudos acima relatados demonstraram o comprometimento do ganho peso, e com isso, o crescimento dos indivíduos. A sua afinidade por agrupamentos tíois e sua influência sobre vários sistemas corporais podem afetar a estrutura corporal do indivíduo e o metabolismo geral o indivíduo e com isso sua interferência no incremento do peso corporal. A perda de peso de animais expostos a toxicidade ambiental por cádmio, mercúrio e chumbo

vem sendo utilizado como um parâmetro de comparação dos índices de toxicidade e vulnerabilidade da espécie, induzidos pela intoxicação por este metal, podendo estar diretamente relacionada com a redução de reserva energética e de massa muscular (CORREA et al., 2004).

Figura 1: Ganho de peso dos embriões dos grupos controle e tratados.



Fonte: do autor.

3.2 ANÁLISE DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS EXTERNOS DE EMBRIÕES CONTROLE (GC) E TRATADOS (GT) COM CHUMBO.

No terceiro dia de desenvolvimento (estádio 20 HH), observam-se 37 ou mais pares de somitos posicionados ao longo da região dorsal do corpo, a cabeça apresenta-se grande em relação ao tronco e vesícula óptica com pigmentação tênue. Característica morfológica do embrião quando tratado. Os membros posteriores são relativamente maiores que os anteriores (HAMBURGER & HAMILTON, 1951).

De acordo com as descrições de Hamburger & Hamilton (1951), entre E9 e E10, os segmentos distais de asa e pernas são proporcionalmente mais longos. Uma ranhura horizontal é claramente visível na ponta do maxilar superior, mas o bico é apenas indicado na ponta da mandíbula. A pálpebra possui uma membrana nictitante que cobre as papilas esclerais anteriores e se aproxima da córnea. A pálpebra inferior cresceu para o nível da córnea e a circunferência das pálpebras é uma elipse estreitada com a sua borda ventral achatada.

Quantos aos aspectos morfológicos analisados na pesquisa, todos os embriões do grupo controle apresentaram os membros bem desenvolvidos, assim como a mandíbula e a vesícula óptica. Embriões deste mesmo grupo obtiveram membros superiores e inferiores identificados com facilidade durante a observação. Os ovos tratados com chumbo e apresentaram

malformações, com variações referentes à mandíbula, apresentando mandíbula presente e bem desenvolvida em dois embriões do grupo e outros dois com ausência dessa estrutura (Figura 2). Os membros superiores e inferiores em todos deste grupo estavam presentes e bem desenvolvidos. No grupo tratado somente com ácido p-cumárico, apareceram três embriões com ausência de membros (Figura 2) e também presença dos mesmos com pouco desenvolvimento em um dos embriões deste grupo.

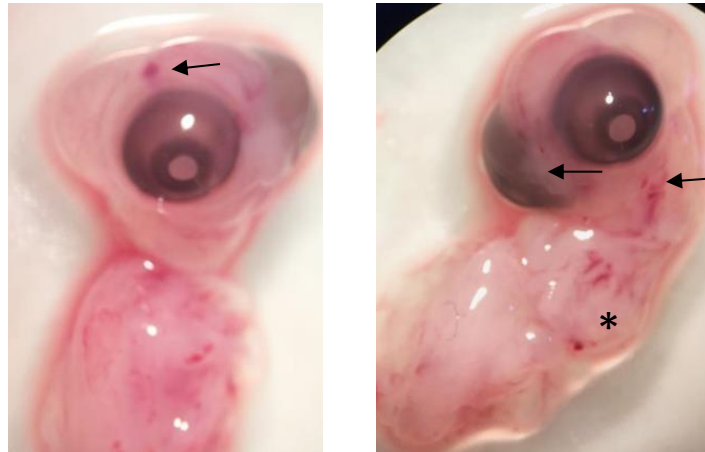
Dessa forma, é sugestivo que o dia do tratamento (E4) possa ter ligação com as alterações encontradas nos embriões analisados. Pois, espera-se que as estruturas analisadas ainda não estivessem completamente desenvolvidas em E4 e como o tratamento ocorre cronicamente com a absorção lenta e gradual das substâncias testadas, pode-se verificar as alterações em E9, durante a remoção dos embriões do ovo. As alterações morfológicas evidenciadas com mais frequência foram nos embriões que receberam os diferentes tratamentos (Figura 3).

Neste estudo os embriões submetidos à salina (controle), apresentaram pequenos focos hemorrágicos, não mostrando, porém, alterações das características morfológicas próprias da espécie. Nos embriões tratados com o acetato de chumbo pode-se observar alterações vasculares de grande representatividade, caracterizando-se por extravasamento sanguíneo dentro das vesículas cerebrais. Narbaitz e colaboradores (1985) administrou uma única dose de nitrato de chumbo diluído, na câmara de ar de ovos de White Leghorn, no décimo dia de incubação e vinte e quatro horas após a administração do metal, observou pequenos e múltiplos focos hemorrágicos na maioria dos embriões observados. Após quarenta e oito horas de administração do chumbo, houve uma ampliação da área hemorrágica em todos os embriões estudados. No terceiro dia após a administração, aumentou a área hemorrágica, consequentemente havendo necrose no tecido nervoso. Estes resultados nos indicam que a hemorragia consiste na lesão primária produzida pelo chumbo. Alterações morfológicas como hidrocefalia, extrusão visceral e malformação de face, foram observadas no grupo tratado com acetato de chumbo, comprometendo o padrão normal do desenvolvimento de *Gallus domesticus*, indicando a ação deletéria deste metal no desenvolvimento do sistema nervoso desta espécie (Figura 3 e 4).

Além disso, a exposição aos metais pesados pode, portanto, perturbar os processos de proliferação, diferenciação e migração celular, que são altamente regulados durante o desenvolvimento do SNC (ALBUQUERQUE, 2016), fato que pode ser reforçado a partir os números de malformações registradas em nosso estudo, indicando que na dose utilizada o

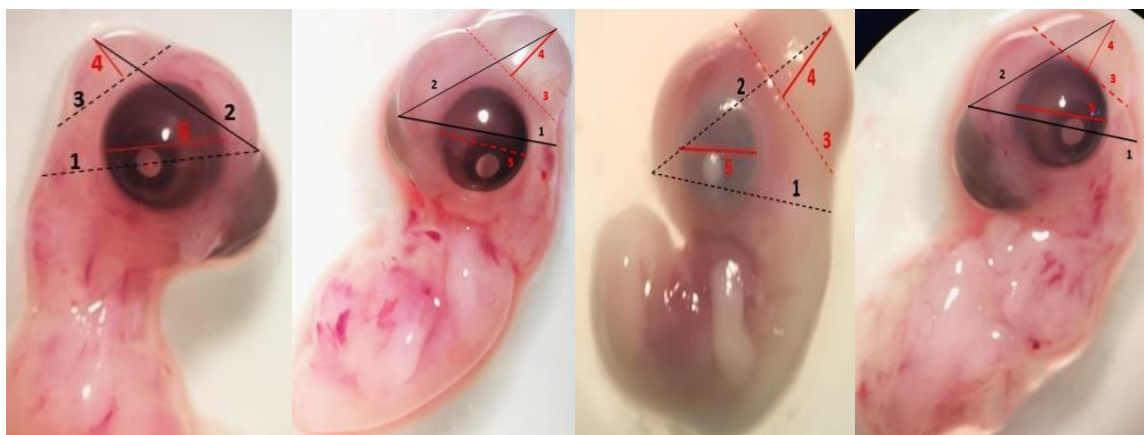
acetato de chumbo é um agente teratogênico multipotente, interferindo nos mecanismos de formação de vários sistemas orgânicos.

Figura 2: Malformações observadas no grupo tratado com acetato de chumbo. Áreas hemorrágicas (setas) e não desenvolvimento dos membros superiores (*). Aumento 20X.



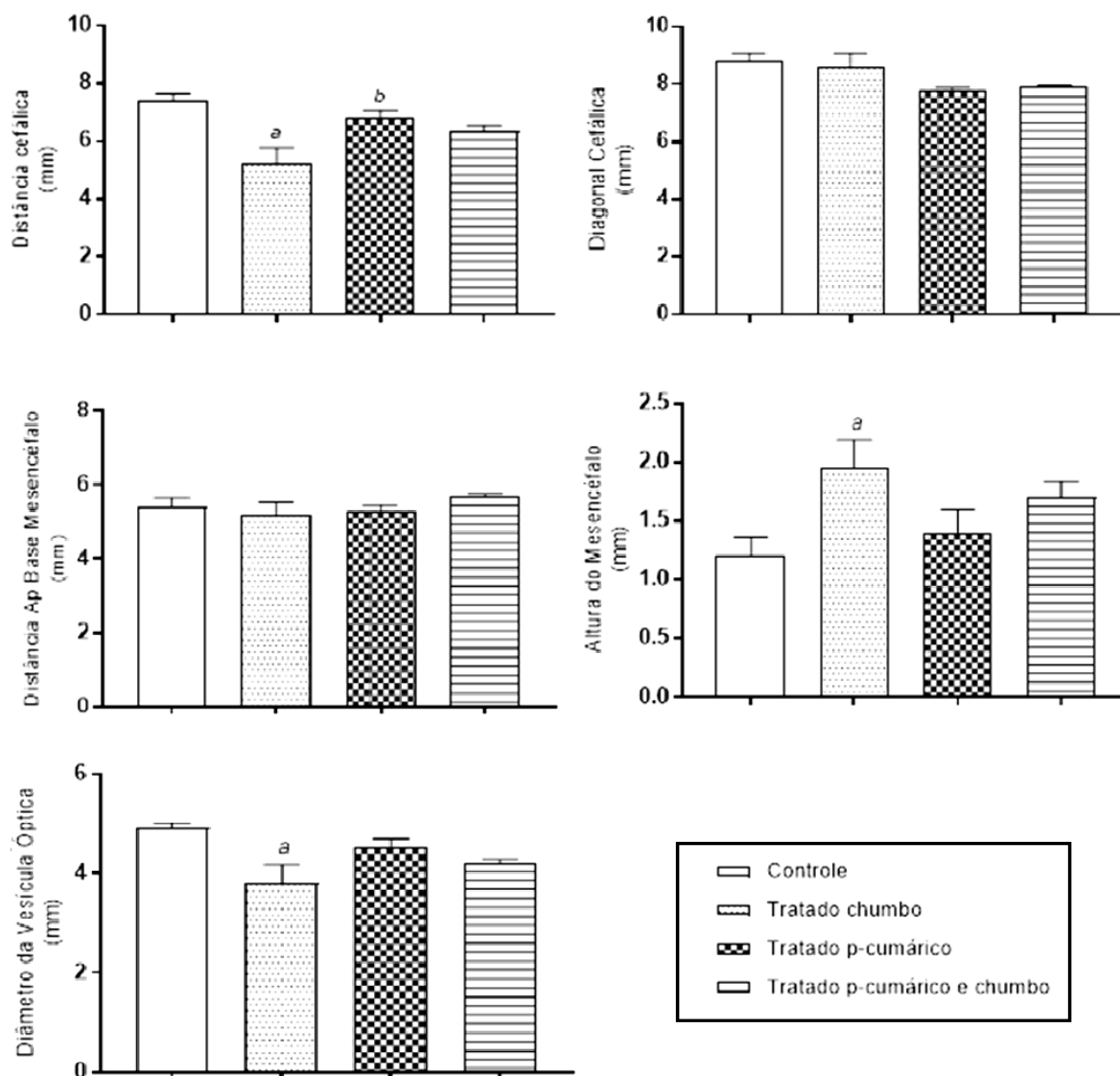
Fonte: do autor.

Figura 3: Imagens de embriões em E9 e as aferições da região encefálica de embrião do grupo controle (a); grupo tratado com chumbo (b); grupo tratado com ácido p-cumárico (c) e com ácido p-cumárico e chumbo. Aumento 20x. Sendo: 1. Distância cefálica. 2. Diagonal cefálica. 3. Distância AP base mesentério. 4. Altura do mesentério. 5. Diâmetro da vesícula óptica.



Fonte: do autor.

Figura 4: Gráficos de barras representando valores s médios (\pm EPM) das aferições de estruturas morfológicas encefálicas.



Fonte: do autor.

3.2 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DO MTT.

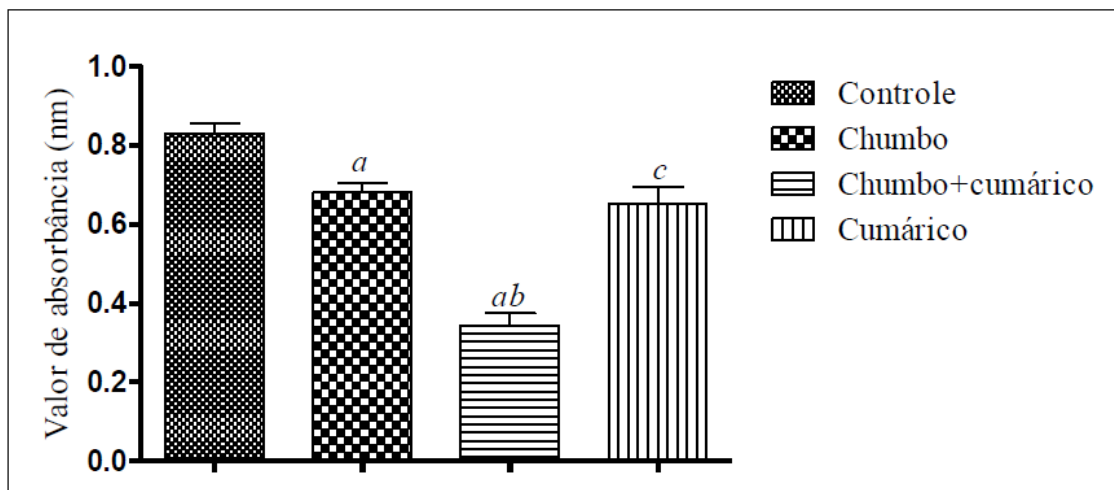
O método do MTT é um teste colorimétrico utilizado para verificar a viabilidade celular baseado na atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais. As desidrogenases mitocondriais presentes nas células viáveis – com metabolismo ativo – clivam e convertem o reagente MTT (tetrazólio) em um produto de coloração roxa denominado formazan, enquanto células mortas não são capazes de realizar essa conversão. (BOCHNIE, K. A.; GREGÓRIO, C. P.; MACIEL, R. A. P, 2016).

Dessa forma é possível quantificar a atividade metabólica das células testadas através da absorbância. Neste caso, foram utilizadas para análise as células dos hemisférios cerebrais dos embriões dos 4 grupos.

Verificou-se que o chumbo de fato reduziu a viabilidade celular da amostra dos hemisférios cerebrais dos embriões de *G. domesticus*, tendo em vista que é uma substância tóxica para o organismo, sendo o estresse celular provocado pela ação do metal sobre a membrana mitocondrial, causando sua ruptura. Ou seja, apresenta um efeito citotóxico sobre as células dos embriões e, conseqüentemente, um efeito progressivo no que se refere ao tecido, órgão, sistema e organismo progressivamente.

Além disso, foi possível notar uma diminuição significativa na viabilidade das células em todos os outros grupos tratados, mostrando que, além do chumbo, o ácido *p*-cumárico também possuiu um efeito citotóxico ($p \leq 0,05$) para o embrião e, mais ainda, quando associados (Figura 5).

Figura 5: Método de MTT, através dos valores de absorbância, para detectar a viabilidade celular dos hemisférios cerebrais dos embriões tratados com salina, chumbo, ácido *p*-cumárico +chumbo e apenas ácido *p*-cumárico.



4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo corroboraram com estudos sobre a toxicidade embrionária pelo acetato de chumbo e contribuíram com a compreensão da sensibilidade do embrião frente a substâncias exógenas durante o desenvolvimento embrionário, da mesma forma, observado no grupo que recebeu ácido *p*-cumárico, através das análises morfológicas externas e teste de toxicidade através do MTT.

Assim, consideram-se parcialmente aceitas as hipóteses propostas neste trabalho, uma vez que o ácido *p*-cumárico contribuiu negativamente com o ganho de peso do embrião, além de ter afetado a viabilidade celular e a morfologia externa dos embriões quando comparados ao controle.

O acetato de chumbo é absorvido pelo embrião juntamente com o vitelo e o período de incubação com acetato de chumbo permitiu verificar que a dose utilizada provocou alterações a nível celular, reduzindo sua viabilidade e provocou alterações morfológicas externa importantes. O tratamento com ácido *p*-cumárico não foi capaz de reduzir as alterações morfológicas provocadas pelo chumbo e o ácido *p*-cumárico mostrou-se citotóxico para o embrião, principalmente quando associado ao chumbo.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Cláudia Almeida Coelho de. Embriotocidade do MeHg sobre a organização estrutural e ultraestrutural do mesencéfalo e cerebelo de *Gallus domesticus*. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

ALVARENGA, Katia de Freitas. Brainstem auditory evoked potentials in children with lead exposure. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2015; 81(1):37-43.

ARAÚJO, Ulisses; PIVETTA, Fatima R; MOREIRA, Josino. Avaliação da exposição ocupacional ao chumbo: proposta de uma estratégia de monitoramento para prevenção dos efeitos clínicos e subclínicos. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 15(1):123-131, jan-mar, 1999.*

BOCHNIE, Kariman Assis; GREGÓRIO, Paulo César; MACIEL, Rayana Ariane Pereira. Análise da Viabilidade Celular por Mtt em Células Tratadas com Toxinas Urêmicas – Revisão. *Cad. da Esc. de Saúde, Curitiba, V.1 N.15: 42-51. 2016.*

CARLSON, Bruce. *Embriologia humana e biologia do desenvolvimento.* 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

CLARKSON, Thomas. The three modern faces of mercury. *Environmental Health Perspectives.* Vol 110, 1. 2002.

CLARKSON, Thomas. The toxicology of mercury and Its chemical compounds - Critical Reviews. *Toxicology*. 36, 8, 2006.

CORNFORD, E.M., CORNFORD M.E. Nutrient transport and the blood–brain barrier in developing animals. *Fed. Proc.* 45, 2065– 72, 1986.

CORREA, Mercè; ROIG-NAVARRO, Antoni; ARAGON, Carlos. Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. *Life Sciences*. 74 (16): 2009- 2021, 2004.

DOMOWICZ, Miriam et al. Astrocyte precursor response to embryonic brain injury. *Brain Resarch*. 1389, 35-49, 2011

EK, Joakim; KATARZYNA, Dziegielewska; HABGOOD, Mark; SAUNDERS, Norman. Barriers in the developing brain and neurotoxicology. *NeuroToxicology*. 33, 586–604, 2012.

FALLUEL-MOREL, Anthony et al. Developmental mercury exposure elicits acute hippocampal cell death, reductions in neurogenesis, and severe learning deficits during puberty. *Journal of Neurochemistry*. 1968-1981, 2007.

GARMUS, Tabata et. al. Extraction of Phenolic Compounds from Pitanga (*Eugenia Uniflora* L.) Leaves by Sequential Extraction In Fixed Bed Extractor Using Supercritical CO₂, Ethanol and Water as Solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 86, p. 4-14, 2014.

GILBERT, S. F. *Development Biology*. 9th ed. Massachusetts: Sinauer, 2010.

GREENER, Yigal, KOCHEN, Joseph. Methylmercury Toxicity in the Chick Embryo. *Teratology*. 28, 23-28, 1983.

HAMBURGUER, Viktor; HAMILTON, Howard. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*. 88: 49-92. 1951.

HEINZ, G. H; HOFFMAN, D. J; KONDRAD, S. L. Factors Affecting the Toxicity of Methylmercury Injected into Eggs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 264–279. 2006.

LIMA, Luciano Souza de. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO (O-Metil)-N-(2,6-Diidroxibenzoil)-tiramina (RIPARINA III) DA PLANTA Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) SOBRE A MORFOGÊNESE DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM EMBRIÃO DE Gallus gallus. Dissertação (Pós-Graduação em Morfotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Recife, 2017.

MOREIRA, Fátima Ramos; MOREIRA, Josino Costa. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 15(2), 2004.

MULLER, Yara et al. Behavioral impairments related to lead-induced developmental neurotoxicity in chicks. Arch Toxicol, 82:445-45,1, 2008.

NARBAITZ, Roberto; MARINO, Irma; SARKAR, Kiriti. Lead-induced early lesions in the brain of chick embryo. Teratology, 32:389-396, 1985.

RIVERO, L. B. D et al. Ação Do Acetato De Chumbo Sobre O Padrão De Desenvolvimento De Embriões De Gallus Domesticus. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 1, n. 1, 2006, 83-87.

ROSA, Juliana Martins da. Estudo do mecanismo de ação antidepressiva da glutathione em camundongos. 2005. 122p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ROTHERBERG, Stephen et al. Maternal blood lead level during pregnancy in South Central Los Angeles. Arch. Environ. Health, 54(3): 151-157. 1999.

SAHA, S. et al. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and fractions of Eugenia jambolana root bark and isolation of phytoconstituents. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 23, n. 4, p. 651-661, 2013.

SALEH, Kamel; SARHAN, Mohammed. Clastogenic analysis of chicken farms using micronucleus test in peripheral blood. Journal of Applied Sciences Research, 3(12): 1646-1649. 2007.

SANDERS, Alison et al. Association between arsenic, cadmium, manganese, and lead levels in private wells and birth defects prevalence in North Carolina: a semi-ecologic study. *BMC Public Health* 14:1. 2014.

SANTOS, M. C. B. Avaliação da Toxicidade e Comportamento Geoquímico do Chumbo em Solos Contaminados de Santo Amaro da Purificação (BA) após Atenuação por Fósforo. *Rev. Virtual Quim.*, vol 9, nº5, 2135-2150. 2017.

SAVOLAINEN, Kai; LOIKKANEN, Jarkko; EERIKAINEN, Simo; NAARALA, Jonne. Interactions of excitatory neurotransmitters and xenobiotics in excitotoxicity and oxidative stress: glutamate and lead. *Toxicol Lett.* 28 (102-103): 363-7, 1998.

SCHATZ, Janaína Chaves. Caracterização Morfológica De Embriões De Gallus Domesticus, Expostos Ao Acetato De Chumbo, Com Ênfase Na Sua Ação Em Nível Tecidual E Celular Na Medula. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SCHEUHAMMER, Anton; MEYER, Michael; SANDHEINRICH, Mark; MURRAY, Michael. Effects of Environmental Methylmercury on the Health of Wild Birds, Mammals, and Fish. *Ambio: A Journal of the Human Environment*, 36, 12-18, 2007.

SERAFIN, Claudia. 2006. Estudo da composição química e das propriedades biológicas das partes aéreas de *Plinia glomerata*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia. Universidade do Vale do Itajaí

SILVA, Daniela Graziane Oliveira da; QUEIROZ, Alexandre Cavalcante de; LEME, Ednilse; SMITH, Welber Senteio. A qualidade da água do Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brasil e a comunidade de aves aquáticas. *Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente*. Vol. 7, No. 1, 28-35. 2018.

TAKAMATSU, Tetsurou; FUJITA, Setsuya. Growth of Notochord and Formation of Cranial and Mesencephalic Flexures in Culture of Chick Embryo. *Developmental Growth and Differentiation*. 29 (5), 497- 502. 1987.

UEBEK, Alana et al. Processos de Remediação do Solo Contaminado com Chumbo. *Revista Caderno Pedagógico*. Lajeado, v. 14, n. 1, p. 63-71, 2017.

ZAREMBSKI, Paul; GRIFFITHS, Peter; WALKER, James; GOODALL, Henry. Lead in neonates and mothers. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 134 (1983) 35-49. Elsevier. 1983.