



## Comparação dos Efeitos do Material Particulado em Suspensão (PTS) Colhido em Diferentes Fontes Emissoras de Poluentes sobre a Embriogênese em Ovos de Galinha

D. C. AZEVEDO,\* D. S. OLIVEIRA, H. M. B. GUIMARÃES, R. S. L. MARTINS,  
M. MACCHIORE & P. H. N. SALDIVA

LIM 05 – Laboratório de Poluição Ambiental, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,  
Av. Dr. Arnaldo, 455, 1º andar, sala 1226, Cerqueira César, São Paulo, SP

### RESUMO

Partículas em suspensão no ar atmosférico são responsáveis pelos efeitos adversos à saúde, podendo provocar malformações embrionárias. O presente estudo compara a embriotoxicidade de amostras de material particulado em suspensão (PTS) de três perfis de fontes emissoras de poluentes: São Paulo, Capital; Cubatão; e Araraquara. Foram utilizados ovos recém-fecundados de *Gallus domesticus* divididos em: controle negativo, expostos ao PTS e controle positivo. Os ovos foram abertos e analisadas as taxas de mortalidade e peso. A taxa de mortalidade dos ovos expostos ao PTS de Cubatão foram as maiores (41,7%), em relação a Araraquara (37,5%) e a São Paulo (9,1%), na dose de 0,3 µg/L ( $p < 0,05$ ). A média dos pesos daqueles que sobreviveram foi menor entre os expostos ao PTS de Cubatão, comparados aos de São Paulo e Araraquara. Esses dados revelam que não apenas as concentrações do PTS interferem no desenvolvimento embrionário, mas também os componentes, visto que a maior mortalidade e a menor média de peso encontram-se na amostra de Cubatão.

*Palavras-chave:* poluição, material particulado em suspensão (PTS), embriogênese, teratogênese.

### ABSTRACT

#### Comparison of particulate suspended matter (PSM) effects from different pollution sources on chicken egg embryogenesis

Airborn particles are due to adverse effects on health and may cause adverse fetal outcomes. The present study compares the embryotoxicity of the PTS (Total Suspended Particulate) from three different emitting pollution sources: São Paulo, Capital; Cubatão; and Araraquara. Chicken fertilized eggs were divided on: nontreatment control, PTS treated and positive control. The eggs were opened and analyzed the mortality rates and weight of the embryos. The mortality rates of the PTS treated eggs were the highest on Cubatão (41.7%) followed by Araraquara (37.5%) and São Paulo (9.1%) at 0.3 µg/L PTS dose ( $p < 0.05$ ). The mean weight from hatching embryos were lower at Cubatão PTS treated when compared with São Paulo and Araraquara. These observations are supportive of the concept that not only the concentration of PTS interferes on embryo development, but also their components, therefore the highest mortality and the lower mean weight belong to Cubatão sample.

*Key words:* air pollution, total suspended particulate (PTS), embryogenesis, teratogenesis.

### INTRODUÇÃO

A exposição à poluição atmosférica de grandes centros, como a cidade de São Paulo, tem merecido a atenção de muitos estudos, uma vez que efeitos adversos à saúde têm sido observados em exposições com níveis de concentrações abaixo dos considerados seguros (Saldiva *et al.*, 1992, 1994, 1995).

Partículas atmosféricas são componentes importantes da poluição atmosférica. São constituídas de materiais orgânicos e inorgânicos que podem ser gerados através de processos de combustão. O material particulado tem sido alvo de muitos estudos, uma vez que sua toxicidade está relacionada não somente à concentração, mas também à natureza química da partícula e sua composição. Assim, podemos afirmar que uma

\*Corresponding author: Sandro Estevan Moron, e-mail: sandromoron@uol.com.br.

mesma concentração de aerossol de combustão de biomassa, como, por exemplo, a resultante da queima de palha de cana-de-açúcar, e a fuligem de exaustão de automóveis devem emitir diferentes toxicidades, assim como as partículas exaladas das chaminés de indústrias petroquímicas podem ser ainda mais tóxicas. O material particulado pode ser formado por substâncias como sulfatos, nitratos, amônia, cloro e carbono, elementos-traço como chumbo, cádmio e mercúrio, bem como alguns metais de transição como o ferro e materiais biológicos, dependendo do tipo de material do qual se originaram (Gilmour et al., 1996; Harrison & Yin, 2000; Cerná et al., 2000).

Tanto estudos epidemiológicos quanto experimentais mostram que a exposição à poluição atmosférica diminui o desenvolvimento pré e perinatal. Pereira et al. (1998) mostraram associação significativa entre mortalidade intra-uterina e concentrações de poluição atmosférica na cidade de São Paulo. Em um seguimento desse trabalho, verificou-se que, em dias em que a poluição atingia níveis elevados, havia aumento importante do nível de carboxihemoglobina no cordão umbilical dos recém-nascidos. Além dos efeitos observados em humanos, a poluição atmosférica, quando atinge áreas silvestres, traz alterações ao desenvolvimento embrionário de animais (Hui, 2002).

A visão de que a placenta oferecia proteção total contra os agentes externos foi questionada a partir do incidente com o uso da Talidomida por gestantes. Utilizado na prevenção de êmese gravídica, causou diversas anomalias fetais, como desenvolvimento anormal dos membros e face, deficiências cardíacas e renais, entre outras, comprovando o efeito teratogênico de algumas substâncias (Koren, 1998; Moore, 2000).

No Brasil, exemplo de anomalias fetais devido a agentes externos ocorreu na cidade de Cubatão, importante pólo petroquímico, onde foi detectada associação entre o nascimento de crianças malformadas, apresentando especialmente anencefalia, e a poluição industrial daquela região, na década de 1980 (Rabello-Gay et al., 1991).

Assim, temos que tanto a Talidomida quanto a poluição industrial de Cubatão são compostos teratogênicos, uma vez que podem provocar malformações ou aumentar a incidência de anomalias. No humano, o período de maior suscetibilidade a um teratógeno vai desde a terceira até a oitava semana de gestação, período no qual ocorre a diferenciação celular. Entretanto, se o teratógeno atuar no início da embriogênese pode acarretar a morte do feto (Moore, 2000). As manifestações mais comuns de teratogênese estão restritas à morte do feto, carcinogênese e malformações (Koren, 1998).

Apesar da dificuldade em transpor a fetos humanos as lesões causadas em animais (Koren, 1998), modelos experimentais com embriões de galinha constituem a melhor ferramenta para descobrir os possíveis efeitos teratogênicos de substâncias, pois possuem rápido desenvolvimento embrionário (20 a 21 dias), têm desenvolvimento embrionário

externo, ou seja, o ovo fora do corpo materno, o que facilita a sua manutenção, e fácil técnica experimental (processo de exposição ao PTS), além de ser um modelo experimental de embrião reconhecido pela comunidade científica, quando se trata de estudos envolvendo a teratogênese (Guimarães, 2004).

Considerando que o material PTS colhido em três municípios distintos (Cubatão, Araraquara, São Paulo) possa ter diferente toxicidade, devido à natureza do material particulado resultante da combustão proveniente de cada um deles, o presente estudo analisou e comparou os possíveis efeitos teratogênicos destes sobre embriões de *Gallus domesticus*, identificando quais concentrações de cada amostra são mais agressivas ao desenvolvimento do embrião, e diferenciou o grau de teratogenicidade pelo local proveniente da amostra.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Coleta do material particulado*

O material particulado (PTS) foi coletado em três municípios diferentes: na atmosfera do prédio da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, região da capital paulista de intenso tráfego de veículos automotores (Cetesb, 2002); atmosfera proveniente da queima de cana-de-açúcar (biomassa) na região de Araraquara, interior do Estado de São Paulo; e atmosfera do pólo petroquímico de Cubatão. A coleta do material foi de 24 horas, em sistemas de Amostradores de Médio Volume, sendo todo material aproveitado. Após a coleta, o material particulado foi diluído em soro fisiológico (Ameenuddin & Sunde, 1984). O material particulado diluído em soro foi agitado em um sonicador por 60 minutos. Após a homogeneização, a amostra foi diluída em concentrações diferentes conhecidas, 0,03 e 0,3 µg/L, utilizadas durante os experimentos.

A análise do material particulado foi realizada através do método de ativação de nêutrons, no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo.

### *Tratamento dos embriões*

Os experimentos foram executados em três etapas, cada uma realizada com o material PTS recolhido de cada município de estudo. Foram utilizados ovos recém-fecundados, 120 ovos para cada uma das etapas, nos seguintes grupos:

- grupo intacto (controle negativo) – 15 ovos não inoculados;
- grupo salina (controle negativo) – 15 ovos inoculados com 0,3 ml de salina (0,9%);
- grupos com tratamento de inoculação – 0,3 ml de solução PTS a 0,03 µg/L; 0,3 ml de solução PTS a 0,3 µg/L;
- grupo Ciclofosfamida (controle positivo) – 15 ovos inoculados com 0,3 ml de solução de Ciclofosfamida a 0,017 mg/ml (Gilani & Chatzinoff, 1982).

Ciclofosfamida é uma droga sintética utilizada na terapia de câncer e que sabidamente causa malformações de esqueleto e tecidos em embriões (IARC, 1972).

Com exceção do grupo intacto, os ovos foram inoculados com suas respectivas soluções, no terceiro dia de formação embrionária, considerando como tempo zero a fecundação.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que, na dose de 0,3 µg/L, a solução PTS de Cubatão obteve a menor média de peso; já entre São Paulo e Araraquara, as médias não apresentaram diferença estatisticamente significativa, conforme exposto na Figura 1.

Em relação à viabilidade de sobrevivência após a eclosão, temos que os ovos expostos ao material PTS de Cubatão

obtiveram a maior mortalidade (41,7%), em Araraquara foi intermediária (37,5%) e em São Paulo foi a menor verificada (9,1%), na dose de 0,3 µg/L, sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 2).

Os filtros utilizados no preparo das soluções foram enviados para o IPEN, e a análise foi feita pela Dra. Mitiko Saiki, usando o método de ativação de nêutrons (Tabela 1). Constata-se que alguns elementos estão presentes somente em Cubatão, principalmente urânio, que sabidamente tem efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário, além de ser mutagênico e carcinogênico (Durakovic, 1999). Diante dos resultados aqui expostos, pode-se dizer que não apenas as concentrações do PTS interferem no desenvolvimento embrionário, mas também os componentes, visto que a maior mortalidade e a menor média de peso encontram-se na amostra de Cubatão.

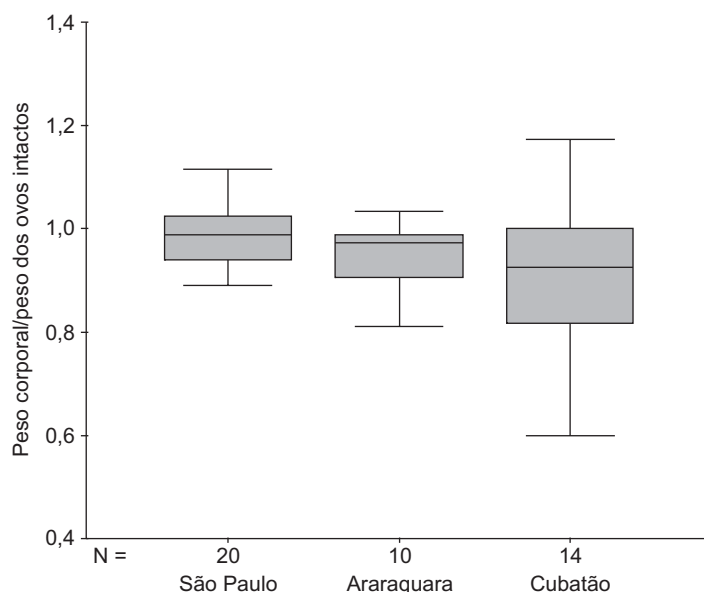


Figura 1 — Peso dos embriões ao nascimento.

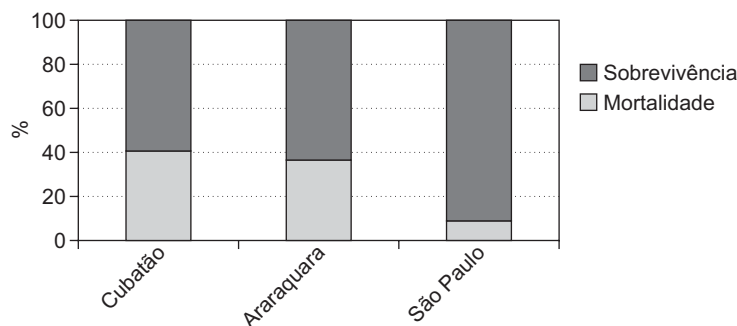


Figura 2 — Sobrevivência e mortalidade dos embriões (em %).

Tabela 1 — Elementos químicos da análise dos filtros.

Elemento	Amostra PTS Cubatão	Amostra PTS São Paulo	Amostra PTS Araraquara
Ca, $\mu\text{g m}^{-3}$	79,9 $\pm$ 1,5	Não detectado	Não detectado
Ni, $\mu\text{g m}^{-3}$	0,12 $\pm$ 0,02	Não detectado	Não detectado
U, $\text{ng m}^{-3}$	17,14 $\pm$ 0,05	Não detectado	Não detectado
Ce, $\text{ng m}^{-3}$	841 $\pm$ 5	Não detectado	Não detectado
Nd, $\text{ng m}^{-3}$	311 $\pm$ 57	Não detectado	Não detectado
Sm, $\text{ng m}^{-3}$	47,08 $\pm$ 0,05	Não detectado	Não detectado
Tb, $\text{ng m}^{-3}$	3,86 $\pm$ 0,05	Não detectado	Não detectado

Agradecimentos — CNPq, pela concessão de bolsa de iniciação científica 2003-2004.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMEENUDDIN, S. & SUNDE, M. L., 1984, Sensitivity of chick embryo to various solvents used in egg injection studies. *Proc. of the Soc. for Experim. Biol. And Med.*, 175: 176-178.
- CERNÁ, M., POCHMANOVÁ, D., PASTORKOVÁ, A., BENES, I., LENICEK, J., TOPINKA, J. & BINKOVÁ, B., 2000, Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic Part I. Bacterial mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM10 particulates. *Mutat. Res.*, 469: 71-82.
- CETESB, 2002, *Relatório de qualidade do ar do Estado de São Paulo 2001*. Série Relatório – Secretaria do Estado do Meio Ambiente. CETESB, Sao Paulo. Disponível em: URL: <http://www.cetesb.sp.gov.br/AR>.
- DURAKOVIC, A., 1999, Medical effect of internal contamination with Uranium. *Croat. Med. J.*, 40(1): 49-66.
- GILANI, S. H. & CHATZINOFF, M., 1983, Embryopathic effects of Cyclophosphamide. *Environ. Res.*, 31: 296-301.
- GILMOUR, P. S., BROWN, D. M., LINDSAY, T. G., BESWICH, P. H., MACNEE, W. & DONALDSON, K., 1996, Adverse health effects of PM10 particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Ocup. Environ. Med.*, 53: 817-822.
- GUIMARÃES, H. M. B., 2004, *Avaliação do efeito tóxico do PM10 no desenvolvimento embrionário do Gallus Domesticus*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- HARRISSON, R. M. & YIN, J., 2000, Particulate matter in the atmosphere: which particulate properties are important for its effects on health? *Sci. Total Environ.*, 249: 85-101.
- HUI, C. A., 2002, Concentration of chromium, manganese, and lead in air and avian eggs. *Environ. Pollut.*, 120(2): 201-206.
- IARC, 1981, *Monographs on evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man*. World Health Organization, Geneva, 1972 (multivolume work), 26: 176.
- KOREN, G., PASTUSZAK, A. & ITO, S., 1998, Drugs in pregnancy. *N. Engl. J. Med.*, 16: 1128-37.
- MOORE, K. L. & PERSAUD, T. V. N., 2000, *Embriologia clínica*. Guanabara Koogan, 543, 6. ed.
- PEREIRA, L. A., LOOMIS, D., CONCEIÇÃO, G. M., BRAGA, A. L. F., ÁREAS, R. M., KISHI, H. S., SINGER, J. M., BOHM, G. M. & SALDIVA, P. H. N., 1998, Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Envir. Health Persp.*, 6: 325-329.
- RABELLO-GAY, M. N., RODRIGUES, M. A. L. R. & MONTELEONE-NETO, R., 1991, *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese – métodos e critérios de Avaliação, Ribeirão Preto*. Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, 246p.
- SALDIVA, P. H. N., KING, M., DELMONTE, V. L. C., MACCHIONE, M., PARADA, M. A. C., DALIBERTO, M. L., SAKAE, R. S., CRIADO, P. M. P., SILVEIRA, P. L. P., ZIN, W. A. & BOHM, G. M., 1992, Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ. Res.*, 57: 19-33.
- SALDIVA, P. H. N., LICHTENFELS, A. J. F. C., PAIVA, P. S. O., BARONE, I. A., MARTINS, M. A., MASSAD, E., PEREIRA, J. C. R., XAVIER, V. P. & BOHM, G. M., 1994, Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo: a preliminary report. *Environ. Res.*, 65: 218-225.
- SALDIVA, P. H. N., POPE II, C., SCHWARTZ, J., DOCKERY, D. W., LICHTENFELS, A. J. F. C., SALGE, J. M., BARONE, I. A. & BOHM, G. M., 1995, Air pollution and mortality in elderly people : a time series study in São Paulo, Brazil. *Arch. Environ. Health.*, 50(2): 159-163.