

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELINA MEZZOMO DEBIASI

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA AÇÃO DO CLORETO DE MANGANÊS DURANTE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE *Gallus gallus*.

Curitiba
2011

MARCELINA MEZZOMO DEBIASI

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA AÇÃO DO CLORETO DE MANGANÊS DURANTE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE *Gallus gallus*.

Monografia apresentada ao Curso de especialização em
Biologia Celular e Tecidual, da Universidade Federal do
Paraná, por ocasião da obtenção do grau de especialista
em Biologia Celular e Tecidual.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Claudia Feijó Ortolani-
Machado.

Co-orientadora: Prof^ª Dra. Patrícia Franchi de Freitas.

Curitiba
2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Debiasi, Marcelina Mezzomo

Análise morfológica da ação do cloreto de manganês durante o desenvolvimento embrionário inicial de *Gallus gallus*. / Marcelina Mezzomo Debiasi . – Curitiba, 2011.

49 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Claudia Feijó Ortolani-Machado

Co-orientadora: Patrícia Franchi de Freitas

Monografia (especialização) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Curso de especialização em Biologia Celular e Tecidual.

1. Galinha - Embrião 2. Manganês I. Título II. Ortolani-Machado, Claudia Feijó III. Freitas, Patrícia Franchi IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Curso de especialização em Biologia Celular e Tecidual.

CDD (20. ed.) 591.4

**PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU EM
BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL**



SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

TERMO DE APROVAÇÃO

MARCELINA MEZZOMO DEBIASI

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DA AÇÃO DO CLORETO DE MANGANÊS DURANTE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE *Gallus gallus*.**

Monografia aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Especialista no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dra. Cláudia Feijó Ortolani-Machado.
Orientadora – Departamento de Biologia Celular, UFPR

Prof. MSc. Ivo Hartmann
Departamento de Biologia Celular, UFPR

Ana Carolina Barni Azevedo
Bióloga – Mestranda – Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR

Curitiba, 23 de novembro 2011.

AGRADECIMENTOS

Aos coordenadores do Curso de Especialização em Biologia Celular e Tecidual - UFPR que aceitaram e permitiram que eu realizasse a parte prática deste experimento na Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC – Campus de Joaçaba-SC, cidade onde resido.

À Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC, por ceder o espaço e os equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

À empresa que disponibilizou os ovos e também a seus funcionários que trouxeram e entregaram os mesmos para nós.

À professora Claudia Feijó Ortolani-Machado, orientadora, que compartilhou seus conhecimentos, possibilitando chegar ao final de cada etapa deste estudo.

À professora Patrícia Franchi de Freitas, co-orientadora, que compartilhou seus conhecimentos e auxiliou na parte experimental.

Ao professor Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro do laboratório de Toxicologia e de Biologia do Desenvolvimento – UFPR, que nos auxiliou a definir as concentrações de cloreto de manganês e a professora Fernanda Maurer D'Agostini-UNOESC, pelo apoio e ajuda.

À minha mãe pelo auxílio dedicado durante a realização dos experimentos.

À minha família, por compreender os momentos ausentes, aos meus colegas de trabalho pelo auxílio e a todos que de alguma forma colaboraram para que este trabalho fosse realizado com êxito.

RESUMO

Embriões de aves são utilizados como modelo na embriologia experimental, pois apresentam diversas vantagens quando comparados com embriões de mamíferos. O manganês é um micronutriente essencial, porém, quando exposto a níveis elevados no organismo resulta em uma desordem neurológica e sintomas neuropsiquiátrico conhecido como “manganismo”. Considerando a possibilidade da contínua exposição da população aos compostos com manganês, buscou-se neste estudo avaliar morfológicamente o efeito toxicológico do cloreto de manganês em diferentes estádios do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus*, expostos a diferentes concentrações. Ovos embrionados foram divididos em quatro grupos experimentais: 1) Grupo controle A, ovos permaneceram fechados, sem intervenções, 2) Grupo controle B, onde os ovos foram injetados com PBS (solução salina tamponada com fosfato, veículo do contaminante injetado na câmara de ar), 3) Grupos 3 e 4 foram expostos ao cloreto de manganês, nas concentrações de 50 µM e 100 µM. Todos os ovos foram incubados durante 3 ou 7 dias. Os embriões de 3 dias foram coletados, fixados em Carnoy, corados com Carmalúmen de Mayer e montados em lâmina histológica, os embriões de 7 dias foram coletados, fixados em solução ALFAC e preservados em álcool 70% para posterior análise. Os resultados demonstraram que os embriões de *Gallus gallus* expostos ao cloreto de manganês em ambas concentrações apresentam atraso no desenvolvimento embrionário e malformações quando comparados com os dos grupos controles A e B. O cloreto de manganês, nas doses utilizadas, apresentou efeito teratogênico, levando a alterações principalmente no desenvolvimento do encéfalo. Sugere-se a realização de estudos adicionais, em outros estádios de desenvolvimento, inclusive após a eclosão e outros modelos experimentais contribuirão para o melhor entendimento dos efeitos do cloreto de manganês.

Palavras chave: *Gallus gallus*, cloreto de manganês, desenvolvimento embrionário; análise morfológica.

ABSTRACT

Avian embryos are used as model in experimental embryology, since they have several advantages when compared to mammalian embryos. Manganese is an essential micronutrient, but when exposed to high levels in the body results in a neurological disorder and neuropsychiatric symptoms known as "manganism." Considering the possibility of continued public exposure to manganese compounds, this study sought to morphologically evaluate the toxic effects of manganese chloride at different stages of embryonic development of *Gallus gallus*, exposed to different concentrations. Fertilized eggs were used, divided into four experimental groups: 1) The control group, eggs were closed without intervention, 2) Control group B, where the eggs were injected with PBS (vehicle of the contaminant injected in the air chamber), 3) Groups 3 and 4 were exposed to manganese chloride at concentrations of 50 μ M and 100 μ M. After exposure the eggs were incubated for 3 to 7 days. The 3-day embryos were fixed in Carnoy, stained with Mayer's Carmalúmen and stretched on slides, embryos were fixed in 7 days ALFAC solution and preserved in 70% ethanol for future analysis. The results showed that embryos of *Gallus gallus* exposed to manganese chloride in both concentrations, and variations present delayed when compared with the control group A and B. The manganese chloride at the doses used produced a teratogenic effect, particularly with alterations in brain development. It is suggested that further studies in other stages of development, including after eclosion and other experimental models will contribute to better understanding of effects of manganese chloride.

Key-words: *Gallus gallus*. Manganese Chloride. Embryonic development. Morphological analysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 CLIVAGEM E FORMAÇÃO DO EPIBLASTO NO EMBRIÃO DE GALINHA.....	12
FIGURA 2 DESENVOLVIMENTO DO TUBO NEURAL E MESODERME NO EMBRIÃO DE GALINHA	13
FIGURA 3 A. TRABALHADORES EXPOSTOS A VAPORES OU FUMAÇA DE SOLDA. B. MINÉRIO DE MANGANÊS. C. PILHAS	16
FIGURA 4 EXPOSIÇÃO DOS OVOS AO CLORETO DE MANGANÊS	21
FIGURA 5 METODOLOGIA DO RECORTE DO DISCO EMBRIONÁRIO, DISTENSÃO E COLORAÇÃO DE EMBRIÃO DE 3 DIAS DE INCUBAÇÃO ESTÁGIO 19/20 HH	23
FIGURA 6 METODOLOGIA DA RETIRADA DA MEMBRANA EM EMBRIÃO DE 7 DIAS ESTÁGIO 30/31 HH	24
FIGURA 7 EMBRIÕES NOS ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS 15 A 20	27
FIGURA 8 EMBRIÕES NOS ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS 25 A 26; 29 A 32.....	28
FIGURA 9 EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTOS A 50 μ M E 100 μ M DE CLORETO DE MANGANÊS INCUBADOS POR 3 DIAS NOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO 18, 16/17 E 19	35
FIGURA 10 EMBRIÕES EXPOSTOS A 50 μ M E 100 μ M DE CLORETO DE MANGANÊS INCUBADOS POR 3 DIAS NOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO 17,18,20.....	36
FIGURA 11 EMBRIÕES EXPOSTOS A 50 μ M E 100 μ M DE CLORETO DE MANGANÊS INCUBADOS POR 3 DIAS NOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO 14 E 17	37
FIGURA 12 EMBRIÕES CONTROLE E EMBRIÕES EXPOSTOS (50 μ M E 100 μ M) DE CLORETO DE MANGANÊS INCUBADOS POR 7 DIAS NOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO 26 E 30	41

FIGURA 13 EMBRIÕES EXPOSTOS (50 μ M) DE CLORETO DE MANGANÊS INCUBADOS POR 7 DIAS NOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO 25 E 30.....	42
---	----

LISTA DAS TABELAS

TABELA 1 QUANTIDADE DE OVOS UTILIZADOS PARA O EXPERIMENTO	20
TABELA 2 CARACTERÍSTICAS PRESENTES NOS EMBRIÕES DE GALINHA DE ACORDO COM O ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO, SEGUNDO HAMBURGER E HAMILTON (1951)	24
TABELA 3 QUANTIDADE DE EMBRIÕES COM 3 DIAS DE INCUBAÇÃO QUE DESENVOLVERAM, QUE ROMPERAM AS MEMBRANAS E QUE NÃO DESENVOLVERAM	29
TABELA 4 ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS DEFINIDO DOS EMBRIÕES COM 3 DIAS DE INCUBAÇÃO.....	30
TABELA 5 ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS INTERMEDIÁRIOS DETERMINADOS EM EMBRIÕES COM 3 DIA DE INCUBAÇÃO.....	31
TABELA 6 ALTERAÇÕES OBSERVADAS EM EMBRIÕES COM 3 DIAS DE INCUBAÇÃO DE CADA GRUPO	33
TABELA 7 QUANTIDADE DE EMBRIÕES COM 7 DIAS DE INCUBAÇÃO QUE DESENVOLVERAM E QUE NÃO DESENVOLVERAM	38
TABELA 8 NÚMERO DE EMBRIÕES PARA CADA ESTÁDIO EMBRIONÁRIO DOS OVOS COM 7 DIAS DE INCUBAÇÃO	39
TABELA 9 ALTERAÇÕES OBSERVADAS EM EMBRIÕES DOS OVOS COM 7 DIAS DE INCUBAÇÃO	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 EMBRIÕES DE AVES COMO MODELO ANIMAL	10
1.2 DESENVOLVIMENTO DE <i>Gallus gallus</i>	11
1.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO X AGENTES TERATOGENICOS.....	14
1.4 MANGANÊS	15
2.OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	20
3.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA	21
3.2.1 Embriões com 3 dias de incubação.....	21
3.2.2 Embriões com 7 dias de incubação.....	23
3.2.3 Determinação do estágio embrionário.....	24
4 RESULTADOS	29
4.1 EMBRIÕES INCUBADOS POR 3 DIAS	29
4.2 EMBRIÕES INCUBADOS POR 7 DIAS	37
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 EMBRIÕES DE AVES COMO MODELO ANIMAL.

O conjunto similar de estádios de desenvolvimento entre embriões de vertebrados possibilita a utilização de organismos modelos na embriologia experimental. Embriões de aves são amplamente utilizados como modelo experimental, pois os ovos fertilizados são fáceis de serem obtidos, as observações e manipulações podem ser feitas apenas abrindo-se o ovo, com a possibilidade de acompanhamento diário em laboratório, e sem que haja interferência de fatores maternos. Além disto, o embrião de galinha apresenta desenvolvimento relativamente curto (21 dias), os ovos são ricos em vitelo, como forma de nutrição durante o desenvolvimento embrionário, e como os embriões estão dispostos em uma pequena região sobre o vitelo (WOLPERT *et al.*, 2000; GILBERT, 2003), isso facilita a manipulação, observação e coleta dos mesmos.

Embriões de aves são modelos convenientes em manipulações microcirúrgicas experimentais e para investigações dos efeitos de compostos químicos sobre o desenvolvimento. Em especial, embriões de *Gallus gallus* são utilizados em experimentos para avaliação de efeitos teratogênicos de contaminantes ambientais, pois nos estádios precoces de desenvolvimento apresentam-se muito suscetíveis à ação de agentes tóxicos, podendo assim alterar o desenvolvimento embrionário normal e interferir nos mecanismos de formação de vários sistemas orgânicos. (WOLPERT *et al.*, 2000; RIVERO *et al.*, 2006).

O modelo experimental de aves mais utilizado em laboratórios é a espécie *Gallus gallus* (galinha). As incubadoras artificiais simulam o processo natural de incubação pelas galinhas, sendo que o fator essencial para êxito é o controle da temperatura que deve permanecer em torno de 37 a 38°C, pois a oscilação da temperatura influencia diretamente no desenvolvimento embrionário. Também é necessário manter umidade e ventilação controladas para que os embriões possam realizar as trocas gasosas. (WAGENINGEN *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de cada estrutura embrionária de *Gallus gallus*, foi descrito e organizado em estádios, pois a correlação baseada somente na idade cronológica pode levar a equívocos das reais fases morfológicas. (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). O conhecimento detalhado de cada estágio embrionário possibilita o acompanhamento e a identificação da formação e organização das estruturas básicas dos embriões.

1.2 DESENVOLVIMENTO DE *Gallus gallus*.

Os ovos de aves apresentam grande acúmulo de vitelo que permite ao embrião se desenvolver na ausência de fonte externa (materna) de alimentação. O vitelo está localizado no polo vegetativo do ovo enquanto que as estruturas citoplasmáticas e o núcleo estão completamente deslocados para o polo animal e restritos a uma pequena área. Devido à grande quantidade de vitelo, o sulco de clivagem desenvolve-se em um pequeno disco de citoplasma ativo no polo animal. (GILBERT, 2003).

Nas aves, o processo de clivagem inicia-se após a fertilização do óvulo no istmo do oviduto. Depois da terceira clivagem, o ovo deixa o istmo e direciona-se ao útero, onde aumenta o número de blastômeros e forma o blastodisco ou blastoderme (FIGURA 1). Na região central do blastoderme, as células mais profundas são descartadas para formar a zona pelúcida translúcida, enquanto as externas formam um anel periférico mais escuro, a zona opaca. No momento da postura, o blastoderma é constituído por 60.000 células, sendo que algumas são delaminadas em cavidades subgerminais para formar a camada do epiblasto, que dará origem ao embrião e o hipoblasto, que origina as estruturas extraembrionárias. (WOLPERT *et al.*, 2000; GILBERT, 2003; GARCIA; FERNÁNDEZ, 2006).

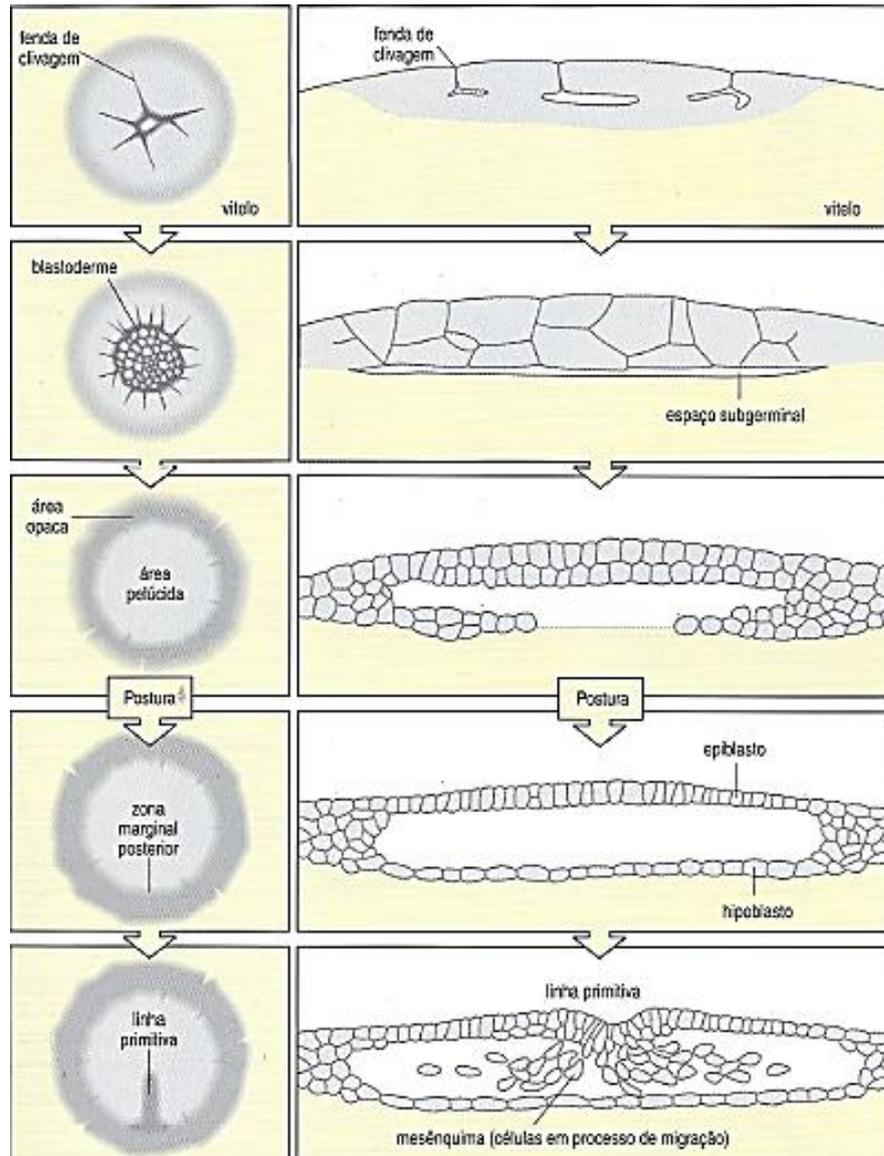


FIGURA 1. CLIVAGEM E FORMAÇÃO DO EPIBLASTO NO EMBRIÃO DE GALINHA.
 FONTE: WOLPERT *et al.*, 2000.

A gastrulação se inicia com o desenvolvimento da linha primitiva, que determina o eixo do embrião. Essa linha é formada pelo espessamento causado pelo ingresso de células mesodérmicas do epiblasto para dentro da blastocele, e pela migração de células da região lateral posterior em direção ao centro. A linha primitiva se estende em 60-75% do comprimento da área pelúcida. Os intensos movimentos celulares dão origem aos três folhetos embrionários ectoderma, mesoderma e endoderma. Na segunda fase da gastrulação, a linha primitiva começa a regredir movendo o nódulo de Hensen de uma posição próxima do centro da área

pelúcida para uma posição mais posterior. A gastrulação gera embriões com distinto grau de maturidade e desenvolvimento ântero-posterior. Enquanto uma porção de células da região posterior está gastrulando, outras na porção anterior já estão começando a formar órgãos. (WOLPERT *et al.*, 2000; GARCIA; FERNÁNDEZ 2006;).

A notocorda e os somitos são formados à medida que o nódulo de Hensen regride. Simultaneamente, o tubo neural começa a se desenvolver como um par de pregas neurais, seguido pelo dobramento e fechamento do tubo neural, avançando em direção cefálica e caudal até que pequenas áreas permaneçam abertas em ambas as extremidades (FIGURA 2). Ao mesmo tempo em que as pregas neurais fundem-se na linha média dorsal, a dobra cefálica desenvolve-se, separando a cabeça da superfície do epiblasto. Acompanhando a neurulação e o desenvolvimento da dobra cefálica, o embrião também se dobra no lado ventral para formar o intestino primitivo. Os dois rudimentos do coração juntam-se, formando um órgão localizado ventralmente e os somitos originam as vértebras, os músculos axiais dos membros e a derme. (WOLPERT *et al.*, 2000; MOORE; PERSAUD, 2008).

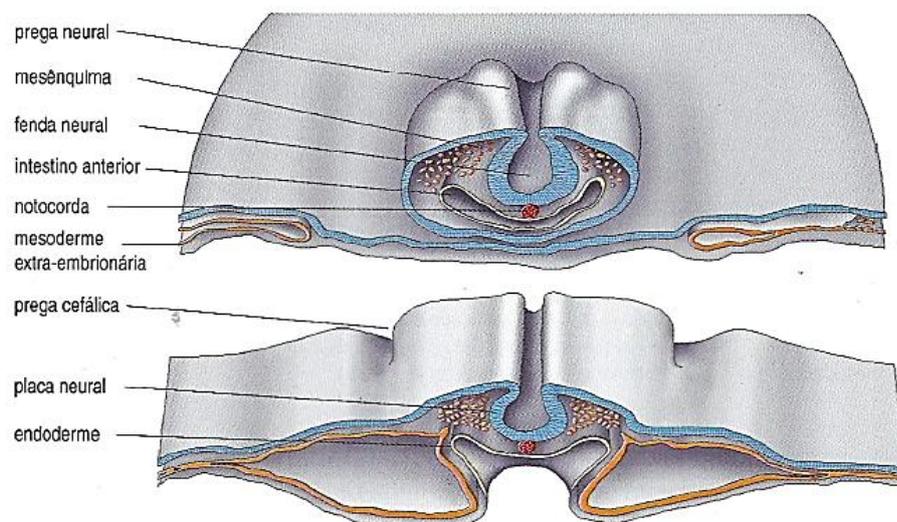


FIGURA 2. DESENVOLVIMENTO DO TUBO NEURAL E MESODERME NO EMBRIÃO GALINHA. FONTE: WOLPERT *et al.*, 2000.

Aproximadamente três dias após a postura do ovo, o embrião possui 40 somitos, cabeça bem desenvolvida, coração formado e vasos conectados com os tecidos extraembrionários, possibilitando assim a circulação com batimentos cardíacos. Nesse estágio, o embrião recebe a nutrição através das membranas extraembrionárias, proteção mecânica proveniente do saco amniótico cheio de fluido e um alantóide para o armazenamento dos produtos oriundos da excreção. No tempo restante, antes da eclosão, se desenvolvem os olhos e os ouvidos, o embrião cresce em tamanho e os órgãos internos se desenvolvem. As asas, pernas e bico se formam e as penas surgem nas asas e no corpo. Após 21 dias de incubação o pinto eclode. (WOLPERT *et al.*, 2000).

1.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO X AGENTES TERATOGENICOS.

A exposição de embriões a agentes teratogênicos pode causar graves anomalias congênitas. 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 são sempre sensíveis, do começo da sua formação até o nascimento. (GILBERT, 2003; GÓMEZ DUMM, 2006; MOORE; PERSAUD, 2008).

Segundo Rivero (2005), o acetato de chumbo pode ser caracterizado 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.

Estudos de análise morfológica em embriões de aves constatam que o metal cádmio, também atua como um agente teratogênico, causando graves alterações na região cefálica dos embriões expostos a este metal durante o desenvolvimento. (YAMAMOTO, 2009). Além disso, pesticidas e compostos orgânicos de mercúrio têm causado anormalidades neurológicas e de comportamento em bebês cujas mães os ingeriram durante a gravidez. (GILBERT, 2003).

Alguns compostos químicos encontrados naturalmente no ambiente também podem causar defeitos de nascimento. (GILBERT, 2003). Segundo Matos (2009), embriões de aves expostos ao extrato da planta de *Ateleia glazioviana* apresentam alterações no sistema cardiovascular, tendo como consequência a inviabilidade ou morte do embrião.

A capacidade de um agente produzir defeitos congênitos depende do genótipo do conceito, estágio do desenvolvimento por ocasião da exposição, da dose e da duração da exposição. O mecanismo de ação dos teratógenos pode envolver a inibição de um processo bioquímico ou molecular específico, a patogênese pode envolver morte celular, diminuição da proliferação celular ou outros fenômenos celulares. (SADLER, 2005).

1.4 MANGANÊS.

A industrialização tem como consequência de sua produção uma diversidade enorme de produtos químicos tóxicos e gera resíduos prejudiciais ao meio ambiente. (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). A extração e utilização dos metais têm contribuído significativamente com o aumento da poluição do ar, da água e do solo.

O minério de manganês é um recurso natural que ocupa um importante papel no Brasil, pelas reservas existentes e pela essencialidade na produção de ferroligas e aço, para o qual ainda é insumo fundamental. Além disso, esse metal e seus compostos são utilizados na produção de pilhas eletrolíticas, cerâmicas, eletrodos para solda, ligas especiais e produtos químicos. (MARTINS; LIMA, 2001; COSTA; FIGUEREDO, 2001).



FIGURA 3. A. TRABALHADORES EXPOSTOS VAPORES OU FUMAÇA DE SOLDA. B. MINÉRIO DE MANGANÊS. C. PILHAS.
 FONTE: GOOGLE, 2011.

O manganês também é um micronutriente essencial, participa de vários processos fisiológicos em animais e vegetais. Nos vegetais os íons manganês ativam as enzimas descarboxilases e desidrogenase envolvidas no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. (TAIZ; ZEIGER, 2004). Nos seres humanos o manganês desempenha um papel importante na regulação metabólica, faz parte de vários componentes do ciclo de Krebs e da arginase, também é importante na formação do esqueleto, pois funciona como catalisador da síntese de glicosaminoglicanos da cartilagem e do osso. (DOUGLAS, 2006). A ingestão de Mn em baixos níveis é necessária à saúde humana, porém quando encontrado em níveis elevados apresenta efeito neurotóxico. (NEVES *et al.*, 2009).

A fonte mais importante de exposição da população ao manganês é através dos alimentos. Porém, as pessoas que vivem em regiões de minério natural, próximas às instalações de produção de ferro e aço, usinas de energia movidas a carvão ou de depósitos de resíduos podem ser expostas a níveis elevados de manganês particulado em suspensão no ar, embora esta exposição seja bem menor do que no local de trabalho. (WHO, 1999).

Ainda, as pessoas podem ingerir água com alta concentração de manganês, devido à contaminação pela erosão de rochas e solos, atividades de mineração e de resíduos industriais ou por lixiviação de manganês a partir de materiais descartados em aterros antropogênicos ou solo, tais como baterias de células secas. (RAUPP, 2008; ZOCHE; FREITAS; QUADROS, 2010;).

Determinadas ocupações como soldagem, mineração ou trabalhos em fábricas que utilizam Mn, são fontes comuns de inalação excessiva deste metal. Os problemas de saúde mais comuns em trabalhadores expostos a elevados níveis envolvem o sistema nervoso. Apresentam mudanças no comportamento, nos movimentos (lentos e desajeitados), além de provocar irritação nos pulmões que pode levar à pneumonia. (WHO, 1999). Efeitos respiratórios, semelhantes aos observados nos trabalhadores, foram identificados em estudos com macacos expostos a altos níveis de Mn. (ATSDR, 2008). Segundo Roth (2006), a vulnerabilidade à manifestação dos sintomas deste transtorno, pode ter influência genética nas diferentes populações.

Os sintomas de toxicidade do Mn podem aparecer lentamente, ao longo de meses ou anos e resultam em uma desordem neurológica e sintomas neuropsiquiátricos que podem culminar em uma doença tipo *Parkinson* conhecida como “manganismo”. (WHO, 1999; ATSDR, 2008). O Mn apresenta potencialidade em penetrar a barreira hemato-encefálica, e atravessa em quantidade limitada a barreira placentária durante o período gestacional, assim permitindo atingir o feto em desenvolvimento. (ATSDR, 2008). Em laboratórios, roedores fêmeas alimentadas com altos índices de Mn antes de engravidar, apresentaram deficiência na fertilidade, além de apresentarem doenças renais e urinárias. (ZHANG *et al.*, 2002).

Estudos em crianças sugerem que níveis elevados de exposição ao Mn causem efeitos indesejáveis no desenvolvimento do cérebro, incluindo mudanças no comportamento e diminuição no aprendizado. Em alguns casos, tais níveis de exposição têm sido suspeitos de causar sintomas severos da doença manganismo, incluindo dificuldade em falar e andar. Ainda não foram elucidadas se tais mudanças são temporárias ou permanentes, e se a doença é causada somente pela ação do manganês. (ATSDR, 2008). Segundo Menezes Filho (2009), há evidências de que a exposição ambiental excessiva ao Mn tem efeito na cognição das crianças e também na função intelectual materna.

Considerando a possibilidade da contínua exposição da população aos compostos de Mn, evidencia-se a necessidade de estudos analisando os reais efeitos do Mn nos organismos, em especial durante o desenvolvimento embrionário, pois há vários caminhos e vias em que um agente tóxico pode se manifestar em um organismo. O xenobiótico pode atingir a molécula alvo e reagir com ela ou pode

influenciar adversamente o microambiente biológico causando disfunção molecular, celular e de organelas ou de órgãos, levando a efeito deletério. (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

Os estudos até o momento não são suficientes para confirmar a toxicidade do cloreto de manganês durante o desenvolvimento embrionário. Desta forma, a análise morfológica de embriões de *Gallus gallus* expostos ao MnCl em diferentes períodos do desenvolvimento, pode contribuir para avaliar o efeito toxicológico deste metal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL.

Avaliar o efeito toxicológico do cloreto de manganês durante algumas fases do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus* (galinha) expostos a diferentes concentrações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Expor embriões de galinha ao cloreto de manganês nas concentrações de 50 e 100 μM , durante 3 e 7 dias de incubação (estádios embrionários 19-20 e 30-31 HH, respectivamente);
- Avaliar os efeitos da exposição do MnCl através do estudo anatomo-morfológico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL.

- Obtenção dos embriões:

Ovos fertilizados de *Gallus gallus* foram fornecidos pelo incubatório local.

Após a higienização, os ovos foram analisados para verificação da presença de rachaduras na sua casca e separados por equivalência de peso.

- Grupo experimental:

Para este experimento foram utilizados 253 ovos no total, sendo que destes, 164 foram abertos após 3 dias de incubação, e 89 após 7 dias de incubação. Para análise dos embriões com 3 dias de incubação, utilizou-se 34 ovos para controle sem perfuração da casca (controle fechado), 41 ovos injetados com o veículo do contaminante (Controle PBS), 39 ovos contaminados com cloreto de manganês a 50 μM e 50 ovos para a concentração 100 μM (TABELA 1).

Para os embriões com 7 dias de incubação foram utilizados 18 ovos para o controle sem perfuração da casca, 16 com controle PBS, 26 e 29 para os contaminados com cloreto de manganês nas concentrações de 50 e 100 μM , respectivamente (TABELA 1).

TABELA 1. QUANTIDADE DE OVOS UTILIZADOS PARA O EXPERIMENTO

	3 DIAS	7 DIAS	TOTAL
Controle	34	18	52
PBS	41	16	57
50 μM de MnCl	39	26	65
100 μM de MnCl	50	29	79
Total	164	89	253

FONTE: a autora (2011)

A casca dos ovos foi primeiramente perfurada na região da câmara de ar com agulha mais espessa para facilitar a entrada da agulha de insulina, para administração do PBS ou do cloreto de manganês (FIGURA 4 A e B). Após a injeção do contaminante e remoção da agulha, o orifício foi selado com fita adesiva e os ovos foram incubados à temperatura de 38° C, umidade relativa de 65 a 75% por 3 e 7 dias.

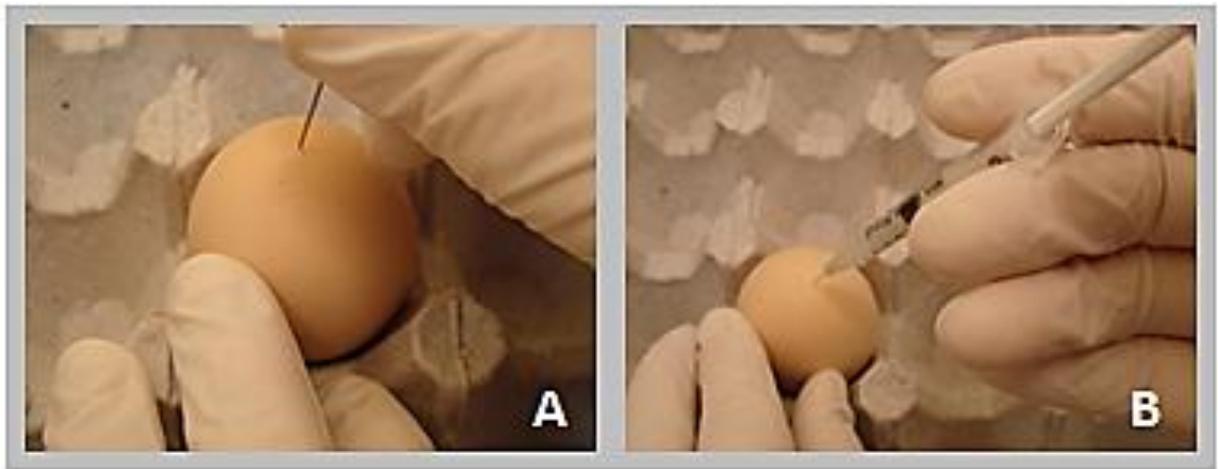


FIGURA 4. INJEÇÃO DE CLORETO DE MANGANÊS. A. OVO SENDO PERFURADO COM AGULHA GROSSA NA CÂMARA DE AR. B. PBS E CONTAMINANTE SENDO INJETADO COM A UTILIZAÇÃO DE UMA AGULHA E SERINGA DE INSULINA.

FONTE: a autora (2011)

3.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA.

3.2.1 Embriões com 3 dias de incubação.

Para análise morfológica dos embriões com 3 dias de incubação, foi utilizada a técnica de montagem total. Setenta e duas horas após a injeção e incubação, os ovos foram abertos e seus discos embrionários (FIGURA 5 A) recortados com o auxílio de tesoura e pinça. Posteriormente, foram transportados para placa de Petri

contendo PBS. Os embriões foram lavados em PBS para remover o excesso de vitelo (FIGURA 5 B).

Foi colocado sobre o disco embrionário, um papel filtro retangular com um recorte em forma de losango na região central encaixada exatamente sobre o embrião, para mantê-lo distendido e submerso na solução fixadora (FIGURA 5 C). Em seguida, os embriões foram fixados em solução fixadora de Carnoy, por 2 h a temperatura ambiente em uma placa de Petri fechada.

Após a fixação, os embriões foram lavados em água destilada e colocados em etanol 70%, onde permaneceram por 12 horas. Para a coloração, os embriões foram hidratados em água destilada por 10 minutos e submersos no corante Carmalúmen de Mayer por aproximadamente 48 h (FIGURA 5 D).

Depois de corados, os embriões foram desidratados em série alcoólica crescente (etanol a 70%, 80%, 95%, 100% I e 100% II; 10 min em cada banho) e, em seguida, diafanizados em dois banhos consecutivos de xileno (xilol), por 10 min cada.

Para a montagem das lâminas permanentes, foi utilizada a resina Permount®. Após a confecção das lâminas, a análise foi realizada em microscópio de campo claro Bioval e fotografadas com câmara digital Sony.

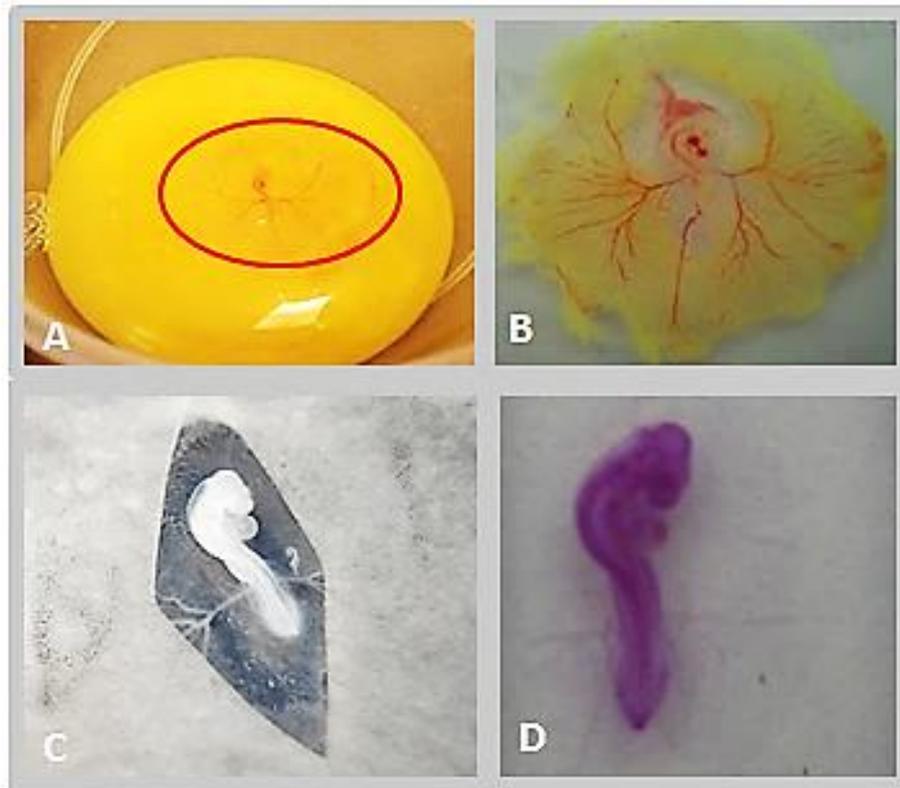


FIGURA 5. A: OVO ABERTO INDICANDO LOCAL DO DISCO EMBRIONÁRIO ÁREA CIRCUNDADA. B: DISCO EMBRIONÁRIO RECORTADO. C: EMBRIÃO DISTENDIDO COM AUXÍLIO DO PAPEL FILTRO. D: EMBRIÃO CORADO COM CORANTE CARMALÚMEN DE MAYER.

FONTE: a autora (2011)

3.2.2 Embriões com 7 dias de incubação.

Os ovos que permaneceram por 7 dias na incubadora após a exposição, foram abertos e, com auxílio de pinça, foram retirados os embriões com suas membranas anexas (FIGURA 6 A). Posteriormente, os embriões foram removidos das membranas e lavados com PBS (FIGURA 6 B). Visando facilitar a entrada do fixador nos embriões, foram realizadas duas perfurações com agulha, uma na porção cefálica e outra na porção caudal.

Em seguida, os embriões foram fixados em solução ALFAC, (etanol 80%, ácido acético, 99,7% e formol 37%), por 6 horas em temperatura ambiente, após transferidos para etanol 70%.

Posteriormente, os embriões foram analisados com auxílio de estereomicroscópio Quimis. Após as análises, os embriões foram mantidos em etanol 70% para embalagem futura em paraplast.

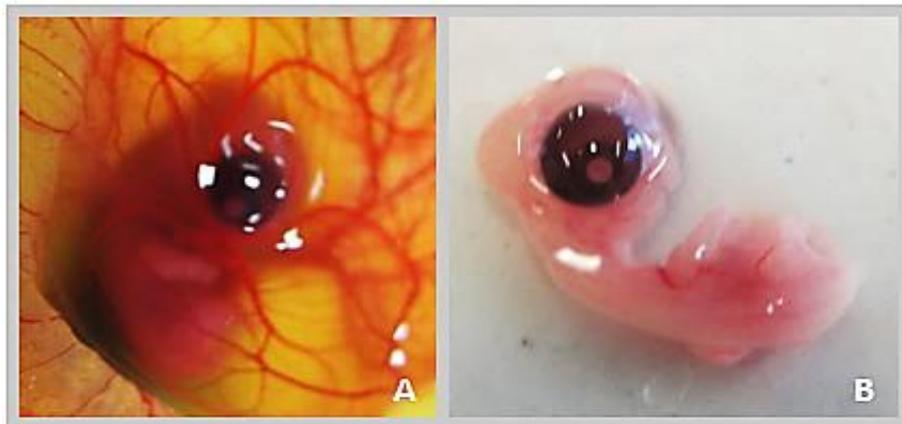


FIGURA 6. A. EMBRIÃO GRUPO CONTROLE COM MEMBRANAS. B: EMBRIÃO GRUPO CONTROLE SEM MEMBRANAS, NO PBS.
FONTE: a autora (2011)

3.2.3 Determinação do estágio embrionário.

O estágio de desenvolvimento embrionário foi determinado de acordo com o número de somitos e formação do sistema nervoso, além de outras características descritas em cada estágio (TABELA 2), segundo Hamburger-Hamilton (1951).

TABELA 2. CARACTERÍSTICAS PRESENTES NOS EMBRIÕES DE GALINHA DE ACORDO COM O ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO, SEGUNDO HAMBURGER E HAMILTON (1951).

Estádio embrionário	Características
14 HH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Eixo do prosencéfalo e rombencéfalo formam um ângulo reto. ➤ Rotação do corpo para trás até somitos 7-9. ➤ Arcos viscerais 1 e 2, e fendas 1 e 2 são distintos. ➤ Vesícula óptica começa a invaginar. ➤ Abertura do orifício auditivo constricta. ➤ Lente placoide é formada. ➤ Circuito ventricular do coração ventralmente ao canal atrioventricular. ➤ Âmnio se estende até os somitos 7-10.

continua

TABELA 2. CARACTERÍSTICAS PRESENTES NOS EMBRIÕES DE GALINHA DE ACORDO COM O ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO, SEGUNDO HAMBURGER-HAMILTON (1951).
continuação

15 HH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Prega lateral do corpo se estende da região anterior até os somitos 15 - 17. ➤ Flexão craniana: eixos do prosencéfalo e rombencéfalo formam um ângulo agudo. Os ventralmente, os contornos de ambos são quase paralelos. ➤ Âmnion se estende até os somitos 7-14. ➤ Tronco distinto.
16 HH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rotação do corpo se estende ao nível dos 11^o a 13^o somitos. ➤ Dobras laterais do corpo estendem-se ao nível dos somitos 17-20, entre os níveis das asas e pernas. ➤ Primórdio da perna é ainda plano, representada por uma condensação do mesoderma. ➤ Âmnio se estende aos somitos 10-18. ➤ Todas as flexões são mais acentuadas. ➤ Broto da cauda em um cone curto, em linha reta, delimitado a partir do blastoderma. ➤ Arcos viscerais: Terceira fenda oval ainda em formação. ➤ Prosencéfalo alongado.
17 HH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rotação do corpo se estende aos somitos 14-15. ➤ Dobras laterais do corpo estendem-se em todo o perímetro do mesmo. ➤ Brotos das asas e pernas deslocados do blastoderma por dobramento das pregas do corpo. ➤ Flexão craniana é inalterada. ➤ Flexão cervical é maior do que em estágios anteriores, com ângulo maior do que 90 graus. ➤ Flexão do tronco é distinta no nível branquial. ➤ Rotação do corpo se estende aos somitos 17-18. ➤ Broto da cauda dobrado ventralmente. ➤ Indicação de fossas nasais.
18 HH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Brotos das pernas ligeiramente maiores do que das asas. ➤ Somitos: 30-36 estendem-se além do nível do broto da perna. ➤ Âmnio normalmente fechado, ocasionalmente pode haver um orifício na região lombar. ➤ O eixo da medula forma um ângulo quase reto com o eixo posterior do tronco. ➤ Flexão do tronco foi deslocada para a região lombar. ➤ Rotação do corpo: se estende para a região posterior do corpo. Os brotos das pernas não estão mais no plano horizontal. ➤ O broto da cauda é girado para a direita cerca de um ângulo de 90 graus em relação ao eixo do tronco posterior.
19 HH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Brotos das pernas continuam ligeiramente maiores do que das asas. ➤ Os somitos 37-40 se estendem até a cauda, porém o final da cauda, que é dirigida para frente, não é segmentada. ➤ Flexão do tronco desaparece parcial ou totalmente devido a rotação do corpo inteiro. ➤ O contorno da parte posterior do tronco é reto (direta) com a base da cauda, o broto da cauda é curvado voltado para a região anterior. ➤ Processo maxilar aproximadamente do mesmo comprimento que o processo mandibular. ➤ O alantóide é uma pequena bolsa de tamanho variável, ainda não vesicular. ➤ Olhos despigmentados.

continua

TABELA 2. CARACTERÍSTICAS PRESENTES NOS EMBRIÕES DE GALINHA DE ACORDO COM O ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO, SEGUNDO HAMBURGER-HAMILTON (1951).
conclusão

20 HH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Broto das pernas claramente maiores do que o broto das asas. ➤ Brotos das pernas ligeiramente assimétricos e das asas simétricos. ➤ Ponta da cauda ainda sem segmentação. ➤ Curva na região caudal começa a se estender para frente na região lombo-sacral. ➤ Rotação do tronco completa. ➤ Processo maxilar distinto, igual ou superior ao comprimento do processo mandibular. ➤ O alantóide vesicular de tamanho variável em relação a média dos tamanho do mesencéfalo.
25 HH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Olhos com tonalidade acinzentada fraca. ➤ Cotovelo e joelho com articulações distintas em vista dorsal e ventral. ➤ Placa digital distinta na asa, porém ainda não possui demarcações dos dígitos. ➤ Indicações de fracos sulcos na perna demarcando o terceiro dedo do pé.
26 HH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Processo maxilar alongado atendendo a parede do sulco nasal, notando assim um entalhe no ponto de fusão. ➤ Membros consideravelmente alongados. ➤ Contorno das placas digitais arredondadas indicando um leve sulco entre o segundo e terceiro dígitos. ➤ Demarcação dos três primeiros dedos distintos. ➤ Contorno do processo maxilar com uma linha pontilhada. ➤ Processo mandibular alongado ventralmente.
29 HH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Asa dobrada no cotovelo. ➤ Segundo dígito nitidamente mais longo que os demais. ➤ Sulcos rasos entre o primeiro, segundo e terceiro dígito. ➤ Do segundo ao quarto dedos há cristas separadas por sulcos distintos com indicações de redes entre eles. ➤ Quinto dedo do pé rudimentar. ➤ Processo mandibular alongado se comparado com o estágio 28. ➤ Processo mandibular fundido. ➤ Bico maior do que no estágio 28.
30 HH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Os três principais segmentos do braço e perna são claramente demarcados. ➤ Asa encontra-se curvada na articulação do cotovelo e perna dobrada na articulação do joelho. ➤ O processo mandibular se aproxima do bico, mas a diferença entre os dois é ainda visível.

FONTE: HAMBURGER-HAMILTON (1951).

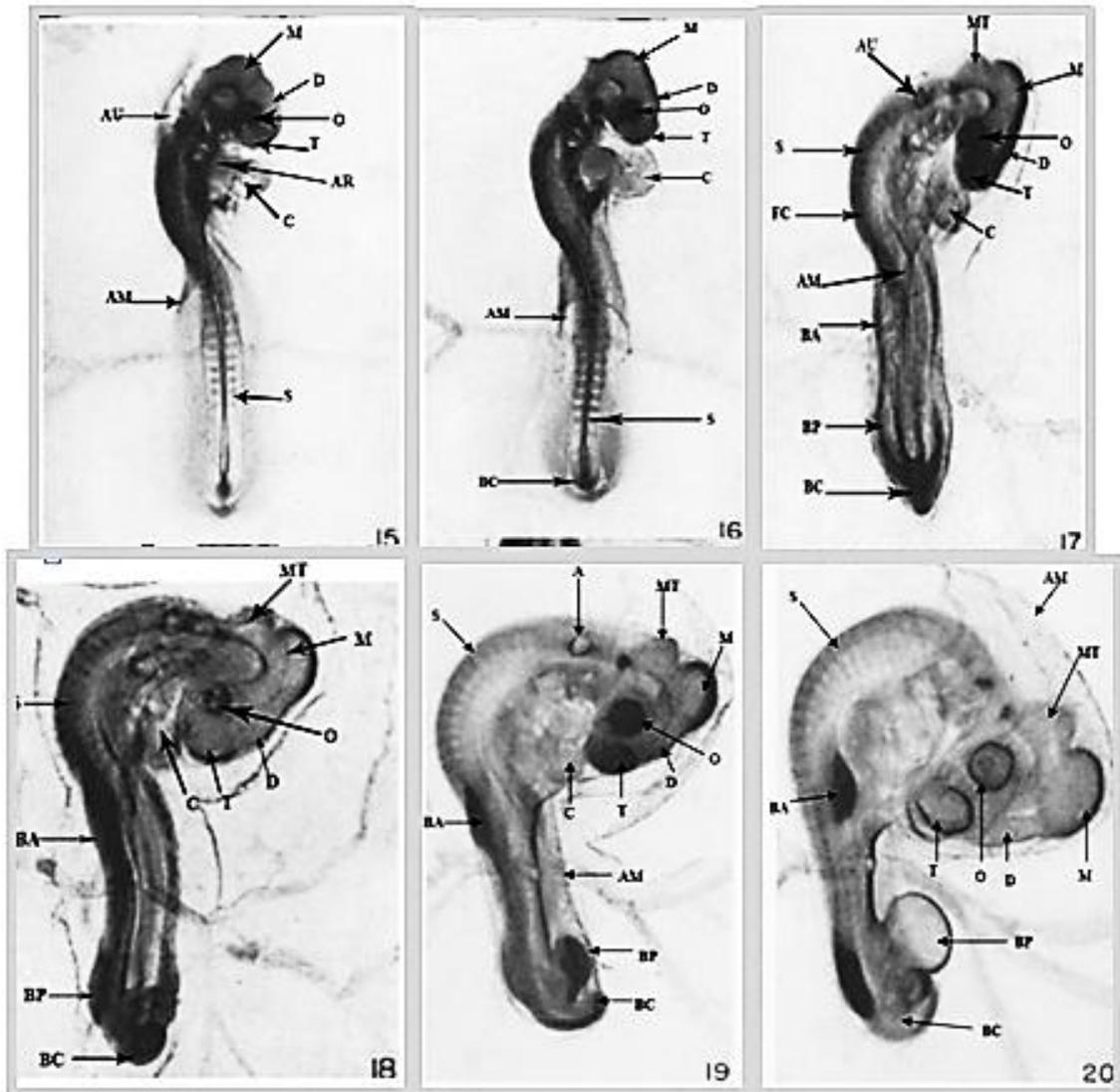


FIGURA 7 . EMBRIÕES NOS ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS 15 A 20.

AM = ÂMNION; AR = ARCOS BRANQUIAIS; AU = VESÍCULAS AUDITIVAS; BA = BROTO DA ASA; BC = BROTO DA CAUDA; BP = BROTO DA PERNA C = CORAÇÃO; D = DIENCÉFALO; FC = FLEXURA CERVICAL; M = MESENCEFALO; MT = METENCEFALO; N = NEURÓPORO ANTERIOR; O = VESÍCULA ÓPTICA; R = ROMBOENCÉFALO; S = SOMITOS; T = TELENCÉFALO.

FONTE: : HAMBURGER E HAMILTON (1951)

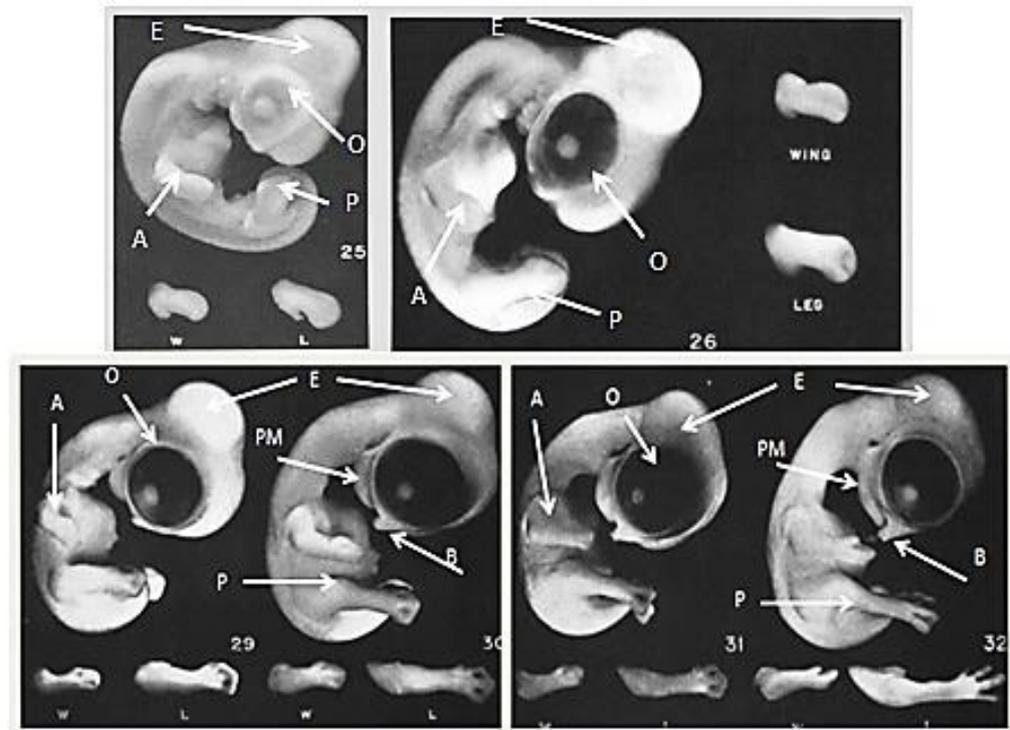


FIGURA 8 . EMBRIÕES NOS ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS 25 E 26; 29 A 32.
 A = ASA; O = OLHO; E = ENCÉFALO; PM = PROCESSO MANDIBULAR; B = BICO; P = PERNA.
 FONTE: HAMBURGER e HAMILTON (1951).

4 RESULTADOS

4.1 EMBRIÕES INCUBADOS POR 3 DIAS.

Durante o procedimento de montagem total dos embriões foram perdidos alguns indivíduos devido ao rompimento das membranas extraembrionárias no momento de recortar o disco embrionário. Verificou-se que, nos embriões expostos ao cloreto de manganês o número de indivíduos em que houve rompimento de membranas foi maior do que nos grupos controles. O número de embriões que tiveram rompimento de membranas extraembrionária corresponde a 17,1% dos indivíduos na concentração de 50 μM e 18,3% na concentração de 100 μM , enquanto que, para os embriões controle fechado e injetados com PBS o percentual ficou em 12,1% e 12,9%, respectivamente (TABELA 3; GRÁFICO 1).

Para analisar o desenvolvimento embrionário, foram considerados todos os embriões vivos no momento da abertura dos ovos, inclusive aqueles com as membranas rompidas. No grupo controle fechado, 73,52% dos ovos incubados continham embriões vivos, no grupo controle injetado com PBS 60,97% e os embriões expostos ao cloreto de manganês (50 μM e 100 μM) apresentaram taxas de 69,2% e 54% respectivamente (TABELA 3; GRÁFICO 1).

TABELA 3. Quantidade de embriões com 3 dias de incubação que desenvolveram, que romperam as membranas e que não desenvolveram.

3 DIAS	CONTROLE	PBS	50 μM MnCl	100 μM MnCl
Vivos (íntegros)	21(61,76%)	21(51,21%)	21(53,8%)	20(40,0%)
Rompeu membrana	4(11,76%)	4(9,75%)	6(15,3%)	7(14,0%)
Total que não desenvolveu	9(26,47%)	16(39,02%)	12(30,7%)	23(46,0%)
Total que desenvolveu	25(73,52%)	25(60,97%)	27(69,2%)	27(54,0%)
Total de ovos utilizados	34(100%)	41(100%)	39(100%)	50(100%)

FONTE: a autora (2011)

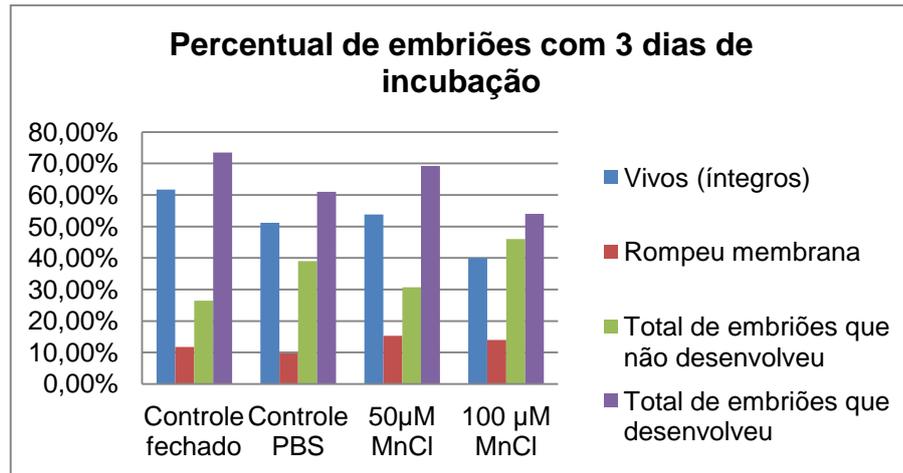


GRÁFICO 1. PERCENTUAL DE EMBRIÕES COM 3 DIAS DE INCUBAÇÃO QUE DESENVOLVERAM, ROMPERAM AS MEMBRANAS E, QUE NÃO DESENVOLVERAM.

FONTE: a autora (2011)

Com relação aos estádios de desenvolvimento em que os embriões estavam, foi possível identificar seis estádios embrionários diferentes (15,16,17,18,19 e 20), com predomínio de indivíduos nos estádios 17 e 18 (TABELA 4). Estes estádios foram determinados levando-se em consideração o número de somitos, desenvolvimento dos membros e do sistema nervoso central, além de outras estruturas, segundo Hamburger e Hamilton (1951).

TABELA 4. ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS DEFINIDO DOS EMBRIÕES COM 3 DIAS DE INCUBAÇÃO.

ESTÁDIO	CONTROLE	PBS	50 µM MnCl	100 µM MnCl	TOTAL
15	_____	_____	1(4,76%)	_____	1(1,22%)
16	1(5%)	2(9,52%)	1(4,76%)	1(5%)	5(6,1%)
17	6(30%)	5(23,81%)	3(14,29%)	6(30%)	20(24,4%)
18	6(30%)	10(47,62%)	3(14,29%)	1(5%)	20(24,4%)
19	3(15%)	1(4,76%)	3(14,29%)	_____	7(8,53%)
20	_____	_____	1(4,76%)	_____	1(1,2%)
Total de embriões com estágio definido.	16(80%)	18(85,71%)	12(57,14%)	8(40%)	54(65,85%)
Total	20(100%)	21(100%)	21(100%)	20(100%)	82(100%)

FONTE:a autora(2011)

Também foram observados 6 estádios intermediários (14/17, 15/16, 16/17, 16/18, 17/18 e 18/19) com predomínio de indivíduos nos estádios 16/18 e 17/18 (TABELA 5). Estes estádios foram determinados levando-se em consideração o número de somitos, desenvolvimento dos membros e do sistema nervoso central, além de outras estruturas, segundo Hamburger e Hamilton (1951). Estes embriões em estádios intermediários foram analisados separadamente por apresentarem atraso no desenvolvimento do encéfalo em relação ao número de somitos e ao desenvolvimento dos membros no mesmo indivíduo.

No grupo controle fechado 20% dos indivíduos se apresentaram em estádios intermediários de desenvolvimento enquanto que no grupo controle injetado com PBS 14,3%. Observou-se que, dos embriões expostos ao cloreto de manganês, 42,8% apresentaram-se em estádios intermediários de desenvolvimento para a concentração de 50 μ M, e 60% para a concentração de 100 μ M (TABELA 5).

TABELA 5. ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS INTERMEDIÁRIOS DETERMINADOS EM EMBRIÕES COM 3 DIAS DE INCUBAÇÃO

ESTÁDIO	CONTROLE	PBS	50 μ M MnCl	100 μ M MnCl	TOTAL
14/17	_____	_____	2(9,5%)	1(5%)	3(3,66%)
15/16	_____	_____	_____	2(10%)	2(2,44%)
16/17	_____	_____	1(4,76%)	1(5%)	2(2,44%)
16/18	_____	2(9,5%)	5(23,8%)	5(25%)	12(14,63%)
17/18	4(20%)	1(4,8%)	1(4,76%)	2(10%)	8(9,76%)
18/19	_____	_____	_____	1(5%)	1(1,22%)
Total de embriões com estádios intermediários	4(20%)	3(14,3%)	9(42,8%)	12(60%)	28(34,15%)
Total de embriões	20(100%)	21(100%)	21(100%)	20(100%)	82(100%)

FONTE: a autora (2011)

Nos embriões do grupo controle fechado não foram observadas alterações morfológicas. Verificou-se alteração na formação do sistema nervoso central em um único embrião contido em ovo injetado com PBS. Os embriões dos grupos expostos ao cloreto de manganês apresentaram alterações morfológicas e atraso no desenvolvimento do encéfalo (TABELA 6).

A maior incidência de alterações morfológicas foi observada nos embriões do grupo exposto à maior concentração de cloreto de manganês (100 μM), sendo que destes 35% apresentaram alterações na formação do encéfalo e 25% apresentaram atraso no desenvolvimento do encéfalo em relação ao número de somitos no mesmo indivíduo (FIGURA 9 C e D; TABELA 6; GRÁFICO 2).

Os embriões do grupo exposto à menor concentração de cloreto de manganês (50 μM) também apresentaram alterações morfológicas. Neste grupo o percentual foi de 38,09% dos embriões com alterações na formação do encéfalo e 19,04% dos embriões com atraso no desenvolvimento do encéfalo em relação às outras estruturas, como número de somitos e morfologia dos membros, porém a morfologia estava preservada (TABELA 6; GRÁFICO 2).

Foram observadas alterações na formação das vesículas encefálicas, somente nos embriões do grupo exposto ao cloreto de manganês (50 μM) Destes, 25% apresentaram formação de sulco no mesencéfalo (FIGURA 9 E, F), 12,5% mostraram alteração no prosencéfalo (FIGURA 10 A e B) e 12,5% com alterações no telencéfalo (FIGURA 10 C e D).

Verificou-se que no grupo de embriões expostos à maior concentração de cloreto de manganês (100 μM) um indivíduo não desenvolveu vesícula e placóide óptico (FIGURA 10 E e F). Em embriões expostos à concentração de 50 μM de cloreto de manganês dois indivíduos apresentaram desenvolvimento inicial dos olhos, porém a formação foi incompleta (FIGURA 11 A e B).

Foi possível observar alterações grosseiras na região cefálica (vesículas encefálicas) de 38,09% e 35% dos embriões expostos às concentrações de 50 e 100 μM de cloreto de manganês, respectivamente (FIGURA 11 C e D).

Dos embriões expostos ao cloreto de manganês nas concentrações de 50 e 100 μM , 42,86% e 40% dos indivíduos, respectivamente, estavam morfológicamente normais (TABELA 6).

TABELA 6. ALTERAÇÕES OBSERVADAS EM EMBRIÕES COM 3 DIAS DE INCUBAÇÃO DE CADA GRUPO.

	CONTROLE	PBS	50 μ M MnCl	100 μ M MnCl
Alterações no Sistema Nervoso Central-encéfalo	_____	1(4,76%)	8(38,09%)	7(35%)
Estádios – HH	_____	17 (1 indivíduo)	15(1 indivíduo); 16(1 indivíduo); 17(1 indivíduo); 19(2 indivíduo); 20(1 indivíduo); 14/17(1 indivíduo); 17/18(1 indivíduo).	16(1 indivíduo); 17(4 indivíduos); 18(1 indivíduo); 16/17(1 indivíduo); 17/18(1 indivíduo).
Atraso desenvolvimento do sistema nervoso central em relação ao número de somitos no mesmo indivíduo.	_____	_____	4(19,04%)	5(25%)
Estádios- HH	_____	_____	14/17(1 indivíduo); 16/18(1 indivíduo); 17(1 indivíduo); 18(1 indivíduo).	17(1 indivíduo); 15/16(1 indivíduo); 16/18(1 indivíduo); 18/20(1 indivíduo).
Total com atraso e alterações SN	_____	1(4,76%)	12(57,14%)	12(60%)
Total de indivíduos morfológicamente normais	20(100%)	20(95,2%)	9(42,8%)	8(40%)

FONTE: a autora(2011)

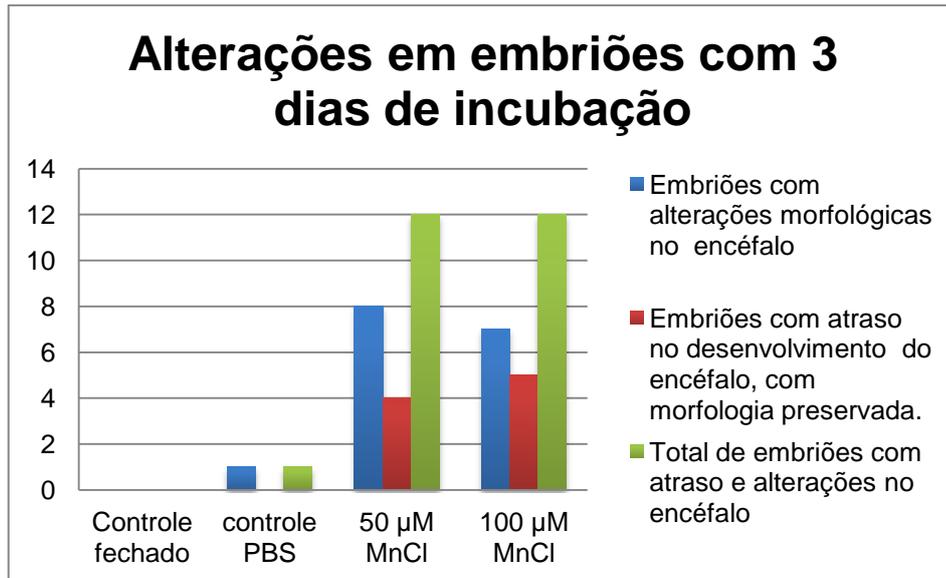


GRÁFICO 2. NÚMERO DE EMBRIÕES COM 3 DIAS DE INCUBAÇÃO COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, ATRASO DE DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO COM RELAÇÃO AO NÚMERO DE SOMITOS NO MESMO INDIVÍDUO E O TOTAL DE ALTERAÇÕES E ATRASO DO SISTEMA NERVOSO.

FONTE: a autora(2011)

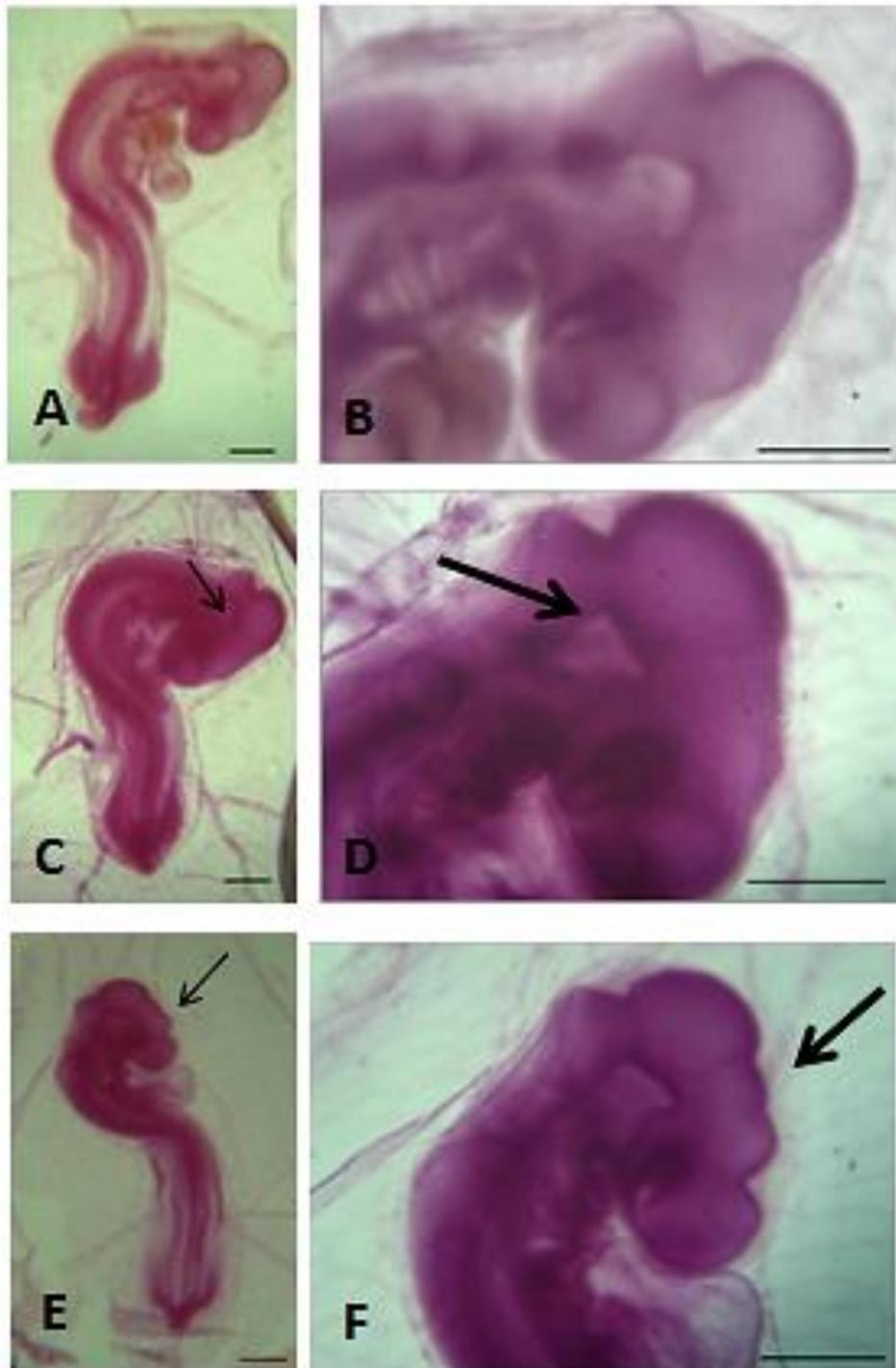


FIGURA 9. EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTOS A 50 μ M E 100 μ M DE CLORETO DE MANGANÊS INCUBADOS POR 3 DIAS. A. INDIVÍDUO CONTROLE NO ESTÁDIO 18 DE DESENVOLVIMENTO SEM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS. C. INDIVÍDUO CONTAMINADO COM 50 μ M DE CLORETO DE MANGANÊS COM BROTOS DE MEMBROS E SOMITOS CORRESPONDENTES AO ESTÁDIO 18 E ENCÉFALO CORRESPONDENTES AO ESTÁDIO 16/17 (SETA). E. INDIVÍDUO CONTAMINADO COM 50 μ M DE CLORETO DE MANGANÊS NO ESTÁDIO 19 COM A FORMAÇÃO DE SULCO ATÍPICO NO MESENCÉFALO (SETA). B, D, F, MAIOR AUMENTO DE A, C, E, RESPECTIVAMENTE. BARRA = 0,1 CM. FONTE: a autora (2011)

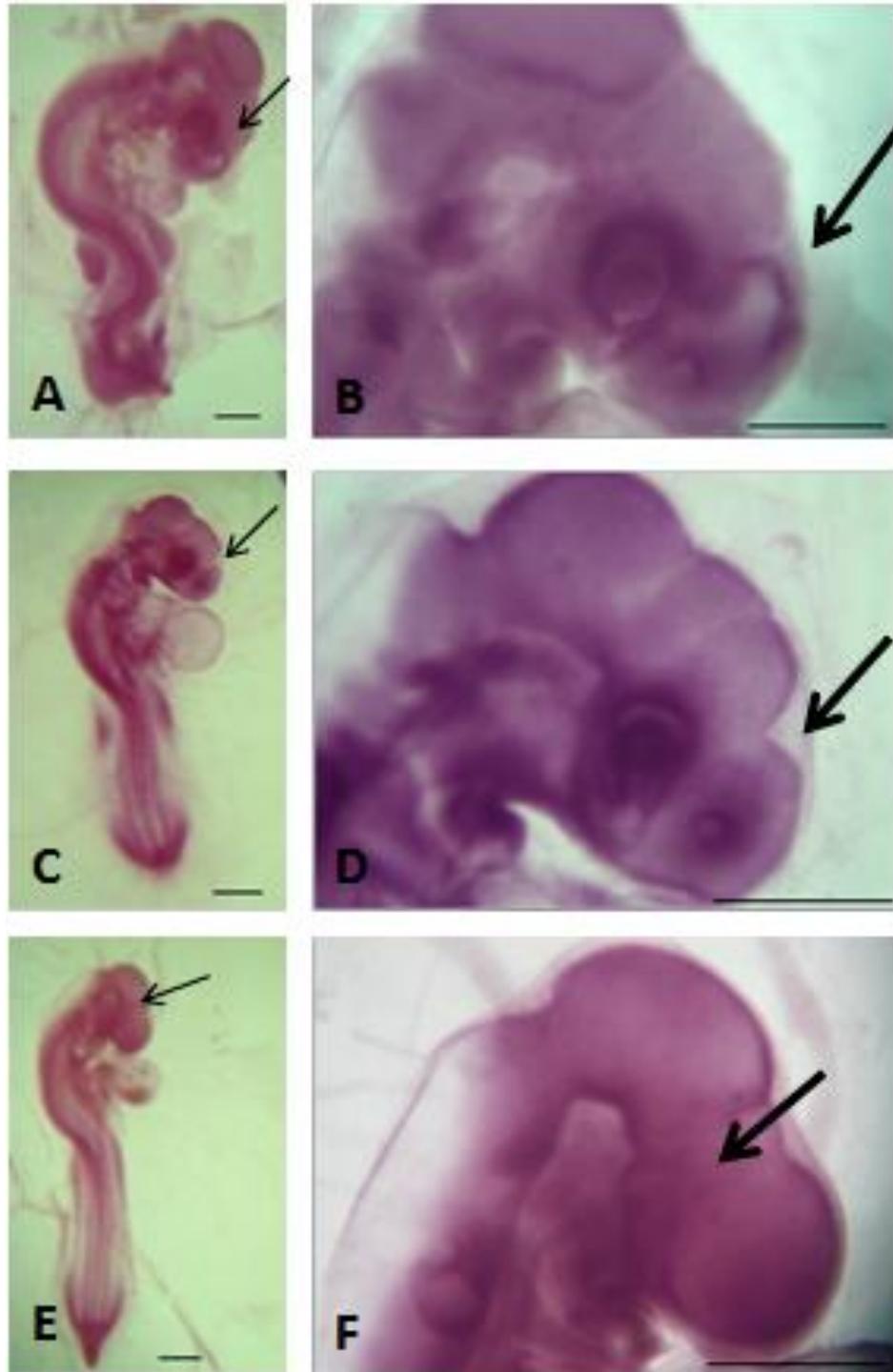


FIGURA 10. EMBRIÕES EXPOSTOS AO CLORETO DE MANGANÊS INCUBADOS POR 3 DIAS. A. INDIVÍDUO EXPOSTO A $50 \mu\text{M}$ DE CLORETO DE MANGANÊS NO ESTÁDIO 20 DE DESENVOLVIMENTO COM ALTERAÇÃO NO PROSENCÉFALO, FALHA NA DIVISÃO (SETA). C. INDIVÍDUO EXPOSTO A $50 \mu\text{M}$ DE CLORETO DE MANGANÊS NO ESTÁDIO 18 COM ALTERAÇÃO NO TELENCEFALO (SETA). E. INDIVÍDUO EXPOSTO A $100 \mu\text{M}$ DE CLORETO DE MANGANÊS NO ESTÁDIO 17 COM FALHA E DESENVOLVIMENTO DA VESÍCULA E PLACÓIDE ÓPTICOS (SETA). B, D E F, MAIOR AUMENTO DE A, C, E, RESPECTIVAMENTE. BARRA = $0,1 \text{ CM}$.

FONTE: a autora (2011)

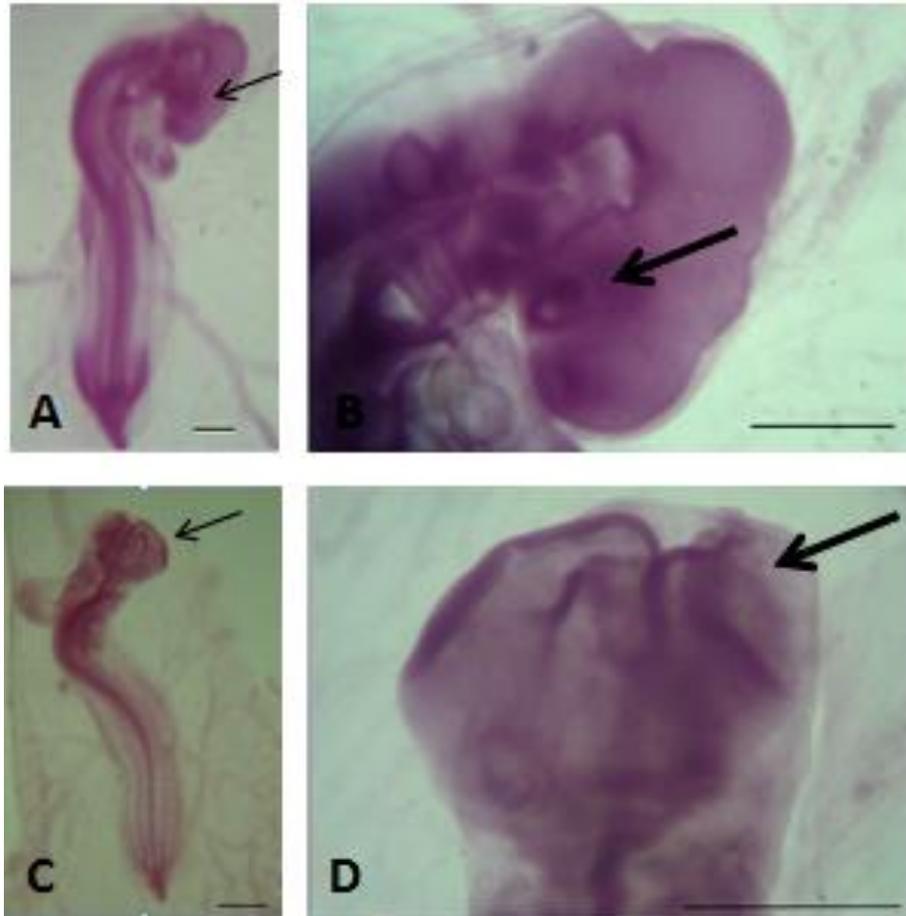


FIGURA 11. EMBRIÕES EXPOSTOS AO CLORETO DE MANGANÊS INCUBADOS POR 3 DIA. A. INDIVÍDUO EXPOSTO A 50 μ M DE CLORETO DE MANGANÊS NO ESTÁDIO 17 DE DESENVOLVIMENTO COM ATRASO NO DESENVOLVIMENTO DA VESÍCULA E PLACÓIDE ÓPTICOS (EQUIVALENTES AO ESTÁDIO 14), (SETA). C. INDIVÍDUO EXPOSTOS A 100 μ M DE CLORETO DE MANGANÊS NO ESTÁDIO 17 COM A REGIÃO CEFÁLICA TOTALMENTE ALTERADA (SETA). B E D, MAIOR AUMENTO DE A E C, RESPECTIVAMENTE. BARRA = 0,1 CM. FONTE: a autora (2011)

4.2 EMBRIÕES INCUBADOS POR 7 DIAS.

Para verificar a taxa de sucesso no desenvolvimento de embriões nos ovos incubados por 7 dias, foram considerados apenas os embriões que estavam vivos no momento da coleta. O sucesso no desenvolvimento embrionário em ovos do grupo controle fechado foi de 61,1%, nos do grupo injetado com PBS foi de 62,5%, dos

grupos expostos ao cloreto de manganês foi de 30,8% para a concentração de 50 μM e 34,5% para a concentração de 100 μM (TABELA 7; GRÁFICO 3).

TABELA 7. QUANTIDADE DE EMBRIÕES COM 7 DIAS DE INCUBAÇÃO QUE DESENVOLVERAM E QUE NÃO DESENVOLVERAM.

7 DIAS	CONTROLE	PBS	50 μM MnCl	100 μM MnCl
Desenvolveu	11 (61,1%)	10 (62,5%)	8 (30,8%)	10 (34,5%)
Não desenvolveu	7 (38,8%)	6 (37,5%)	18 (69,23%)	19 (65,5%)
Total de ovos	18 (100%)	16 (100%)	26 (100%)	29 (100%)

FONTE: a autora (2011)

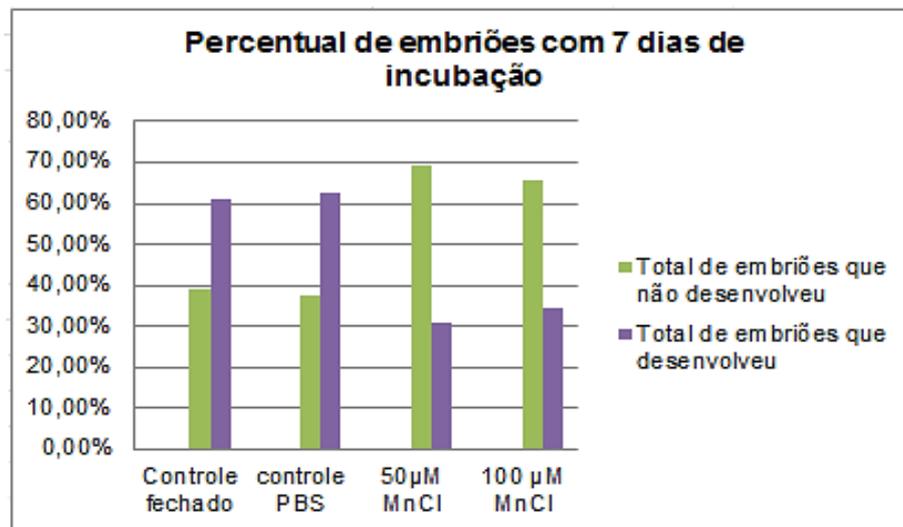


GRÁFICO 3. PERCENTUAL DE EMBRIÕES COM 7 DIAS DE INCUBAÇÃO QUE DESENVOLVERAM E NÃO DESENVOLVERAM.

FONTE: a autora (2011)

Nos embriões incubados por 7 dias foram observados quatro estádios de desenvolvimento, sendo que a maior ocorrência em todos os grupos foi do estágio 30 correspondendo a 74,3% do total dos embriões. Somente nos grupos expostos ao cloreto de manganês (50 e 100 μM) foram observados indivíduos nos estádios 25 e 26. No estágio 29 houve ocorrência de indivíduos dos grupos controle fechado e

de indivíduos expostos ao cloreto de manganês correspondendo 15,4% do total. (TABELA 8).

TABELA 8. NÚMERO DE EMBRIÕES PARA CADA ESTÁDIO EMBRIONÁRIO DOS OVOS COM 7 DIAS DE INCUBAÇÃO.

ESTÁDIO	CONTROLE	PBS	50 μ M MnCl	100 μ M MnCl	TOTAL
25	_____	_____	1 (12,5%)	1 (10%)	2 (5,1%)
26	_____	_____	1 (12,5)	1 (10%)	2 (5,1%)
29	1 (9%)	_____	2 (25%)	3 (30%)	6 (15,4%)
30	10 (91%)	10 (100%)	4 (50%)	5 (50%)	29 (74,3%)
Total	11 (100%)	10 (100%)	8 (100%)	10 (100%)	39 (100%)

FONTE: a autora (2011)

No grupo controle fechado observou-se apenas um indivíduo com a região cefálica totalmente alterada. No grupo injetado com PBS, 20% dos indivíduos apresentaram alterações no desenvolvimento dos olhos, onde somente um dos olhos se desenvolveu. Os grupos expostos ao cloreto de manganês nas duas concentrações apresentaram alterações envolvendo o sistema nervoso central em 62,5% para a concentração de 50 μ M e 50%, para a concentração de 100 μ M (TABELA 9; GRÁFICO 4).

As alterações relacionadas com o desenvolvimento das vesículas e placóides ópticos correspondem a 69,2% e as alterações na região cefálica a 30,76%. Nas malformações das vesículas e placóides ópticos observou-se diminuição da pigmentação retiniana, formação incompleta ou ausência total em alguns indivíduos (FIGURA 12 C e D, 13 A e B). Em embriões com a região cefálica totalmente alterada também foi observado atraso total no desenvolvimento (FIGURA 13 C e D).

Nos grupos em que os embriões foram expostos ao cloreto de manganês houve um percentual de 37,5% para a menor e 50% para a maior concentração, de indivíduos morfologicamente normais (TABELA 9).

TABELA 9. ALTERAÇÕES OBSERVADAS EM EMBRIÕES DOS OVOS COM 7 DIAS DE INCUBAÇÃO

	CONTROLE	PBS	50 μ M MnCl	100 μ M MnCl
Ausência ou malformação das vesículas e placóides ópticos.	_____	2(20%)	3(37,5%)	4(40%)
Estádio HH	_____	30 (2 indivíduos)	30 (1 indivíduo); 29 (2 indivíduos).	25(1 indivíduo); 29(2 indivíduos); 30(1 indivíduo).
Região cefálica totalmente alterada	1(9%)	_____	2(25%)	1(10%)
Estádio HH	29 (1 indivíduo)	_____	25(1 indivíduo); 26(1 indivíduo).	25(1 indivíduo).
Total com alterações SN	1(9%)	2(20%)	5(62,5%)	5(50%)
Total de indivíduos morfológicamente normais	10(91%)	8(80%)	3(37,5%)	5(50%)
Total de embriões	11(100%)	10(100%)	8(100%)	10(100%)

FONTE: a autora (2011)

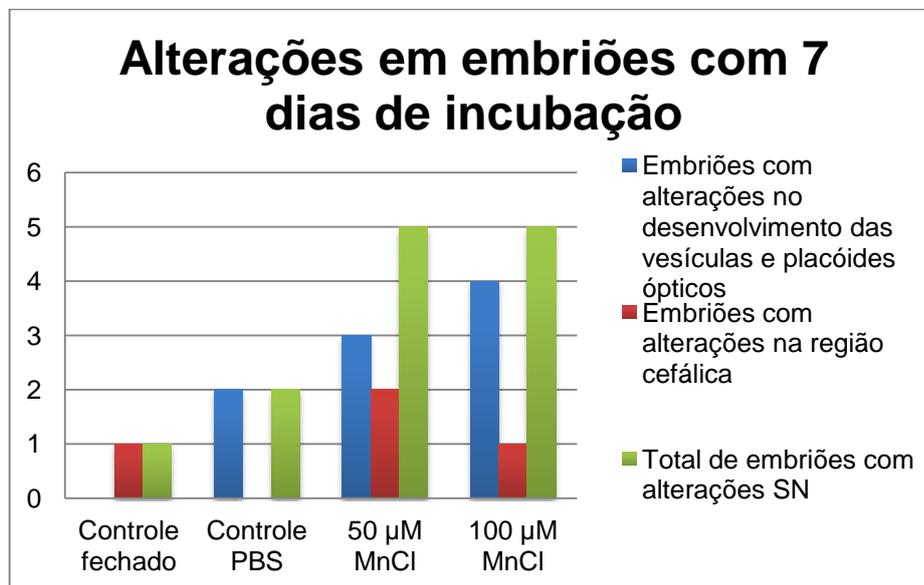


GRÁFICO 4. NÚMERO DE EMBRIÕES COM 7 DIAS DE INCUBAÇÃO COM ALTERAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DAS VESÍCULAS E PLACÓIDES ÓPTICO, EMBRIÕES COM ALTERAÇÕES NA REGIÃO CEFÁLICA E O TOTAL DE ALTERAÇÕES NO ENCÉFALO.

FONTE: a autora(2011)

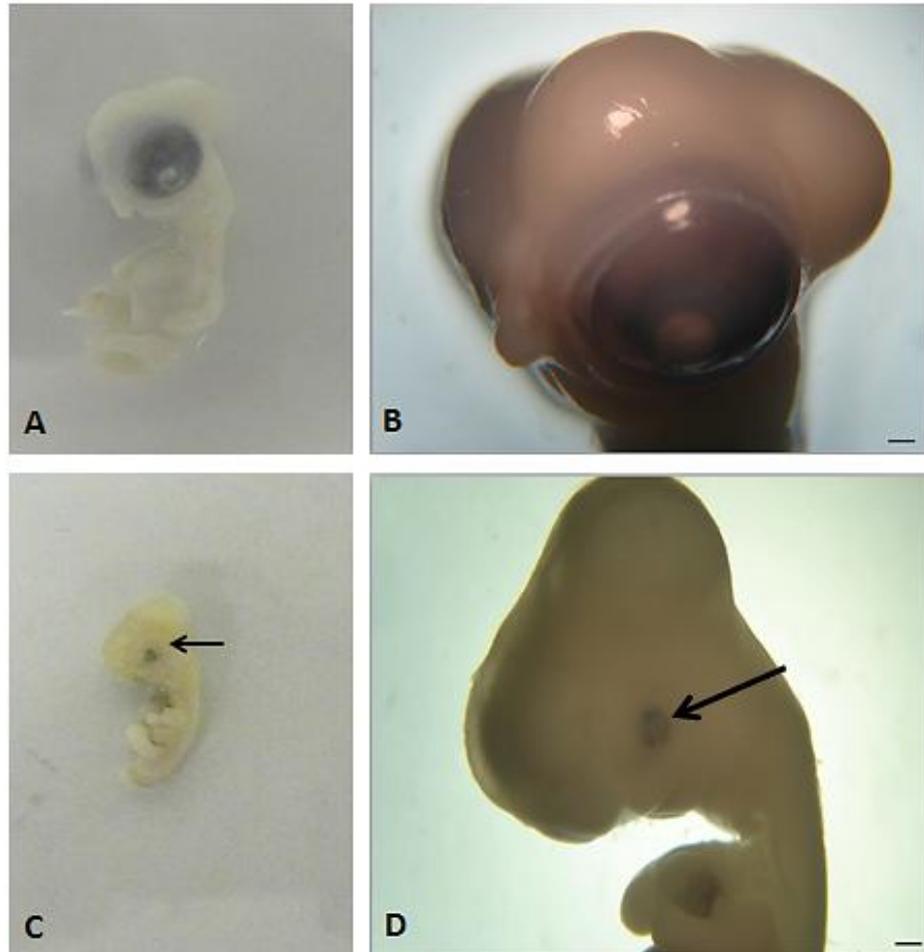


FIGURA 12. EMBRIÕES CONTROLE E EMBRIÕES EXPOSTOS AO CLORETO DE MANGANÊS INCUBADOS POR 7 DIAS. A. INDIVÍDUO CONTROLE NO ESTÁDIO 30 DE DESENVOLVIMENTO. C. INDIVÍDUO EXPOSTO A 100 μ M DE CLORETO DE MANGANÊS NO ESTÁDIO 26 COM ALTERAÇÃO NA FORMAÇÃO DA VESÍCULA E PLACÓIDE ÓPTICO (SETA). B E D, MAIOR AUMENTOS DE B E D, RESPECTIVAMENTE. BARRA = 0,1 CM
FONTE: a autora (2011)

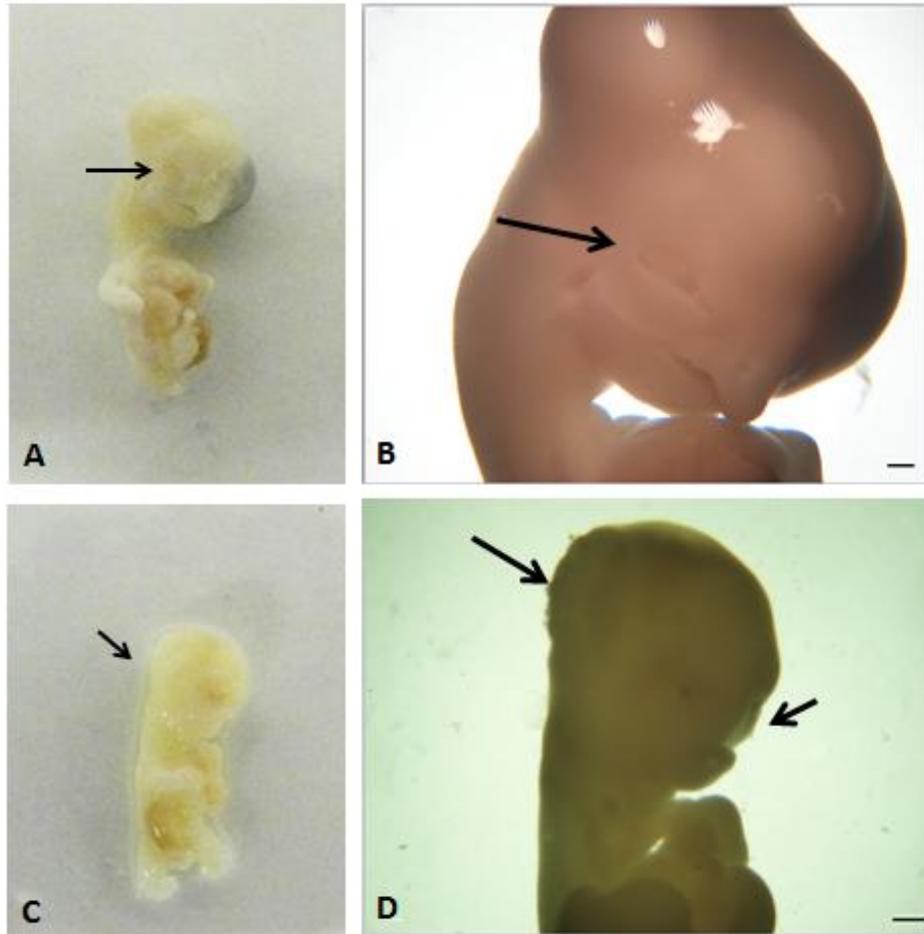


FIGURA 13. EMBRIÕES EXPOSTOS AO CLORETO DE MANGANÊS INCUBADOS POR 7 DIAS. A. INDIVÍDUO EXPOSTO A 50 μM DE CLORETO DE MANGANÊS NO ESTÁDIO 30 DE DESENVOLVIMENTO COM FALHA NO DESENVOLVIMENTO DA VESÍCULA E PLACÓIDE ÓPTICO (SETA). C. INDIVÍDUO EXPOSTO A 50 μM DE CLORETO DE MANGANÊS NO ESTÁDIO 25 COM REGIÃO CEFÁLICA TOTALMENTE ALTERADA (SETA). B E D, MAIOR AUMENTOS DE A E C, RESPECTIVAMENTE. BARRA = 0,1 CM
 FONTE: a autora (2011)

Neste estudo, com embriões de *Gallu gallus* incubados por 3 e 7 dias, todas as alterações morfológicas observadas estavam relacionadas com a formação do encéfalo. O desenvolvimento embrionário das demais estruturas e órgãos não apresentaram alterações morfológicas.

5 DISCUSSÃO

A utilização de embriões de aves como modelo possibilitou avaliar morfológicamente o efeito do cloreto de manganês em diferentes concentrações durante algumas fases do desenvolvimento embrionário. Observou-se que os ovos expostos ao cloreto de manganês e incubados por três dias, havia embriões com membranas aparentemente mais sensíveis, quando comparadas com o embrião do grupo, controle fechado e injetado com PBS. Esta diferença pode estar relacionada com a suscetibilidade de embriões de *Gallus gallus* expostos a agentes tóxicos nos estágios precoces de desenvolvimento. (RIVERO *et al.*, 2006).

O percentual de falha no desenvolvimento embrionário foi elevado nos ovos do grupo controle, sendo maior nos ovos do grupo injetado com PBS e incubados por 3 dias Este índice mais elevado pode ser devido à contaminação, apesar de ter sido utilizado, agulhas grossas estéreis para realizar a perfuração da casca e agulhas de insulina novas em cada experimento. Em relação ao grupo controle fechado, o índice elevado de falhas neste grupo pode ser justificado pelo fato de tratar-se de um modelo biológico muito sensível, sujeitos a erros no desenvolvimento decorrentes do transporte, manuseio, abertura da casca e condições da incubadora (RIVERO 2005; YAMAMOTO, 2009). Porém os ovos dos grupos expostos as diferentes concentrações de cloreto de manganês (50 μM e 100 μM) principalmente aqueles incubados por 7 dias apresentaram maior número de falhas no desenvolvimento que o controle fechado e o injetado com PBS. O cloreto de manganês nestas concentrações pode ter influenciado o desenvolvimento destes embriões.

O estudo detalhado do desenvolvimento de certos órgãos constitui excelente modelo para análise de processos de desenvolvimento como a padronização do corpo, especificação de informação posicional, a indução, a mudança de forma e a diferenciação celular. (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; WOLPERT *et al.*, 2000). Neste estudo observou-se que os embriões expostos ao cloreto de manganês em ambas as concentrações apresentaram atraso no desenvolvimento do encéfalo em relação as outras estruturas. Num mesmo indivíduo o número dos somitos e a

morfologia dos brotos dos membros, não correspondem com o estágio de desenvolvimento do encéfalo. O desenvolvimento do sistema nervoso central de vertebrados ocorre a partir da formação da placa neural, próximo ao final da gastrulação. A placa neural começa a curvar-se para formar o tubo neural que se torna regionalizado ao longo do eixo ântero-posterior. (WOLPERT *et al.*, 2000).

Além do atraso no desenvolvimento do encéfalo, verificou-se que os embriões expostos ao cloreto de manganês apresentam alterações morfológicas na formação do encéfalo, como formação de sulco atípico no mesencéfalo, falha na subdivisão do prosencefalo, alterações no tamanho e morfologia do telencéfalo. As vesículas encefálicas são formadas pela fusão das pregas neurais da região cefálica e pelo fechamento do neuroporo rostral, formando o prosencefalo, mesencéfalo e o rombencéfalo. Posteriormente, o prosencefalo subdivide-se em telencéfalo e diencefalo, o mesencéfalo não se divide e o rombencéfalo divide-se em metencéfalo e mielencéfalo. (MOORE; PERSAUD, 2008).

As alterações mais graves foram observadas em embriões expostos ao cloreto de manganês em ambas as concentrações. Nestes embriões a região cefálica apresentou-se totalmente alterada e observou-se ausência de desenvolvimento da vesícula e placóide óptico ou malformações dos mesmos. Outros trabalhos que utilizaram embriões de *Gallus gallus* como modelo para avaliar o efeito dos metais chumbo e cádmio, obtiveram resultados semelhantes com graves alterações na região cefálica. Desta forma, ambos foram considerados agentes teratogênicos multipotentes capazes de alterar o padrão de desenvolvimento do sistema nervoso central. (RIVERO *et al.*, 2006; YAMAMOTO, 2009).

Observou-se que no grupo controle fechado e o injetado com PBS houve um pequeno número de indivíduos que apresentaram alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central, os quais podem estar relacionados com erros genéticos inerentes ao desenvolvimento embrionário. Segundo Gómez Dumm (2006) nas malformações com bases genéticas ou aberrações cromossômicas, o defeito é intrínseco e se expressa mesmo em embrião que esteja em um ambiente normal.

Nem todos os indivíduos dos grupos expostos ao cloreto de manganês, manifestaram alterações, aproximadamente 40% tinham morfologias preservadas. Tal fato pode estar relacionado com fatores genéticos, devido à variabilidade individual intraespecífica. (RIVERO, 2005).

Ainda é importante salientar que estes indivíduos, apesar de não apresentarem alterações morfológicas, podem, após o nascimento, apresentar alterações comportamentais e deficiência no sistema locomotor, dados que não foram testados no presente trabalho. No estudo realizado por Rivero (2005), sobre o comportamento pós-natal de embriões de *Gallus domesticus* expostos ao chumbo, também foram observadas alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central, além de menor atividade locomotora e menor atividade exploratória.

Sabe-se que em seres humanos a exposição a elevados níveis de manganês causam problemas no sistema nervoso apresentando mudanças no comportamento, movimentos lentos e desajeitados, como dificuldade em andar e falar. (ATSDR, 2008). Outros trabalhos apresentam evidências que a exposição excessiva ao manganês tem efeito na cognição das crianças. (MENEZES FILHO, 2009).

No presente estudo os resultados demonstram que em embriões de *Gallus gallus* nos estádios precoces de desenvolvimento embrionário, o cloreto de manganês em ambas as concentrações causou alterações morfológicas e retardo no desenvolvimento do encéfalo, entretanto são necessários estudos adicionais, em outros estádios de desenvolvimento, inclusive após a eclosão e outros modelos experimentais contribuirão para o melhor entendimento dos efeitos do cloreto de manganês.

6 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho foi possível concluir que:

- Ovos de *Gallus gallus* expostos ao cloreto de manganês nas concentrações de 50 e 100 μM apresentaram maior número de falhas no desenvolvimento embrionário, quando comparados com o grupo controle fechado e o controle injetado com PBS.
- Os ovos expostos ao contaminante apresentaram maior número de embriões com rompimento de membranas.
- Nos grupos contaminados, observou-se maior número de embriões com atraso no desenvolvimento da região cefálica em relação ao número de somitos e desenvolvimento dos brotos dos membros no mesmo indivíduo.
- Nos embriões expostos ao cloreto de manganês a região cefálica foi a mais afetada, apresentando alterações nas vesículas encefálicas e no desenvolvimento das vesículas e placóides ópticos.
- O cloreto de manganês nas concentrações utilizadas apresentou efeito teratogênico como alterações morfológicas e atraso no desenvolvimento do encéfalo.

REFERÊNCIAS

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry - **Draft Toxicological Profile For Manganese** - U.S Department of health and human services , 2008. Disponível em <http://atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151.pdf>>. Acesso em 05/04/11.

AZEVEDO, F. A., CHASIN, A. A. DA MATTA. 1ª edição. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. Editora RiMa. São Paulo, 2004.

COSTA, M.R. M.; FIGUEIREDO, R. C. Manganês. Balanço mineral brasileiro, 2001. Disponível em <http://dnpm.gov.br/assets/galeriadocumento/balancomineral2001/manganes.pdf>>. Acesso em 05/04/11.

DOUGLAS, C. R. **Fisiologia Aplicada à Nutrição**. 2ª edição. Guanabara Koogan. Rio de janeiro, 2006.

GARCIA, S. M. L.; FERNANDEZ, C. **Embriologia**. 2ªedição. Artmed .Porto Alegre, 2006.

GILBERT, SCOTT F. **Biologia do desenvolvimento**. 5ª edição. FUNPEC editora. Ribeirão Preto - SP, 2003.

GÓMEZ DUMM, CESAR. **Embriologia humana**: Atlas e texto. 1ª edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2006.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v.88, p.49-92, 1951.

MANGÂNES – Imagens. Disponível em:<http://www.google.com.br/search?hl=pt-BR&client=firefox-a&rls=org.mozilla:pt-BR:official&q=manganes%20-20imagens&gs_sm=e&gs_upl=15177311619991011625021221221115101013001117512.1.2.11610&um=1&ie=UTF-8&tbn=isch&source=og&sa=N&tab=wi&biw=986&bih=620>. Acesso em: 25/03/2011

MARTINS, I.; L. I. V. Ecotoxicologia do Manganês e seus compostos. Centro de recursos ambiental, - **CRA Séries cadernos de referencia ambiental v7**. Salvador-BA- 2001

MATOS, E. C. **Avaliação dos efeitos tóxicos de timbó (*ateleia glazioviana*) no desenvolvimento embrionário de galinha doméstica (*gallus domesticus*).** Trabalho de graduação (bacharel em Ciências Biológicas), Setor Área de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina. Joaçaba-SC, 2009

MENEZES FILHO, J. A. **Níveis elevados de manganês e déficit cognitivo em crianças residentes nas proximidades de uma metalúrgica ferro-manganês na Região Metropolitana de Salvador, Bahia.** Tese em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente. Rio de Janeiro, 2009.

MOORE KEITH L; PERSAUD T.V.N. **Embriologia Clínica**, 8ª edição. Elsevier. Rio de Janeiro, 2008.

NEVES, E. B. MENDONÇA JUNIOR, N.; MOREIRA, M. F. R.. Avaliação da exposição a metais numa oficina de recuperação de armamento de uma organização militar. **Ciênc. saúde coletiva vol.14 nº.6**, 2009. Disponível em http://.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232009000600036&script=sci_arttext. Acesso em 23/05/11.

RAUPP, G. **Avaliação ambiental do rio da Laje e suas interações com o ecossistema costeiro no município de Sombrio – SC.** Dissertação programa de pós-graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, 2008.

RIVERO, L. B. D. **Exposição de embriões de *gallus domesticus* ao acetato de chumbo e seus efeitos sobre a histologia cerebelar e o comportamento no período pós-natal.** Dissertação programa de pós-graduação Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis- SC, 2005.

RIVERO, L. B. D. *et al.* Ação do acetato de chumbo sobre o padrão de desenvolvimento de embriões de *gallus domesticus*. Florianópolis, SC. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol. v. 1, n.1, p 83-87**, 2006.

ROTH, J. A. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. Department of Pharmacology and Toxicology. **University at Buffalo**. Buffalo, New York, USA, 2006.

SADLER, T.W. **Langman Embriologia Médica**. 9ª edição. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 3ª edição. Artemed, Porto Alegre, 2004.

WAGENINGEN, N. V. *et al.* A incubação de ovos por galinhas e na incubadora. Fundação agromisa, 2004. Disponível em <[http:// anancy.net/documents/file_pt/34-p-2004_screen.html](http://anancy.net/documents/file_pt/34-p-2004_screen.html)>. Acesso 30/05/11.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manganese And Its Compounds. Concise International Chemical Assessment Document 12. Geneva, 1999. Disponível em <[http:// http://whqlibdoc.who.int/publications/1999/924153012X.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/1999/924153012X.pdf)>. Acesso 18/05/11

WOLPERT. L. *et al.* **Princípios de Biologia do Desenvolvimento**.: 1ª edição, Artmed, Porto Alegre, 2000.

YAMAMOTO, FLÁVIA YOSHIE. **Padronização de metodologias aplicadas ao estudo da exposição de embriões de aves a contaminantes ambientais**. Trabalho de graduação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2009.

ZAGATTO, P. A.;BERTOLETTI, E.. **Ecotoxicologia Aquática**. Princípios e Aplicações. Editora RiMa. São Carlos- SP, 2006.

ZHANG, BEM-YAN *et al.* Effect of manganese on heat stress protein synthesis of new-born rats. **World Journal**, 2002. Disponível em [http:// wjgnet.com/1007-9327/8/114.pdf](http://wjgnet.com/1007-9327/8/114.pdf). Acesso em 23/05/11.

ZOCHE, J. J.; FREITAS, M.; QUADROS, K. E. Concentração de Zn e Mn nos efluentes do beneficiamento de carvão mineral e em *typha domingensis* pers (typhaceae). **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.34, n.1, p.177-188, 2010.