

# **INFLUÊNCIA DO PH NA TOXICIDADE DE SOLUÇÕES EM MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA (CAM) DO EMBRIÃO DE GALINHA**

**Palavras-Chave:** TOXICIDADE, PH, MEMBRANA CORIOALANTÓICA

**Autores(as):**

**LIVIA DOS SANTOS VALÉRIO, FOP - UNICAMP**

**ARTHUR ANTUNES COSTA BEZERRA, FOP - UNICAMP**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MICHELLE FRANZ MONTAN (orientadora), FOP - UNICAMP**

---

## **INTRODUÇÃO:**

O modelo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha tem sido amplamente utilizado para avaliar a toxicidade de substâncias químicas diversas (Palmeira-de-Oliveira et al., 2018; Ma et al., 2020; Reis et al., 2022; Tomás et al., 2023). Este modelo apresenta como vantagens ser relativamente simples, rápido e de baixo custo, além de permitir a triagem de uma grande quantidade de amostras farmacológicas em um curto período (Ribatti, 2016).

A CAM é uma membrana extraembrionária simples, ricamente vascularizada e que desempenha diversas funções vitais, incluindo a troca de gases entre o embrião e o meio externo e o transporte de cálcio da casca do ovo (Gabrielli e Accili, 2010). Porém, ela é extremamente sensível a alterações ambientais, como variações na tensão de oxigênio, pH e osmolaridade (Ribatti, 2016), e reage rapidamente a substâncias químicas ou biológicas aplicadas em sua superfície (Saw et al., 2008).

No entanto, não há informações claras na literatura acerca dos reais efeitos que fatores como o pH das substâncias têm sobre a CAM, e isso sinaliza a necessidade de novos estudos. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da variação de pH na avaliação da toxicidade de soluções utilizando o modelo HET-CAM.

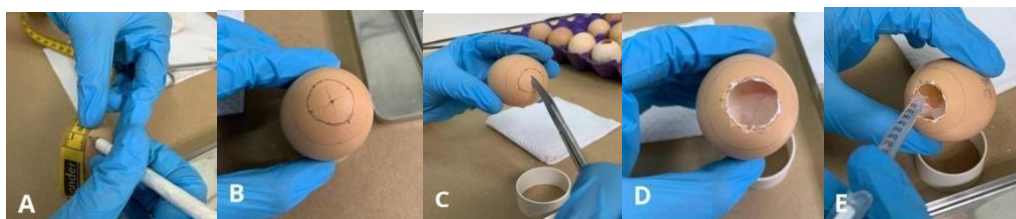
## **METODOLOGIA:**

Os experimentos ocorreram conforme a metodologia descrita no protocolo DB-ALM No 96 – HET-CAM, do *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM). Este projeto foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética ao Uso de Animais (CEUA/UNICAMP) e, por se tratar de um modelo alternativo ao uso de animais reconhecido internacionalmente, a sua análise foi dispensada pela CEUA. Os ovos utilizados neste estudo foram fornecidos por produtores locais da cidade de Piracicaba, São Paulo.

Os ovos fecundados foram inspecionados, com o intuito de avaliar-se a integridade de suas cascas, e foram pesados em balança digital, sendo utilizados apenas aqueles com peso dentro da faixa de 50-60g. Foram incubados em chocadeira comercial sob temperatura interna de 37 °C e UR de 55-65%, até o décimo dia de desenvolvimento embrionário. No décimo dia, os ovos foram submetidos à ovoscopia (técnica de incidência de luz sobre a casca do ovo para visualização de seu conteúdo interno), conforme a Figura 1, seguido da confecção da janela de acesso na casca (Figura 2) e exposição da CAM.



**Figura 1:** Técnica da Ovoscopia



**Figura 2:** Passo a passo da confecção da janela e exposição da CAM. **A** janela com diâmetro de 1,8 cm. **B** dimensões da janela. **C** confecção da janela com uma tesoura. **D** janela finalizada. **E** 1mL de solução salina para umedecer a membrana da casca.

Após a exposição da CAM, foi realizado o registro da imagem pré-tratamento da membrana utilizando uma câmera acoplada um estereomicroscópio (OPTIKA, modelo SZX-T), com aumento de 6,7x. Para a avaliação da influência do pH foram testadas duas substâncias, PBS (Tampão Fosfato Salino) pH inicial igual a 7,4 e o Cloreto de Sódio a 0,9%, pH inicial 6,4. A substância que teve menor variação de pH ao longo do tempo foi o Tampão Fosfato Salino, sendo assim, escolhido para análise do pH das soluções. Em seguida, realizou-se os tratamentos utilizando 5 soluções com pH na faixa de 5 a 9, aplicadas em uma quantidade de 0,3 mL de cada solução, sobre a superfície da membrana, na qual permaneceram por 3min. Após esse período, foi realizado o registro fotográfico pós-tratamento da membrana. Cada formulação foi testada em 24 ovos, divididos em 4 grupos de 6 ovos cada.

As imagens obtidas foram avaliadas a partir da análise visual proposta pelo protocolo DB-ALM 96. Foi realizada a atribuição de pontuações aos seguintes efeitos irritantes detectados visualmente: hemorragia, lise (desaparecimento) dos vasos sanguíneos e coagulação. Ao final, obteve-se uma pontuação final para grupo de 06 ovos e, a partir desta, uma classificação final para cada substância testada quanto à sua toxicidade. Nesse sentido, cada substância recebeu 04 classificações finais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

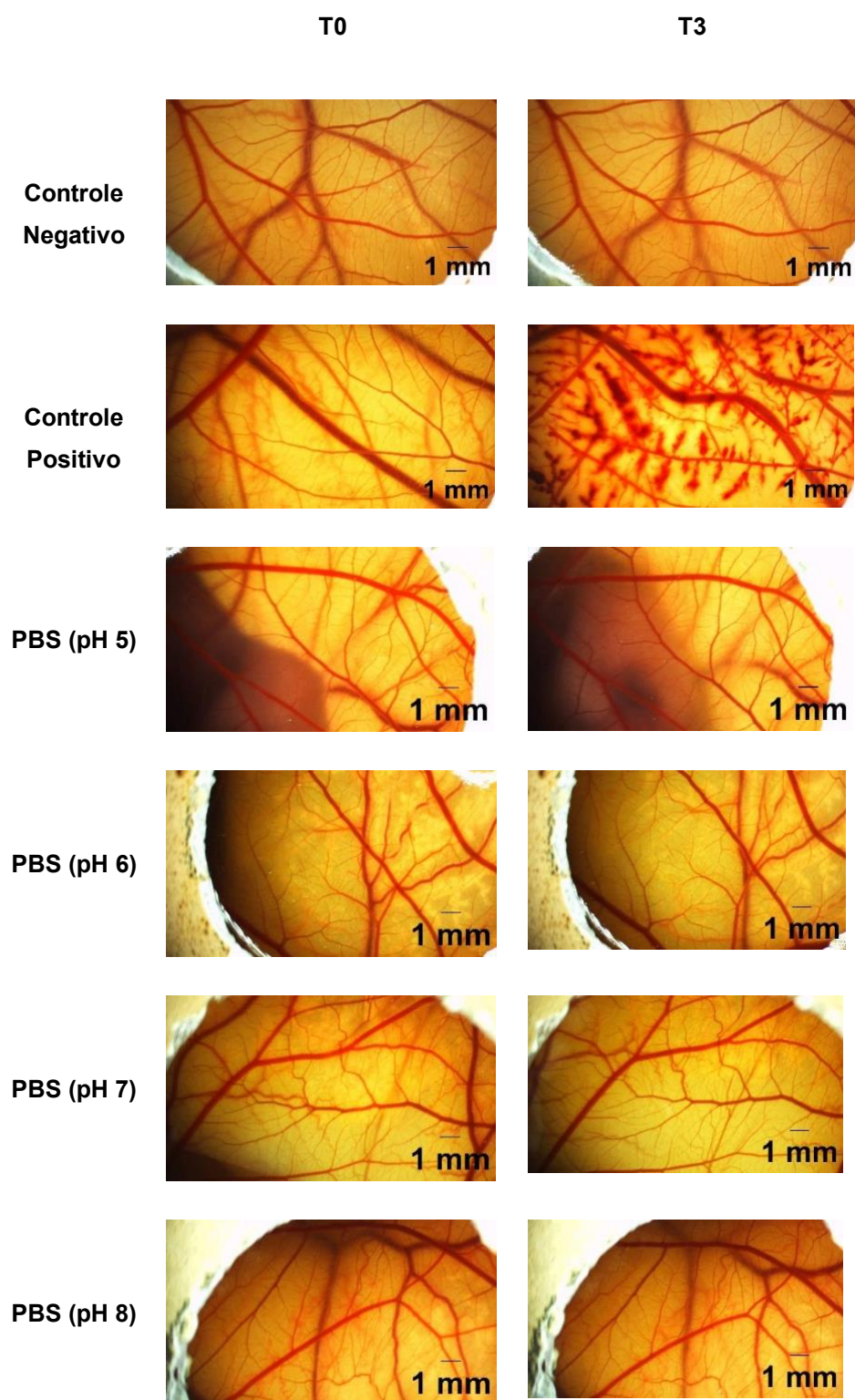
Após a análise das imagens obtidas, substâncias avaliadas foram classificadas quanto à sua toxicidade, conforme mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação final das substâncias avaliadas em modelo HET-CAM.

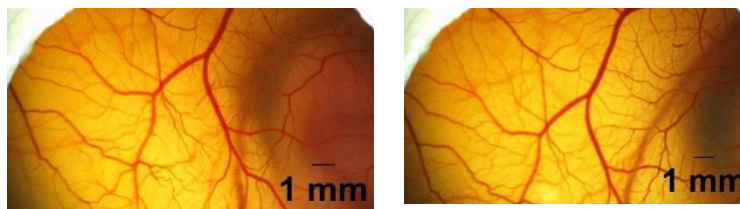
| Tratamento        | Grupo (N-6) | Pontuação final | Classificação final   |
|-------------------|-------------|-----------------|-----------------------|
| pH 5              | 1           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 2           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 3           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 4           | 0               | Não-irritante         |
| pH 6              | 1           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 2           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 3           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 4           | 0               | Não-irritante         |
| pH 7              | 1           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 2           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 3           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 4           | 0               | Não-irritante         |
| pH 8              | 1           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 2           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 3           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 4           | 0               | Não-irritante         |
| pH 9              | 1           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 2           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 3           | 0               | Não-irritante         |
|                   | 4           | 0               | Não-irritante         |
| Controle negativo | 1           | 0               | Não irritante         |
|                   | 2           | 0               | Não irritante         |
|                   | 3           | 0               | Não irritante         |
|                   | 4           | 0               | Não irritante         |
| Controle positivo | 1           | 17              | Severamente irritante |
|                   | 2           | 16              | Severamente irritante |
|                   | 3           | 16              | Severamente irritante |
|                   | 4           | 18              | Severamente irritante |

A Figura 3 mostra a CAM antes (T0) e após (T3) os tratamentos realizados. É possível notar que, com exceção do controle positivo, os tratamentos não causaram efeito irritante na CAM. Isso mostra que

a variação de pH das soluções dentro da faixa avaliada (5-9) não influencia ou altera os resultados dos ensaios de toxicidade em modelo HET-CAM num período de tratamento de 3min, contrariando a hipótese inicial do nosso estudo.



PBS (pH 9)



**Figura 3.** Imagens pré-tratamento (T0 = tempo 0) e pós-tratamento (T3 = tempo 3min) da CAM. Substâncias testadas: controle negativo (solução salina a 0,9%), controle positivo (hidróxido de sódio a 0,1mol/L) e Aristoflex (100mg, 200mg, 300mg, 400mg e 500mg).

## CONCLUSÕES:

Conclui-se que a variação do valor de pH de 5 a 9 das soluções testadas não influenciou nos resultados obtidos nos ensaios de toxicidade em modelo HET-CAM, considerando que todos os tratamentos foram classificados como não irritantes.

---

## BIBLIOGRAFIA

ECVAM DB-ALM. **Protocol No. 96: Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM).** 2010.

GABRIELLI, Maria Gabriella; ACCILI, Daniela. **The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development.** BioMed Research International, v. 2010, n. 1, p. 940741, 2010.MA, Xue et al. **Skin irritation potential of cosmetic preservatives: An exposure-relevant study.** Journal of Cosmetic Dermatology, v. 20, n. 1, p. 195-203, 2021.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, Rita et al. **Testing vaginal irritation with the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane assay.** ALTEX-Alternatives to animal experimentation, v. 35, n. 4, p. 495-503, 2018.

REIS, Fernanda Padoin dos et al. **Locust bean gum nano-based hydrogel for vaginal delivery of diphenyl diselenide in the treatment of trichomoniasis: formulation characterization and in vitro biological evaluation.** Pharmaceutics, v. 14, n. 10, p. 2112, 2022.

RIBATTI, Domenico. **The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): A multifaceted experimental model.** Mechanisms of development, v. 141, p. 70-77, 2016.

SAW, Constance et al. **Chick chorioallantoic membrane as an in situ biological membrane for pharmaceutical formulation development: a review.** Drug development and industrial pharmacy, v. 34, n. 11, p. 1168-1177, 2008.

TOMÁS, Mariana et al. **Vaginal sheets with Thymbra capitata essential oil for the treatment of bacterial vaginosis: design, characterization and in vitro evaluation of efficacy and safety.** Gels, v. 9, n. 4, p. 293, 2023.