



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018  
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo  
ISBN 978-85-7029-145-5

## SENSIBILIDADE DO NEMATOIDE *CAENORHABDITIS ELEGANS* FRENTE A UM ANTISSÉPTICO DE AMÔNIO QUATERNÁRIO USADO COMO SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Matheus de Paula **Santos**<sup>1</sup>; Vera Lucia S. S. de **Castro**<sup>2</sup>; Rodrigo Fernandes **Castanha**<sup>3</sup>; José Henrique **Vallim**<sup>4</sup>; Claudio Martín **Jonsson**<sup>5</sup>

Nº 18409

**RESUMO** - Testes de toxicidade usando nematoides são uma maneira promissora de identificar os efeitos biológicos de substâncias tóxicas no solo e em ambientes aquáticos. O *Caenorhabditis elegans* é um nematoide de vida livre que tem sido amplamente usado em estudos ecotoxicológicos devido à sua facilidade de cultura, tempo curto de geração e conhecimento acumulado a respeito da sua fisiologia. Contudo, a fim de avaliar o risco ecotoxicológico de novos materiais ou de amostras ambientais, os testes de toxicidade devem ser padronizados para gerar dados reprodutíveis dentro de um laboratório e comparáveis entre diferentes laboratórios. Portanto, é necessário usar uma substância de referência para estimar a confiabilidade dos dados produzidos pelo laboratório em questão. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade do *C. elegans* cultivado no Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança (LEB) da Embrapa Meio Ambiente frente a um antisséptico de amônio quaternário (BAC-C16), usado como substância de referência. Para isto usaram-se os procedimentos descritos na norma ISO 10872:2010. Os resultados indicam que os dados gerados pelos procedimentos executados no LEB, utilizando essa norma, atendem o padrão de qualidade exigido pela mesma quanto à condução de estudos ecotoxicológicos com *Caenorhabditis elegans*. Tal fato garante a possibilidade do uso deste organismo-teste no LEB em estudos de avaliação ecotoxicológica de agroquímicos, nanomateriais e amostras ambientais, dentre outros materiais-teste.

**Palavras-chaves:** *C. elegans*, nematoide, ISO 10872:2010, toxicidade, BAC-C16, substância de referência.

1 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, PUCC, Campinas-SP; matheus-ps27@hotmail.com

2 Colaboradora: Pesquisadora, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

3 Colaborador: Assistente, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

4 Colaborador: Analista, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

5 Orientador: Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; claudio.jonsson@embrapa.br



**ABSTRACT-** *Toxicity tests using nematodes are a promising way to identify the biological effects of toxic substances in soil and aquatic environments. Caenorhabditis elegans is a free nematode that has been widely used in ecotoxicological studies because its ease culture, short generation time and accumulated knowledge regarding its physiology. Toxicity tests should be standardized to generate data to assess the ecotoxicological risk of new materials and environmental samples. Thus, test results must be reproducible within a laboratory and comparable across laboratories. It is therefore necessary to estimate the accuracy and reliability of the data produced by the laboratory through the use of a reference substance. The objective of the present study was to evaluate the sensitivity of C. elegans cultivated in the Laboratory of Ecotoxicology and Biosafety (LEB) of Embrapa Environmet against a quaternary ammonium antiseptic (BAC-C16), used as reference substance. For this, the procedures described in ISO 10872: 2010 was used. The results indicate that the data generated by the procedures performed in the LEB using this standard methodology, meet the required quality required in the conduction of ecotoxicological studies with C elegans. This fact guarantees the possibility of using this test organism in the LEB in studies of ecotoxicological evaluation of agrochemicals, nanomaterials and environmental samples, among other test materials.*

**Keywords:** *C. elegans*, nematode, ISO 10872:2010, toxicity, BAC-C16, reference substance.

## **1. INTRODUÇÃO**

Os testes alternativos tem sido empregados cada vez mais devido aos custos financeiros e éticos do uso de um grande número de animais, juntamente com o maior tempo necessário para a condução do teste (XIONG et al., 2017). Testes de toxicidade usando nematoides são uma maneira promissora de identificar os efeitos biológicos de substâncias tóxicas no solo e em ambientes aquáticos (HUNT, 2017). Os nematoides são invertebrados abundantes e diversificados em sedimentos e solos com muitas espécies não ocorrendo apenas em habitats terrestres, mas também em águas superficiais. Nestes últimos habitats, esses organismos vivem na água dentro do espaço intersticial das partículas (HODDA et al., 2009; TRAUNSPURGER, 2000).

O *Caenorhabditis elegans* é um nematoide de vida livre no solo, sendo encontrado também em grande número em ambientes aquáticos (POLITZ e PHILIPP, 1992). Ele se alimenta de



**12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018**  
**01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-145-5**

bactérias e é encontrado principalmente em habitats ricos em micro-organismos, como material em decomposição (ex: plantas), mas também em sedimentos de água doce ricos em nutrientes. Eles ocupam posições importantes na cadeia bentônica, representando diferentes níveis tróficos bem como diferentes níveis de tolerância a mudanças em condições ambientais. Algumas espécies podem ser facilmente cultivadas (MONTEIRO et al., 2014).

O *Caenorhabditis elegans* tem sido amplamente usado em estudos ecotoxicológicos devido à sua facilidade de cultura, tempo curto de reprodução, transparência corporal além do conhecimento acumulado de sua fisiologia, desenvolvimento e genética do organismo. Testes de toxicidade com *C. elegans* já foram desenvolvidos para avaliar a toxicidade de amostras aquosas, sedimentares e de solo utilizando parâmetros de toxicidade, alterações de crescimento e de reprodução (HOSS et al., 2012).

O *Caenorhabditis elegans* também é frequentemente usado em estudos com nanopartículas, porque permite a avaliação de parâmetros de nanotoxicidade tais como reduções no comprimento do corpo, progênie e comportamento de locomoção, além dos efeitos na sobrevivência e vida útil (JACQUES et al., 2017). Os dados obtidos nestes estudos poderão apoiar a discussão sobre os marcos regulatórios da nanotecnologia e seus usos na agricultura (HUNT et al., 2017).

Contudo, para gerar dados para avaliar o risco ecotoxicológico de compostos químicos e amostras ambientais, os testes de toxicidade devem ser padronizados. Assim, os resultados dos testes devem ser reprodutíveis dentro de um laboratório e comparáveis entre diferentes laboratórios. Deste modo, o uso de uma substância de referência é uma ferramenta para avaliar a sensibilidade relativa de uma população de organismos que será utilizada em testes de toxicidade, e também para estimar a precisão e confiabilidade dos dados produzidos pelo laboratório em questão (RESGALLA e LAITANO, 2002).

O Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança (LEB) da Embrapa Meio Ambiente trabalha com diversas espécies de organismos não-alvo na determinação do risco de agrotóxicos e nanocompostos. Nesse contexto, o método “Distribuição de Sensibilidade das Espécies” (SSD-Sensitive Species Distribution) é usado na análise de risco para prever concentrações perigosas de contaminantes ambientais (LIU et al. 2016) e também de nanomateriais e nanopesticidas (GOTTSCALK et al. 2013; COLL et al., 2016; JACQUES et al., 2017; CHEN et al., 2018). SSDs são distribuições cumulativas que utilizam um grande número de espécies (DOWSE et al., 2013). De modo a ampliar a base de dados e a gama de organismos-teste a serem usadas nesses estudos de SSD, a implementação de ensaios com *C. elegans* torna-se extremamente importante.



**12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018**  
**01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-145-5**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade do *C. elegans* cultivado nas instalações do LEB frente a uma substância de referência (antisséptico de amônio quaternário) de modo a ter subsídios para emissão de dados que atendam o padrão de qualidade exigido na condução de estudos ecotoxicológicos com esse organismo-teste.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Foi realizado o teste com o produto químico de referência cloreto monohidratado de benzilcetildimetilamônio (Figura 1) ou “benzylcetyldimethylammonium chloride monohydrate” (BAC-C16; CAS:122-18-9 ; Sigma B4136). Os parâmetros avaliados foram crescimento, recuperação, reprodução e fertilidade de acordo com a Norma ISO 10872:2010.

Soluções de estoque de BAC-C16 foram preparadas utilizando água ultrapura, obtendo as seguintes concentrações: 7,1; 10,6; 16; 24; 36; 54 e 81 mg/L. Para obtenção de organismos na fase J2, utilizados nos ensaios de toxicidade, as fêmeas grávidas sofreram sincronização e após 24 h foram resuspensas em meio EPA (KLEIVEN e OUGHTON, 2015).

Os indivíduos de *C. elegans* (Figura 2) foram oriundos de cultivo do LEB. A exposição foi realizada num período de 96 h a temperatura controlada de  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ , no escuro. Foram inseridos pelo menos 10 indivíduos J2 em cada poço, adicionando como alimento suspensão de *E. coli* OP50, totalizando um volume de 500  $\mu\text{L}$ . Em seguida, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  das diferentes concentrações da solução-teste. Após 96 h de exposição, para finalizar o teste, adicionou-se 0,5 mL de solução de Rosa Bengala (300 mg/L) em cada poço. Em seguida, as placas foram aquecidas em estufa de secagem durante 10 minutos a  $80^{\circ}\text{C}$ .

Os parâmetros avaliados foram:

- Recuperação: Após 96 h, contou-se o número de indivíduos adultos em cada poço e calculou-se a recuperação dividindo-se o número de adultos pelo de organismos introduzidos no início do teste. O valor resultante foi multiplicado por 100.

- Fertilidade: com o auxílio de um microscópio no aumento de 25 vezes foi determinada a existência de ovos presentes no interior do corpo de cada indivíduo exposto. Um verme é considerado “grávido” se o número de ovos no interior do corpo  $\geq 1$ . Calculou-se por repetição a % de organismos-teste grávidas em relação ao número total de organismos recuperados, dividindo o número de organismos-teste grávidas expostas pelo total de organismos-teste recuperados. O valor resultante foi multiplicado por 100.



- Reprodução: Contou-se o número de jovens produzidos (segunda geração) usando um microscópio (aumento de 25 vezes). Dividiu-se o número de jovens produzidos pelo de adultos recuperados. O resultado foi expresso como número de jovens produzidos por organismo-teste exposto.

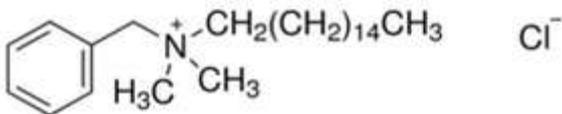


Figura 1. Estrutura do cloreto monohidratado de benzilcetildimetilamônio (BAC-C16).

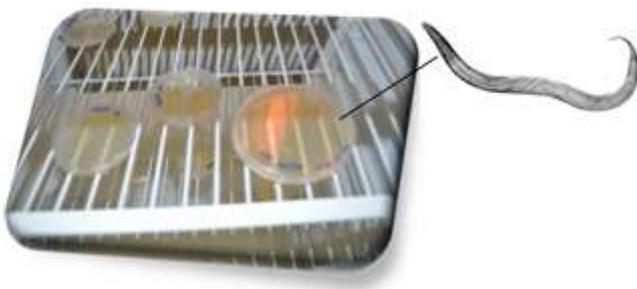


Figura 2. Cultivo de *C. elegans* em placas de Petri.

A fim de que os organismos-teste atendam aos requisitos da Norma ISO 10872:2010, e para validação do teste, é esperado que a Concentração Média Efetiva de Inibição de Crescimento ( $EC_{50 \text{ crescimento}}$ ) fique entre 8 a 22 mg/L; a recuperação no controle entre 80 e 120 %; a fertilidade do controle maior ou igual a 80 %; e a reprodução média no controle maior ou igual a 30. A  $EC_{50 \text{ crescimento}}$  foi calculada utilizando-se o módulo “Simple Regression” do programa Statgraphics Centurion XVII (Versão 17.1.04).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à exposição do organismo-teste ao produto químico de referência BAC-C16 estão apresentados na Tabela 1.



**12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018**  
**01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-145-5**

**Tabela 1.** Parâmetros em *C. elegans* expostos durante 96 horas a diferentes concentrações de BAC-C16.

<b>BAC (mg/L)</b>	<b>Número de organismos</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Fertilidade (%)</b>	<b>Reprodução*</b>	<b>Crescimento (µm)</b>
<b>TESTE 1</b>					
Controle	43	98	100	31	1332
7,1	41	85	100	5	1349
10,6	43	87	0	0	1240
16	43	91	0	0	308
24	41	88	0	0	285
36	43	65	0	0	202
54	41	73	0	0	263
81	40	48	0	0	341
<b>TESTE 2</b>					
Controle	43	100	98	101	1178
7,1	41	98	98	37	953
10,6	41	75	100	29	413
16	41	90	0	0	294
24	45	97	0	0	297
36	44	29	0	0	249
54	48	27	0	0	290
81	51	59	0	0	297

\* número de jovens produzidos por indivíduo adulto.

O teste padronizado de toxicidade com *C. elegans*, baseado na Norma ISO 10872:2010, é um instrumento adequado para avaliar a toxicidade dos organismos aquáticos e terrestres



**12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018**  
**01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-145-5**

utilizando parâmetros como crescimento (fases L1 a L4), fertilidade e reprodução (adultos). Antes do início da avaliação toxicológica de um toxicante, é importante verificar a validade e sensibilidade do sistema teste (SCHERTZINGER et al., 2017).

Conforme os dados apresentados na Tabela 1, os resultados de recuperação, fertilidade e reprodução nos controles são compatíveis com a Norma ISO 10872:2010, pois em média apresentaram valores de 99%, 99% e 66%, respectivamente. Os valores encontrados de crescimento são utilizados junto as outras concentrações da substância de referência avaliada para calcular a concentração média efetiva de inibição de crescimento ( $CE_{50 \text{ crescimento}}$ ). A Norma recomenda que o valor da  $CE_{50 \text{ crescimento}}$  para BAC-C16 deva estar na faixa de 8 a 22 mg/L. A  $CE_{50 \text{ crescimento}}$  dos dados obtidos foi de 13,8 mg/L, valor que atende a faixa recomendada.

Os resultados indicam que os critérios de validade foram cumpridos: a recuperação média dos organismos nos controles foi de 80 a 120% (indica precisão na adição de organismos teste e de separação de nematoides); 80% de fertilidade nos controles (indica qualidade de controle suficiente); e a presença de 30 descendentes por organismo nos controles (em medições de reprodução; indica qualidade de controle suficiente) (HÖSS et al., 2012).

Por outro lado, as vezes se fazem necessárias adaptações no procedimento da Norma devido a características particulares do material-teste, como é o caso dos nanomateriais (HÖSS et al., 2012). A ausência de convergência entre os ensaios de segurança de uso dos nanomateriais é uma ocorrência relativamente comum, mesmo utilizando protocolos padronizados, devido as complexas interações entre os organismos e os nanomateriais. Com isso, pode ocorrer grande variedade de resultados quando é avaliado o potencial tóxico de nanomateriais. Para superar essas discrepâncias de resultados é necessário o desenvolvimento e validação de testes e protocolos confiáveis, robustos e reprodutíveis para avaliar os potenciais riscos da produção, manipulação e uso de nanomateriais e fomentar normas regulatórias. Neste sentido, avaliações toxicológicas de materiais de referência, bem como a implantação de protocolos internacionalmente aceitos são de suma importância para o avanço da nanotecnologia (LAURENT et al., 2012).

Assim, por exemplo, HANNA et al. (2016) observaram que as nanopartículas apresentam variabilidade aumentada nos resultados em relação àqueles obtidos com BAC-C16, sugerindo a necessidade de algumas adaptações no método proposto pela Norma. LUO et al. (2017) avaliaram o uso de diferentes meios de cultura quanto à toxicidade de nanopartículas de prata: meio de crescimento de nematoides (NGM), meio NGM acrescido de goma (NGG) e meio “K-medium” (KM). Os autores observaram que a toxicidade de nanopartículas de prata obtida no meio de teste NGG



**12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018**  
**01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-145-5**

foi muito maior do que nos outros meios devido à melhor dispersão das nanopartículas, indicando que por vezes algumas adaptações podem ser necessárias ao teste.

#### **4. CONCLUSÃO**

Um laboratório, ao realizar ensaios com qualidade, deve se basear em regulamentações emitidas por órgãos de normatização. Conseqüentemente, deve demonstrar que tem condições de executar de maneira adequada estes ensaios de acordo com os métodos normatizados, dentro das condições específicas de suas instalações. Neste contexto, os requisitos da Norma ISO 10872:2010 foram atendidos no presente estudo, o que indicou a correta execução do procedimento, gerando resultados de qualidade e reprodutíveis nos testes de avaliação de toxicidade com *C. elegans*. Isto garante a correta execução de estudos de ecotoxicidade com este organismo- teste nas instalações do LEB. Entretanto, dependendo das características do material-teste, algumas adaptações ao método proposto pela Norma poderão ser necessárias. A implementação de ensaios com *C. elegans* no LEB torna-se relevante na medida que aumenta a gama de organismos-teste na predição de concentrações ambientais sem efeito adverso para comunidades aquáticas estimadas pela metodologia SSD.

#### **5. AGRADECIMENTOS**

À EMBRAPA Meio Ambiente (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) pela oportunidade e suporte para a realização do estudo da Iniciação Científica.

Ao CNPq por conceder a bolsa de Iniciação Científica para o estudo.

#### **6. REFERÊNCIAS**

CHEN, G.; PEIJNENBURG, W.J.G.M.; XIAO, Y.; VIJVER, M.G. Developing species sensitivity distributions for metallic nanomaterials considering the characteristics of nanomaterials, experimental conditions, and different types of endpoints. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p.563-570, 2018.

COLL, C.; NOTTER, D.; GOTTSCHALK, F.; SUN, T.; SOM, C.; NOWACK, B. Probabilistic environmental risk assessment of five nanomaterials (nano-TiO<sub>2</sub>, nano-Ag, nano-ZnO, CNT, and fullerenes). **Nanotoxicology**, v. 10, p.436–444, 2016.



**12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018**  
**01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-145-5**

DOWSE, R.; TANG, D.; PALMER, C.G.; KEFFORD, B.J. Risk assessment using the species sensitivity distribution method: data quality versus data quantity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32(6), p. 1360-1369, 2013.

GOTTSCHALK, F.; KOST, E.; NOWACK, B. Engineered nanomaterials (ENM) in waters and soils: a risk quantification based on probabilistic exposure and effect modeling. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, p. 1278–1287, 2013.

HANNA, S. K.; COOKSEY, G.A.; DONG, S.; NELSON, B.C.; MAO, L.; ELLIOTT, J.T., PETERSEN, E. J. Feasibility of using a standardized: *Caenorhabditis elegans* toxicity test to assess nanomaterial toxicity. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 5, p. 1080-1089, 2016.

HODDA, M.E; PETERS, L.; TRAUNSPURGER, W. Nematode diversity in terrestrial, freshwater aquatic and marine systems. In: WILSON, M.J.; KAKOULI-DUARTE, T. (Ed.) **Nematodes as Environmental Indicators**. Wallingford: CABI, 2009. p 45–93.

HÖSS, S.; AHLF, W.; BERGTOLD, M.; BLUEBAUM-GRONAU, E.; BRINKE, M.; DONNEVERT, G.; MENZEL, R.; MÖHLENKAMP, C.; RATTE, H.T.; TRAUNSPURGER, W.; VON DANWITZ, B.; PLUTA, H.J. Interlaboratory comparison of a standardized toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* (ISO 10872). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 1525-1535, 2012.

HUNT, P.R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50-59, 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water Quality – Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). ISO 10872: 2010**. Geneva: International Organization for Standardization, 2010.

JACQUES, M.T; OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.R.; FRACETO, L.F.; ÁVILA, D.S. Safety assessment of nano pesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 245–253, 2017.

KLEIVEN, M.; OUGHTON, D. **Standard Operating Procedure. Toxicity test with the nematode *Caenorhabditis elegans* for the NANoREG core nanomaterials**. Norway: NMBU, 2015. 15 p.

LAURENT, S.; BURTEA, C.; THIRIFAYS, C.; HÄFELI, U.O.; MAHMOUDI, M. Crucial ignored parameters on nanotoxicology: the importance of toxicity assay modifications and "cell vision". **PLoS One**, v.7, n. 1, p. e29997, 2012.

LIU, N.; WANG, Y.; YANG, Q.L.V. Y.; JIN, X.; GIESY, J.P.; JOHNSON, A.C. Probabilistic assessment of risks of diethylhexyl phthalate (DEHP) in surface waters of China on reproduction of fish. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 482-488, 2016.

LUO, X.; XU, S.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, S.; CHEN, S.; XU, A.; WU, L. A novel method for assessing the toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*, **Chemosphere**, 168, 648-657, 2017.

MONTEIRO, L.; BRINKE, M.; DOS SANTOS, G.; TRAUNSPURGER, W.; MOENS, T. Effects of heavy metals on free-living nematodes: A multifaceted approach using growth, reproduction and behavioural assays. **European Journal of Soil Biology**, n. 62, p.1-7, 2014.

POLITZ, S.M.; PHILIPP, M. *Caenorhabditis elegans* as model for parasitic nematodes: A focus on the cuticle. **Parasitology Today**, v. 8, n. 1, p. 6-12, 1992.

RESGALLA, Jr., C.; LAITANO, K.S. **Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. Notas Técnicas FACIMAR**, v. 6, p. 153-163, 2002.



**12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018**  
**01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-145-5**

SCHERTZINGER, G.; ZIMMERMANN, S.; GRABNER, D.; SURES, B. Assessment of sublethal endpoints after chronic exposure of the nematode *Caenorhabditis elegans* to palladium, platinum and rhodium. **Environmental Pollution**, v. 230, p. 31-39, 2017.

TRAUNSPURGER, W. The biology and ecology of lotic nematodes. **Freshwater Biology**, v. 44, p. 29–45, 2000.

XIONG, H.; PEARS, C.; WOOLLARD, A. An enhanced *C. elegans* based platform for toxicity assessment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9839, 2017.