

Dec 29, 2024

Version 1

Protocolo Detalhado para o Ensaio de Citotoxicidade em Artemia salina usando Extratos de Cianobactérias V.1

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.x54v9r341v3e/v1>

Ricardo Borges¹

¹UFRJ

LAABio-IPPN-UFRJ



Ricardo M. Borges

UFRJ

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.x54v9r341v3e/v1>

Protocol Citation: Ricardo Borges 2024. Protocolo Detalhado para o Ensaio de Citotoxicidade em Artemia salina usando Extratos de Cianobactérias. protocols.io <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.x54v9r341v3e/v1>

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the **[Creative Commons Attribution License](#)**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited



Protocol status: In development

We are still developing and optimizing this protocol

Created: December 29, 2024

Last Modified: December 29, 2024

Protocol Integer ID: 117370

Keywords: estudos ecotoxicológicos biomarcadore, de artemia salina para avaliar, bioacumulação de, artemia salina pode ser usada para medir, estresse oxidativo, toxicidade, bioacumulação, triagens toxicológica, artemia salina, monitore os movimento, estudo de crescimento, estudo de mobilidade, este método, cianobactéria, organismos aquático, após exposição, exposição prolongada, movimentação, estudo, os movimento, artêmias joven

Abstract

Este protocolo detalha o uso de nauplios (artêmias jovens) de *Artemia salina* para avaliar a toxicidade de extratos de cianobactérias. Este método é baseado em técnicas padronizadas para triagens toxicológicas rápidas, confiáveis e de baixo custo.

Ensaio Subletais

Estudo de Mobilidade:

Avalia o impacto de compostos na movimentação dos nauplios.

Método: Monitore os movimentos dos nauplios em intervalos regulares e compare com controles.

Estudo de Crescimento:

Avalia a toxicidade crônica observando o crescimento dos nauplios em exposição prolongada (~7 dias).

Estudos Ecotoxicológicos Biomarcadores de Estresse Oxidativo:

Artemia salina pode ser usada para medir a atividade de enzimas antioxidantes (ex.: SOD, CAT, GPx) após exposição a compostos.

Bioacumulação:

Avalia a capacidade de bioacumulação de contaminantes em organismos aquáticos.

Guidelines

Considerações de Controle de Qualidade

Viabilidade Inicial dos Nauplios:

Certifique-se de que os nauplios utilizados estejam ativos e viáveis antes do início do experimento.

Validação do Controle Positivo:

O controle positivo deve apresentar mortalidade consistente, indicando a funcionalidade do sistema experimental.

Evitar Contaminação:

Utilize materiais estéreis para evitar interferências bacterianas ou químicas.



Safety warnings



Limitações e Notas

Compatibilidade do Solvente:

Certifique-se de que o solvente (ex.: DMSO) não interfere nos resultados.

Complexidade do Extrato:

Componentes do extrato podem ter diferentes modos de ação; recomenda-se complementar com análises químicas do extrato.

Generalização dos Resultados:

Este ensaio avalia toxicidade geral; para respostas mais específicas, considere modelos como zebrafish ou *C. elegans*.

Materiais Necessários

1 Reagentes e Soluções

- Cistos de *Artemia salina* (disponíveis comercialmente).
- Água salgada artificial (preparar com NaCl, sal marinho ou comprar solução pronta; salinidade de 30 g/L).
- Extratos de cianobactérias dissolvidos em DMSO ou outro solvente adequado.
- DMSO (controle negativo, concentração final $\leq 1\%$).
- Água destilada ou ultrapura.
- Controle positivo: substância com toxicidade conhecida (ex.: dicromato de potássio, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 10 $\mu\text{g/mL}$).

2 Equipamentos

- Incubadora ou lâmpada para eclosão dos cistos.
- Frascos ou recipientes de vidro/plástico para eclosão.
- Placas de 96 poços.
- Pipetas ou micropipetas (com ponteiros estéreis).
- Lupa ou microscópio estereoscópico.

3

Preparo dos Nauplios de *Artemia salina*

4 Eclosão dos Cistos:

1. Hidrate os cistos em água salgada artificial (salinidade de ~ 30 g/L) ou água do mar filtrada.
2. Transfira 1 g de cistos para um recipiente contendo 1 L de água salgada

Incubação:

1. Incube sob luz contínua (~ 1000 lux; fluorescente ou LED) e temperatura de $25\text{--}30^\circ\text{C}$ por 24–48 horas.
2. Garanta boa oxigenação, utilizando um sistema de aeração (ex.: bomba de ar).
3. Os nauplios eclodem e podem ser separados dos cistos não eclodidos com um filtro ou por fototropismo (atração pela luz).

Coleta de Nauplios:

1. Após 24–48 horas, os cistos eclodirão, liberando os nauplios.
2. Utilize uma fonte de luz para atrair os nauplios (fototropismo positivo).
3. Separe os nauplios com uma pipeta ou filtro, descartando resíduos e cistos não eclodidos.



5

Preparo das Soluções de Teste

6 Solução Estoque:

1. Dissolva os extratos de cianobactérias em DMSO ou outro solvente apropriado.
2. Prepare uma solução estoque (ex.: 10 mg/mL).

Diluições:

1. Dilua a solução estoque em água salgada para obter concentrações finais de teste (ex.: 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL).
2. Certifique-se de que a concentração final de DMSO não exceda 1% no poço.

Controles:

1. Controle negativo: DMSO diluído em água salgada ($\leq 1\%$).
2. Controle positivo: Prepare uma solução de $K_2Cr_2O_7$ em água salgada (concentração final ex.: 10 µg/mL).

Montagem do Experimento

7 Distribuição dos Nauplios:

1. Transfira 10 nauplios para cada poço de uma placa de 24 ou 96 poços, utilizando uma pipeta Pasteur ou micropipeta.
2. Adicione 200 µL de água salgada em cada poço para manter o volume uniforme.

Adição das Soluções de Teste:

1. Adicione 200 µL das soluções de extratos diluídos aos respectivos poços.
2. Inclua réplicas técnicas e biológicas para cada concentração.

Incubação:

1. Incube a placa em temperatura ambiente (25–28°C) sob luz contínua por 24–48 horas.
2. Não é necessário oxigenar as placas durante o ensaio.

Avaliação dos Resultados

8 Mortalidade:

1. Após 24–48 horas, conte o número de nauplios mortos em cada poço usando uma lupa ou microscópio estereoscópico.
2. Nauplios mortos são identificados pela ausência de movimentação ou flutuação passiva.



Cálculo da Mortalidade (%):

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{\text{Nauplios Mortos}}{\text{Nauplios Totais}} \times 100$$
$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{\text{Nauplios Mortos}}{\text{Nauplios Totais}} \times 100$$

Análise Estatística:

1. Calcule a CL50 (Concentração Letal para 50% dos organismos) utilizando análise de regressão ou o método de Probit.
2. Compare os resultados com os controles para validar o ensaio.

Considerações de Controle de Qualidade

- 9 Viabilidade Inicial dos Nauplios:
Certifique-se de que os nauplios utilizados estejam ativos e viáveis antes do início do experimento.
- Validação do Controle Positivo:
O controle positivo deve apresentar mortalidade consistente, indicando a funcionalidade do sistema experimental.
- Evitar Contaminação:
Utilize materiais estéreis para evitar interferências bacterianas ou químicas.

Resultados Esperados

- 10
- Mortalidade aumenta proporcionalmente à concentração do extrato.
 - CL50 fornece uma medida da toxicidade relativa do extrato de cianobactérias.
 - Comparação com o controle negativo verifica a especificidade do efeito.

Identificação de Nauplios Vivos e Mortos

- 11 Critérios de Identificação Manual
- **Nauplios vivos:**
 - o Mostram movimento espontâneo ou resposta a estímulos (como luz ou leve agitação da placa).
 - **Nauplios mortos:**
 - o Permanecem imóveis mesmo após estímulos.
 - o Flutuam passivamente ou ficam no fundo do poço sem movimentação.
- Método Manual:
1. Após o período de incubação (24-48 horas), coloque a placa de 96 poços sob uma lupa ou microscópio estereoscópico.

2. Conte o número de nauplios vivos e mortos em cada poço.
3. Registre os dados de cada poço para análise posterior.

2. Métodos Automatizados (se disponível)

- Uso de Sistemas de Rastreamento de Movimento:

- o Ferramentas como DanioVision (Noldus) ou outros sistemas de rastreamento de movimento podem ser adaptados para monitorar a movimentação dos nauplios.
- o Esses sistemas detectam automaticamente movimentos em cada poço e geram relatórios indicando mortalidade.

- Análise de Imagens:

- o Tire imagens de cada poço usando um scanner de placas ou câmera acoplada ao microscópio.
- o Vídeos curtos de 10 segundos podem ser utilizados.
- o Use softwares como ImageJ ou CellProfiler para contar automaticamente os nauplios vivos e mortos com base em critérios definidos (tamanho, contraste ou movimento).

3. Registro dos Resultados

Cálculo da Mortalidade (%):

Para cada poço, calcule a mortalidade com a seguinte fórmula:

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{\text{Nauplios Mortos}}{\text{Nauplios Totais}} \times 100$$
$$\text{Mortalidade (\%)} = \text{Nauplios Totais} \times \frac{\text{Nauplios Mortos}}{\text{Nauplios Totais}} \times 100$$

Controle de Qualidade:

- O controle negativo (água salgada + DMSO) deve ter baixa mortalidade (<10%).
- O controle positivo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ou equivalente) deve apresentar alta mortalidade (>90%) para validar o ensaio.

4. Análise Estatística

Cálculo da CL50 (Concentração Letal 50%):

1. Use os dados de mortalidade para construir uma curva dose-resposta, relacionando a concentração do extrato com a mortalidade observada.
2. Ajuste os dados com um modelo de regressão não-linear (ex.: logística ou Probit).
3. Determine a CL50, a concentração do extrato que causa 50% de mortalidade nos nauplios.

Software para Análise:

- Excel: Para análise básica (gráficos e cálculos simples).
- Prism (GraphPad): Para ajuste de curvas e cálculo de CL50.
- R ou Python: Para análise avançada com pacotes como drc (R) ou SciPy (Python).