



## Validação do método para cultivo de *Artemia salina* e posterior teste de toxicidade com kombucha

### Validation of the method for cultivating of *Artemia salina* and subsequent toxicity test with kombucha

Poliana Lopes Caetano<sup>1</sup>, Alessandra Cristine Novak Sydney<sup>2</sup>

#### RESUMO

O trabalho mostra uma pesquisa de validação de um método para o cultivo de *Artemia salina*, foram estudados sua origem, ciclo de vida e seu ambiente natural, com esses dados foi possível escolher parâmetros e estrutura ideal para que ocorra o seu desenvolvimento em laboratório até a fase necessária para realizar os testes de toxicidade. Para isso vários testes foram realizados a fim de encontrar o método mais adequado e que atendesse as especificações de sobrevivência das *Artemia salina*. O método escolhido foi aquele que apresentou menor tempo de eclosão e que trazia melhores características fisiológicas para os microcrustáceos. Com a primeira etapa validada, avançou-se para os testes de toxicidade, sendo testados diferentes concentrações de kombucha, obtendo-se resultados preliminares que em grandes concentrações e maior tempo de fermentação apresentaram alta mortalidade para as *Artemia salina*, porém o estudo deve prosseguir em andamento e validado com outras amostras para garantia de funcionamento do teste de toxicidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Artemia salina*; kombucha; toxicidade.

#### ABSTRACT

The work shows validation research on a method for the cultivation of *Artemia salina*, its origin, life cycle and natural environment were studied, with these data it was possible to choose parameters and structure for its development to occur in the laboratory until the phase necessary to carry out toxicity tests. To this end, several tests were carried out in order to find the most appropriate method that met the survival specifications of *Artemia salina*. The method chosen was the one that presented the shortest hatching time and that provided better physiological characteristics for the microcrustaceans. With the first stage validated, we moved on to toxicity tests, testing different concentrations of kombucha, obtaining preliminary results that in large concentrations of samples and longer fermentation time showed high mortality for *Artemia salina*, however the study must continue in progress and validated with other samples to guarantee the functioning of the toxicity test.

**KEYWORDS:** *Artemia salina*; kombucha; toxicity.

## INTRODUÇÃO

A *Artemia salina* é um pequeno crustáceo da ordem Anostraca, possui tamanho e coloração variadas, que habita ambientes de alta salinidade. O ciclo de vida da *Artemia salina* é bastante rápido, segundo Abelin (1997), o ciclo se inicia de um cisto que contém um embrião com metabolismo suspenso, podendo sobreviver durante anos quando desidratados. No momento que são proporcionadas condições de ambiente para seu desenvolvimento, os cistos se hidratam, eclodem e passam para o primeiro estágio larval de crescimento da artemia, conhecido como náuplio, podendo se tornar adulta entre 2 a 3 semanas de vida.

<sup>1</sup> Voluntariado na Iniciação Científica e Tecnológica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: polianacaetano@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 9520042363423043.

<sup>2</sup> Docente no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: alessandrac@utfpr.edu.br. ID Lattes: 9198896851080646.

O teste de toxicidade contra a *Artemia salina* é um ensaio biológico considerado como uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de toxicidade (AMARANTE et al., 2010). Neste estudo utilizamos como ativo biotecnológico a kombucha, uma bebida fermentada que contém uma cultura de leveduras e bactérias. E segundo Meyer (1962) a fase ideal para os estudos de toxicidade com as artemias é o primeiro estágio de náuplios, a partir da sua eclosão os testes são realizados em sequência, então essa transição entre os ovos e náuplios teve uma maior atenção.

Essa pesquisa teve como foco o estudo no ambiente laboratorial adequado para o cultivo da *Artemia salina* para sua eclosão e seu desenvolvimento necessário até a fase ideal para os testes de toxicidade, e assim validar um método de cultivo e posteriormente testar com um ativo biotecnológico, sendo este primeiramente a kombucha, e depois utilizar esta como base para diferentes tipos de ativos.

## DESENVOLVIMENTO

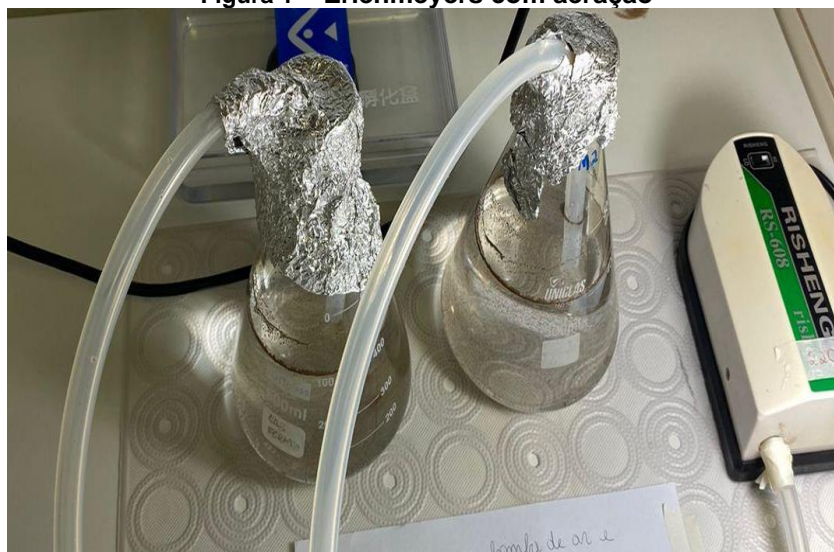
### AMBIENTE IDEAL PARA CULTIVO DAS ARTEMIAS SALINAS

Inicialmente foram coletados dados e parâmetros encontrados na literatura, que serviram como um base para que fosse possível estabelecer passos para realizar testes para encontrar o ambiente de cultivo ideal e mais eficiente para que as artemias pudessem eclodir e se tornarem náuplios. Os cistos usados nos testes foram comprados em comércio local em loja especializada em aquarismo.

Todos os testes foram realizados com a mesma solução, água destilada, sal marinho na concentração de  $30 \text{ g/L}^{-1}$ , pH na faixa de 8 a 9 que foi ajustado com bicarbonato de sódio, temperatura entre 24 a 27 °C e 0,3 gramas de cisto de artemias.

O primeiro teste foi preparada a solução inicial e colocada em um Erlenmeyer com mangueira de aeração direto na água (figura 1), após 48 horas algumas artemias haviam eclodido, e com 72 horas estavam mortas.

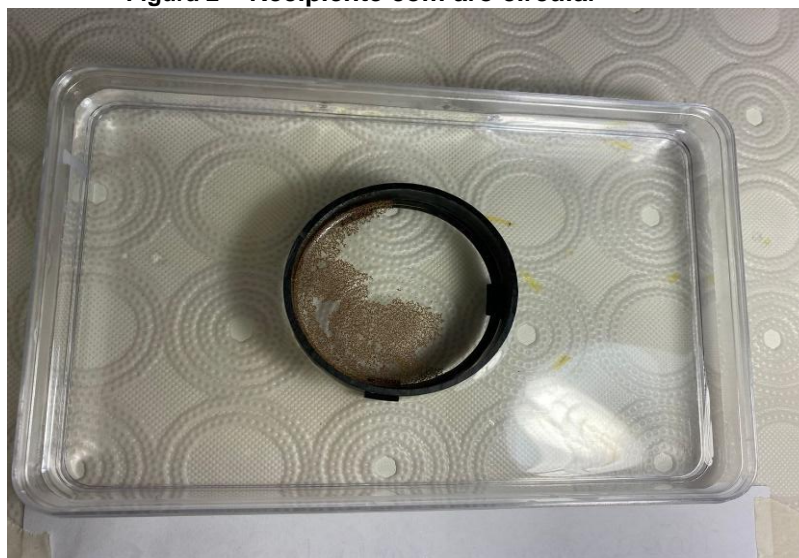
Figura 1 – Erlenmeyers com aeração



Fonte: Autoria própria (2023).

No segundo teste também foi preparada a solução inicial e colocado em um recipiente retangular com um aro circular no centro para que as artemias eclodissem e fosse mais fácil a separação das larvas das cascas dos ovos, sem aeração (figura 2). Após 36 horas já estavam eclodidas e com 72 horas algumas ainda estavam vivas e após 96 horas todas estavam mortas.

Figura 2 – Recipiente com aro circular



Fonte: Autoria própria (2023).

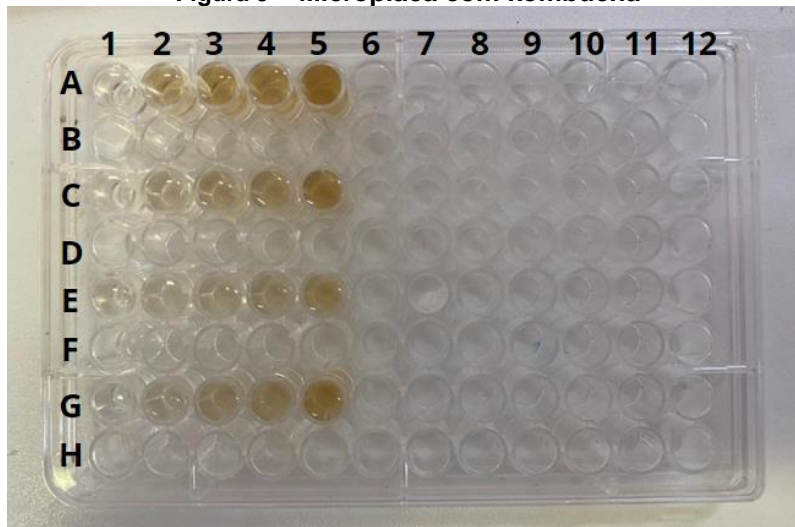
Ambos os testes foram realizados em duplicatas e como o segundo método apresentou melhores condições e menos tempo para eclosão o foco do estudo se concentrou nesse método.

#### TESTE DE TOXICIDADE USANDO A *Artemia salina*

Com base na metodologia de Meyer (1982) o teste de toxicidade foi realizado com a *Artemia salina* na fase de náuplio, em que foi preparado o ambiente validado anteriormente para a eclosão dos ovos e no preparo das diluições. O ativo biotecnológico escolhido para o teste foi o chá antes da fermentação e a kombucha (chá fermentado) após 7 dias, 14 dias e 21 dias de fermentação. A kombucha utilizada nos testes foi produzida através do chá preto, obtida de outra linha de pesquisa do laboratório.

Primeiramente os ovos foram colocados para eclosão e após 36 horas cerca de 10 larvas foram transferidas para os poços da microplaca, cada poço possui 350  $\mu$ L. Foram realizados os testes nas seguintes proporções, 80% solução e 20% amostra, 60% solução e 40% amostra, 100% de amostra. Nas linhas da microplaca, a letra A continha amostras de chá, letra C amostra de 7 dias de fermentação, letra E amostra de 14 dias de fermentação e letra G amostra de 21 dias de fermentação (figura 3).

Figura 3 – Microplaca com kombucha



Fonte: Autoria própria (2023).

O teste foi realizado em duplicata e para o controle foi feito um teste branco com 10 larvas colocadas em somente solução salina.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Depois de 24 horas, foi realizada a contagem de artemias que não se moviam, consideradas mortas, nas diferentes concentrações de chá sem fermentação e a kombucha após 7 dias, 14 dias e 21 dias de fermentação, podemos analisar na tabela 1 que os resultados da contagem foram diferentes na duplicata 1 e duplicata 2, então foi feita uma média entre as duas.

Tabela 1 – Contagem de Artemias mortas

	Concentração (µL)	Duplicata 1	Duplicata 2	Média
Branco	0	2	1	1,5
Chá	70	5	6	5,5
	140	7	10	8,5
	350	10	10	10
7 dias	70	2	4	3
	140	10	10	10
	350	10	10	10
14 dias	70	10	10	10
	140	10	10	10
	350	10	10	10
21 dias	70	10	10	10
	140	10	10	10
	350	10	10	10

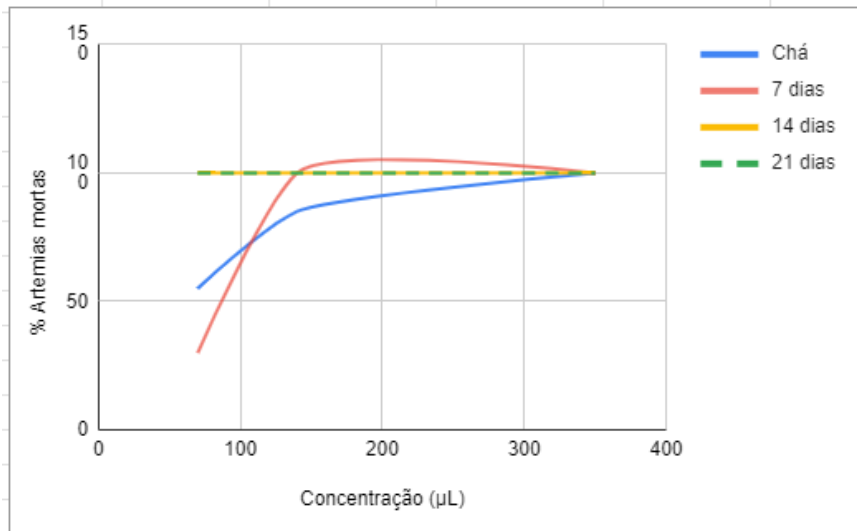
Fonte: Autoria própria (2023).

Após a observação da sobrevivência das Artemias nas diferentes concentrações verificou-se o número de Artemias que haviam morrido (tabela 1). Com esses dados foi construído o gráfico 1, podemos observar que em 14 e 21 dias de fermentação da



kombucha não houveram artemias vivas, e somente com o chá sem fermentação e a kombucha após 7 dias de fermentação obtivemos variação de artemias vivas e mortas.

Gráfico 1 – Porcentagem de morte das artemias em diferentes concentrações



Fonte: Autoria própria (2023).

Na literatura encontramos que se tratando de toxicidade a dose letal mediana (DL50 ou LD50, do inglês Lethal Dose) é a dose necessária de uma dada substância ou tipo de radiação para matar 50% de uma população em teste, e ao analisar o gráfico podemos observar que se compararmos as linhas do chá e a kombucha após 7 dias de fermentação na faixa de aproximadamente 50% de artemias mortas, o chá em menores concentrações do que a kombucha após 7 dias de fermentação já mataria metade da população de artemias.

## CONCLUSÃO

Esta pesquisa contribui com informações relevantes sobre o cultivo de *Artemia salina* em ambiente laboratorial para analisar a toxicidade, visto que as maiores informações encontradas sobre esse assunto são para fins de aquarismo. Diante dos resultados apresentados no estudo, concluímos que o chá sem fermentação se mostrou mais tóxico do que a kombucha após 7 dias de fermentação, visto que a concentração para atingir a DL50 é mais baixa comparada à kombucha após 7 dias. Portanto fica para as pesquisas seguintes, realizar os testes com mais pontos de concentração de kombucha, como também intervalos de tempo menores de fermentação para produção da kombucha, a fim de se obter uma curva mais precisa, para uma maior confiabilidade dos resultados, além disso testar o método com outros tipos de amostras se tornando um teste de toxicidade para outros tipos de compostos bioativos.

## Agradecimentos

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela oportunidade de estar desenvolvendo esta pesquisa, juntamente à Fundação Araucária por estar financiando parcialmente a pesquisa.



## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

ABELIN, Patricia. A indústria de Artemia no Great Salt Lake. **Panorama da aquicultura**, Rio de Janeiro, v.7, n.43, p.30-33, set/out 1997.

AMARANTE, Cristine Bastos *et al.* Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à Artemia salina e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **ACTA AMAZONICA**, Pará v.41, n.3, p. 431–434, 2011.

ARTÊMIA SALINA DO RN. **Sobre a Artêmia**. Natal, 2008. Disponível em: <https://artemiasalinadorrn.com.br/sobre-artemia.php>. Acesso em: 21 set. 2023.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

SANTOS, Davi Vicente Dos. **ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO HIBISCUS SABDARIFFA**. Orientador: Dr. <sup>a</sup> Alaíde de Sá Barreto. 2018. 94 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) - Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2018.

ZANIN, Tatiana. Kombucha: o que é, benefícios. **TUA SAÚDE**, 2023. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/beneficios-do-kombucha>. Acesso em: 21 set. 2023.