

Desenvolvendo um controle de qualidade alternativo para bebidas industriais utilizando o organismo modelo *Caenorhabditis elegans* no ensino básico

Autores: Douglas Correia de Souza^a; Annelise Santos^b; Bruna Drumond^b; Letícia Gomes^b; Maria Angélica Ferreira^b; Rafaela Drumond^b; Luiz Paulo Rigueira de Moraes^c; Maria Aparecida Scatamburlo Moreira^a; Jackson Victor de Araújo^a.

^a Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (PPGMV/UFV), Viçosa, MG, Brasil.

^b Colégio Ômega, Viçosa, MG, Brasil.

^c Programa de Pós-graduação em Administração, Universidade Federal de Viçosa (PPGADM/UFV), Viçosa, MG, Brasil.

Resumo

A segurança alimentar é um desafio global, e a presença de contaminantes em alimentos e bebidas representa uma grave ameaça à saúde coletiva. Nosso intuito nesse trabalho foi verificar o nematoide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como um bioindicador de agentes tóxicos em bebidas industriais comercializadas localmente. Este trabalho foi desenvolvido como uma metodologia ativa de ensino acessível no ensino básico em aulas no laboratório de ciências em um colégio. Avaliamos a taxa de sobrevivência dos nematoides após exposição às amostras de diferentes lotes de uma mesma marca popular de refrigerantes. Nossos resultados indicaram que as amostras testadas não causaram toxicidade aguda nos nematoides, sendo compatíveis com o controle negativo. Averiguamos que *C. elegans* pode ser uma ferramenta promissora para o ensino de ciências e para a promoção da educação em saúde, permitindo que estudantes participem ativamente do processo científico no monitoramento da qualidade dos alimentos que consomem.

Palavras-Chave: Contaminação de alimentos; Controle de qualidade; Nematoides.

1. Introdução

As intoxicações alimentares representam um desafio substancial para a saúde pública. Essas intoxicações são causadas por diferentes fontes de contaminação, como substâncias químicas, microrganismos e/ou seus subprodutos tóxicos. Intoxicações alimentares geram uma extensa variedade de agravos à saúde, incluindo casos com sequelas irreversíveis e fatais (Bernardes et al., 2018). De acordo com a OMS (2015), anualmente, cerca de 420 mil pessoas morrem e 600 mil têm danos à sua saúde após ingerirem alimentos contaminados. Assim, é indicado monitorização ampla e constante desses alimentos para reduzir tais riscos. A automatização na produção de alimentos, quando realizada segundo padrões de boas práticas, fornece um bom controle no processo, aumentando a seguridade desses produtos em relação a desvios da cadeia produtiva. A população brasileira figura entre os maiores consumidores de refrigerantes no mundo. Estudos recentes demonstraram que os refrigerantes estão entre os 20 alimentos ultra processados que população brasileira consome como parte regular da sua dieta (Rodrigues et al., 2021; WHO, 2015).

Recentemente uma série de óbitos associados ao consumo de bebidas industriais contaminadas, com destaque para cervejas contaminados por dietilenoglicol, geraram grande repercussão midiática. Casos como o citado, evidenciam a relevância dos riscos à saúde pública decorrentes da contaminação de alimentos e bebidas, demandando uma análise aprofundada dos processos de produção e controle de qualidade (CQ) desses produtos (Caldeira et al., 2021; Mansur, 2022). Essas lacunas significativas na detecção de desvios na cadeia produtiva de bebidas e na mitigação de riscos potenciais, destacam a necessidade contínua de pesquisa e inovação no CQ desses produtos. Assim, além de inovação nesses CQ, é importante o desenvolvimento de formas da própria comunidade realizar testes do que consome, somando aos já realizados pelo estado e iniciativa privada (Teixeira & Gemal, 2014).

Nesse trabalho foi utilizado o nematoide *C. elegans* como um bioindicador de agentes tóxicos. *C. elegans* é um organismo modelo mundialmente utilizado para

diversos tipos de análises toxicológicas. É um animal invertebrado com cerca de 1mm de comprimento. Seu uso ganhou popularidade graças ao trabalho pioneiro de Sydney Brenner e de outros cientistas que se dedicaram ao mapeamento de seu genoma e à compreensão de seu desenvolvimento, comportamento e rede neuronal. Vantagens como baixo custo e fácil manutenção do animal em laboratório o tornam um modelo interessante para o desenvolvimento de CQ de alimentos, pois responde bem a contaminantes (Hoshino et al., 2008; Hunt, 2017). Trabalhos recentes utilizaram o nematoide para avaliar os efeitos de bebidas em parâmetros fisiológicos, sobrevivência do animal e como agente neuroprotetivo nos modelos de Parkinson e Alzheimer (Canedo-Reis et al., 2023; De Oliveira Caland et al., 2019; Zhang et al., 2022).

Nosso intuito foi avaliar o nematoide *C. elegans* como um bioindicador de agentes tóxicos para o CQ de bebidas de consumo humano. Selecionamos refrigerantes industriais, vendidos no comércio local da cidade de Viçosa-MG-Brasil. Outro aspecto crucial para o desenvolvimento do trabalho, foi que ele pudesse ser realizado como uma metodologia ativa de ensino e como forma de extensão universitária entre o Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa e as escolas de ensino básico do município. Assim o projeto propôs desenvolver ambientes pluriversitários de aprendizagem inclusivo, no qual o conhecimento e avanço científico seja gerado, compartilhado e valorizado. Dentro dessa abordagem enfatizamos a importância do diálogo multidisciplinar, incentivando a ocupação e criação de espaços onde diferentes abordagens, como de ensino e pesquisa possam ser transmitidas e compartilhadas em uma comunidade (Souza Santos, 2008, 2023).

2. Material e Métodos

2.1 Seleção das amostras

Foram selecionadas 25 amostras de diferentes lotes de uma única marca popular de refrigerante. As amostras foram adquiridas no comércio local da cidade de Viçosa-MG-Brasil, e foram mantidas protegidas da luz e em temperatura ambiente até o momento da análise.

2.2 Cultivos dos organismos

Foram utilizadas cepas de origem do CGC (*Caenorhabditis Genetics Center*) doadas gentilmente pela Dra Francine Coa (USP). Utilizamos a cepa de *C. elegans* Bristol N2 e a cepa de bactéria *Escherichia coli* OP50 como fonte de alimento para os animais. O cultivo das placas foi realizado nos laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa e as análises no laboratório de ciências do Colégio Ômega na cidade de Viçosa-MG-Brasil. Os vermes foram cultivados em incubadora B.O.D a 20 °C em placas contendo Meio-NGM (1,7% Bactoágar, 0,5% Bacto peptona, 50 mM NaCl, 25 mM tampão fosfato de potássio pH 6,0, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄ e 5 µg/mL de colesterol, H₂O qsp 1 litro) semeadas com caldo Luria incubado com a cepa *E. coli* OP50. Foi preparado meio tampão M9 (3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO₄, H₂O qsp 1 litro) para coleta e lavagem dos animais e das placas. Foi utilizado S. Basal como meio de exposição e controle (5.85 g NaCl, 1 g K₂HPO₄, 6 g KH₂PO₄, 1 mL colesterol (5 mg/mL em etanol), H₂O qsp 1 litro). Todos os materiais utilizados durante as análises no colégio retornaram ao Departamento de Veterinária para descarte de acordo com protocolos de manejo de resíduos em pesquisa da instituição. Todos os materiais foram manipulados por meio de técnicas estabelecidas (Gubert, 2022).

2.3 Sincronização dos vermes

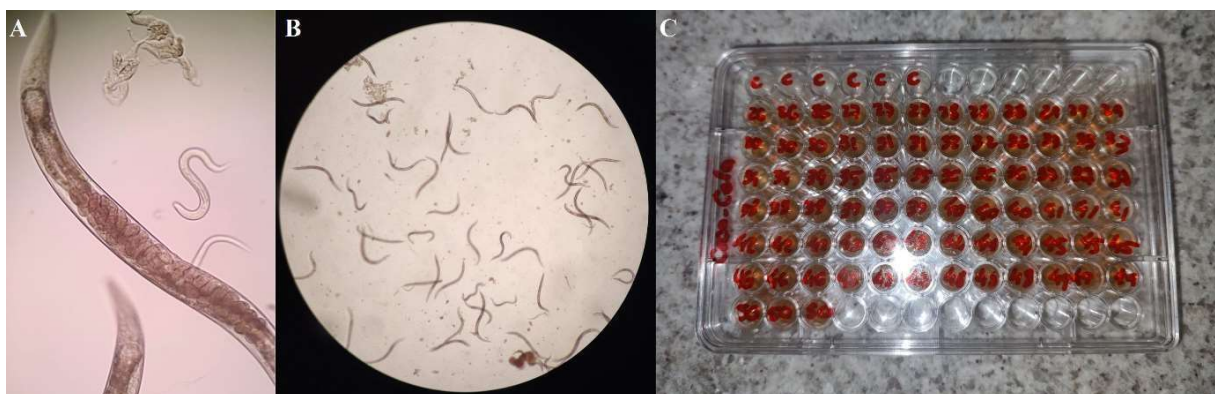
Resumidamente, para sincronizar uma população de *C. elegans* no mesmo estágio larval, vermes adultos grávidos (Figura1A) foram tratados com água estéril contendo NaOH 0,5 M e Hipoclorito de Sódio a 4% (v/v) (NaClO) preparada no momento do uso. Os ovos foram liberados e isolados por agitação, centrifugados (1.300 × g por 1 min) e depois lavados 3 vezes em tampão M9. Na última lavagem os ovos foram suspensos em S. Basal, deixados sob agitação suave a 20°C por 16 horas para que os ovos eclodissem. As larvas L1 foram transferidas para meio NGM e incubadas com *E. coli* OP50 a 20°C por aproximadamente 60 horas até atingirem o estágio L4 (Figura1B).

2.4 Design do experimento

Todas as análises com os nematoides foram realizadas em triplicata. Após serem coletados e lavados 3 vezes em S. Basal, os mesmos foram centrifugados a ($1300 \times g$ por 2 minutos) e a suspensão foi ajustada para que cada 50 μ l contivesse >30 vermes L4. Foram pipetados 50 μ l de S. Basal contendo os vermes em placa de 96 poços (Figura1C) contendo 50 μ l das amostras (concentração final de 50%), depois incubados em temperatura ambiente por 24 horas. Para cada leitura, 30 nematoides foram recuperados e analisados por microscopia direta. O controle negativo foi realizado também em triplicata onde os vermes foram expostos a S. Basal. Para o controle positivo foi utilizado NaClO a 10% por ser um potencial contaminante no processo industrial e o verme ser sensível ao agente (Gubert, 2022; Menegaro, et al., 2016).

Para determinar a taxa de sobrevivência de *C. elegans*, o número de vermes vivos foi registrado a cada leitura e a porcentagem de vermes sobreviventes foi calculada usando a seguinte fórmula: sobrevivência (%) = (vermes vivos/total de vermes utilizados) $\times$ 100. Os vermes foram considerados mortos quando não responderam a estímulo mecânico.

Figura 1- *Caenorhabditis elegans* em ensaio laboratorial. (A) *Caenorhabditis elegans* adulto gravido e ao lado em estágio L1. (B) Vermes sincronizados em estágio L4 recém expostos aos refrigerantes. (C) Placa de 96 Poços onde foram realizados os testes de exposição.



Fonte: Autores, 2024.

2.5 Análises estatísticas

A análise de dados foi realizada utilizando o software Microsoft Excel. As comparações entre os grupos foram conduzidas usando a análise de variância de uma via (One Way ANOVA, Tukey pós teste). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (Fay, 2013; Sant'anna & Vommaro & De Souza, 2013).

3. Resultados e Discussão

Após a exposição dos nematoides às amostras de refrigerante (Tabela 1), não foi observada mortalidade significativa dos animais em nenhuma das 25 amostras testadas. Os grupos experimentais, incluindo o controle negativo (nematoides expostos apenas ao meio S. Basal), apresentaram taxas de sobrevivência superiores a 97%, indicando que não houve efeito tóxico agudo dos refrigerantes nas condições testadas. O controle positivo apresentou 100% de mortalidade, indicando a já conhecida toxicidade aguda do Hipoclorito de Sódio no modelo. Se demonstrou diferenças estatística significativa das medias de sobrevivência das amostras testadas com o controle positivo. Não houve diferença estatística entre a média de sobrevivência das amostras e do controle negativo ($p < 0,05$; One-way ANOVA, Tukey pós-teste).

Tabela 1. Sobrevivências de *Caenorhabditis elegans* expostos a amostras de refrigerantes.

Teste	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
Amostras (n=25)	97*	100*	100*	99*	192%	1,1
Controle Negativo (S. Basal)	100	100	100	100	0%	0,0
Controle Positivo (NaClO)	0**	0**	0**	0**	0%	0,0

Valores com (*) não apresentam diferença estatística em relação ao controle negativo. Valores com (**) apresentam diferença estatística em relação ao controle negativo. Ambos valores com (***) indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; One-way ANOVA, Tukey pós-teste).

A ausência de mortalidade dos nematoides expostos as amostras sugere que os refrigerantes analisados são seguros em termos de toxicidade de agentes sensíveis ao nematoides sob as condições experimentais empregadas. A escolha de *C. elegans* como bioindicador foi fundamentada na sua alta sensibilidade a diversos agentes

tóxicos encontrados em alimentos e na facilidade de manipulação em laboratório. Estudos anteriores já utilizaram o modelo na detecção de toxicidade em outros tipos de amostras alimentares, como água, sucos, e outras bebidas industriais (Clavijo et al., 2016; Mudd & Liceaga, 2022; Zhang et al., 2022). Outros trabalhos também utilizaram a associação de patógenos encontrados em alimentos como cepas de *E. coli* diarreiogênicas, como *E. coli* enteroagregativa e enterohemorrágica, além de *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus* (Hoshino et al., 2008).

A ausência de mortalidade dos nematoides em nosso estudo pode estar relacionada a diferentes fatores, como a natureza dos compostos presentes nos refrigerantes ou a necessidade de um período de exposição mais prolongado para observar efeitos tóxicos. É importante ressaltar que, apesar de *C. elegans* ser um modelo eficiente para estudos de toxicologia, a ausência de efeitos tóxicos agudos observados neste estudo não elimina a possibilidade de efeitos subcrônicos ou crônicos que não foram avaliados. Adicionalmente, a metodologia utilizada pode ser complementada com outros testes toxicológicos e bioensaios que avaliem diferentes parâmetros fisiológicos e comportamentais dos nematoides. A implementação de um CQ alternativo usando *C. elegans* pode fornecer uma ferramenta adicional para monitorar a segurança de bebidas industriais, contribuindo para a saúde de uma população. Outra potencial vantagem no uso do modelo, seria o seu uso para CQ com a ISO 10872-2020 que utiliza uma metodologia com padronização internacional para análise da água, solo e efluentes. Assim, pode ser utilizada no CQ da água de uso na fabricação dos alimentos, assim como seus outros componentes, além do produto final, aumentando as chances de se triar desvios na cadeia produtiva (ISO, 2020). É necessário sempre considerar a complementação com outras abordagens e análises para garantir uma avaliação mais abrangente da segurança dos produtos. Apesar de apresentar alta sensibilidade ao contaminantes, testes "*in vivo*", quando feitos em apenas uma espécie ou tipo celular possuem baixa especificidade. Assim, é interessante em estudos futuros a verificação e correlação dos principais contaminantes nesses produtos e expor o nematoide e outros organismos e cultivos celulares para definir apropriadamente o modelo como um bioindicador para padronização em escala industrial. Outro limitante que o

nematoide só irá apresentar mortalidades expressivas em agentes que lhe causarem essa resposta, assim a triagem de outros contaminantes específicos em humanos e outros modelos, não é compatível com a metodologia. Essa metodologia deve ser aperfeiçoada e testada em diferentes alimentos, associando os principais contaminantes e seus limites máximos a diferentes respostas no modelo.

Os resultados deste estudo destacam a importância de pesquisas contínuas e inovações no campo dos CQ de alimentos e bebidas. A utilização de metodologias integrativas que envolvam a comunidade e a educação, como a parceria com escolas de ensino básico, pode potencializar o impacto dessas práticas, promovendo uma cultura de segurança alimentar e consumo consciente. Os alunos do colégio participaram da organização do trabalho, na coleta das amostras, na execução da metodologia em laboratório e apresentaram seus resultados na feira de ciências em forma de pôster. Esse trabalho foi realizado em parceria com o professor de biologia e como parte do processo avaliativo dos alunos.

4. Conclusão

Nosso principal objetivo nesse trabalho foi desenvolver com os alunos do ensino básico, formas de ensino ativo em aulas de biologia onde os estudantes aprendessem a partir do desenvolvimento e inovação científica. Para isso, os alunos escolheram um alimento cotidiano para análise laboratorial, nesse caso refrigerantes de uma popular marca. *C. elegans* respondeu bem as nossas expectativas, foi um teste rápido, barato e com metodologia acessível aos estudantes. A falta de mortalidade dos animais em todas as amostras testadas evidencia, com as limitações do teste, seguridade para consumo humano. O desenvolvimento da pesquisa dentro da sala de aula, como forma de se criar ambientes pluriversitários, tem grande potencial no processo de aprendizagem dos alunos e geram ao mesmo tempo um produto de extensão que pode somar na vigilância de saúde de uma comunidade.

5. Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

(Fapemig) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) código financeiro 001.

6. Referências

Bernardes, N. B., Facioli, L. D. S., Ferreira, M. L., Costa, R. D. M., & Sá, A. C. F. D. (2018). Intoxicação alimentar: Um problema de Saúde Pública. *Id on line Revista de Psicologia*, 12, 894–906.

Caldeira, L. R., Madureira, F. D., Maia, T. D. F., Muller, C. V., & Fernandes, C. (2021). Simultaneous quantification of ethylene glycol and diethylene glycol in beer by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Chemistry*, 346, 128871.

Canedo-Reis, N. A. P., De Oliveira Pereira, F. S., Ávila, D. S., Guerra, C. C., Flores Da Silva, L., Junges, C. H., Ferrão, M. F., & Bergold, A. M. (2023). Grape juice reduces the effects of amyloid β aggregation phenotype and extends the longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nutritional Neuroscience*, 26, 1147–1158.

Clavijo, A., Kronberg, M. F., Rossen, A., Moya, A., Calvo, D., Salatino, S. E., Pagano, E. A., Morábito, J. A., & Munarriz, E. R. (2016). The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. *Science of The Total Environment*, 569–570, 252–261.

De Oliveira Caland, R. B., Cadavid, C. O. M., Carmona, L., Peña, L., & De Paula Oliveira, R. (2019). Pasteurized Orange Juice Rich in Carotenoids Protects *Caenorhabditis elegans* against Oxidative Stress and β -Amyloid Toxicity through Direct and Indirect Mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–13.

Fay, D. S. (2013). A biologist's guide to statistical thinking and analysis. *WormBook*, 1–54.

Gubert, P. (2022). Guia para pesquisadores iniciantes em *Caenorhabditis elegans*. Rio de Janeiro: Publicar Editora.

Hoshino, K., Yasui, C., Ikeda, T., Arikawa, K., Toshima, H., & Nishikawa, Y. (2008). Evaluation of *Caenorhabditis elegans* as the Host in an Infection Model for Food-borne Pathogens. *Japanese Journal of Food Microbiology*, 25(4), 137–147.

Hunt, P. R. (2017). The *C. elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology*, 37(1), 50–59.

International Organization for Standardization. (2020). *Water Quality – Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of Caenorhabditis elegans (Nematoda)*. ISO 10872: 2020. Geneva: International Organization for Standardization.

Mansur, R. (2022). Caso Backer: Mais de 2 anos após mortes por intoxicação, Justiça começa a ouvir testemunhas. *G1 Minas — Belo Horizonte*. Disponível em: <https://g1.globo.com/mg/minas-gerais/noticia/2022/05/23/caso-backer-mais-de-2-anos-apos-mortes-por-intoxicacao-justica-comeca-a-ouvir-testemunhas.ghtml>

Menegaro, A.; Flores, A, & Sbardelotto. (2016). Sanitizantes: Concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. *Scientia Agraria Paranaensis*, 15, 2, 171–174.

Mudd, N., & Liceaga, A. M. (2022). *Caenorhabditis elegans* as an in vivo model for food bioactives: A review. *Current Research in Food Science*, 5, 845–856.

Rodrigues, R. M., Souza, A. D. M., Bezerra, I. N., Pereira, R. A., Yokoo, E. M., & Sichieri, R. (2021). Evolução dos alimentos mais consumidos no Brasil entre 2008-2009 e 2017-2018. *Revista de Saúde Pública*, 55, 1–10.

Sant’anna, V., Vommaro, R. C., & De Souza, W. (2013). *Caenorhabditis elegans* as a model for the screening of anthelmintic compounds: Ultrastructural study of the effects of albendazole. *Experimental Parasitology*, 135, 1–8.

Souza Santos, B. (2008). A Universidade no sec. XXI: por uma universidade nova. Cortez Editora: São Paulo.

Souza Santos, B. (2023). O futuro começa agora. São Paulo: Boitempo.

Teixeira, C. R. R. R., & Gemal, A. L. (2014). Segurança Alimentar e Vigilância Sanitária: Dois pesos e duas medidas e a qualidade fora da balança. *Vigilância Sanitária em Debate*, 0(0), 407/202.

WHO. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015. (2015). *Who*. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/.

Zhang, W., Zhang, N., Zheng, S., Zhang, W., Liu, J., He, L., Ezemaduka, A. N., Li, G., Ning, J., Xian, B., & Gao, S. (2022). Effects of commercial beverages on the neurobehavioral motility of *Caenorhabditis elegans*. *PeerJ*, 10, e13563. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.13563>.