



BioDetection Systems

Princípios da Tecnologia CALUX[®]

(*C*hemical- *A*ctivated *L*uciferase *E*xpression)



Dr. Peter A. Behnisch

**Diretor Comercial da Empresa BDS,
Amsterdã, Holanda**





BDS no Amsterdam Sciencepark





BioDetection Systems BV – Perfil

Foco

Fornecer bioensaios inovadores e implementar seus usos nos mais altos padrões internacionais.

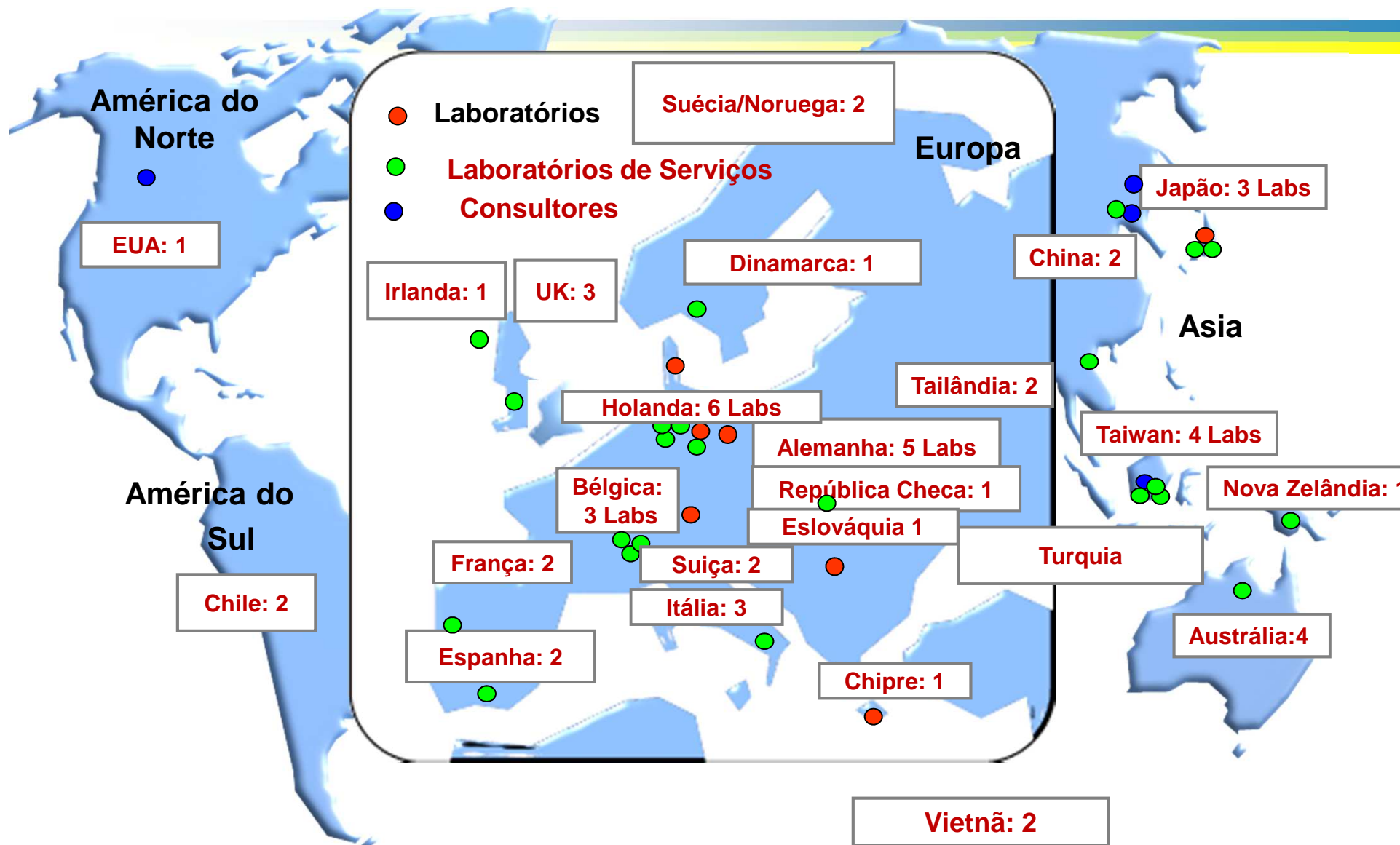
Atividades:

- ISO 17025 serviço de acreditação
- análises
- Licenças para uso dos bioensaios
- Treinamento
- Pesquisa e desenvolvimento
- Consultoria





Aceitação internacional.....



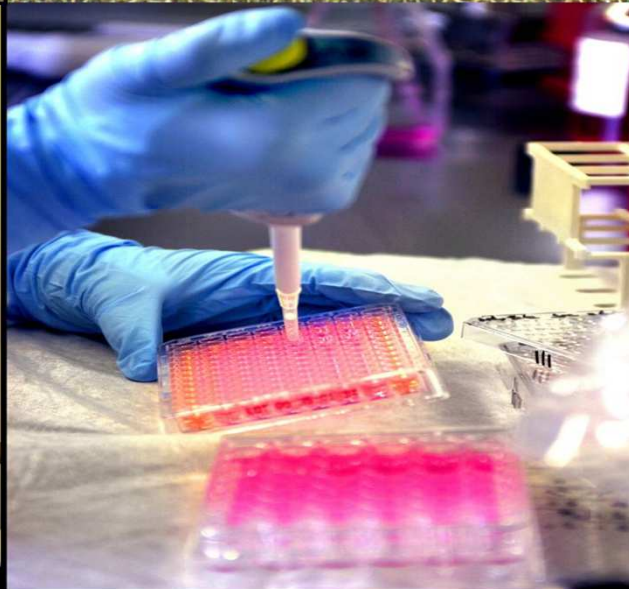
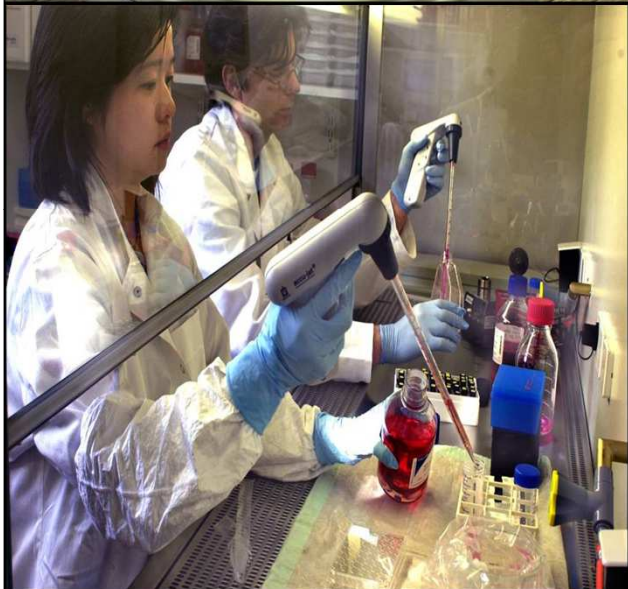
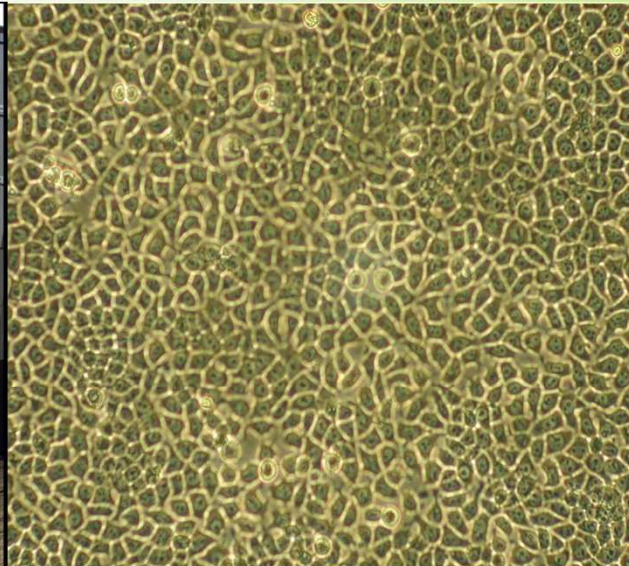


Princípios do CALUX®

Chemical- Activated Luciferase Expression



Cultura de Células e Luminômetro



- **Extração/Limpeza**



Cultura celular

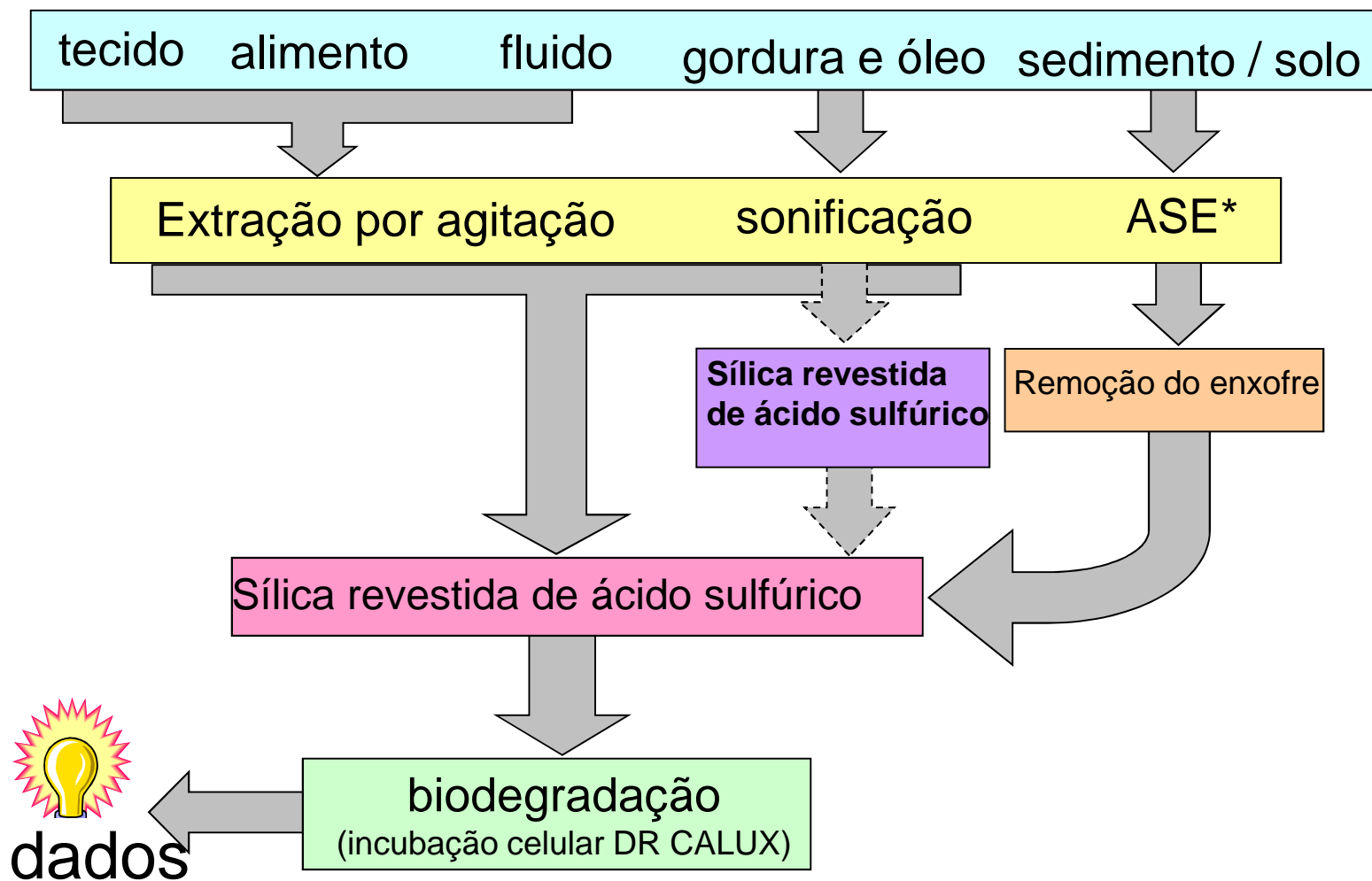


Medição





Visão geral da extração e de “clean-up”



*ASE: Accelerated Solvent Extraction (Extração Acelerada com Solventes)

- **Homogeneização das amostras**



- **Extração**



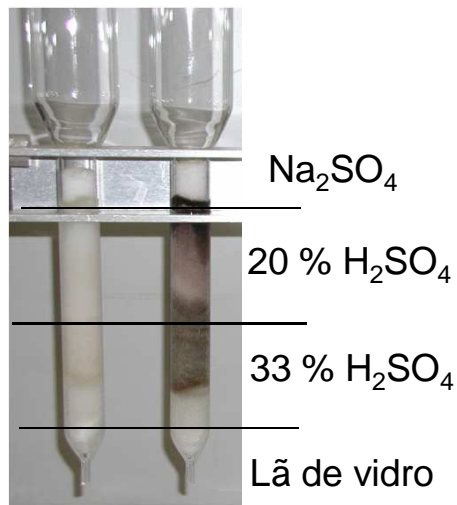
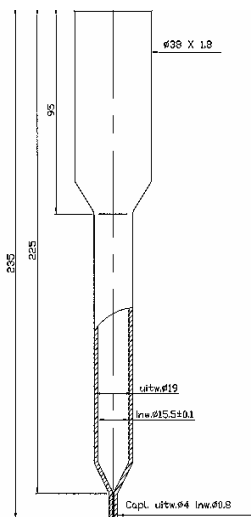


Técnicas de limpeza – coluna de sílica ácida(1)

Oxidação/polimerização da gordura pela sílica ácida e fracionamento cromatográfico

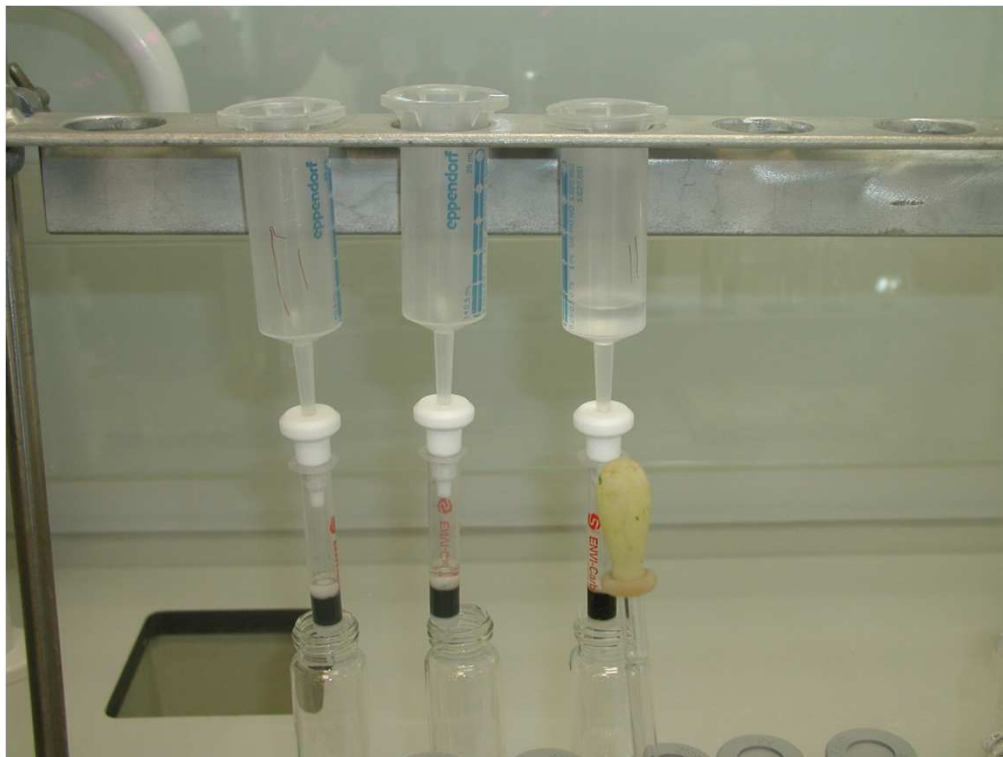
- rápido (15 amostras por hora)
- pequeno volume de solvente (70 – 130 ml)
- alta recuperação (múltiplas camadas)

Capacidade de gordura 0,5 g





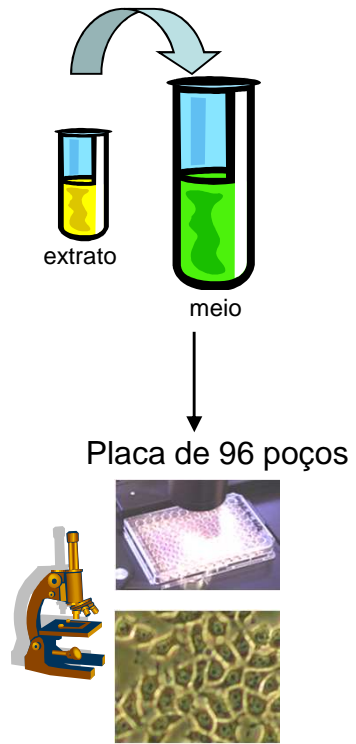
Técnicas de limpeza– coluna de carbono(2) Separação coplanar PCBs dioxinas/furanos



**Protocolo para a coluna
Envi- Carb da Supelco,
ver em:**

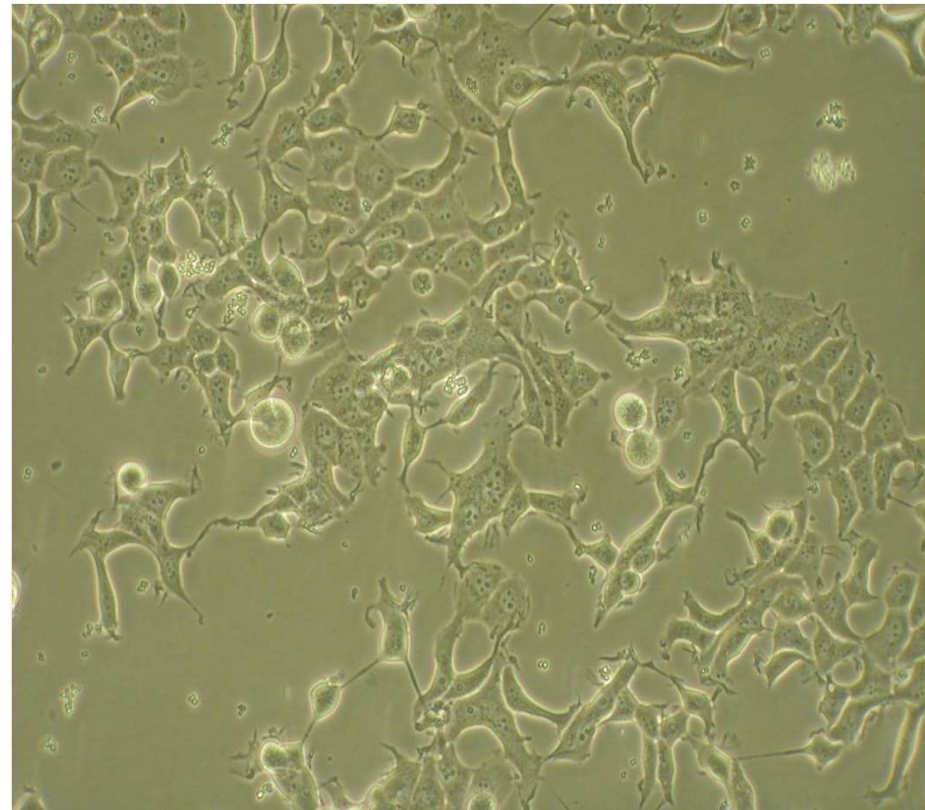
**Concejero et al. J. of
Chromatography A, 917
(2001), 227**

Cultura celular(1)

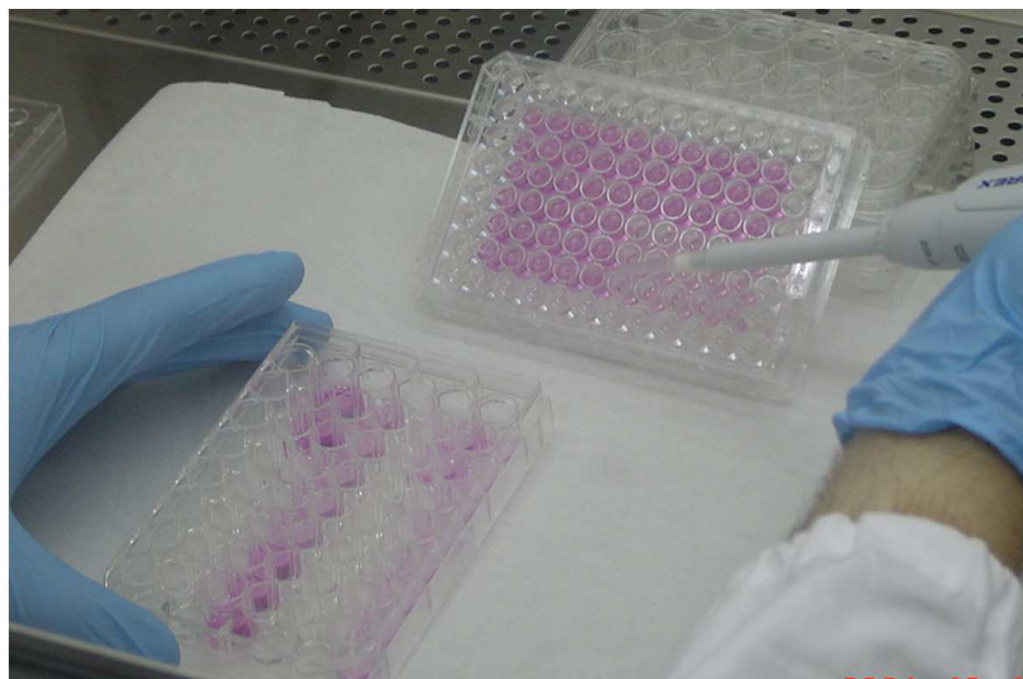




Microscópio -H4II taxa de células do fígado(2)



- **Exposição (pequena quantidade de DMSO em meio)**

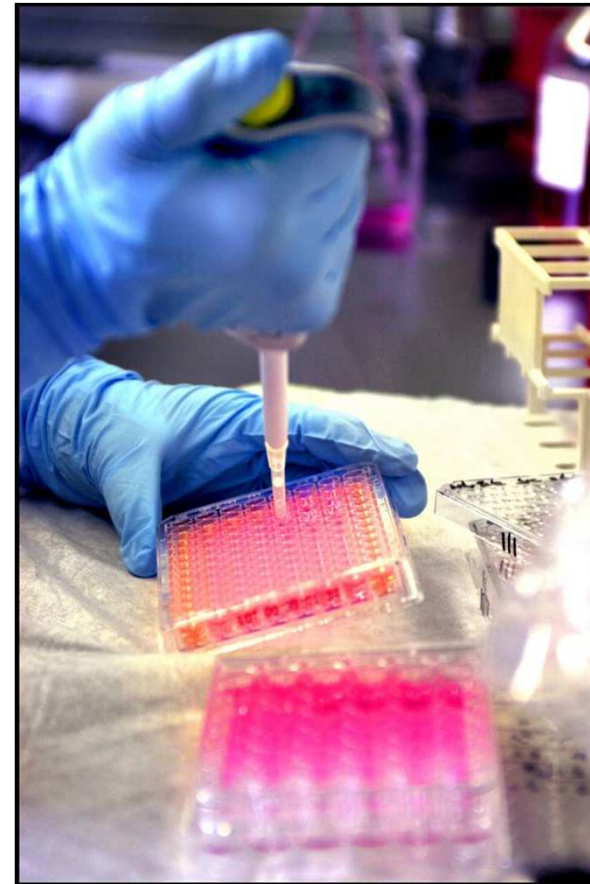




Agitador de placa de 96 poços (5)

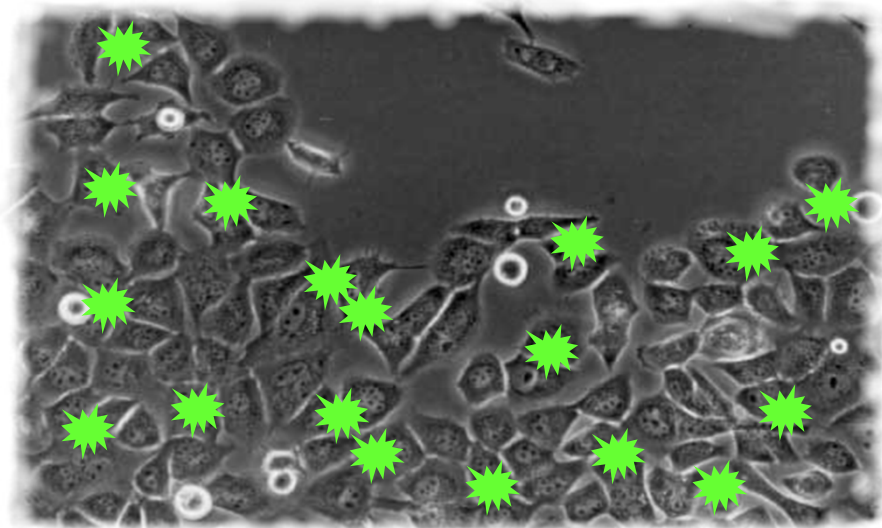


Cultura celular (6)

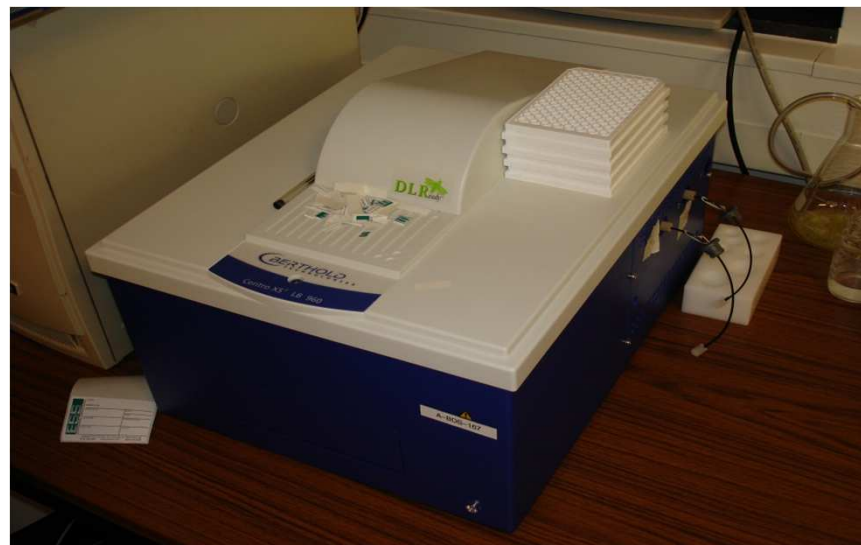




Fácil detecção de emissão de luz



Células DR CALUX[®] emitem luz sempre que substâncias com forma de dioxina estão presentes



Luminômetro Centro XS3
Sistema de detecção Berthold





TEF (Toxic Equivalency Factor) OU TEQ (Toxic Equivalency Quantity)

Compound	WHO TEF	CALUX REP Based on EC50 Values	REP Range (EC20 - EC50)
Dioxins			
TCDD	1	1.00 +/- 0.01	
12378-PeCDD	1	0.73 +/- 0.10	0.44 to 1.02
123478-HxCDD	0.1	0.075 +/- 0.014	0.034 to 0.137
123678-HxCDD	0.1	0.098 +/- 0.017	0.043 to 0.183
123789-HxCDD	0.1	0.061 +/- 0.012	0.028 to 0.114
1234678-HpCDD	0.01	0.031 +/- 0.008	0.015 to 0.058
OCDD	0.0001	0.00034 +/- 0.00008	0.00025 to 0.00049
Furans			
2378-TCDF	0.1	0.067 +/- 0.010	0.040 to 0.104
12378-PeCDF	0.05	0.14 +/- 0.04	0.14 to 0.15
23478-PeCDF	0.5	0.58 +/- 0.08	0.37 to 0.78
123478-HxCDF	0.1	0.13 +/- 0.02	0.07 to 0.20
123678-HxCDF	0.1	0.14 +/- 0.03	0.10 to 0.19
123789-HxCDF	0.1	0.11 +/- 0.02	0.05 to 0.18
234678-HxCDF	0.1	0.31 +/- 0.06	0.31 to 0.31
1234678-HpCDF	0.01	0.024 +/- 0.007	0.019 to 0.031
1234789-HpCDF	0.01	0.044 +/- 0.010	0.032 to 0.059
OCDF	0.0001	0.0016 +/- 0.0005	0.0003 to 0.0058
PCBs			
PCB 77	0.0005	0.0014 +/- 0.0004	0.0012 to 0.0017
PCB 81	0.0001	0.0045 +/- 0.0012	0.0022 to 0.0085
PCB 114	0.0005	0.00014 +/- 0.00002	0.00014 to 0.00017
PCB 126	0.1	0.038 +/- 0.007	0.037 to 0.042
PCB 156	0.0005	0.00014 +/- 0.00002	0.00013 to 0.00019
PCB 169	0.01	0.0011 +/- 0.0003	0.0007 to 0.0017



Visão geral dos materiais de referência do DR CALUX

Materiais de referência BDDs para óleo de peixe e alimentos :

- **Metade do limite da EU para dioxinas,**
- **No limite da EU para dioxinas e**
- **No limite da EU para TEQ Total (Dioxinas e PCBs-dl)**





BDS organiza os testes de proficiência do DR CALUX®



Aviso

BDS Inter-laboratory DR CALUX® Calibration Study 2009 (BICS-2009)

Matrizes:

a definir

Envio de amostra:

meados de 2009

Custos:

Aproximadamente € 500.--



DR CALUX[®]



DR: Dioxin Response

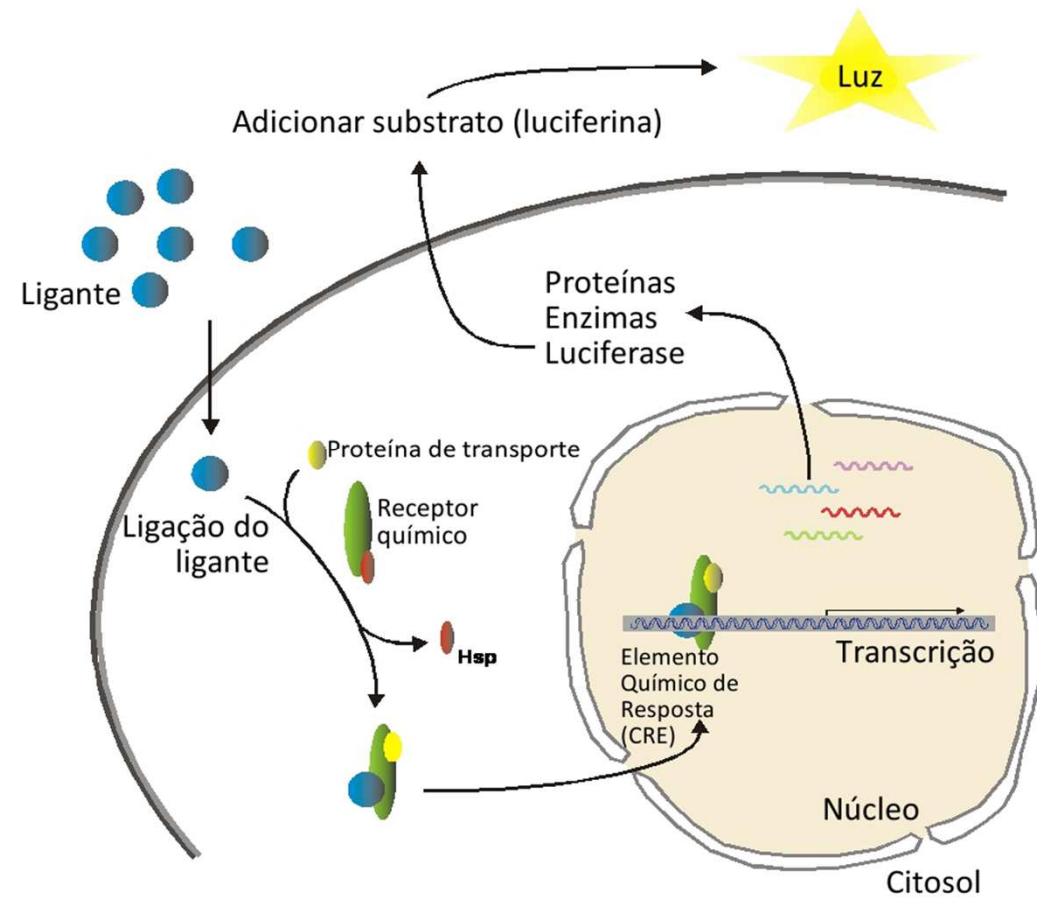
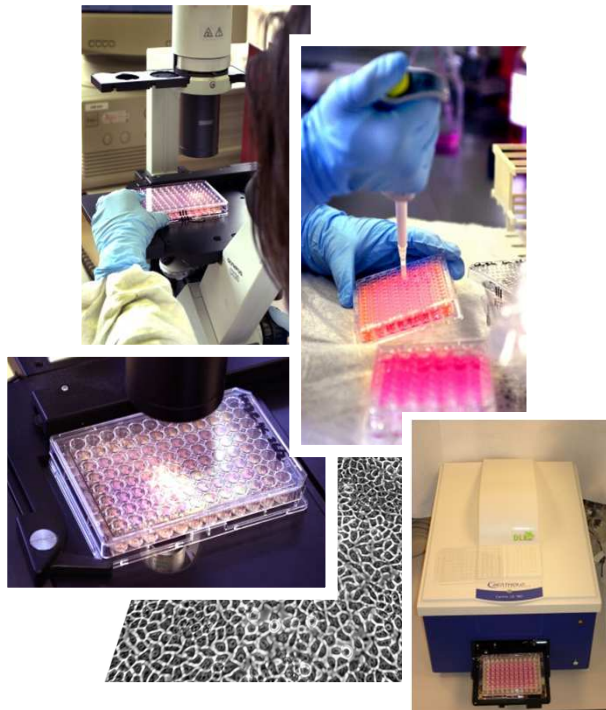


Princípio do método para DR CALUX

DR: Dioxin Response

- a. DR Calux é um procedimento “screening” bioanalítico para compostos “dioxin-like”.
- b. Método baseia-se na habilidade da dioxina e compostos relacionados de ligar e ativar o **receptor AhR** (receptor nuclear /aril hidrocarbono).
- c. Este **receptor AhR** é uma proteína que responde a compostos químicos e que se liga ao DNA.
- d. Esta proteína ativada e ligada ao DNA é responsável pelos efeitos tóxicos e biológicos desses compostos químicos.
- e. A medida do nível de ativação do receptor AhR por um composto químico resulta em formação de luz e fornece uma estimativa da potência relativa e potencial tóxico desses compostos e/ou extratos, com resultados expressos em Equivalentes Tóxicos (TEQs).

Princípio do bioensaio CALUX





CALUX Tests

Aims: eg C Clinical; D Doping; E Envi; F Food/Feed; H Health; P Pharma

<u>BioDetectors</u>	<u>Compounds</u>	<u>Aims</u>	<u>Diseases</u>
DR	Dioxin, PCB, PAHs	E; F; H	Acne; Cancer
ER α , β	EDCs; Estradiol	all	Cancer, Menopause
AR α , β	EDCs; DHT	all	Cancer
TR α , β	Hormons; T3	C; Dust; IodineDef.	Thyroid, Neuro; Brain
GR	Glucocorticoids	all + MS	Asthma; Inflammation
PR	Progsterones	C; P	Fertility
Nf kappa B	Imune, Inflammation	Obesity, Heart Disease; Diabetes	Obesity, Heart Disease; Diabetes
RxR	Metabolic Syndrom (MS)		
PPAR γ 2	TBT	E;H	damage to the aquatic life, Obesity

Which other compounds, aims and projects would be interesting for YOU? 25



A série CALUX-10 da BDS e aplicações típicas

- **DR-CALUX** (dioxinas, furanos, PCBs, POPs, PAHs, ligantes do receptor AhR)
- **ER α -CALUX** (estrógenos naturais e sintéticos, fitoestrógenos, xenoestrógenos (pseudo-estrógenos), DES, interferentes endócrinos, tamoxifeno e outros anti-estrógenos)
- **ER β -CALUX** (como o ER α -CALUX, mais recomendado para fitoestrógenos)
- **AR-CALUX** (andrógenos, esteróides anabólicos, pseudo-andrógenos, antibióticos, promotores de crescimento, nandrolona, flutamida, drogas esteroidais)
- **PR-CALUX** (progesterona, MPA e outros compostos com atividade progesterônica, antidiuréticos esteroidais, antagonistas da aldosterona, inibidores da aromatase)



A série CALUX-10 da BDS e aplicações típicas

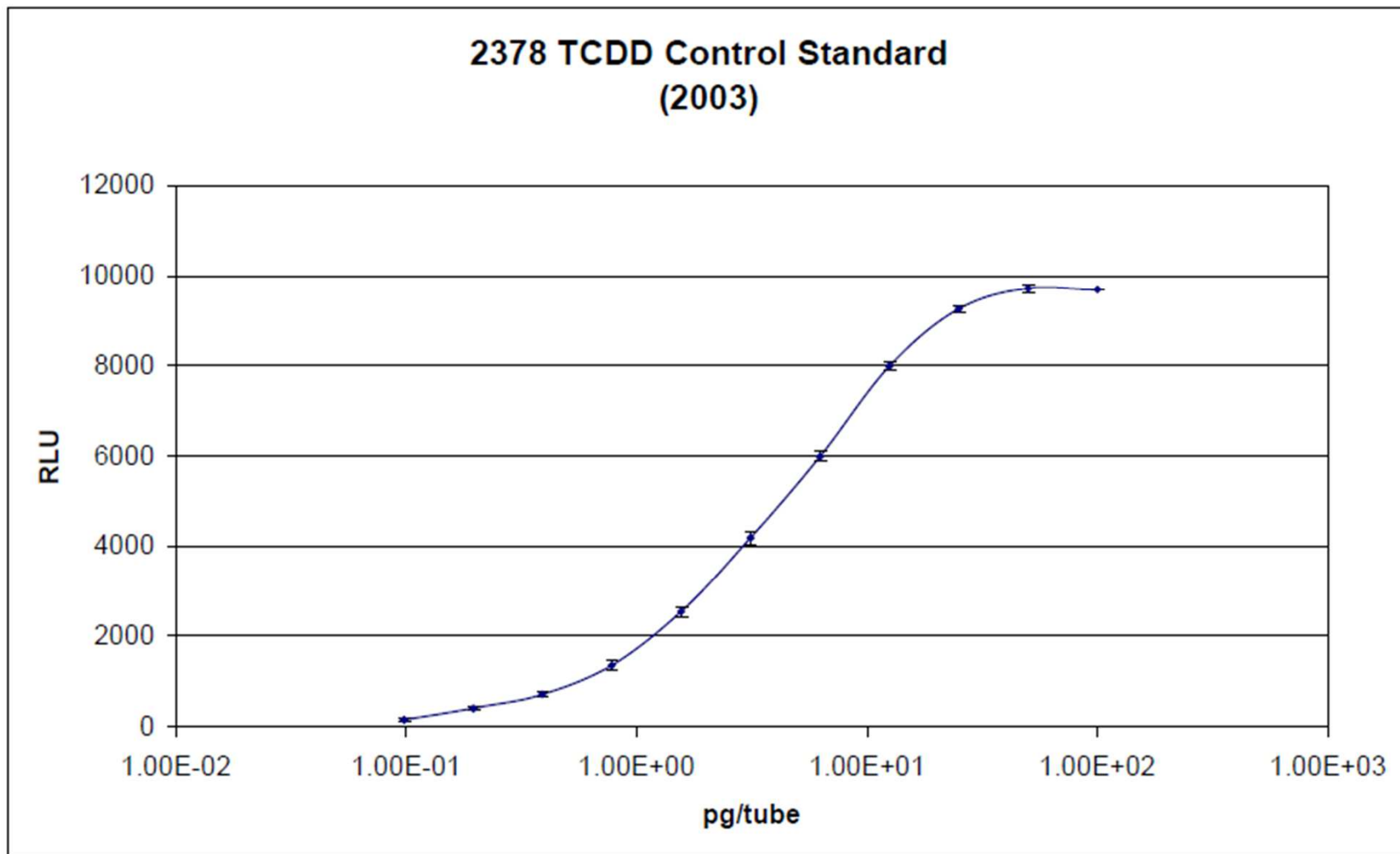
- **GR-CALUX** (cortisol, corticoesteróides)
- **TR β -CALUX** (hormônios da tireóide, agentes antitiroidianos, agentes contrastantes, POPs, poluentes ambientais, nitrofenos)
- **RAR-CALUX** (retinol, vitamina A, retinóides, ácido retinóico)
- **NF- κ B-CALUX** (endotoxinas, moduladores TNF α , citocinas)
- **PPAR γ -CALUX** (derivados de ácidos graxos, proliferadores de peroxissomo, alquil-estanho, ftalatos)



Legislações para DR CALUX®

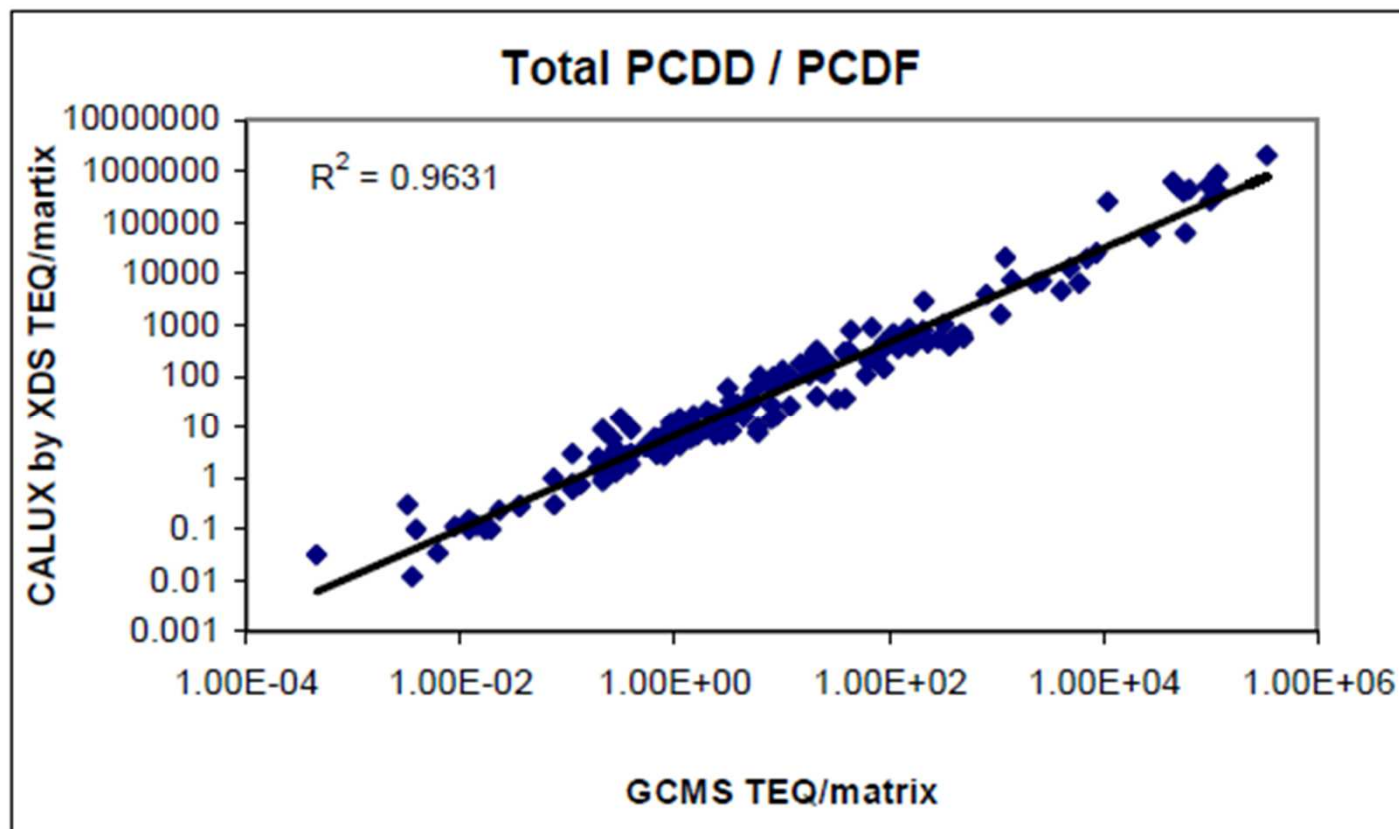


Curva dose-resposta





Correlação CALUX x GC MS





Sedimentos e material de dragagem DR CALUX

Holanda: (50 ng CALUX-TEQ/kg d.w.)

Noruega: (25 ng CALUXTEQ/kg d.w.)

Japão: (150 ng CALUX-TEQ/kg d.w.)

Alemanha: (100 ng CALUXTEQ/kg d.w.)



Solos residenciais

DR CALUX

Holanda: (1.000 ng TEQ/kg)

EUA: (1.000 ng TEQ/kg)

Japão: (1.000 ng TEQ/kg)

Alemanha: (1.500 ng TEQ/kg)



Lodo (*Dutch Sludge Guideline*)

DR CALUX

Holanda: (50 ng CALUX-TEQ/kg d.w.)



Tributilestanho (*TBT*)

PPAR γ 2 CALUX

O TBT foi introduzido no mercado nos anos 40 nos EUA, e na Europa na década de 50. Com grande utilidade na indústria dos plásticos e em tintas anti-incrustantes para barcos.

Holanda: 100-250 $\mu\text{g Sn/kg.dw}$

Holanda: CALUX (em estudos)



Atividade Estrogênica

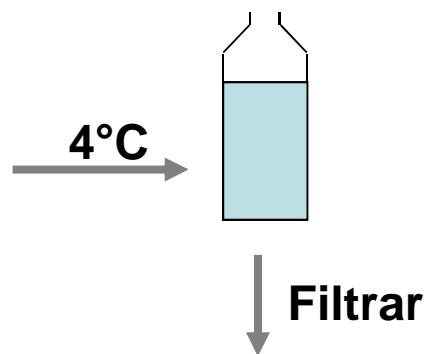
ER CALUX[®]



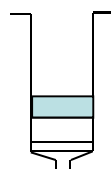
ER: Estrogen Response



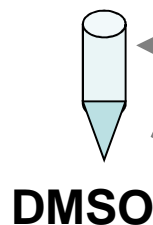
Procedimento para análise de hormônios em água



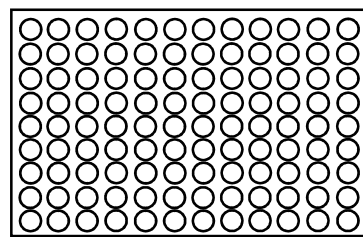
Filtrar



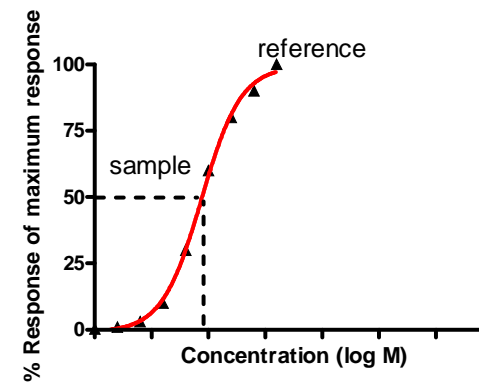
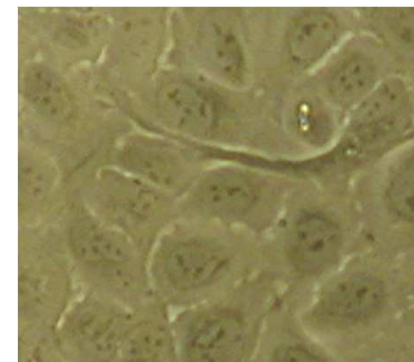
SPE (Oasis-HLB)



DMSO

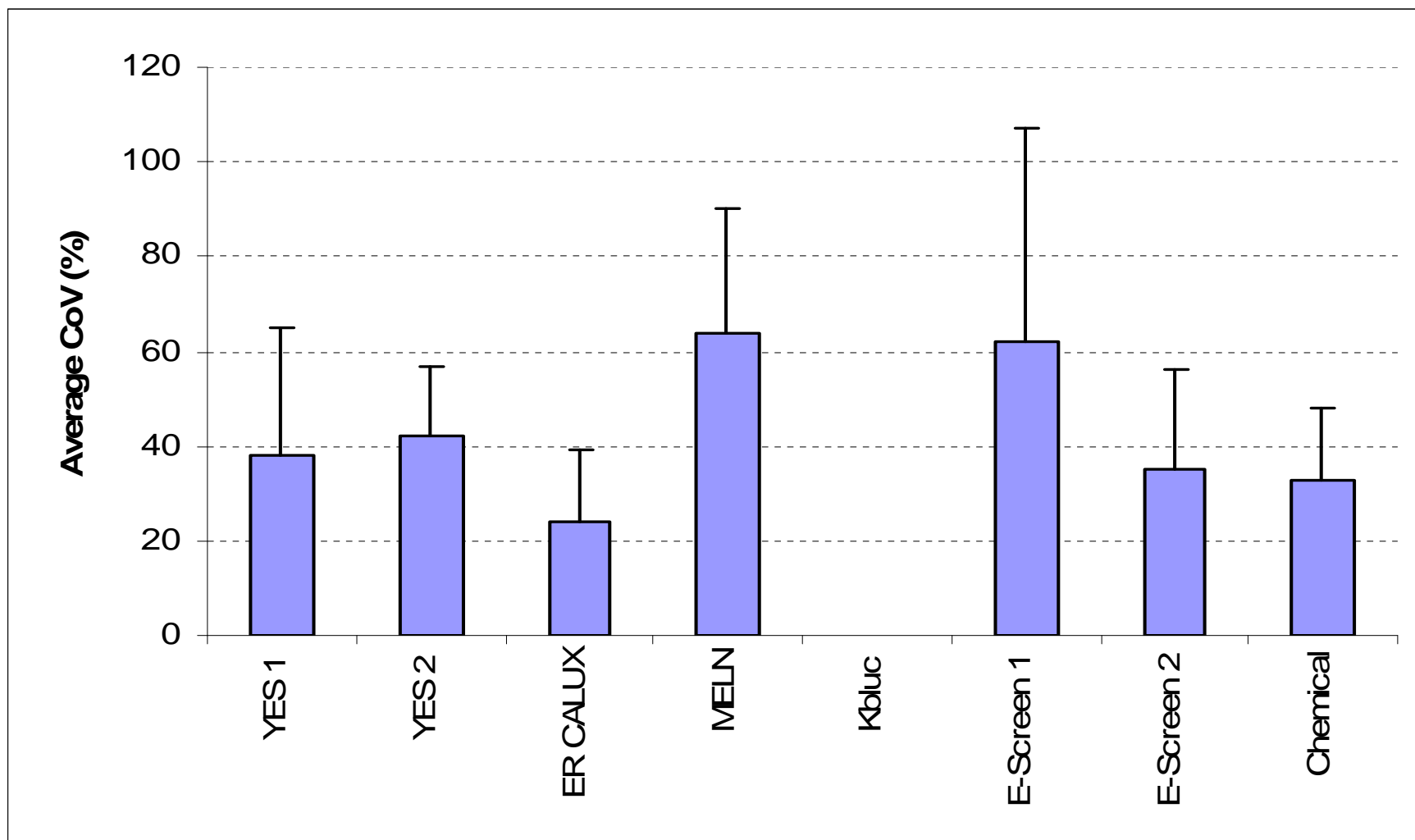


CALUX



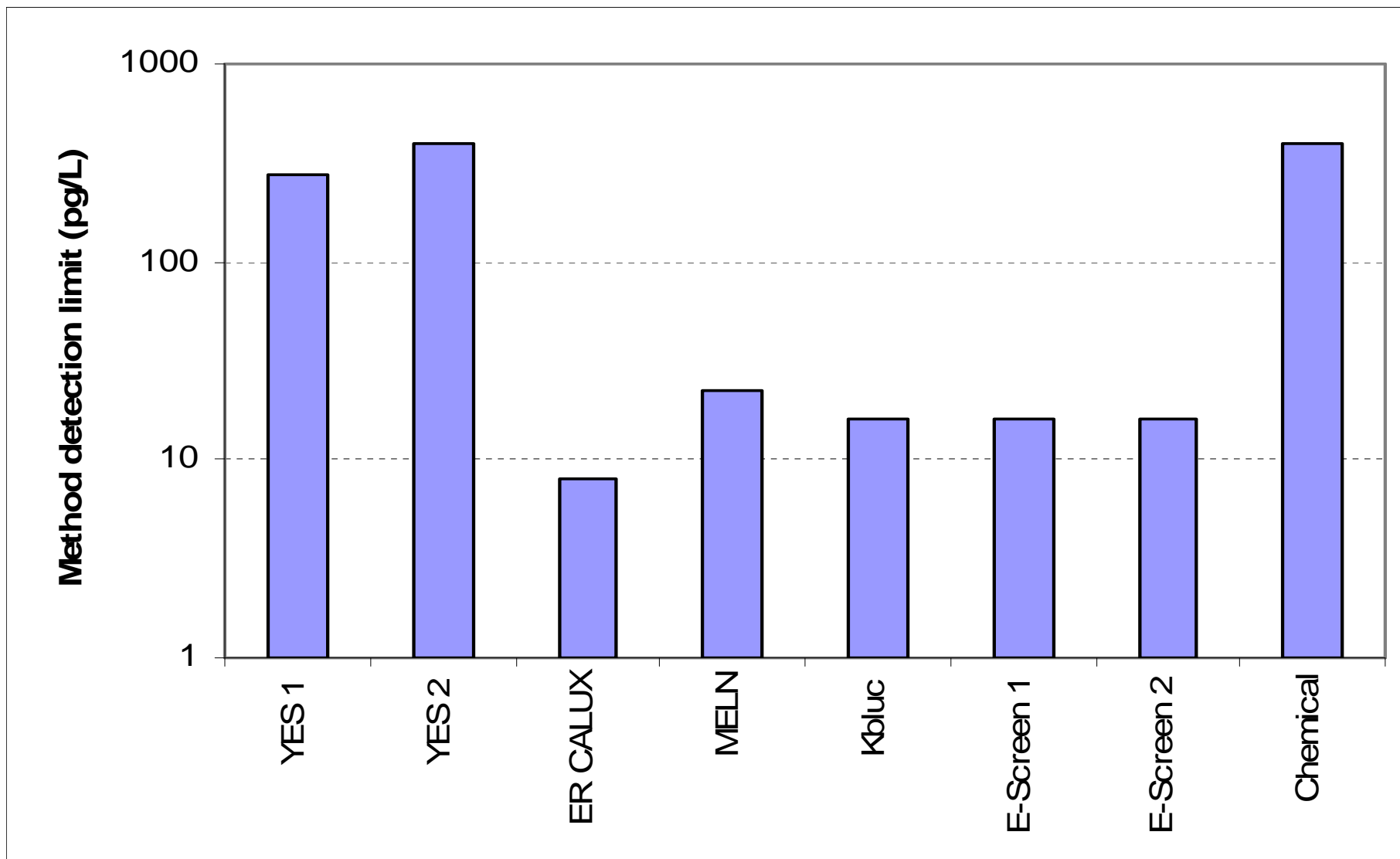


Coeficiente de variação para amostras ambientais



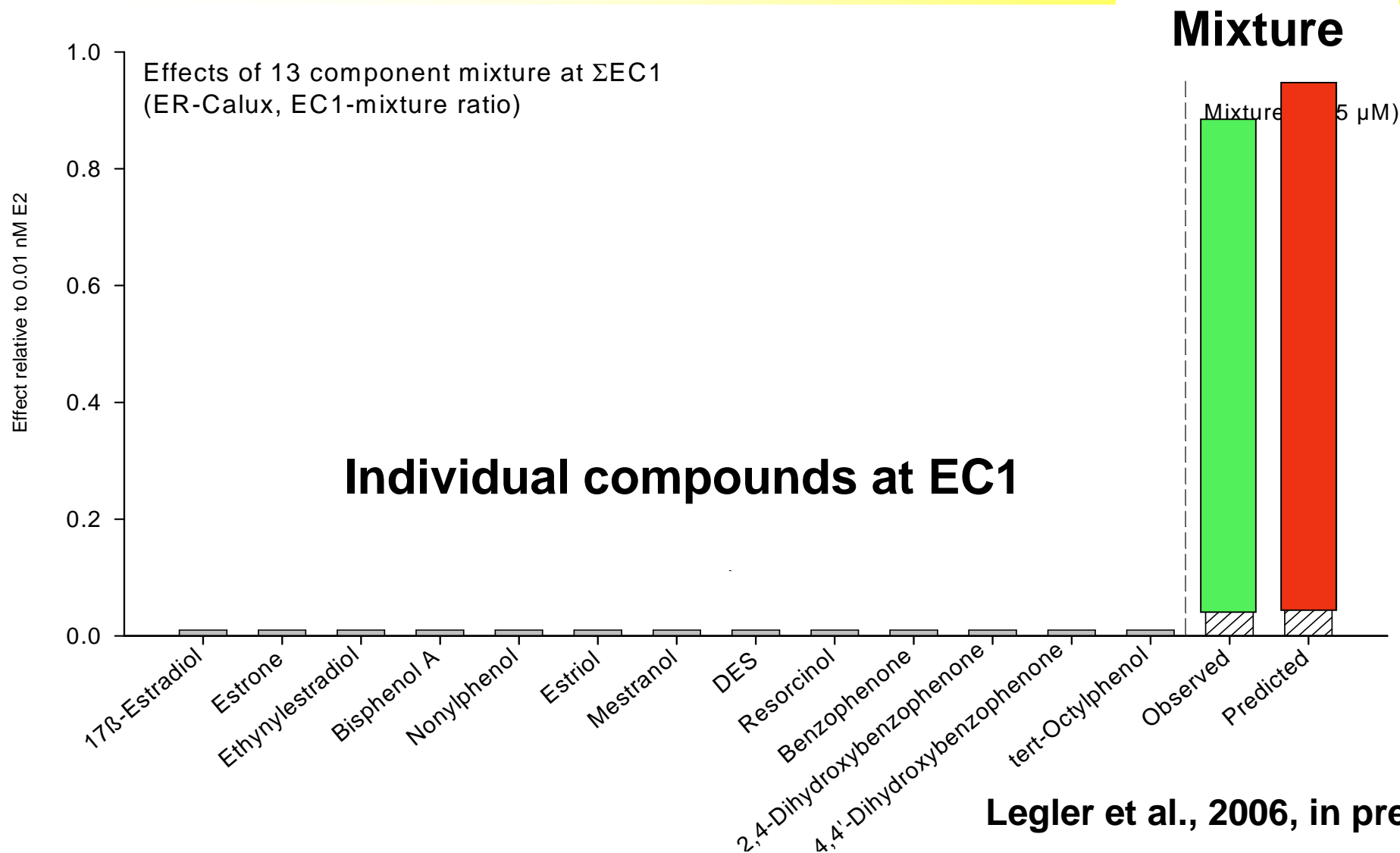


Limites de detecção para (2,5 L) amostra





Multi compound effects



Legler et al., 2006, in prep



EU-ACE project: Complex mixtures of EDCs in marine organisms

**What to do with complex mixtures of pollutants
or what about multi drug miss-use in Doping?**

Dec. 2001 – June 2005;

- Partner 1 – Brunel University, UK (Prof. J. Sumpter, coordinator)**
- Partner 2 – London University, UK**
- Partner 3 – University of Bremen, Germany**
- Partner 4 – Centre for Marine and Enviro Res, Portugal**
- Partner 5 – Dept. of Pharmacochem., VU, Netherlands**
- Partner 6 – IVM, Vrije Universiteit, Netherlands**
- Partner 7 – University of Venice, Italy**





"Flush the pills"

Health facilities flush estimated 100M kilos of drugs a year

Hospitals and other health institutes flush every year 113,4 million kg of un-used pharmaceuticals through the toilet. And this is a conservative estimate according to the *Associated Press*.



bron: Associated Press (via USA Today; 14-9-08)



Legislações para ER CALUX®



Hormone-like compounds in water

- No human health risk based on ADI for 17β -oestradiol and estrogenic activity in surface water (< 1,7 ng EEQ/L) and drinking water (< 0,014 ng EEQ/L)
- Bio-assays are a very suitable screening technique for estrogenic activity in water
- **'Trigger value' of 7 ng EEQ/l** as determined by ER-CALUX, above this value identification of compounds and new risk assessment is needed (safety factor 1000)
- This trigger value is not applicable for ecotoxicological risk assessment



Publicações



Método EPA

METHOD 4435

METHOD FOR TOXIC EQUIVALENTS (TEQS) DETERMINATIONS FOR DIOXIN-LIKE CHEMICAL ACTIVITY WITH THE CALUX[®] BIOASSAY

1.0 SCOPE AND APPLICATION

1.1 Method 4435 is a bio-analytical screening procedure for dioxin-like compounds in soils/sediments. This method is based on the ability of dioxin and related chemicals to activate the Ah receptor (AhR), a chemical-responsive DNA binding protein that is responsible for producing the toxic and biological effects of these chemicals. Measurement of the level of activation of AhR-dependent gene expression by a chemical or chemical extract provides a measure by which to estimate the relative potency and toxic potential of these chemicals and/or extracts with resulting values expressed as Toxic Equivalents (TEQs). Information on a commercially available genetically engineered cell line that contains the firefly luciferase gene under trans-activational control of the AhR (Ref. 41) can be found at the following website: <http://www.dioxins.com/>



YES x CALUX

UK WATER INDUSTRY RESEARCH LIMITED

**ENDOCRINE DISRUPTERS IN SEWAGE SLUDGE : A COMPARISON OF
ANALYTICAL METHODS**

Executive Summary

The oestrogenicity of sewage sludge and soils was determined using the recombinant yeast screen (YES) and the ER-CALUX bioassays. The results obtained from the YES bioassay were inconsistent and show poor correlation in relation to accuracy and recovery for spiked samples. Results obtained from the ER-CALUX bioassay showed that sewage sludge is oestrogenic. However, aqueous leachates of the soil and most of the sludge samples (except primary and activated sludge) gave no oestrogenic response. This suggests that the oestrogenic compounds present in sludge may not leach into groundwater or be bioavailable when applied to land.

Fractionation of solvent extracts of soil and sludge samples showed that in general the majority of oestrogenic activity was associated with two out of five HPLC fractions (F2 and F3). Chemical analysis of fraction F3 showed that it contained free steroid oestrogens and nonylphenols. The other four fractions including F2 were not subject to detailed chemical analysis.

Marine Pollution Bulletin 60 (2010) 2026–2042



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul



Application of bioassays in toxicological hazard, risk and impact assessments of dredged sediments

C.A. Schipper^{a,*}, I.M.C.M. Rietjens^b, R.M. Burgess^c, A.J. Murk^{b,d}

^aDeltares, P.O. Box 177, 2600 MH Delft, The Netherlands

^bWageningen University, Toxicology Section, P.O. Box 8000, 6700 EA Wageningen, The Netherlands

^cUnited States Environmental Protection Agency, ORD/NHEERL Atlantic Ecology Division, 27 Tarzwell Dr., Narragansett, RI 02882, United States

^dWageningen Imares, P.O. Box 68, 1970 AB IJmuiden, The Netherlands



Outras creditações/aprovações do DR CALUX®

- **Austrália:** aceito na NATA
- **Japão:**
 - Industrial Standards (JIS) - Diretrizes para ensaio de ligação de gene reporter em receptor arylhydrocarbon (em andamento)
 - DR CALUX é desde 2003 oficialmente aceito para solos e sedimentos
- **Noruega:**
 - Diretrizes de sedimentos: DR CALUX recomendado; nível recomendado por diretriz é 25 ng TEQ/kg dw
- **Holanda:**
 - Diretrizes de sedimentos: DR CALUX obrigatório; nível recomendado por diretriz é 100 ng TEQ/kg dw
- **USA:** EPA 4435 (2008) para CALUX



Avaliações internacionais do DR CALUX®

Sistema de Biotecção B.V. (“BDS”) CALUX® O bioensaio foi avaliado em vários países com diferentes programas de avaliação como

Europa:

- DIFFERENCE 2002-2005 (veja www.dioxins.nl) e HORIZONTAL 2005-2007 Project
- EU International Intercalibration study 2002 (Gizzy et al.)
- International Intercalibration study RINCA and BICS
- Acreditação de laboratório individual ISO 17025 (como para BDS ou outros usuário de EU CALUX)

Ásia:

- Japão: Diversos testes inter laboratoriais com todos os tipos de biodetectores para dioxinas e compostos com forma de dioxina, por exemplo para solo, sedimento, cinzas e diferentes amostras complexas poluídas (2002-2006)
- Coréia: NIER fez um estudo comparativo de diversas matrizes ambientais (2007)

USA:

- SITE Report



Benefícios da Tecnologia CALUX® para a CETESB

- ✓ Teste *screening* mais rápido que a Cromatografia
- ✓ Maior número de amostras que a Cromatografia
- ✓ Teste 80% mais barato que a Cromatografia
- ✓ A Cromatografia seria utilizada nas análises confirmatórias para compostos individuais
- ✓ Correlação forte entre Cromatografia x CALUX
- ✓ Aumento no levantamento de áreas contaminadas
- ✓ Monitoramento dos solos, sedimentos e atividades de dragagem
- ✓ Aumento dos estudos de diagnósticos ambientais
- ✓ Cada vez mais, são derivados valores para legislação (*guidelines*)
- ✓ Atualmente há método EPA
- ✓ Importante: o teste mostra o efeito biológico (**misturas complexas**), o que não ocorre com os métodos químicos analíticos (espectrometria/cromatografia, etc)



ELTA: Setor de Análises Toxicológicas





OBRIGADO