

## ENSAIOS DE FLUORESCÊNCIA DE ALGAS EM TESTES DE TOXICIDADE

Palavras-Chave: LUMINESCÊNCIA, ALGAS, TOXICOLOGIA, TESTE RÁPIDO.

Autores(as):

JULYA CABRAL DE MOURA TAVARES, FT - UNICAMP

Prof. Dr. CRISTIANO DE MELLO GALLEP (orientador), FT - UNICAMP

### INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da fabricação em massa, apesar de vantajoso em relação aos aspectos de variedade e velocidade, trouxe consigo muitos prejuízos, principalmente no que diz respeito ao meio ambiente. Por esse motivo, faz-se necessário o estudo da ecotoxicologia, que trata-se justamente dessa interação das substâncias - naturais ou sintéticas - e seus efeitos sobre o meio biótico. Assim, o estudo ecotoxicológico busca entender tais relações para, assim, solucionar os danos que podem ser causados devido a esse tipo de poluição, principalmente, no que diz respeito a produtos farmacêuticos e pesticidas.

Este trabalho busca comparar os resultados obtidos por método ecotoxicológico tradicional,

baseados na avaliação do crescimento de colônia de algas em 72h, com os dados obtidos por técnica fotônica, a partir do perfil da fluorescência atrasada [delayed luminescence (DL)] nessas colônias, conforme desenvolvido por Katsumata e colaboradores [1-5]. Dessa forma, foram executados testes de toxicidade de ametrina [6], NaCl [7] e, eventualmente, sulfato de zinco [8], mostrando que os dados de DL podem indicar precocemente a toxicidade da solução, com respostas mais rápidas - de 1h a 6h após inoculação - em comparação com o teste tradicional (72h).

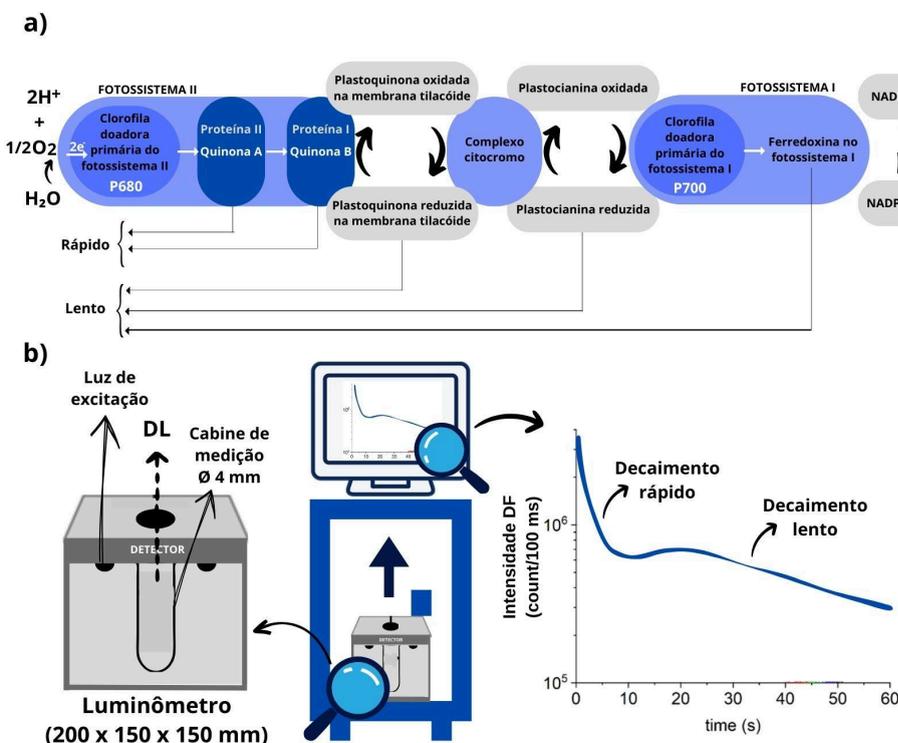


Fig.1 - Teste de DF de amostra de alga (a) base fisiológica do fenômeno e (b) esquema de montagem/ação para realização dos testes (a partir de Katsumata [3]).

O método da DL em testes com algas foi desenvolvido pelo grupo de Katsumata, utilizando-se da resposta conjunta dos sistemas fotossintéticos PS-I e PS-II. Esse sistema tem como base a recombinação de cargas e o transporte de elétrons, sendo os primeiros receptores de elétrons as quinonas QA e QB, que estão localizados próximo à molécula de P680 no fotossistema II, o que resultaria na observação do componente rápido da DL, pela recombinação de cargas entre P680 e QA ou QB. Por outro lado, os portadores de elétrons subsequentes, como a plastoquinona na piscina da membrana tilacóide, a plastocianina e a ferredoxina no fotossistema I, estão localizados mais distantes do fotossistema II, e, portanto, seriam observados como o componente lento da DL, como ilustrado na **Figura 1(a)**. A **Figura 1(b)** ilustra o sistema utilizado para este tipo de teste: basicamente uma câmara escura associada à contador de fótons e sistema de iluminação controlado, e a resposta típica da DL.

## METODOLOGIA

Os testes de toxicidade crônica com *R. subcapitata* são desenvolvidos no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) e os perfis de DL são medidos com uso de dispositivo de fóton-contagem disponível no Laboratório de Fotônica Aplicada (LaFA). Cada teste de toxicidade conta com, no mínimo, 4 concentrações do composto em estudo mais o grupo controle e o branco (amostra contendo alga, oligo e solvente), quando há necessidade. Os organismos são cultivados no LAEG em meio nutritivo conforme a norma ABNT 12648/2011; testes de toxicidade são realizados conforme norma ABNT NBR 12648:2018 [9] e o  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  foi seco em estufa e mantido em dessecador.

Conforme apresentado na **Figura 2**, o procedimento para o teste ocorre da seguinte maneira: (1) preparação do meio oligo (cultivo) para estoque e frascos Erlenmeyer (50mL); (2) lavagem e esterilização

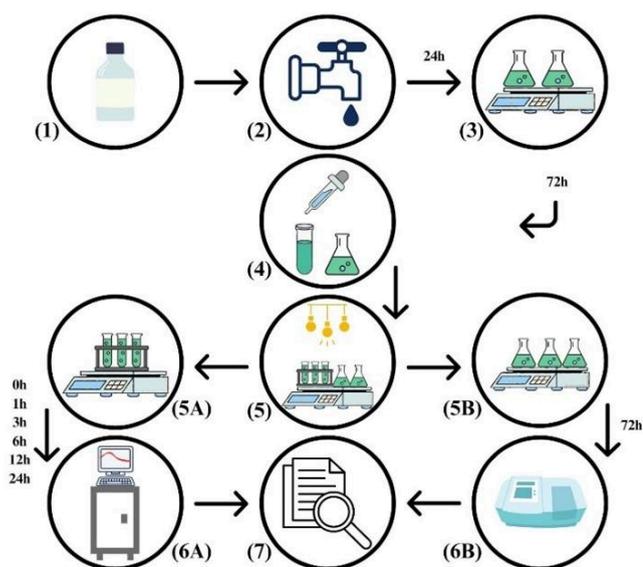


Fig. 2 - etapas de preparo do teste convencional e alternativo.

do material; (3) preparação do inóculo; (4) inoculação das amostras de algas; a quantidade restante é completada com solução oligo e água esterilizada (20 mL para os frascos Erlenmeyer e 10 mL para os tubos de ensaio); (5) cultivo em agitador, com: (5A) teste de DL, usando uma câmara de contagem de fótons (6A), realizado imediatamente após (0h) e 1, 3, 6 e 12 horas após a inoculação e (5B) o teste convencional (absorção da amostra) após 72 horas, usando um espectrofotômetro (6B); e, finalmente, (7) a análise dos dados.

As amostras-mãe de algas são mantidas em condições padrão [10], e cada amostra é realizada em triplicata; os testes de DL são feitos em um sistema de contagem de fótons (Fig.2- 6A: PMX-6100), com

as amostras mantidas no escuro por 60s; em seguida, expostas à luz branca (30s) e à luz infravermelha (@700nm, 1s), e a luminescência retardada e decrescente registrada após por 60s, usando um tempo de integração de 0,1s (ou seja, cnt/0,1s). Os dados de DL triplicados são calculados em média, e o grupo de controle é utilizado como referência.

Análogo ao padrão, o índice de inibição da absorbância (iG) - obtido pela absorbância relativa em relação aos dados do grupo de controle após 72 horas de crescimento - um índice de inibição da DL (iDL) pode ser determinado comparando o número total de contagem de fótons, ao integrar sobre uma janela específica do perfil temporal da DL (5 a 35s), onde ocorre uma oscilação amortecida peculiar relacionada à resposta rápida e lenta do complexo fotossintético. Assim, os diferentes padrões de DL são traduzidos em um diagrama de dados de dose x resposta e plotados juntamente com o iG padrão, para comparação qualitativa e quantitativa. Os dados podem ser visualizados no tempo, como apresentado na **Figura 3** para o caso do NaCl. Comparando-se dados do perfil temporal da DL das amostras sob estresse com a da amostra-controle, é possível determinar a inibição da DL e correlacioná-la com a toxicidade da solução.

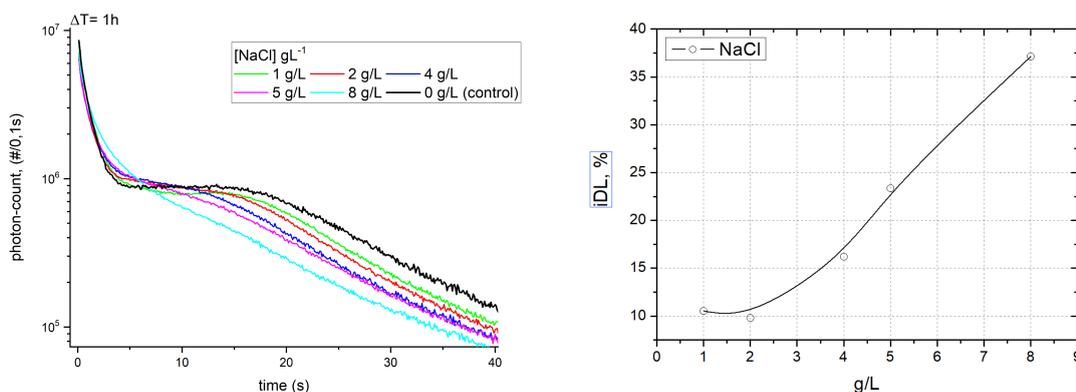


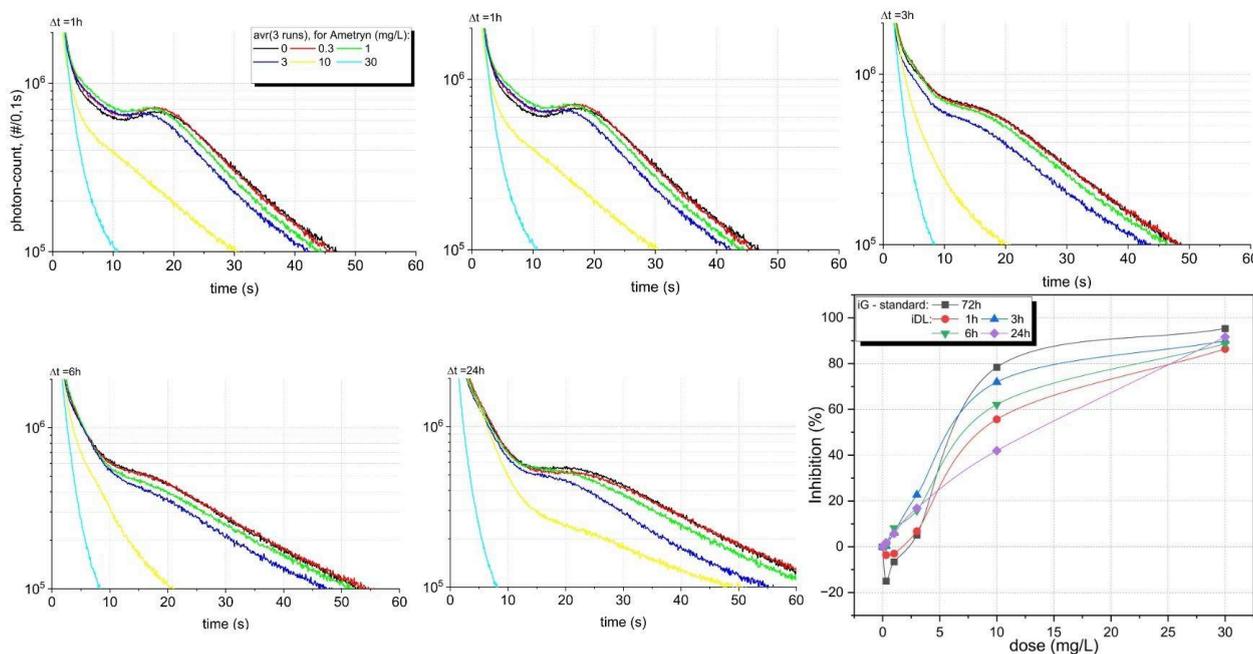
Fig. 3 - Testes de DL: resultado da inibição após 1h de exposição da alga ao NaCl (média das triplicatas); perfis de DL e índice iDL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

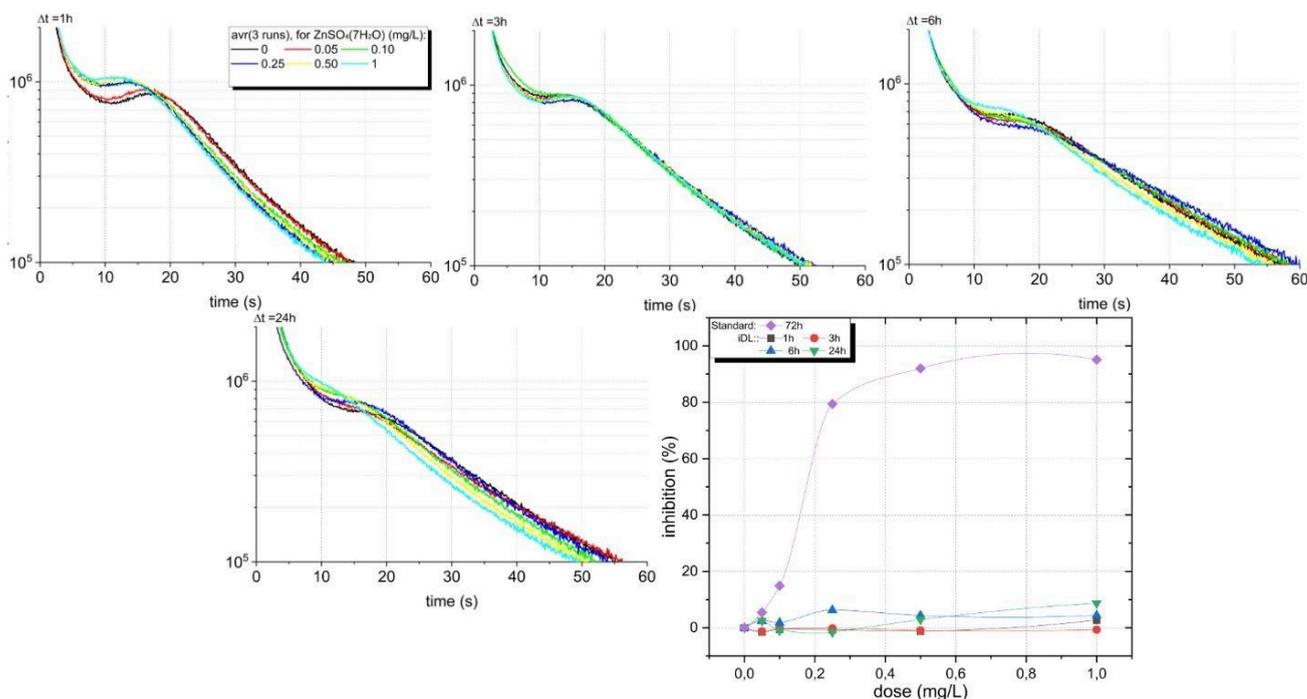
Foram realizados testes de sensibilidade com o sal NaCl, testes com o herbicida ametrina e com o sulfato de zinco. Esses resultados foram apresentados em congressos internacionais [6-8]. Como pode-se observar na **Figura 4**, em apenas 1h após inoculação da substância tóxica (ametrina), através do método da DL, já é possível visualizar a inibição de luminescência.

Em seguida, foram realizados testes utilizando-se a solução de sulfato de zinco e as concentrações definidas para trabalhar com os dois testes (alternativo e tradicional) foram: 0, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 e 1 mg/L. O resultado, para o teste de 72h, apresentou valores de CI50 igual a 0,18 mg/L e CENO igual a 0,07 mg/L. No entanto, o mesmo não foi observado para o teste alternativo que, pela análise da integral da curva, praticamente não apontou toxicidade por parte da solução (**Figura 5**). Porém, ao observar que as amostras apresentaram um decaimento ainda mais rápido, principalmente para as concentrações maiores, decidi estudar um novo método de análise para entender melhor a resposta fotônica para esse

tipo de estressante, buscando também compreender ainda mais as trocas de carga nos fotossistemas I e II, a fim de elaborar um método de análise que possa ser utilizado para qualquer substância ou, pelo menos, para os metais.



**Fig. 4** - Gráficos de DL para diferentes concentrações de ametryn (0-controle, 0.3, 1, 3, 10 e 30 mg/L) nas leituras de 1, 3, 6 e 24h (DL), e a correspondente relação entre inibição e dosagem para DL (iDL, % em relação ao controle) e iG (inibição de crescimento - obtida através do método convencional de 72h).



**Fig. 5** - Gráficos de DL para diferentes concentrações sulfato de zinco nas leituras de 1h, 3h, 6h e 24h (DL), e a correspondente relação entre inibição e dosagem para DL (iDL, % em relação ao controle) e iG (inibição de crescimento - obtida através do método convencional de 72h).

Assim, o teste com sulfato de zinco foi repetido, e o resultado está apresentado na **Figura 6**. Nesse caso, a análise através da integral é válida, mas como pode-se observar, o decaimento para esse tipo de

substância ainda é mais rápido quando comparado a teste de sensibilidade, por exemplo, reforçando a necessidade de compreender a relação entre as trocas de carga nos fotossistemas.

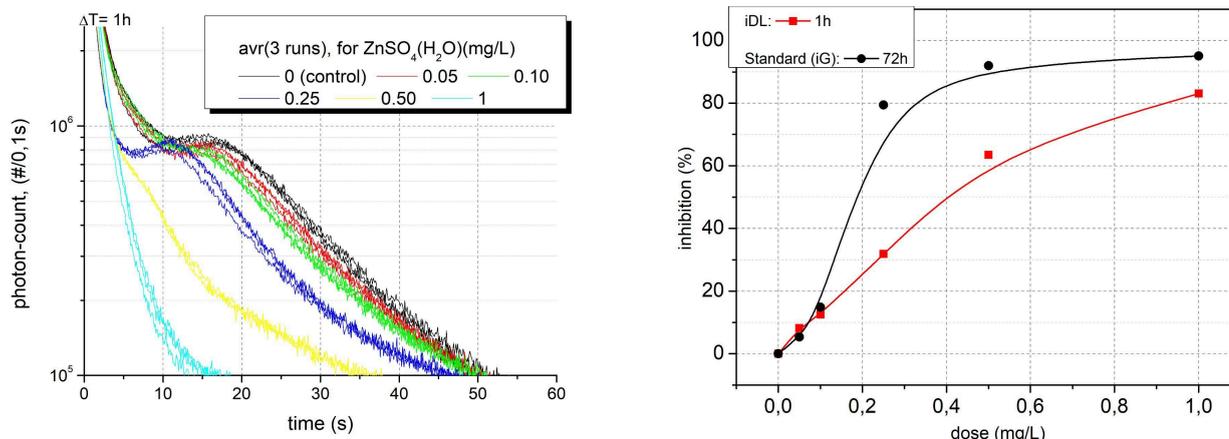


Fig. 6 - Gráficos de DL para diferentes concentrações sulfato de zinco na leitura de 1h após montagem, e a correspondente relação entre inibição e dosagem para DL (iDL, % em relação ao controle) e iG (inibição de crescimento - obtida através do método convencional de 72h).

## CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, conseguimos parcialmente demonstrar a viabilidade de testes de fluorescência em algas como indicador precoce para toxicidade aquática, com menor tempo de teste e menor gasto de insumos. Para os próximos passos, pretende-se estudar novos métodos de análise da curva DL, a fim de padronizar o método para as demais substâncias.

## BIBLIOGRAFIA

- [1]- KATSUMATA, M et al. Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Water Research* 40 (18), 2006.
- [2]- KATSUMATA, M. et al. Utility of Delayed Fluorescence as Endpoint for Rapid Estimation of Effect Concentration on the Green Alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Bull Environ Contam Toxicol* (2009) 83:484–487.
- [3]- KATSUMATA, M. et al. Delayed fluorescence as an indicator of the influence of the herbicides Irgarol 1051 and Diuron on hard coral *Acropora digitifera*. *Marine Pollution Bulletin* (2017).
- [4]- KATSUMATA, M. et al. Validation of rapid algal bioassay using delayed fluorescence in an interlaboratory ring study. *Science of the Total Environment* (2017)
- [5]- KATSUMATA, M. et al. Quantitative prediction of the growth inhibition of various harmful chemicals by statistical analysis of delayed fluorescence decay curves obtained from the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology* (2023).
- [6]- J. C. De Moura Tavares and C. De Mello Gallep, "Rapid Toxicological Tests Using Algae Luminescence," *2023 SBMO/IEEE MTT-S International Microwave and Optoelectronics Conference (IMOC)*, Castelldefels, Spain, 2023, pp. 160-162, doi: 10.1109/IMOC57131.2023.10379749.
- [7]- C. M. Gallep, J. C. M. Tavares and M. V. da Silva, "Algae Luminescence Dynamics Applied for Fast Toxicological Testing," *2023 Photonics & Electromagnetics Research Symposium (PIERS)*, Prague, Czech Republic, 2023, pp. 1149-1151, doi: 10.1109/PIERS59004.2023.10221365.
- [8]- J. C. De Moura Tavares and C. De Mello Gallep, "Algae delayed luminescence dynamics altered by Zinc stress - preliminary data," **apresentado no 2024 International Symposium of Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC)**, Foz do Iguaçu, Brazil, 2024.
- [9] - ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12648:2018. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). ABNT/CEE-106 Análises Ecotoxicológicas. Disponível em: <<https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=391089>>.
- [10] ABNT NBR 12648-2018 / OECD 201/2011 - Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.