

## 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.

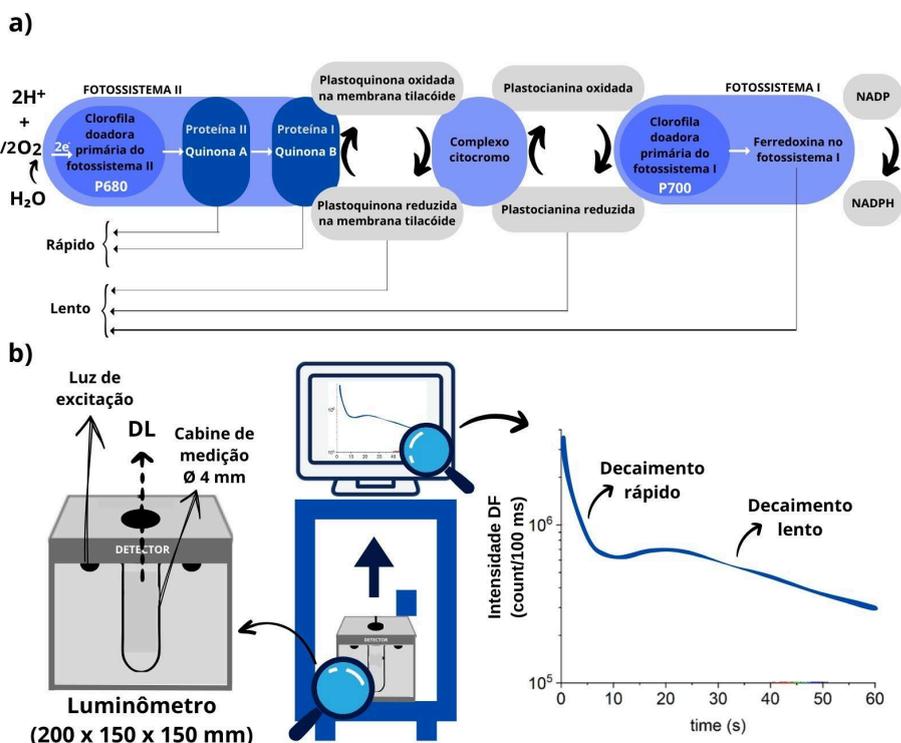


Fig.1 - Teste de DF de amostra de alga (a) base fisiológica do fenômeno e (b) esquema de montagem/ação para realização dos testes (a partir de Katsumata [3]).

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).

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 **Fig.1(a)**. A **Fig.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 **Fig. 2**, o procedimento para o teste ocorre da seguinte maneira: (1)

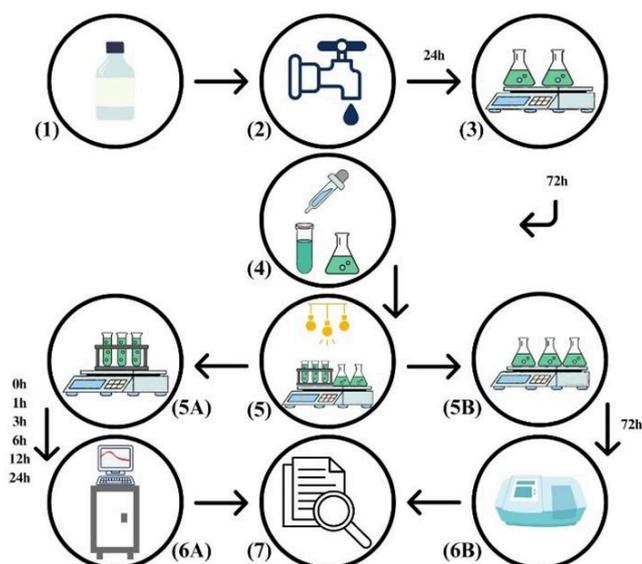


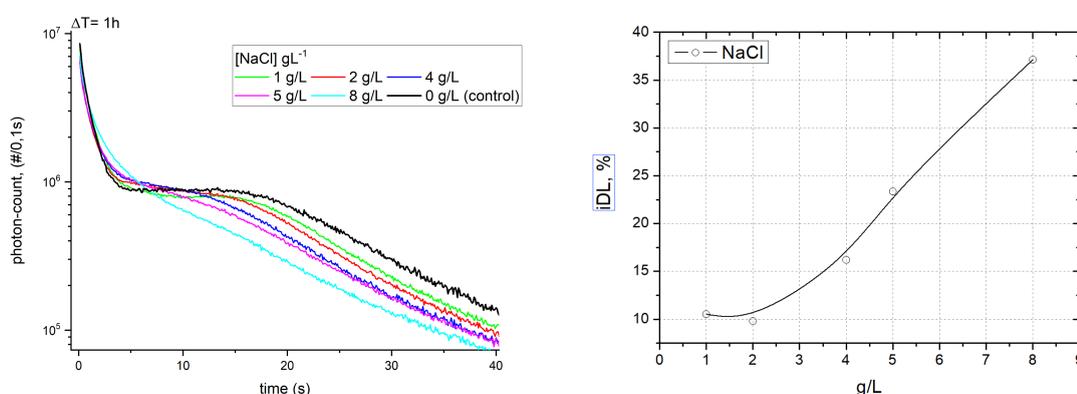
Fig. 2 - etapas de preparo do teste convencional e alternativo.

preparação do meio oligo (cultivo) para estoque e frascos Erlenmeyer (50mL); (2) lavagem e esterilização 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 **Fig. 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 utilizando solução de nitrato de prata. Inicialmente, foi conduzido um teste preliminar empregando o método tradicional, amplamente estabelecido, com o objetivo de determinar as concentrações a serem utilizadas nos próximos experimentos. Para essa etapa, as concentrações iniciais adotadas foram: 0 (controle); 0,004724; 0,04724; 0,4724 e 4,724 mg/L. A relação entre a dose aplicada e a inibição do crescimento resultou em um CI (50) igual a 0,0282 mg/L.

Com base nos resultados preliminares, as concentrações selecionadas para os testes, tanto pelo método tradicional quanto pelo alternativo, foram: 0; 0,005; 0,015; 0,05; 0,15 e 0,5 mg/L. Os resultados obtidos para o método da DL podem ser visualizados na **Fig. 4**.

Observa-se que, embora o método fotônico apresente uma relação proporcional entre a dosagem e a inibição da luminescência, as curvas de inibição da luminescência (iDL) não acompanham de maneira precisa a curva de inibição do crescimento (iG) quando analisadas pela integração das curvas no intervalo de 5 a 35 segundos (**Fig. 5** - direita). Esse mesmo comportamento já havia sido observado em testes anteriores com sulfato de zinco (**Fig. 5** – esquerda).

Para ambos os metais, verificou-se que as amostras apresentaram um decaimento ainda mais acelerado, especialmente em concentrações mais elevadas. Diante disso, o grupo decidiu investigar um novo método de análise que permita compreender melhor a resposta fotônica frente a esse tipo de estressor. O objetivo é aprofundar o entendimento das trocas de carga nos fotossistemas I e II e desenvolver uma abordagem analítica que possa ser aplicada a diferentes substâncias ou, pelo menos, à análise de metais.

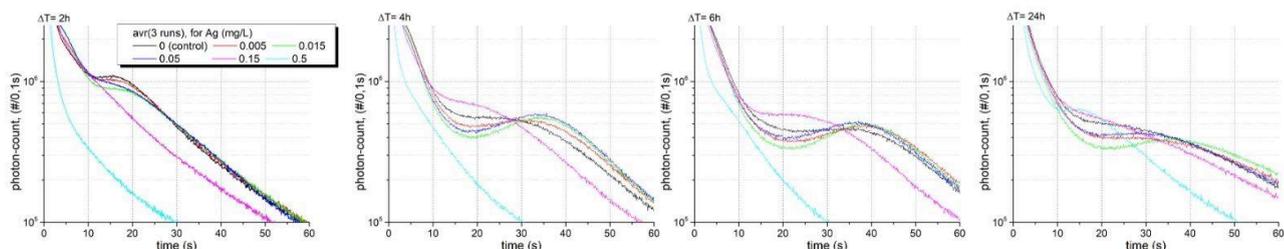


Fig. 4: testes de DL - resultado da inibição entre os intervalos de 2, 4, 6 e 24 horas de exposição da alga ao  $\text{AgNO}_3$  (média das triplicatas).

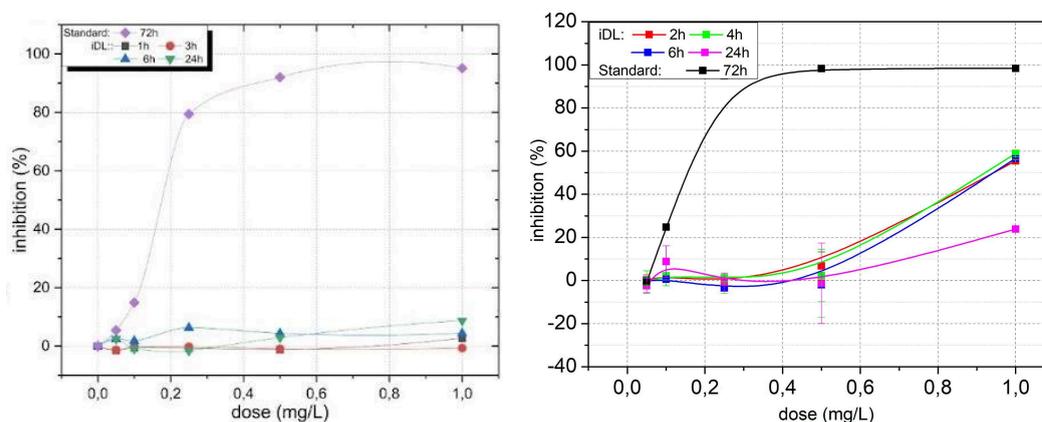


Fig. 5: relação entre inibição e dosagem para DL (iDL, % em relação ao controle) e iG (inibição de crescimento - obtida através do método convencional de 72h) para o teste com sulfato de zinco (esquerda) e nitrato de prata (direita).

Dessa forma, apenas mais dois testes foram repetidos com o  $\text{AgNO}_3$ , através das concentrações: 0; 0,005; 0,01; 0,03; 0,05; 0,1 mg/L, a fim de garantir que os resultados não compatíveis sejam consequência da substância (metal) e suas trocas de carga nos fotossistemas I e II, e não de erros experimentais. Os resultados para um dos testes são exibidos na Fig. 6 a seguir:

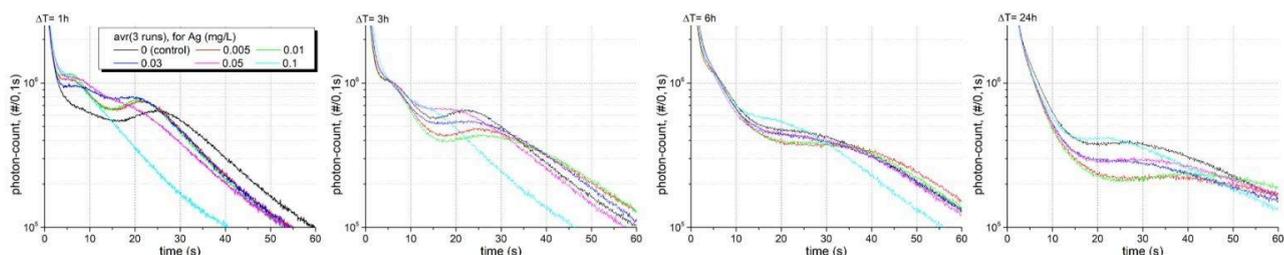


Fig. 6: testes de DL - resultado da inibição entre os intervalos de 1, 3, 6 e 24 horas de exposição da alga ao  $\text{AgNO}_3$  (média das triplicatas).

Assim, os cálculos da iDL como feito até agora (apenas intensidade total) não fornecem padrões consistentes quando comparados ao resultado do teste convencional. Desta forma, é necessário rever o cálculo de iDL, levando em conta a mudança do perfil temporal de cada DL e não apenas sua intensidade.

## 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 aplicar os novos métodos de análise da curva DL para a Prata e outros metais, a fim de padronizar o método para as demais substâncias, e tentar modelar as trocas de cargas nos sistemas PS-I/-II a partir de equações de taxa.

Assim, espera-se a aceitação do método pela comunidade científica, de forma a, eventualmente, complementar ou anteceder a execução tradicional (72h), atualmente utilizada como padrão.

## 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] - TAVARES, JULYA C M ; PRETTE, JOÃO P. ; Conforti, Evandro ; GALLEP, CRISTIANO M. Delayed Luminescence Tests with Algae Under Zinc Stress. In: 2024 SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC), 2024, Salvador. 2024 SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC), 2024. v. 1. p. 1., doi: [10.1109/SBFotonIOPC62248.2024.10813480](https://doi.org/10.1109/SBFotonIOPC62248.2024.10813480)
- [10] - National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 24470, Silver Nitrate. Retrieved March 7, 2025 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Silver-Nitrate>.
- [11] - Luoma SN. 2008. Silver nanotechnologies and the environment: Old problems or new challenges? Woodrow Wilson International Center for Scholars, Project on Emerging Nanotechnologies, Washington, DC.
- [12] - Chun-Mei Zhao, Wen-Xiong Wang, Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Volume 30, Issue 4, 1 April 2011, Pages 885–892, <https://doi.org/10.1002/etc.451>
- [13] - Hook SE, Fisher NS. 2001. Sublethal effects of silver in zooplankton: Importance of exposure pathways and implications for toxicity testing. *Environ Toxicol Chem* 20: 568–574.
- [14] - 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>.
- [15] - ABNT NBR 12648-2018 / OECD 201/2011 - Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.