



ENSAIOS DE FLUORESCÊNCIA DE ALGAS EM TESTES DE TOXICIDADE (AMETRINA)

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 produção em massa - apesar de suas vantagens - trouxe muitas desvantagens, especialmente em relação ao meio ambiente. Por esse motivo, o estudo da ecotoxicologia torna-se necessário, pois trata da interação entre substâncias naturais ou sintéticas e seus efeitos sobre a população biótica. Os estudos ecotoxicológicos visam compreender essas relações e agir contra danos causados pela poluição bioquímica, especialmente em relação a produtos farmacêuticos e pesticidas.

Este estudo tem como objetivo comparar os resultados obtidos por meio de um método ecotoxicológico tradicional - baseado na avaliação do crescimento de colônias de algas ao longo de 72 horas - com dados obtidos por meio de uma técnica fotônica: a análise da luminescência retardada (DL), desenvolvida por Katsumata e colaboradores [1-4]. Neste trabalho, foram realizados testes de concentração de alga (para definir a melhor quantidade a ser trabalhada), testes de sensibilidade, com o sal NaCl, e testes de toxicidade através dos herbicidas flumetralina e ametrina. Infelizmente, houveram problemas na preparação do teste com o herbicida flumetralina, decorrente da concentração do solvente DMSO, que não atendia ao protocolo OECD, de 2019 [5]. Assim, dado o maior acesso e facilidade experimental, os experimentos foram retomados com a ametrina, solúvel em água.

METODOLOGIA:

Conforme apresentado na **Figura 1**, o procedimento para o teste completo é o seguinte: (1) preparação do meio oligo (cultivo): um total de 8L, para frascos Erlenmeyer (50mL) e estoque; (2) lavagem e esterilização de material de vidro; (3) preparação do inóculo; (4) inoculação das amostras de algas, de acordo com as concentrações de substâncias escolhidas; a quantidade restante é completada com solução oligo e água estéril (20 mL para os frascos Erlenmeyer e 10 mL para os tubos de ensaio); (5) cultivo em uma agitadora, com os seguintes passos adicionais: (5A) teste DL, utilizando uma câmara de contagem de fótons (6A), realizado imediatamente após (0h) e 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a

inoculação, e (5B) o teste convencional (absorvância da amostra) após 72h, utilizando um espectrofotômetro (6B); e, finalmente, (7) a análise dos dados.

As amostras-mãe de algas foram mantidas em condições padrão, e cada amostra foi triplicada; os testes DL foram realizados em uma configuração de contagem de fótons (Fig. 1 6A: PMX-6100, Hamamatsu Photonics KK), com as amostras mantidas no escuro por 60 segundos; em seguida, expostas sequencialmente à luz branca (30 segundos) e à luz infravermelha (@700nm, 1 segundo), e a luminescência retardada e decrescente registrada logo após por 60 segundos, utilizando um tempo de integração de 0,1 segundo (ou seja, cnt/0,1s). Os dados de DL triplicados são calculados em média, e o grupo de controle é utilizado como referência, como explicado a seguir.

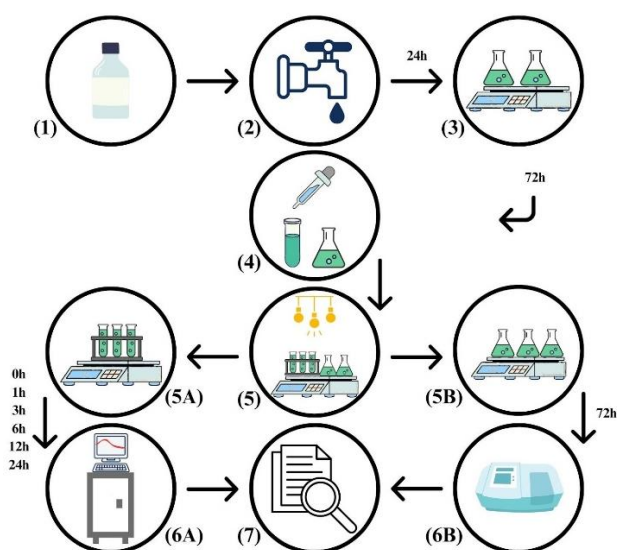


Figura 1 - Etapas de preparo do teste convencional e alternativo.

Análogo ao padrão, o índice de inibição da absorvância (iG) - obtido pela absorvância relativa em relação aos dados do grupo de controle após 72 horas de crescimento - um índice de inibição de DL (iDL) pode ser determinado comparando o número total de contagens de fótons, quando integrado em uma janela específica do perfil de tempo de DL, entre 5 e 35 segundos, onde uma oscilação amortecida peculiar aparece, relacionada à resposta rápida e lenta do complexo fotossintético [2,3]. Dessa forma, os diferentes padrões de DL são traduzidos em um diagrama de dose x resposta e plotados juntamente com o iG padrão, para comparação qualitativa e quantitativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram realizados dois testes de concentrações para definir a quantidade mais adequada para formação da curva de DF. Para o primeiro, foram escolhidas as seguintes concentrações: 50, 100, 500 e 1000 uL. As curvas geradas vêm na figura a seguir **Figura 2**.

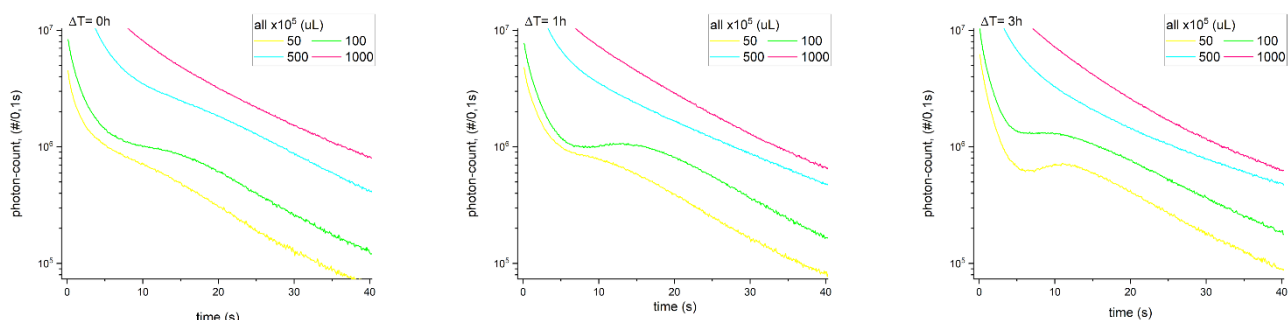


Figura 2 - Testes de DF, por concentração inicial de algas (50, 100, 500 e 1000.10⁵/uL), na evolução temporal até 3h de crescimento.

A partir dessa primeira seleção, foi observada a formação da melhor curva de DF, para 1h, através da concentração de 100x10⁵ uL de *Raphidocelis subcapitata*. Assim, foi realizado um novo teste

utilizando-se das concentrações mais próximas da considerada mais adequada para a primeira hora de leitura, sendo esses valores: 80, 120, 150, 200, 300 e 400 μL .

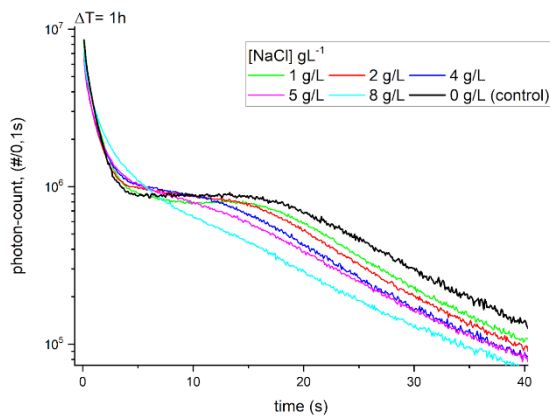


Figura 3-Testes de DF: resultado da inibição após 1h de exposição da alga ao NaCl.

Apesar de ter sido realizado mais um teste de concentrações, com o objetivo de encontrar uma curva ainda mais adequada do que a de 100×10^5 , concluiu-se, através da análise dos gráficos do segundo teste realizado, que a mesma permaneceu considerada como a mais adequada para a leitura de 1h. Dessa forma, tendo definido a concentração de alga, foi feito um teste de sensibilidade com o sal NaCl. Para isso, as concentrações escolhidas, para essa substância, estão na **Figura 3**.

Ao observar a coerência entre a inibição de crescimento de células e a proporção da concentração de NaCl, prosseguiu-se com o teste de toxicidade com a substância flumetralina. Para isso, foram utilizadas as concentrações: 1, 2, 3, 4 e 5 g/L - vide **Figura 4**.

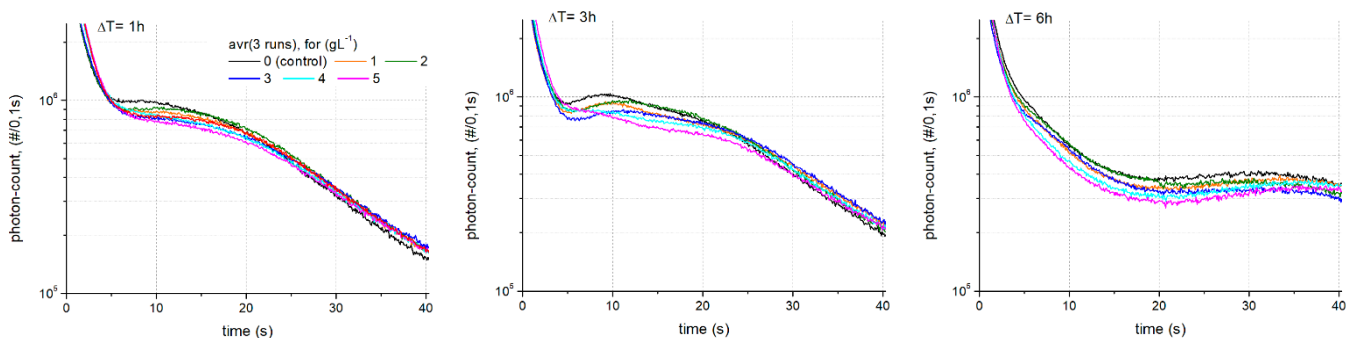


Figura 4 - Testes de DF: resultado da inibição entre os intervalos de 1 a 6 horas de exposição da alga à flumetralina.

Apesar do problema mencionado anteriormente, o teste apresentou a sobreposição do grupo controle, comprovando a inibição de crescimento dada pelo(a) DMSO e/ou flumetralina, mostrando-se relevante para a evolução da utilização do método.

Mais um teste de sensibilidade foi feito e, dessa vez, comparando seu resultado com o teste convencional (72h), Na **Figura 5**, apresentamos os perfis de DL para amostras triplicadas em um teste de sensibilidade usando NaCl e o respectivo gráfico de iDL, com dados obtidos apenas uma hora após a inoculação, com pequenas variações tanto para o perfil temporal quanto para o iDL dentro de cada grupo de doses - o grupo de controle apresenta a oscilação peculiar e mais pronunciada que diminui com o aumento da concentração de sal: a dose de 1g/L diminuiu a amplitude da oscilação; a dose de 4g/L reduziu o período; e a dose de 8g/L suprimiu totalmente o perfil oscilatório. Esses comportamentos são apresentados quantitativamente no gráfico de iDL, com um perfil de dose x resposta quase linear.

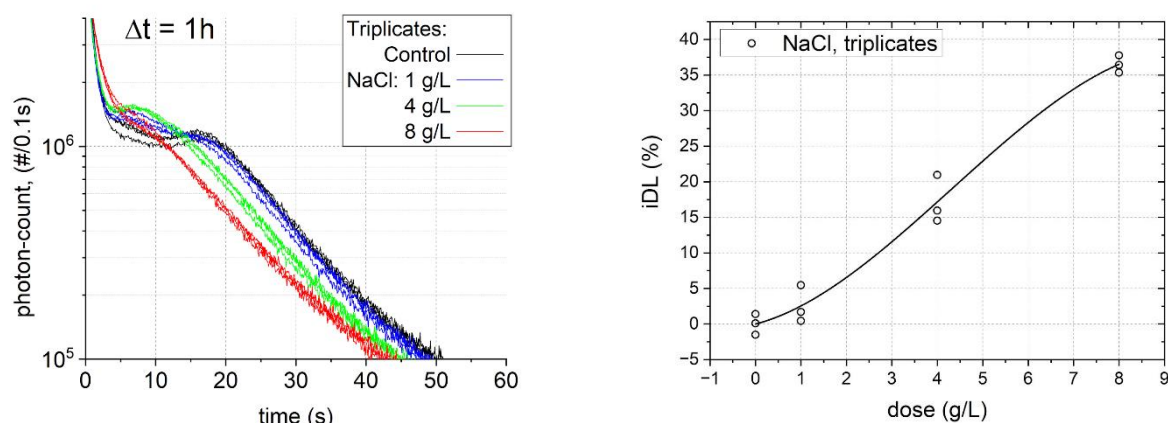


Figura 5 - Gráficos de DL para as triplicatas, uma hora após a inoculação, para o teste de sensibilidade com NaCl: 0 (controle), 1, 4 e 8 g/L e a correspondente inibição DL (iDL, % em relação ao controle) em relação à concentração de sal, para escala linear.

Finalmente, foi executado o teste utilizando a ametrina, através das concentrações: 0 (controle), 0,3, 1, 3, 10 e 30 g/L. As curvas obtidas foram:

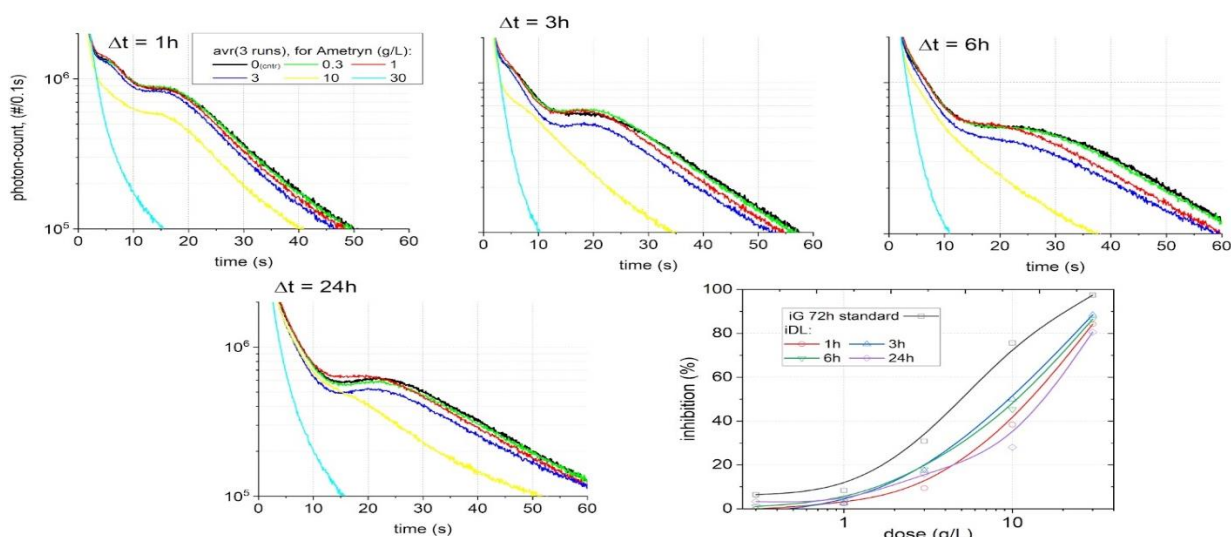


Figura 6 - Gráficos de DL para a média de triplicatas para o teste toxicológico com ametryn: 0 (controle), 0,3, 1, 3, 10 e 30 g/L (1h, 3h, 6h e 24h após a inoculação) e correspondentes inibição da DL (iDL, % em relação ao controle) e teste padrão (inibição do crescimento, iG) em função da concentração do agente tóxico (escala logarítmica).

A **Figura 6** apresenta os dados DL (média das triplicatas) para os testes de toxicidade de ametrina, incluindo também o diagrama de dose versus resposta para o iDL em cada intervalo de tempo após a inoculação - 1, 3, 6 e 24 horas -, plotados juntamente com os dados padrão de inibição de crescimento (iG). O teste padrão também indica a concentração para matar 50% da população ($C_{50} = 5,99$ g/L) e a sensibilidade mínima é de 1,14 g/L. Ao comparar os perfis de inibição, pode-se observar que tanto as respostas do iG quanto do iDL são quase iguais, mas com uma diferença de 15% -20% nos valores absolutos.

Já para os dados obtidos uma hora após a inoculação, a curva de dose x resposta do iDL indica toxicidade começando logo após a dose de 1 g/L, com a sensibilidade aumentando nas horas seguintes, mas diminuindo nos dados do último intervalo de 24 horas, com amostras apresentando dados menos

"estressados". Portanto, mesmo para um agente "levemente tóxico" leve como a ametrina, a abordagem fotônica pode ser eficaz, fornecendo indicações de alerta tóxico algumas horas após a exposição das algas ao perigo. Testes rápidos como este podem ser usados como ensaios preliminares, sendo que testes laboratoriais mais sensíveis ou diretos são realizados apenas quando dados mais precisos são necessários.

Utilizando amostras menores do que o método padrão de teste de crescimento de algas, a abordagem fotônica não apenas economiza custos relacionados ao material e tempo de preparação, mas também reduz a quantidade de resíduos tóxicos que devem ser tratados antes de serem descartados no meio ambiente. Portanto, além de sua resposta rápida, a técnica também é mais sustentável do que o método usual.

CONCLUSÕES:

Foram apresentadas curvas de DL (Deep Learning) para amostras de algas sob estresse químico - NaCl, flumetralina e ametrina, com bons resultados para previsão de toxicidade após apenas uma hora de incubação, muito mais rápido do que o teste padrão de crescimento de algas, que dura 72 horas. A utilização dessa abordagem fotônica, com tamanhos de amostra reduzidos e períodos de preparação e cultivo mais curtos, tem o potencial de fornecer resultados mais precoces. Isso a torna adequada para aplicação em testes de campo, onde pretendemos realizar os próximos experimentos, e também para testes laboratoriais que exigem resultados rápidos. Além disso, serve como uma técnica complementar ao método padrão já estabelecido.

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]- OECD, 2019. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23 (2nd edition). Organ. Econ. Co-operation Dev. 23, 1–81. Disponível em: <<https://doi.org/10.1787/0ed2f88e-en>>.