



**Trabalho de Conclusão de Curso em  
Engenharia Ambiental**

**Determinação da concentração ideal da população inicial para testes  
de luminescência atrasada em ensaios com *Raphidocelis subcapitata***

**Marcos Vinícius da Silva**

**Orientador**

**Prof. Dr. Cristiano de Mello Gallep**

**Limeira, 27 de junho de 2024.**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Biblioteca da Faculdade de Tecnologia  
Mariana Xavier - CRB 8/9615

Si38d Silva, Marcos Vinícius da, 1990-  
Determinação da concentração ideal da população inicial para testes de luminescência atrasada em ensaios com *Raphidocelis subcapitata* / Marcos Vinícius da Silva. – Limeira, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Cristiano de Mello Gallep.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Tecnologia.

1. Luminescência. 2. Toxicidade. 3. Microalgas. I. Gallep, Cristiano de Mello, 1974-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Tecnologia. III. Título.

Informações adicionais, complementares

**Título em outro idioma:** Determination of the ideal concentration of the initial population for delayed luminescence tests in assays with *Raphidocelis subcapitata*

**Palavras-chave em inglês:**

Luminescence

Toxicity

Microalgae

**Titulação:** Engenheiro Ambiental

**Banca examinadora:**

Cristiano de Mello Gallep [Orientador]

Luís Fernando de Ávila

Natália Oliveira de Farias

**Data de entrega do trabalho definitivo:** 27-07-2024

## **Resumo**

O presente trabalho apresenta um breve panorama acerca da Luminescência Atrasada, levando em conta quais aplicações são possíveis e aplicáveis e como estruturar e consolidar este conhecimento com o avanço da tecnologia, com foco em determinar a concentração ideal de células para realizar testes de foton-contagem da luminescência atrasada em *Raphidocelis subcapitata*, comparando com o teste padrão de crescimento utilizado para mensurar efeitos de compostos químicos em algas.

**palavras-chave:** luminescência atrasada, toxicidade, algas.

## **Abstract**

This paper presents a brief introduction to delayed luminescence, considering its possible and useful application, and how to organize and consolidate this knowledge with the progress in Technology and Science. It analyzes the optimal cell concentration for executing the photon counting of delayed luminescence in *Raphidocelis subcapitata*, comparing it with the standard test used to measure the effects of chemical compound on algae.

**key words:** delayed luminescence, toxicity, algae.

## Introdução

A luminescência atrasada (LA) é uma luminescência fotoestimulada ultra fraca. Em algas, plantas e bactérias fotossintéticas, ela pode ser detectada por alguns minutos após a excitação luminosa no escuro.

Strehler e Arnold (1951) observaram que os primeiros experimentos realizados sugeriam que a emissão de luz retardada pelas algas era o reflexo de alguma reação inicial na fotossíntese (STREHLER e ARNOLD 1951). “Aparentemente a excitação do singlete primário é convertida em energia metaestável, a reversão deste processo regenera quanta de energia do singlete excitado, alguns destes quanta são então emitidos como luz atrasada” (CLAYTON pág 633 1965). Poderia se explicar a extrema complexidade do decaimento atrasado de luz, pela presença e atuação de sistemas enzimáticos que utilizam o sistema semi condutor da clorofila para obter elétrons de alta energia (BERTSCH 1962). Nas plantas verdes, de 2.000 a 2.500 moléculas de clorofila interagem para reduzir uma molécula de CO<sub>2</sub>. Já que a reação de redução de uma molécula de CO<sub>2</sub> precisa de 4 elétrons, vemos que 500 a 600 moléculas de clorofila interagem para realizar a transferência de uma frente de elétrons da água para o ciclo de Calvin (ARNOLD 1965). Também temos que em bactérias roxas a emissão de luz atrasada depende do funcionamento dos centros de reação fotossintética (CLAYTON 1965). Segundo Arnold (1965), a extrapolação do decaimento para períodos mais curtos de tempo pode sugerir que uma grande parte da fluorescência observada em algas é luminescência atrasada. Observa-se que as flutuações na intensidade de emissão de luz atrasada podem ser estudadas e inclusive podem se mostrar mais eficientes que alterações na fluorescência, como reflexos das atividades fotoquímicas iniciais (CLAYTON 1965).

Por volta dos anos 80 e 90, uma nova onda de interesse sobre o tema da radiação ultra-fraca em organismos surgiu. Testes foram realizados em alguns países, como Alemanha, Rússia, Israel, Holanda, Itália, Índia e China. Alguns cientistas realizaram testes em diversos materiais biológicos como ovos de galinha, embriões de peixes e sapos, células e culturas microbiológicas, sangue humano e sistemas aquosos simples, e assim os pesquisadores não mediram apenas emissão ultra fraca de fótons, como a luminescência atrasada nesses diversos objetos biológicos (NAUMOVA *et al.* 2018).

## Luminescência atrasada em Algas

Conforme Gerhardt e Krause (1984) se considerarmos o fluxo de volta de elétrons originados de diversos estados oxidativos da cadeia de transporte de elétrons para o oxidado no centro de reação do fotossistema II (PSII), poderemos entender melhor a LA. Smidt e Senger (1987) sugerem que a LA possui um componente de decaimento lento e um componente de decaimento rápido, que podem estar relacionados com o fotossistema I (PSI) e o PSII. De acordo com Bürger e Schmidt (1988) os efeitos causados por fatores ambientais adversos no componente de decaimento longo da LA, representam um potencial método de ensaio para verificar possíveis intoxicações e deficiências minerais em microrganismos fotossintéticos e plantas.

Com base nos espectros de emissão Hideg *et al.* (1991) sugerem que o componente lento da LA, que forma o segundo pico em leitura, é emitido pelo PSII e por subpopulações de PSII que estão localizadas no estroma do tilacóide.

Conforme Scordino *et al.* (1996) além das aplicações, apesar da complexidade, pode-se obter informações úteis estudando os fatores que incidem na cinética da luminescência emitida por amostras biológicas simples, o desafio em si seria conseguir atribuir as mudanças na cinética à efeitos biológicos e físicos corretamente.

Em testes realizados com *Acetabularia acetabulum*, Van Wijk *et al.* (1999) sugerem que a LA pode estar relacionada à integridade da dinâmica da rede de cloroplastos, mesmo que ainda não esteja explicada a relação entre o fluxo de cloroplastos e a LA, indicam, inclusive, que a LA pode ser utilizada para registrar e investigar a integridade do massivo movimento intracelular.

Em testes realizados com as toxinas utilizadas em compostos agrotóxicos, Simazine e 3,5-DCP, por Katsumata *et al.* (2006), observa-se a possibilidade de utilizar a LA como parâmetro rápido para indicar a inibição de crescimento algal, além de possibilidades de diferenciar compostos, tendo em vista que a dinâmica de decaimento apresentada pelos diferentes compostos não é igual.

Segundo Katsumata *et al.* (2009) a LA tem o potencial de servir como prova intrínseca da atividade fotossintética e do estado estrutural em algas. Como a LA está ligada ao bom funcionamento no processo de fotossíntese e pela rapidez que pode ser medida, ela se

torna realmente atraente para ser utilizada como método de verificação de diversos compostos emergentes.

Em testes realizados por Tavares e Gallep (2023) em *Raphidocelis subcapitata* utilizando o método fotônico, conseguiram demonstrar as vantagens de trabalhar com tamanhos de amostras reduzidos e também com períodos mais curtos de preparação, cultivo e obtenção de resultados. Demonstrando que o método fotônico é adequado para testes em campo e serve como técnica suplementar ao método padrão já estabelecido.

Com isto podemos verificar a potencialidade do método fotônico ser padronizado e utilizado, por conta da rápida obtenção de resultados e baixo consumo de insumos.

### **Cenário - teste em algas**

Os testes de inibição de crescimento algal são utilizados amplamente para avaliar a interação destas substâncias emergentes nos níveis primários; o teste de crescimento algal validado pela ISO (ISO 2004) é de 72 horas, havendo inclusive testes de 96 horas, validados pela agência de proteção ambiental dos EUA (USEPA, 2012), utilizando a diretriz padrão como a diretriz de teste 201 (TG201) da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 2011), que descreve os princípios e critérios do teste de crescimento e inibição do crescimento são quantificados pela medição do peso de matéria seca da biomassa algal em função do tempo.

Por conta da grande dificuldade em medir satisfatoriamente o peso dessa massa seca, medidas alternativas são apresentadas como a contagem e/ou volume de células, fluorescência, ou densidade óptica são comuns em várias diretrizes. A TG201 requer um fator de conversão, que seja conhecido, entre o parâmetro substituto medido e a biomassa. Então, na prática, após 72h de cultivo de amostras com 125mL, cada uma é avaliada por densidade óptica, e um fator de inibição de crescimento (%) determinado pela relação com o grupo controle.

Nesse cenário, o uso da LA como proposto pelo grupo de Katsumata, se mostra promissor, pois pode indicar ação tóxica já após 1h após a inoculação de amostras com o agente tóxico, em um volume total de apenas 10mL para cada amostra.

Nesse sentido, é importante estudar e validar aplicações da LA, como forma rápida de analisar amostras sob estresse. Ao analisar o efeito de dois inibidores de elétrons, e sabendo que estudos apontam que a LA se origina de fontes fotossintéticas e não-fotossintéticas, Katsumata *et al.* (2008) esperavam que os inibidores afetariam a oxidação e redução de

plastoquinona. Conseguindo observar que ocorre a redução de grande parte da plastoquinona quando a pré iluminação é forte, as concavidades e convexidades formadas no perfil temporal da LA indicam corrente de elétrons entre o PSI e o PSII. O Sistema de transporte de elétrons ao ser excitado fortemente, faz com que a plastoquinona sofra redução e gere elétrons excedentes no sistema PSI. Parte destes elétrons, que estão excedentes no sistema, continuarão, via ciclo de transporte de elétrons reduzindo a plastoquinona em plastiquinol, que é oxidado no sítio citocromo b6/f. Em condições de escuro absoluto o plastiquinol é reoxidado (Dos Santos 2014).

Katsumata *et al.*(2008) observaram que deixando as amostras algais descansarem da excitação luminosa do cultivo, no escuro, ao serem pré iluminadas antes de ser medida a LA, observa-se a formação de convexidades mais nítidas, na função da emissão de fótons em relação ao tempo, relacionando ao bom funcionamento do PSII, e por conseguinte ao metabolismo sadio dos inóculos analisados.

Katsumata e Takeuchi (2017) demonstram que seus resultados destacam como é útil a medição da LA para verificar a influência de herbicidas em curtos períodos de tempo, analisar qual a influência no transporte da membrana molecular, quais são as taxas de entrada e saída e também sua ligação a uma proteína alvo no fotossistema.

Gallep *et al.* (2023) afirma que novos testes devem ser realizados a fim de otimizar as condições iniciais, tendo que vista que a concentração, idade do inóculo algal e os testes iniciais para a amostra controle são partes essenciais para que os testes sejam reproduzíveis.

Nesse sentido, é preciso adequar a concentração inicial de algas por amostra, de forma a poder realizar testes de LA logo após 1h de inoculação, algo não possível no procedimento padrão, que se utiliza de menor concentração inicial,  $1 \times 10^5$  células/ $\mu$ L.

Por sua vez Tavares e Gallep (2024), já considerando testes bem sucedidos em NaCl, Diuron, Ametrina e Flumetralina, testaram o Sulfato de Zinco ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), obtiveram resultados consistentes, e para além da rápida resposta do método, apontam para a redução de insumos utilizados nos testes, reduzindo também custos com tratamento e adequada disposição do material utilizado, o que torna o método mais sustentável.

No presente trabalho avaliamos as concentrações que melhor formam concavidade, em amostras menores que as convencionais e com menor tempo de teste.

## **Materiais e métodos**

### **Materiais**

No quadro 1, estão listados os materiais utilizados para realizar os testes de luminescência atrasada no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG), em parceria com o Laboratório de Fotônica Aplicada (LAFA).

**Quadro 1:** Materiais utilizados nos ensaios.

❖ Luxímetro Instruterm® mod LD209
❖ Sistema de iluminação que confere $\pm 4000$ lx led
❖ Termômetro THERMO®
❖ Bico de Bunsen
❖ Tubo Falcon®
❖ Pipeta graduada
❖ Câmara Neubauer
❖ Proveta
❖ Frasco Erlenmeyer 50 ml
❖ Balança analítica Marconi® AL500C
❖ <i>Cuvete</i> de quartzo 10 ml
❖ Algodão
❖ Gaze
❖ StopBlood 3M®
❖ Software ICp (inhibition concentration percentage)
❖ Centrífuga Fanen® mod EXCELSA 206 BL

❖ pHmetro THERMO SCIENTIFIC® ORION STAR A211
❖ Espectrofotômetro HACH® DR 3900
❖ Mesa agitadora orbital com controle de temperatura NOVA TÉCNICA® NT715
❖ Mesa agitadora orbital TECNAL® mod TE00
❖ Autoclave vertical ELECTROlab® mod 503 75 L.
❖ Adega Dometic® MF-6w
❖ Bancada de fluxo laminar vertical Pachane® mod Pa50.
❖ Microscópio invertido ZEISS® mod axiovert40CFL com câmera.
❖ Câmara de photon-contagem PMX6100-IR Hamamatsu Photonics KK

## Métodos

Foi utilizado inóculo de *Raphidocelis subcapitata* retirada de estoque à 4°C inoculada em meio oligotrófico para crescimento durante 3 dias em mesa agitadora orbital, em sistema de iluminação LED ( $\pm 4000$  lx). Após 72 horas, o conteúdo foi colocado em centrífuga, em tubos falcon durante 20 minutos à 2500 RPM, sendo retirado o meio oligotrófico, conforme norma ABNT 12648/2011, posteriormente ressuspensando as algas em meio oligotrófico e juntando todas amostras em apenas um tubo, prosseguindo para a contagem de células em Câmara Neubauer e ajuste de concentrações. As amostras de tubo de quartzo contendo meio oligotrófico foram inoculadas com as concentrações  $50 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$ ,  $100 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$ ,  $500 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$ , em triplicatas e  $1000 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  em duplicata, pois não havia quantidade de inóculo suficiente para atingir a concentração estipulada, colocadas em mesa agitadora à 25°C, sendo realizadas leituras após 0h, 1h, 3h, 6h, 12h e 24h na PMX, que se encontrava refrigerada à 19°C.

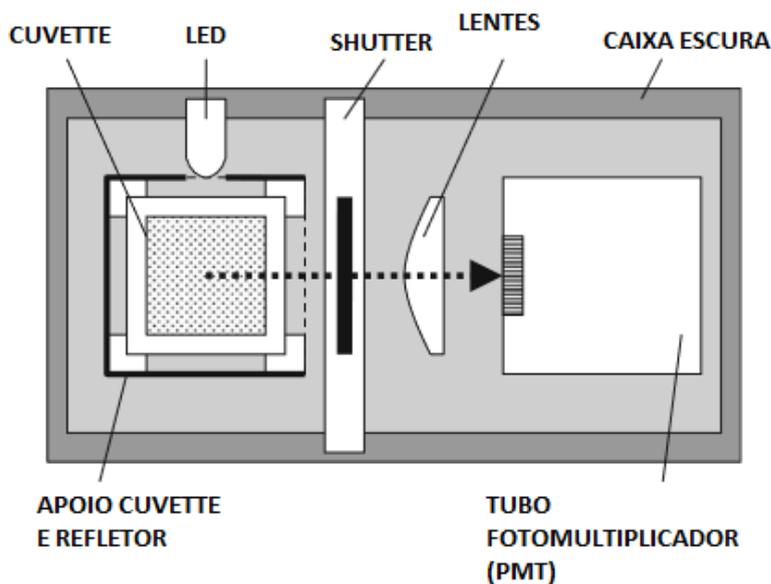
Na câmara de fóton-contagem foi utilizada a programação de 60 segundos no escuro, sendo as amostras excitadas com luz branca por 15 segundos, em seguida vermelha (700 nm)

por 1 segundo, após a excitação luminosa as emissões foram lidas a cada 100 milissegundos por 1 minuto, gerando os dados de LA para análise da melhor concentração algal.

As leituras foram efetuadas em dispositivo de fóton-contagem com válvula fotomultiplicadora sensível no infravermelho, conforme a figura 1, que conta com led de luz branca e de luz vermelha( 680 e 700 nm), espaço para acomodar cuvette, shutter que protege o tubo foto multiplicador, abrindo apenas quando a caixa escura está fechada e totalmente vedada à passagem de luz.

A amostra contendo o inóculo algal é excitada com luz branca e vermelha pelas luzes de led, após a excitação as luzes são desligadas o shutter se abre para que a lente direcione os fótons emitidos pela amostra para o tubo fotomultiplicador, onde é realizada a leitura da quantidade de fótons emitidos pela amostra analisada e posteriormente transformada em dados que serão processados e analisados.

**Figura 1:** PMX 6100 - câmara escura com contador de fótons e excitação por LEDs



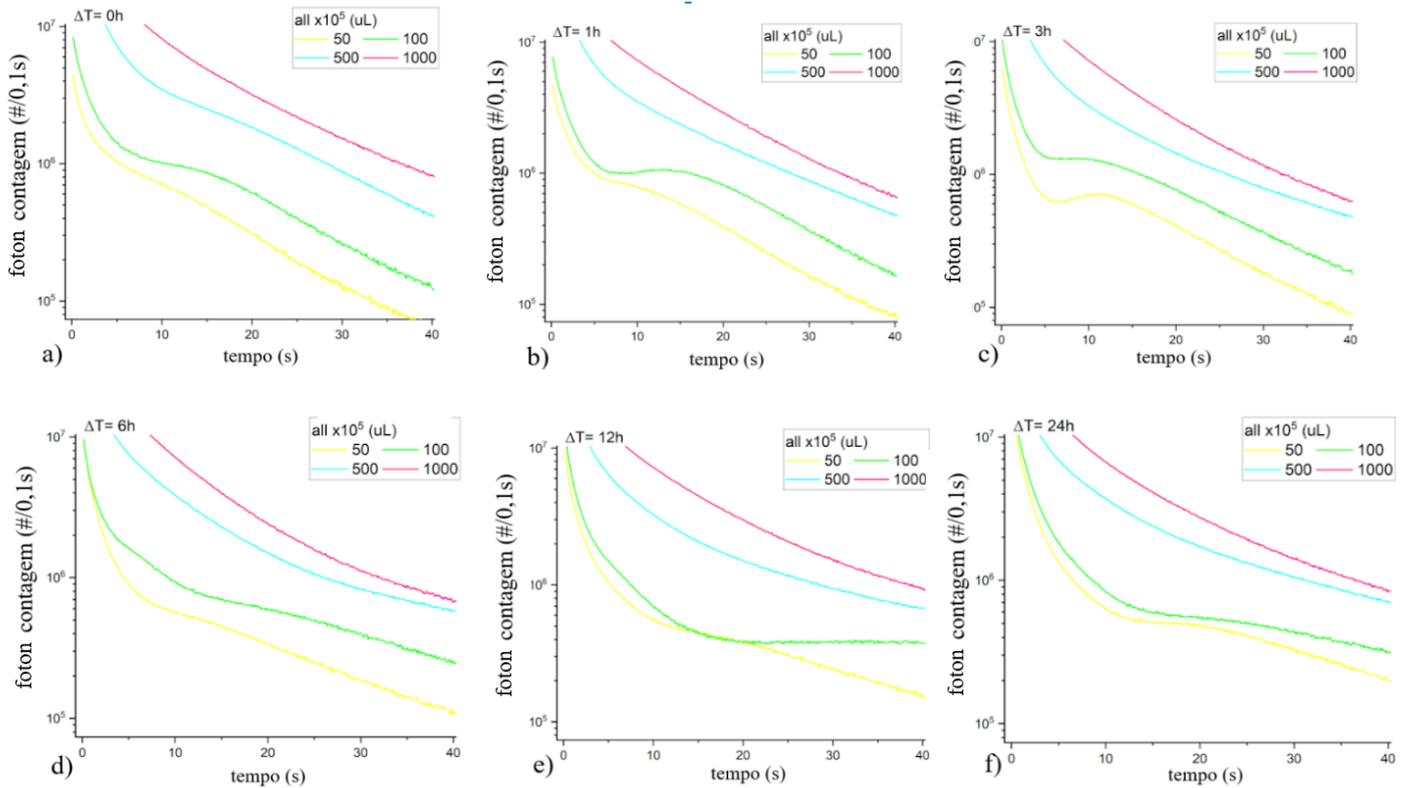
**Fonte :** Katsumata et al(2009)

## Resultados

Os resultados dos testes estão expressos graficamente na Fig 2, pela média das triplicatas e duplicata (vide Anexo para curvas originais, e artigo apresentado em congresso internacional).

Podemos observar na Fig.2(a), que foi lida após a inoculação das algas, que apenas a concentração de  $100 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  começa a apresentar a formação de concavidade, as demais concentrações não apresentam, podemos observar que conforme aumenta a concentração de algas, aumenta a emissão de LA nas amostras, e observamos que as concentrações de  $500 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  e  $1000 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  não apresentam desvio no decaimento exponencial. Na Fig.2(b), conseguimos observar muito bem a formação de concavidade na concentração de  $100 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$ , e o início de formação na concentração de  $50 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  enquanto  $500 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  e  $1000 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  continuam inalteradas. Ao observar a Fig.2(c) verificamos que  $500 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  e  $1000 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  continuam sem esboçar concavidades e enquanto  $100 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  forma uma pequena concavidade a concentração que mostra melhor resultado em 3 horas de teste é a de  $50 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$ . Na Fig.2(d) apenas a concentração de  $100 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  esboça a formação de concavidade, a concentração de  $50 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  apresenta leve alteração e  $500 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  e  $1000 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  continuam sem esboçar nenhum indício de concavidade.

**Figura 2:** Resultados experimentais de concentração ideal de *Raphidocelis subcapitata* - média das triplicatas e duplicata, para as curvas de decaimento após a) 0h, b) 1h, c) 3h, d) 6h, e) 12h e f) 24h.



**fonte:** Laboratório de Fotônica Aplicada (LAFA- UNICAMP) 2022.

Na Fig.2(e) com 12 hrs de teste, podemos observar uma concavidade de ângulo bem aberto na concentração de  $100 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$ , enquanto as outras concentrações continuam seu decaimento sem esboço de concavidades. E por fim na Fig.2(f) observa-se a formação de ligeiras concavidades nas concentrações de  $50 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  e  $100 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$ , enquanto  $500 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  e  $1000 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  não apresentam.

## Discussão

Através dos resultados obtidos conseguimos aferir que para os parâmetros de tempo de contagem e concentração algal, o melhor resultado para verificar o funcionamento do metabolismo algal através da LA é a concentração de  $100 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  na leitura de 1h, conforme Fig.2(b). A concentração de  $50 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  também apresenta resultados promissores na leitura de 3h, o que dependendo do composto a ser testado pode ser interessante como parâmetro da maior tempo de interação entre alga e composto. Com base nos dados obtidos para as curvas de  $500 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  e  $1000 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$ , podemos supor que a quantidade de células inoculadas sobrepõe a capacidade suporte do meio nutritivo utilizado, apresentando decaimento sem concavidades em todas as leituras realizadas. Análises matemáticas podem ser feitas entre as concentrações testadas, a fim de entender melhor quais emissões são dadas através do sistema fotossintético e quais são oriundas do metabolismo algal, pois é possível observar uma diferença, por vezes constante entre as maiores e menores concentrações. Os resultados da Fig.2(a) e (b) podem nos indicar que com os métodos utilizados, pode ser possível obter resultados robustos num espaço de tempo menor que 1h, talvez chegando próximo aos 15 minutos relatados por Katsumata *et al.* (2006).

Como os testes TG201 de 72h envolvem múltiplas gerações de algas, testes mais rápidos determinam os efeitos dos compostos testados em apenas uma geração de algas, o que pode reduzir a sensibilidade aos compostos que afetam múltiplas gerações de algas (Katsumata *et al.* 2006). Mas que também pode nos dar respostas rápidas acerca da interação dos compostos testados com as populações de alga em apenas uma geração.

Segundo Gallep *et al.* (2023) a abordagem fotônica envolve tamanhos de amostra reduzidos, além do curtos períodos de preparação e cultivo, tendo o potencial de obter resultados de maneira mais ágil em comparação com os métodos estabelecidos.

É importante atentar ao fato de que seria interessante, inédito e fundamental realizar testes com espécies de algas que não sejam exóticas, tanto para direcionar a atividade científica para nossa realidade, quanto a título de comparação e fundamentação do método fotônico.

Como mostram dados do Ministério da Agricultura e Pecuária (2022), vindo de uma crescente, nos anos de 2019 a 2021 foram registrados 203 agrotóxicos de baixo impacto no

Brasil. Neste sentido, o método fotônico é um importante aliado na rápida avaliação e classificação destes e de outros diversos compostos emergentes.

Com mais estudos para fundamentar o método fotônico, podemos conseguir avançar o conhecimento e a ciência, nas possibilidades que a LA nos trás além da classificação de compostos de interesse ambiental, como por exemplo, a contribuição para agricultura com a possibilidade de teste não invasivo e não destrutivo de avaliação da viabilidade de sementes de melancia como afirma Grasso *et al.* (2018). Também nos estudos de Musumeci *et al.* (2005) em que foram realizadas leituras de LA com células de fibroblasto saudáveis e células de melanoma, em que pode-se observar uma emissão maior de LA por parte das células cancerígenas. Grasso *et al.* (2016) propõe a utilização da LA como método rápido e não invasivo de verificação dos efeitos decorrentes da exposição de organismos biológicos simples à feixes de íons. Lanzaò *et al.* (2007) descrevem a possibilidade de utilização da LA como biópsia óptica.

Um problema real no uso da LA tem sido a própria baixa intensidade de sinal, algumas ordens de grandeza inferiores à valores típicos da fluorescência. Para superar essa dificuldade cultural, foi necessário desenvolver e implementar programas dedicados, configurações experimentais, capazes de conseguir revelar este sinal (Grasso *et al.* 2023). Neste sentido, conforme afirma Grasso *et al.* (2023) podemos melhorar nosso entendimento acerca de sistemas biológicos através da física quântica, com parâmetros que a mecânica clássica não consegue equacionar, além de métodos obsoletos que não atendem a atual demanda da sociedade.

## **Conclusão**

Mais de 60 anos depois da descoberta do fenômeno da Luminescência atrasada, conseguimos avançar bastante em seu entendimento, e vislumbrar diversas possibilidades de aplicação e investigação do fenômeno da LA. Porém, assim como em outros campos de estudos da LA, algumas relações entre o fenômeno da LA, o sistema fotossintético e o metabolismo algal ainda são desconhecidas. Existem algumas lacunas que realizando testes com diferentes compostos e diferentes espécies, será possível fundamentar e refinar o conhecimento sobre a relação do metabolismo algal e a LA, fundamentando sua aplicação. Inclusive é importante atentar a importância de testar espécies nativas. Ao testar e verificar a

concentração ideal para testes com os métodos utilizados, avançamos no sentido de encontrar os parâmetros capazes de validar o teste fotônico como método alternativo de avaliação da inibição de crescimento algal. Talvez as diferenças e emissão de LA nas diferentes concentrações nos forneçam pistas sobre a relação entre metabolismo algal e emissão de LA. Há indícios de que a concentração de  $100 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  pode ser utilizada em um espaço de tempo menor que 1 hora, com a mesma efetividade do tempo medido no presente trabalho. Entretanto é possível avaliar com grande eficiência, a partir dos dados obtidos, que a LA apresenta enormes possibilidades como método de avaliação rápido, não invasivo e não destrutivo.

## **Agradecimentos**

Agradecemos a disponibilização de equipamentos do LAFA-UNICAMP, assim como a disponibilização pela Prof. Dr<sup>a</sup> Gisela A. Umbuzeiro da infraestrutura, suporte operacional e inóculo algal do LAEG-UNICAMP em especial a colaboração sempre presente da técnica responsável Ádria C. Oliveira. Também à Hamamatsu Photonics KK pelo treinamento inicial e partilha do método.

## **Referência Bibliográfica:**

ARNOLD, W. (1965). An Electron-Hole Picture of Photosynthesis. *The Journal of Physical Chemistry*, 69(3), 788–791.

BERTSCH, W. F. (1962) Two photoreactions in photosynthesis: evidence from the delayed light emission of chlorella, pag 4/5.

BÜRQUER, J., & SCHMIDT, W. (1988). Long term delayed luminescence: A possible fast and convenient assay for nutrition deficiencies and environmental pollution damages in plants. *Plant and Soil*, 109(1), 79–83.

CLAYTON, R. K. (1965) Characteristics of fluorescence and delayed light

emission from green photosynthetic bacteria and algae, *The Journal of General Physiology* 48:633–646.

GALLEP, C. M. TAVARES, J. C. M. DA SILVA, M. V. (2023). Algae Luminescence Dynamics Applied for Fast Toxicological Testing. In *2023 Photonics & Electromagnetics Research Symposium (PIERS)* (pp. 1149-1151). IEEE.

GERHARDT, V., & KRAUSE, H. (1984). Delayed fluorescence of algae. *Journal of Luminescence*, 31-32, 895–89.

GRASSO, R. ABE, T. CIRRONE, G. A. CUTTONE, G. GULINO, M. MUSUMECI, F. ROMANO, F. RYUTO, H. SCORDINO, A. (2016). Effects of Ion Irradiation on Seedlings Growth Monitored by Ultraweak Delayed Luminescence. *PLoS One*.

GRASSO, R. GULINO, M. G. GIUFFRIDA, F. AGNELLO, M. MUSUMECI, F. SCORDINO, A. (2018). Non-destructive evaluation of watermelon seeds germination by using Delayed Luminescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*.

GRASSO, R. MUSUMECI, F. SCORDINO, A. TRIGLIA, A. (2023). Application Potentiality of Delayed Luminescence in Medicine, Biology, and Food Quality Researches. *Ultra-Weak Photon Emission from Biological Systems*, Springer.

HIDEG, E. KOBAYASHI, M. INABA, H. (1991). The far red induced slow component of delayed light from chloroplasts is emitted from photosystem II, *Photosynthesis Research* 29 107–112.

International Organization for Standardization (ISO) 8692:2004 Water Quality - Fresh Water Algal Growth Inhibition Test With Unicellular Green Algae. 2004

KATSUMATA, M. KOIKE, T. KAZUMURA, K. TAKEUCHI, A. SUGAYA, Y. (2009). Utility of Delayed Fluorescence as Endpoint for Rapid Estimation of Effect Concentration on the Green Alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Bull Environ Contam Toxicol*.

KATSUMATA, M. TAKEUCHI, A. KAZUMURA, K. KOIKE, T. (2008). New feature of delayed luminescence: preillumination-induced concavity and convexity in delayed luminescence decay curve in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology, v. 90, n. 3, p. 152-62.

KATSUMATA, M., TAKEUCHI, I. (2017). Delayed fluorescence as an indicator of the influence of the herbicides Irgarol 1051 and Diuron on hard coral *Acropora digitifera*. Marine Pollution Bulletin, 124(2), 687–693.

KATSUMATA, M. KOIKE, T. NISHIKAWA, M. KAZAMURA, K. TSUCHIYA, H. (2006). Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

LANZANÒ, L. SCORDINO, A. PRIVITERA, S. TUDISCO, S. MUSUMECI, F. (2007) Spectral analysis of Delayed Luminescence from human skin as a possible non-invasive diagnostic tool. Eur Biophys J.

MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária. (2022). Mapa publica registros de dois defensivos agrícolas inéditos de baixo impacto. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-publica-registros-de-dois-defensivos-agricolas-ineditos-de-baixo-impacto> Acesso em: 28 de maio de 2024.

MUSUMECI, F. PRIVITERA, G. SCORDINO, A. TUDISCO, S. LO PRESTI, C. APPLGATE, L. A. NIGGLI, H. J. (2005). Discrimination between normal and cancer cells by using spectral analysis of delayed luminescence .

NAUMOVA, E. V. NAUMOVA, A. E. ISAEV, D. A. VOLODYAEV, I. V. (2018). Historical review of early researches on mitogenetic radiation: from discovery to cancer diagnostics. Russian Academy of Science.

SCORDINO, A., TRIGLIA, A., MUSUMECI, F., GRASSO, F., & RAJFUR, Z. (1996). Influence of the presence of atrazine in water on the in-vivo delayed luminescence of *Acetabularia acetabulum*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 32(1-2), 11–17.

SCHMIDT, W. SENGER, H. (1987). Long-term delayed luminescence in *Scenedesmus obliquus* I. Spectral and kinetics properties, *Biochimica et Biophysica Acta* 890 15–22.

TAVARES, J, C, M. GALLEP, C, M. (2023). Rapid Toxicological Tests Using Algae Luminescence . IMOC.

TAVARES, J, C, M. GALLEP, C, M. (2024) Algae delayed luminescence dynamics altered by Zinc stress - preliminary data. 22<sup>a</sup>ISBC E 20<sup>a</sup> ISLS.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2012). Test method green alga, *Selenastrum capricornutum*, growth test, method 1003.0

Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms (fourth edition), EPA.

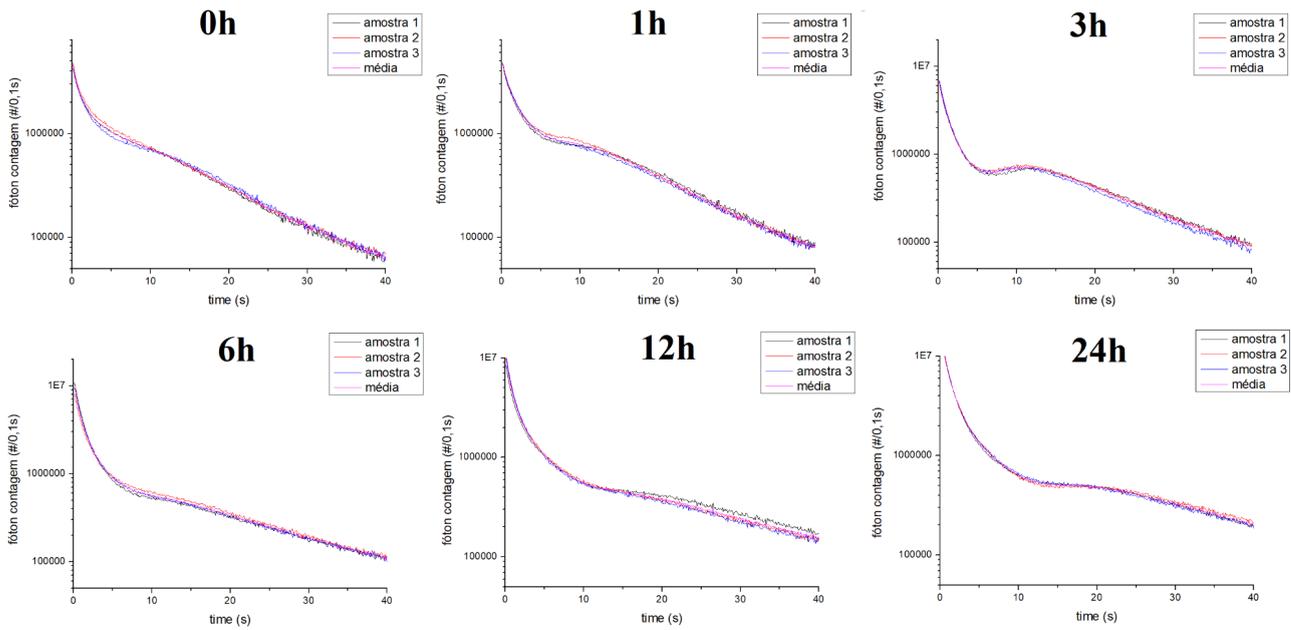
VAN WIJK, R. SCORDINO, A. TRIGLIA A. MUSUMECI, F. (1999). ‘Simultaneous’ measurements of delayed luminescence and chloroplast organization in *Acetabularia acetabulum*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*.

SANTOS, R. dos S. (2014). Fluorescência Atrasada em *Raphidocelis subcapitata*: Implementação, Validação e Transferência Tecnológica de Método Ecotoxicológico Aplicado ao Monitoramento de Qualidade de Água. Relatório Final do Programa Jovem Pesquisador Faepex.

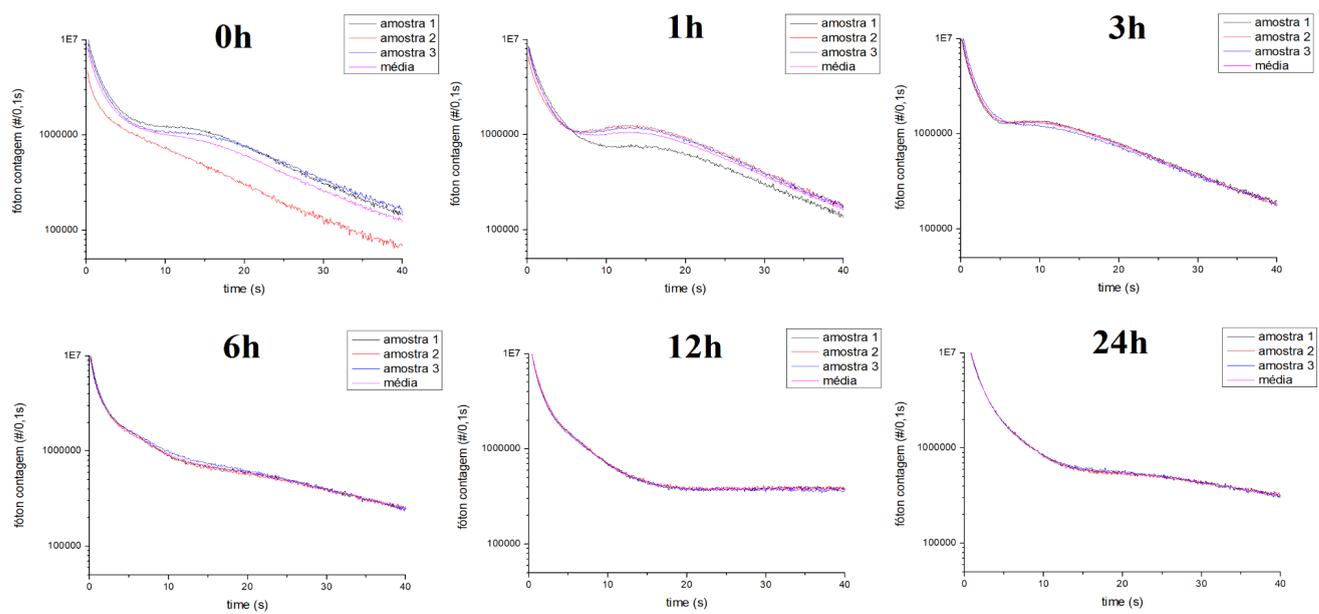
## Anexos

- **Dados brutos de DL:** curvas DL de cada triplicata e duplicata medida, a cada hora-teste após início.

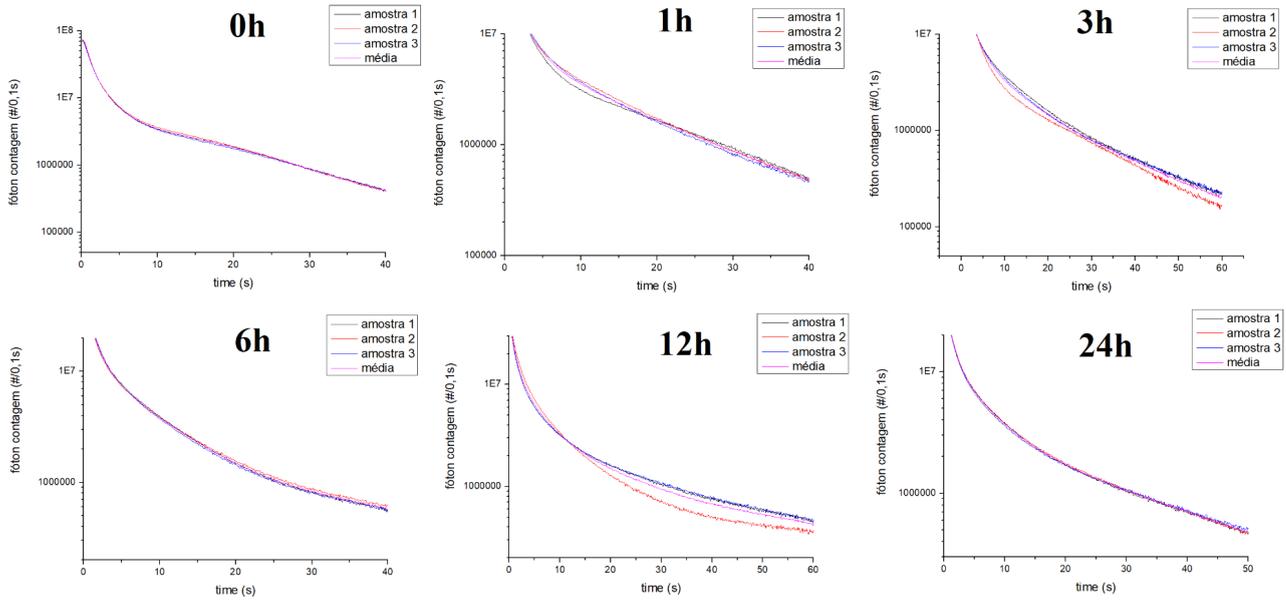
**$50 \times 10^5 / \mu\text{L}$**



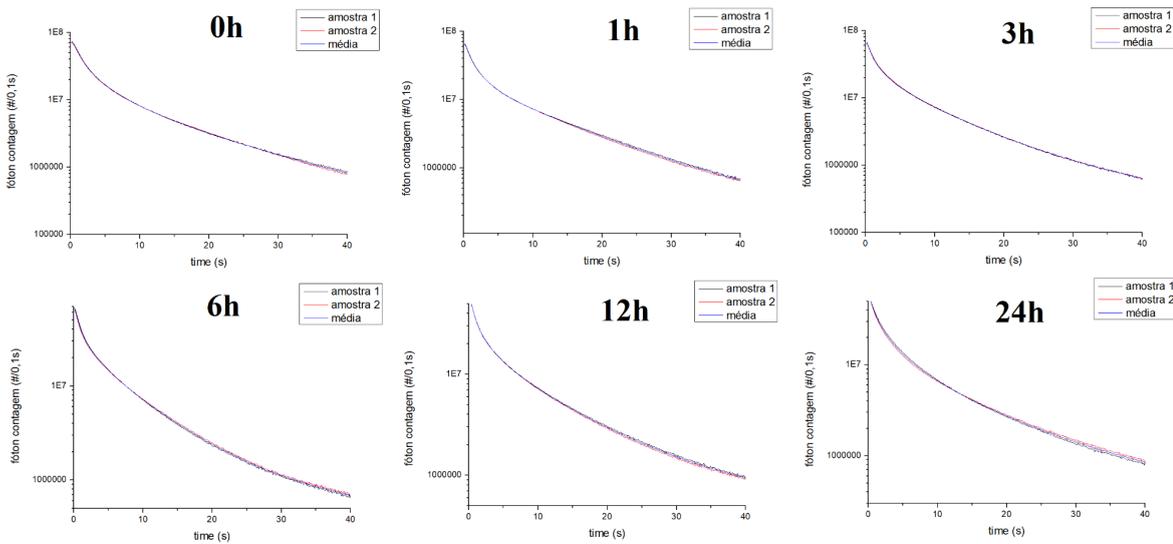
**$100 \times 10^5 / \mu\text{L}$**



## 500x10<sup>5</sup>/μL



## 1000x10<sup>5</sup>/μL



### - Artigo em Congresso internacional:

GALLEP, Cristiano M.; TAVARES, Julya CM; DA SILVA, Marcos V. Algae Luminescence Dynamics Applied for Fast Toxicological Testing. In: **2023 Photonics & Electromagnetics Research Symposium (PIERS)**. IEEE, 2023. p. 1149-1151.

# Algae Luminescence Dynamics Applied for Fast Toxicological Testing

Cristiano M. Gallep, Julya C. M. Tavares, and Marcos V. Da Silva

LaFA — Applied Photonics Lab., Faculdade de Tecnologia

Universidade Estadual de Campinas, Rua Paschoal Marmo 1888, Limeira, SP, Brazil

**Abstract**— We present results for algae (*R. subcapitata*) delayed luminescence when exposed to stressing compounds, showing good sensitivity as fast as 1h after inoculation. The utilization of the photonic approach, which involves reduced sample sizes and shorter preparation and cultivation has the potential to yield earlier outcomes when compared to conventional methods.

## 1. INTRODUCTION

Ecotoxicological tests are generally recognized for their high sensitivity. However, these tests are often associated with significant time and material expenditures, as the bio-samples require several days to fully develop. Additionally, the quantification of populations is typically estimated indirectly and imprecisely through absorbance measurements, or directly and even more expensively through manual enumeration of organisms. In this sense, delayed-luminescence (DL) tests of algae samples (*R. subcapitata*) can be used as a precocious (and cheaper) indicator for toxicological testing, when compared to the standard, 72-h long population growth tests. We present here new results for the sensitivity tests run as preparations (NaCl solutions: 1, 2, 4, 5 e 8 g/L) and the toxicity tests done for flumetralin ( $C_{16}H_{12}ClF_4N_3O_4$ , sol.: 1, 2, 3, 4 e 5 g/L). We also revise past DL data obtained for the pesticides diuron (DCMU,  $C_9H_{10}Cl_2N_2O$ ) [1] and ametrin (N2-ethyl-N4-isopropyl-6-methylthio-1,3,5- triazine-2,4-diamine). Good sensitivity can be obtained as fast as 1h after inoculation with the toxic solution, but goals are critical to the initial algae population used and also its age status. Such algae DL tests were proposed by Katsumata's group [2,3], but they did not reveal such important details on the optimal conditions for the tests to start with.

## 2. MATERIALS AND METHODS

As detailed in Ref. [4], algae samples were cultivated in nutritive media using appropriated dish (10 mL) to be hold further inside the photon-counting dark chamber, and also using the standard, 20-mL erlenmeyer for the standard absorbance tests. Samples were inoculated with the tested solutions in order to achieve the desired final concentrations, plus the control, non-harmed samples. DL tests were performed for each sample after 1, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after the drug inoculation, using dedicated the photon-costing setup (PMX-6100, Hamamatsu KK): dark for 60 s, and sequentially exposed to white light (30 s), and to IR (700 nm, 1 s), with the DL recorded just after (50 ms) turning the excitation off, for the next 60 s using 0.1 s integration time (cnt/0.1 s). Analogous to the standard, inhibition absorbance index, obtained by the relative absorbance in relation to the control group data after 72 h of growth — a DL inhibition index (iDL) can be determined by comparing the respective DL curves in the  $5\text{ s} < t < 30\text{ s}$  DL time profile, and so data can be converted to a 'dose x response' datagram, and compared to the standard curve.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 presents de DL data — each triplicate and average pattern — for the sensitivity tests run with NaCl, taken just one hour after the inoculation of algae samples, and the iDF *versus* concentration datagram for this series. Figure 2 presents the average DL data for the triplicates run with flumetralin, to show the DL evolution in the hours after inoculation, and to confirm that just one hour is enough for the sample to be disturbed and present an inhibited DL curve, when compared to the control (0 g/l) sample.

As seen above (Fig. 1(a)), the DL time profile starts losing the concavity (or plateau) — that is present clearly in the control group, from  $5\text{ s} < t < 25\text{ s}$  — as the NaCl concentration increases from 1 to 8 g/L, looking more and more as a monotonous hyperbolic decay. By comparing each group to the control, the iDL factor is calculated and represents the amount of DL suppression, as shown at Fig. 1(b).

After the sensitivity test, a trial with flumetralin was run, and the DL measured for each triplicate up to 24 h after the inoculation; DL data of each group average is shown at Fig. 2:

already at the first reading, 1 h after start, all stressed groups present DL below the control group, what keeps being repeated up to the 24th hour measurement.

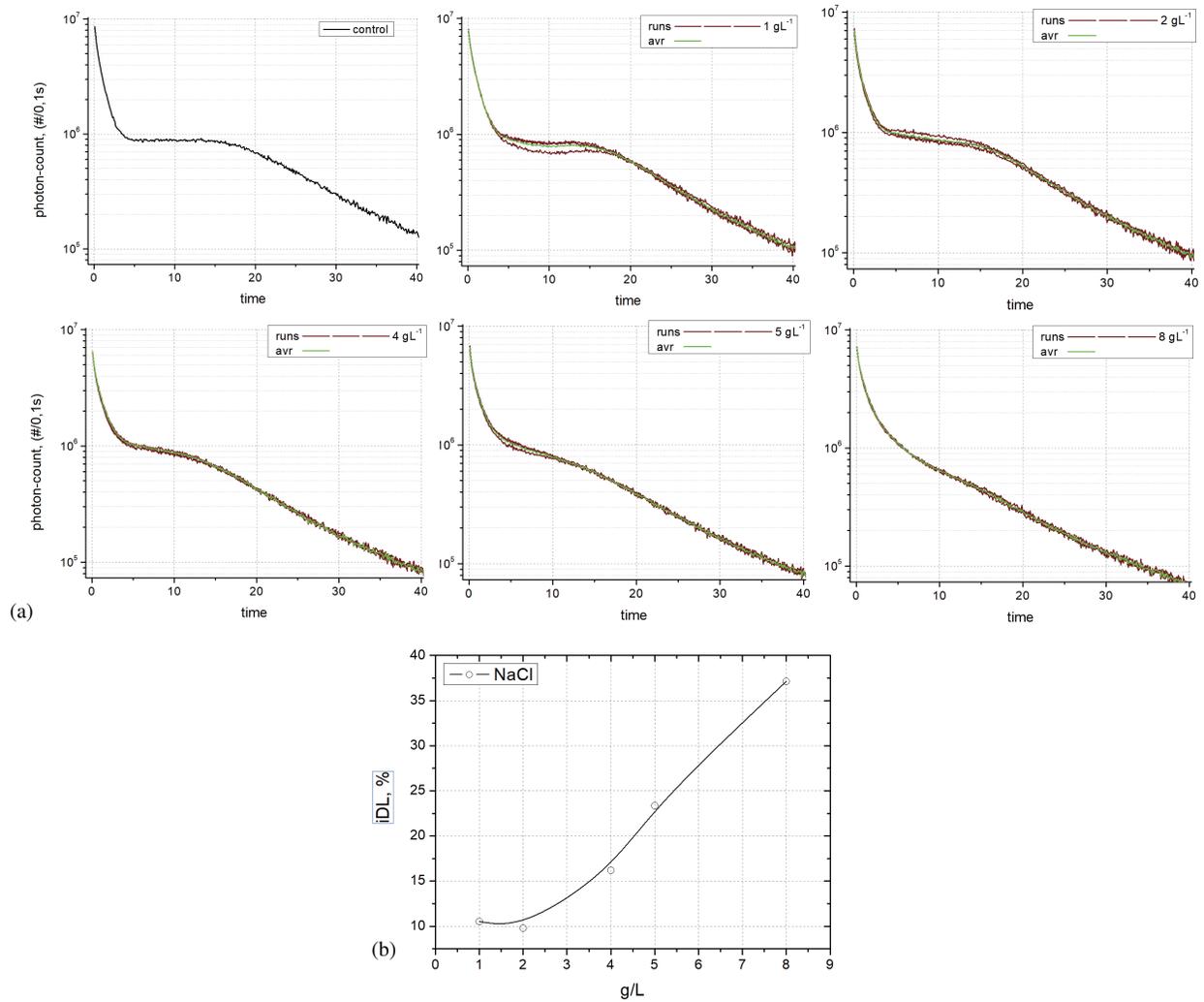
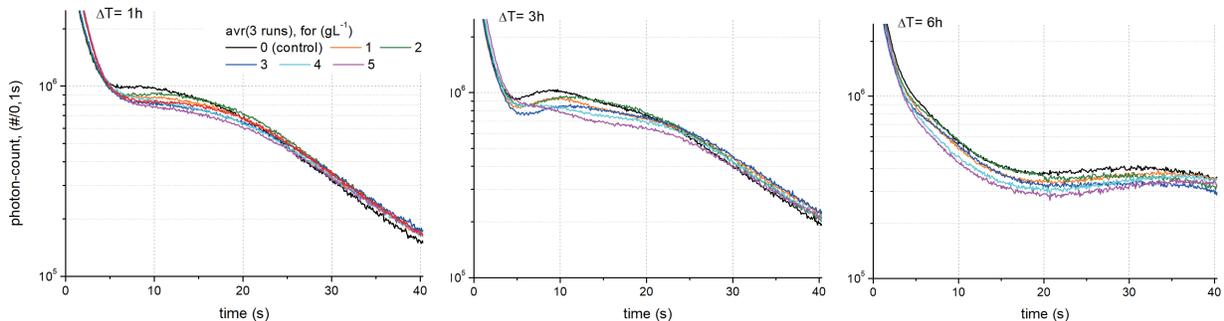


Figure 1. (a) DL plots for triplicates and average photon-count, one hour after inoculation, for sensitivity test with NaCl: 0 (control), 1, 2, 4, 5 and 8 g/L; (b) corresponding DL inhibition (iDF, % in relation to control) versus NaCl concentration.



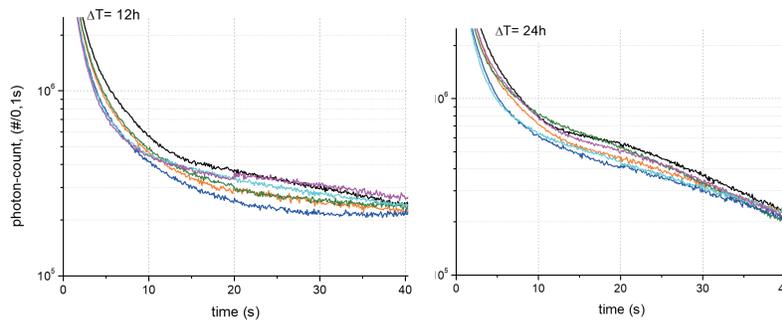


Figure 2. DL pattern dynamics (average of triplicates) changing after inoculation with *flumetralin*: 1, 3, 6, 12 and 24-h after inoculation.

#### 4. CONCLUSION

The utilization of the photonic approach, which involves reduced sample sizes and shorter preparation and cultivation periods, has the potential to yield earlier outcomes compared to conventional methods. This renders it suitable for application in field trials, where implementing cultivation facilities is challenging, and in laboratory experiments requiring prompt results. Furthermore, it serves as a supplementary technique to the established standard methods.

Further tests will be performed in order to optimize the initial conditions, since the concentration and the age of the algae supply, and the initial testing for the control sample, are the keys to these tests to be reproducible and, in future, be used in field trials.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank FAPESP — *Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo* (11/10763-6, 15/11280-0, 23/02079-5) and CNPQ — *Conselho Nacional de Pesquisa* (301701/2019-9), Brazil, for partial research support. We also thank LAEG/FT-UNICAMP staff, by the technician Adria C de Oliveira and prof. Gisela A. Umbuzeiro, for their kind support with algae samples; and to Hamamatsu Photonics KK for the initial support with the technique training.

#### REFERENCES

1. Peixoto, et al., “Luminescence dynamics in *R. subcapitata* as a precocious ecotoxicology indicator,” *Imaging and Applied Optics Congress*, 2022 (OSA) paper JW2A.27.
2. DOI:10.1016/j.watres.2006.07.016.
3. DOI:10.0.3.239/s00128-009-9826-1.
4. ABNT NBR 12648-2018, OECD 201/2011 — Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.