

Influência do ácido fólico (vitamina B9) em organismos aquáticos: *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* como modelos para avaliação da ecotoxicidade

Letícia Melo Almeida, Murilo Alison Vigilato Rodrigues e José Roberto Rogero
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

A radioterapia, apesar de amplamente empregada no tratamento de diversos tipos de câncer, pode gerar efeitos colaterais. As doses de radiação ionizante necessárias à terapia podem afetar a continuidade do tratamento, o que aumenta os óbitos, além de influenciar diretamente na qualidade de vida do paciente [1]. Por isso, segue necessária a busca por novos agentes radiomodificadores que reduzam os efeitos adversos da radioterapia.

O ácido fólico (AF), ou folato, é um micronutriente do complexo B (vitamina B9) que atua como coenzima no metabolismo de aminoácidos, síntese de purinas e pirimidinas, formação de DNA e RNA, sendo associado à divisão celular [2]. A ingestão insuficiente de AF ou sua má absorção pelo organismo pode causar anormalidades metabólicas, como a hiperhomocisteína, hipometilação e quebras de fita do DNA [3], por isso a suplementação deste vem sendo indicado para reduzir e/ou prevenir diversas doenças. No entanto, o seu papel como radiomodificador não é bem compreendido pela falta de estudos *in vivo*. Nesse contexto, é importante identificar a influência do AF frente aos dois tipos de radiação. A estrutura química do AF permite supor uma ação antioxidante do mesmo, reagindo com radicais livres e modificando o efeito da radiação ionizante e não ionizante. Neste contexto, testes de ecotoxicidade em microcrustáceos planctônicos, *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*, organismos-teste de água, doce conhecidos como pulgas d'água, seguindo as normas ABNT-NBR 12713 [4] se mostram uma alternativa interessante para avaliar os efeitos radiomodificadores do AF.

OBJETIVO

Este projeto teve como objetivo investigar a influência do AF nos organismos aquáticos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* irradiados com radiação gama, visando avaliar um esperado efeito radiomodificador.

METODOLOGIA

Os testes de ecotoxicidade foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Química e Meio Ambiente (CEQMA). Os organismos-teste foram cultivados sob condições controladas e os testes seguiram metodologia descrita pela norma da ABNT-NBR 12713 [4]. A partir do valor de IC₅₀, obtido por testes de citotoxicidade, foram definidos os valores de concentração usados nos testes de toxicidade em organismos aquáticos do AF. A água utilizada nos cultivos e testes (denominada água de diluição) foi o meio MS filtrado em rede de plâncton e os parâmetros físico-químicos foram ajustados de acordo com as necessidades de cada organismo-teste [4]. O controle da sensibilidade dos organismos foi realizado periodicamente com substâncias de referência estabelecidas pelos protocolos ambientais como o NaCl. Esse procedimento permite maior precisão e confiabilidade nos resultados obtidos ao longo do tempo. O teste de ecotoxicidade aguda avalia os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico em um curto período de tempo. O critério de avaliação foram a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006). Foram transferidos 5 indivíduos jovens com 6 a 24 horas para os frascos contendo 10 mL das soluções de AF, sendo

4 réplicas para cada concentração. O ensaio teve 48 horas de exposição. Juntamente, sob as mesmas condições que os testes, foram realizados 2 controles para verificar os critérios de aceitação, contendo apenas água de cultivo e outro contendo a concentração mais alta dos testes [4] No ambiente aquático, devido a fatores de diluição, em geral, os organismos estão expostos a níveis subletais dos poluentes. Esta exposição dos organismos ao agente químico, em níveis subletais, pode não levar à morte do organismo, mas pode causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais em longo prazo [5].

As unidades experimentais foram submetidas à radiação gama com doses entre 0 e 1000 Gy, utilizando uma taxa de dose de aproximadamente 27 Gy/min. O resultado da DL₅₀ usado foi obtido em estudo anterior [6], através de uma curva dose-resposta, utilizando os resultados de viabilidade em função das doses de radiação.

RESULTADOS

Os testes iniciais de ecotoxicidade com os microcrustáceos *Daphnia similis* foram feitos para a determinação da LC₅₀. O AF foi solubilizado em 1,0 mL de NaOH 0,5 mol/L, 9,0 mL de PBS 10x e 90 mL de meio MS, resultando em uma concentração de 50 mg/mL. Para os ensaios de toxicidade aguda, as neonatas, nascidas em um período inferior a 24 horas, foram separadas em um béquer de 150 mL com meio MS, com a quantidade mínima de 120 neonatas. Após o preparo da solução de ácido fólico, os organismos-testes foram separados em béqueres, sendo 5 neonatas em cada. As concentrações utilizadas nos testes foram: 6,25%, 12,50%, 25%, 50% e 100% a partir da solução estoque de AF. Para cada concentração, foram utilizados 4 béqueres. Após 6 horas da separação das neonatas, esses organismos foram acondicionados nos béqueres contendo 10 mL da solução teste e colocados em

incubadora por 48 horas, o tempo de duração do teste de ecotoxicidade aguda. Após a realização de triplicata, a média de LC₅₀ obtida foi 35%, sendo 0,175 mg/mL.

CONCLUSÕES

Devido a diversos fatores, como contaminação das algas e a morte de lotes inteiros, a reprodução das *Daphnias similis* foi demorada, o que resultou em uma prolongação dos testes. Todavia, com os primeiros resultados sobre a LC₅₀ do ácido fólico foi possível determinar a concentração a ser empregada posteriormente nos testes com irradiação para se avaliar o seu potencial efeito radiomodificador, que pode ser radioprotetor ou radiosensibilizador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Fuzissaki MA, Paiva CE, Oliveira MA, Lajolo Canto PP, Paiva Maia YC. J Pain Symptom Manage, 58(1):92-99.e1, 2019.
- [2] de Marqui PA, Kuroyanagi FL, Foss MS, Dobre NR, Souza DN, Bittencourt WS, Lima E. UNOPAR Cient, Ciênc Biol Saúde, 16(2):141-148, 2014.
- [3] Fenech M. Mutation Res, 733(1-2):21-33, 2012.
- [4] ABNT. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Norma ABNT-NBR 12713. 21 p. 2004.
- [5] Aragão MA, Araújo RPA. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: Zagatto PA; Bertoletti E. Ecotoxicologia: Princípios e Aplicações. Editora Rima. São Carlos. 464p. 2006.
- [6] Ormenio, MB, et al. Resveratrol radiomodifier effect on *Daphnia similis*. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN)

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e por verbas do Edital COPDE nº 06/2020.