



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE – CCTS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA, QUÍMICA E MATEMÁTICA – DFQM**

EDUARDO GARCIA DE SOUZA

AVALIAÇÃO MOLECULAR DO FÍGADO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO-AMERICANA (*Lithobates catesbeianus*) POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).

**SOROCABA – SP
2022**

EDUARDO GARCIA DE SOUZA

Avaliação molecular do fígado de girinos de rã-touro-americana (*Lithobates catesbeianus*) por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Física, Química e Matemática (DFQM) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), como requisito para obtenção do grau de Licenciado em Química.

Orientadores: Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Prof. Dr. Giovanni Pimenta Mambrini

**SOROCABA – SP
2022**



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

COORDENAÇÃO DO CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA - CCQL-So/CCTS

Rod. João Leme dos Santos km 110 - SP-264, s/n - Bairro Itinga, Sorocaba/SP, CEP 18052-780

Telefone: (15) 32296128 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 3/2022/CCQL-So/CCTS

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)

FOLHA DE APROVAÇÃO

EDUARDO GARCIA DE SOUZA

AVALIAÇÃO MOLECULAR DO FÍGADO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO-AMERICANA (LITHOBATES CATESBEIANUS) POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – *Campus* Sorocaba

Sorocaba, 11 de abril de 2022

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho Prof. Dr. Giovanni Pimenta Mambrini
Membro da Banca 1	Prof. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte
Membro da Banca 2	Profa. Dra. Luciana Camargo de Oliveira



Documento assinado eletronicamente por **Iolanda Cristina Silveira Duarte, Professor(a) do Magistério Superior**, em 11/04/2022, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giovanni Pimenta Mambrini, Docente**, em 11/04/2022, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Camargo de Oliveira, Docente**, em 11/04/2022, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cleoni dos Santos Carvalho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 11/04/2022, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **0648696** e o código CRC **B37132CA**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.009675/2022-76

SEI nº 0648696

Dedico este trabalho a todas as mentes curiosas e brilhantes que usam a (cons)ciência em prol do bem e também aqueles que, apesar de tudo, continuam lutando e transformando vidas por meio da educação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho, cujos ensinamentos, carinho e simpatia com os seus alunos transcendem o laboratório e as fronteiras da universidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Giovanni Pimenta Mambrini, por aceitar a orientar-me prontamente e por mostrar-se entusiasmado frente a novos desafios como todo bom cientista.

Ao Prof. Dr. João Batista dos Santos Junior, por ensinar com maestria e mostrar aos seus alunos a pluralidade e o poder da educação, tornando a sala de aula um ambiente de aprendizagem acolhedor e frutífero para discussões sadias.

À Profa. Dra. Luciana Camargo de Oliveira, por sempre instigar os seus alunos a darem o seu melhor, não aceitando menos do que o impecável – lição aprendida!

A todos os integrantes do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LabiOM), sem os quais, este trabalho não teria sido possível.

À minha sobrinha, Letícia, discente do curso de Geografia, também desta universidade, a qual me fez companhia durante as viagens até à universidade.

A todos os amigos e amigas que fiz ao longo desses anos de graduação, em especial a Jéssica Evelise Ferreira, Rebeca de Mello César, Núbia Evangelista, Mirelle Toti Mafeis, Tamires Mieko Kunitaque, Hellen Karen de Sousa, Samara Sabino de Oliveira, Natalia Rodrigues Ribeiro, Carolline Mascarenhas, Ana Christina Siqueira Lima e Cleber Duarte da Costa por estarem ao meu lado, por me estimularem a continuar quando eu mesmo desacreditei da minha capacidade e por tornar essa caminhada mais leve. A todos vocês o meu carinho e apreço. Contem comigo sempre!

Aos meus pais, ao meu namorado, e familiares, que mesmo sem entenderem ou ter ideia dos percalços enfrentados por todos aqueles que se aventuram em um curso de ciências, por darem-me forças para seguir.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus Sorocaba, por possibilitar que eu tivesse acesso a uma educação superior de qualidade, que eu ampliasse os meus conhecimentos e me tornasse um cidadão mais reflexivo frente às questões concernentes à educação, ao ensino, a pesquisa e a ciência.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Man is not above nature, but in nature”

Ernst Haeckel

RESUMO

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR – é uma técnica fácil de ser executada e que pode ser aplicada a diferentes tipos de amostras, tais como: sólidos, líquidos, gases, semissólidos, polímeros, materiais biológicos, entre outras. O presente trabalho, utilizou a técnica de FTIR para a detecção de possíveis alterações moleculares no fígado de girinos de rã-touro-americana (*Lithobates catesbeianus*) expostos à água coletada da represa de Itupararanga em Votorantim (BV) e do seu reservatório em Ibiúna (RI); ambos pontos pertencem ao rio Sorocaba. Nesse estudo, constatou-se alterações moleculares no intervalo de 3200 – 2600 cm^{-1} do espectro do infravermelho para o fígado dos girinos expostos à água coletada. As alterações observadas, podem estar associadas a presença de metais (Al, Cd, Mn e Zn) na água. Ainda que tenham sido identificadas alterações nos espectros das amostras que foram expostas à água coletada em relação ao controle, análises complementares a esse estudo precisam ser realizadas para que o exposto, seja de fato, confirmado. Portanto, neste trabalho, empenhou-se em entender as alterações observadas nos espectros e também em propor o uso dessa técnica como uma ferramenta alternativa para aplicação em ecotoxicologia.

Palavras-chave: Análise de FTIR. Infravermelho. CECs. *Lithobates catesbeianus*. Tecidos biológicos.

ABSTRACT

Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR – is an easy-to-perform technique that can be applied to different types of samples, such as: solids, liquids, gases, semi-solids, polymers, biological materials, among others. The present work used the FTIR technique to detect possible molecular alterations in the liver of American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to water collected from the Itupararanga dam in Votorantim (BV) and its reservoir in Ibiúna (RI); both points belong to the Sorocaba river. In this study, molecular changes were observed in the range of 3200 – 2600 cm⁻¹ of the infrared spectrum for the liver of tadpoles exposed to the collected water. The observed changes may be associated with the presence of metals (Al, Cd, Mn and Zn) in the water. Although alterations have been identified in the spectra of the samples that were exposed to the water collected in relation to the control, complementary analyses to this study need to be carried out so that the exposed is, in fact, confirmed. Therefore, in this work, it was endeavoured to understand the changes observed in the spectra and also to propose the use of this technique as an alternative tool for application in ecotoxicology.

Keywords: FTIR analysis. Infrared. CECs. *Lithobates catesbeianus*. Biological tissues.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contaminantes de preocupação emergentes (CECs) e seus subgrupos: PPCPs, EDCs, FRs, Pesticidas e ASWs.....	12
Tabela 3 – Modos de vibração molecular comuns para os lipídios	29
Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos e concentrações dos metais ($\mu\text{g L}^{-1}$) presentes nas amostras de água coletada do rio Sorocaba nos pontos em Votorantim (BV) e Ibiúna (RI) durante as estações de verão e de inverno de 2019 e os valores estabelecidos pela resolução 357/2005 do CONAMA.	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Grupos funcionais com as suas respectivas regiões no espectro vibracional	17
Figura 2 – Diagrama simplificado de um interferômetro.....	18
Figura 3 – Diagrama óptico de um interferômetro	19
Figura 4 – Formas de vibração molecular	20
Figura 5 – Rã-touro-americana (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	21
Figura 6 – Etapas do desenvolvimento de um anfíbio anuro	22
Figura 7 – Aquários contendo os girinos utilizados no experimento	25
Figura 8 – Espectroscopia da mama humana: (A) normal; (B) hiperplasia; (C) fibroadenoma e (D) carcinoma.....	28
Figura 9 – Espectros da análise do fígado dos girinos com suas respectivas bandas	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACL – aquários controles (A, B e C)

APIs – Active Pharmaceutical Ingredients

ATR-FTIR – Attenuated Total reflectance Fourier Transform Infrared

ASTM – American Society for Testing and Materials

ASWs – Artificial Sweeteners

BPA – Bisfenol A

BV – ponto de coleta de água: represa de Itupararanga em Votorantim

CAT – Catalase

CECs – Contaminants of Emerging Concern

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DEET – N,N-dietil-meta-toluamida

EDCs – Endocrine-Disrupting Compounds

ETE – Estação de Tratamento de Efluente

FACENS – Faculdade de Engenharia de Sorocaba

FRs – Flame Retardants

FTIR – Fourier transform infrared spectroscopy

GHS – Glutathione Reduzida

GPx – Glutathione Peroxidases

GTS – S-transferases

HHCB – 1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametilciclopenta- γ -2-benzopirano

Kd – Coeficiente de Distribuição Água-Solo

LaBioM – Laboratório de Bioquímica e Microbiologia

MIR – Mid-Infrared

PCO – Proteínas Carboniladas

PI – aquários (G, H e I)

PPCPs – Pharmaceuticals and Personal Care Products

PV – aquários (D, E e F)

RI – ponto de coleta de água: reservatório de Itupararanga em Ibiúna

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

ZDP – Zero Path Difference

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	11
1.1	Contaminantes de Preocupação Emergentes (CECs).....	11
1.2	A técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR.....	16
	A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR – aplicada ao estudo de amostras biológicas e aos contaminantes de preocupação emergentes – CECs.....	20
1.3	A espécie <i>Lithobates catesbeianus</i>	21
2.0	OBJETIVO GERAL	22
2.1	OBJETIVO ESPECÍFICO	23
3.0	METODOLOGIA.....	23
3.1	Coleta das amostras de água	23
3.2	Animas utilizados em laboratório	23
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1	Análises das amostras de fígado	25
5.0	CONCLUSÃO.....	36
6.0	ANEXO I.....	38
7.0	BIBLIOGRAFIA	39

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Contaminantes de Preocupação Emergentes (CECs¹)

Muitas das tarefas das quais executamos rotineiramente, geram algum tipo de substância que pode ser prejudicial aos seres humanos e/ou ao meio ambiente. Essas substâncias, oriundas de medicamentos, hormônios, produtos de limpeza e de higiene pessoal, entre tantas outras, ao chegarem aos mananciais, contaminam à água e os organismos que vivem nesses ecossistemas. A essa classe de substâncias denomina-se: contaminantes de preocupação emergente (STARLING; AMORIM; LEÃO, 2019).

Os CECs podem ser substâncias naturais ou sintéticas que estão presentes no ar, água e solo, porém, cuja toxicidade ou persistência no ambiente é passível de alterar o metabolismo de um ser vivo (SAUVÉ; DESROSIERS, 2014): Tais substâncias podem ser classificadas em três grupos:

- I. contaminantes novos, isto é, compostos ou moléculas que ainda não foram estudados e que surgiram recentemente na literatura científica;
- II. contaminantes já conhecidos, mas que os problemas ambientais não foram totalmente compreendidos;
- III. contaminantes tradicionais, ou seja, já conhecidos, mas que tiveram informações novas descobertas.

Grande parte dos CECs que chegam ao ambiente aquático se deve a um sistema de tratamento de águas residuais ineficiente, o que tem contribuído para a (re)contaminação de rios, lagos, lençóis freáticos e bacias hidrográficas, uma vez que, mesmo após o tratamento da água, algumas substâncias permanecem inalteradas e, portanto, chegam a esses ambientes em sua forma integral (SALIMI; ESRAFILI; GHOLAMI, 2017).

Ademais, os CECs abarcam outros subgrupos de substâncias, como os dos produtos de cuidados pessoais e farmacêuticos (PPCPs²), os dos disruptores

¹ CECs do inglês contaminants of emerging concern

² PPCPs do inglês pharmaceuticals and personal care products

endócrinos (EDCs³), os dos retardantes de chamas (FRs⁴), os dos pesticidas e os dos adoçantes artificiais (ASWs⁵) (SALIMI; ESRAFILI; GHOLAMI, 2017). Em razão disso, a identificação e o estudo do comportamento dessas substâncias nos mais variados ambientes em que possam ser encontradas, seja em um lago ou em um órgão de um animal, faz-se urgente a compreensão dos riscos inerentes que essas substâncias apresentam para o meio ambiente e também para as diferentes formas de vida.

A Tabela 1 apresenta os subgrupos mencionados no estudo de SALIMI; ESRAFILI; GHOLAMI et al., (2017), trazendo alguns exemplos de CECs e os seus respectivos usos.

Tabela 1 – Contaminantes de preocupação emergentes (CECs) e seus subgrupos: PPCPs, EDCs, FRs, Pesticidas e ASWs

Subgrupos	Uso	Exemplo
PPCPs		
Analgésicos	Aliviar dores	Aminofenol e ácido acetilsalicílico
Drogas antiepiléticas	Anticonvulsionante	Carbamazepina e primidona
Anti-hiperlipidemicos	Reguladores de lipídios	Gemfibrozil, ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico
Anti-inflamatórios não-esteroidais	Anti-inflamatório	Diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno e naproxeno
Hormônios sintéticos	Hormônios	Estrona, 17 α -Estradiol, 17 α -etinilestradiol e estriol
Antimicrobianos	Antibióticos	Eritromicina, sulfametoxazol e tetraciclina
	Antissépticos	Triclosano, bifenilos, clorofeno
Almíscares policíclicos	Fragrâncias	1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametilciclopenta- γ -2-benzopirano (HHCB)
	Repelentes de insetos	N,N-dietil-meta-toluamida (DEET)
	Fragrâncias	Acetofenona
Outros	Estimulantes	Cafeínas
EDCs		
Esteróides	Estrogênio	17 β -estradiol
	Metabólitos	Estrona
Alquilfenóis	Produtos industrializados e de uso doméstico	Nonylfenol e octfenol
Compostos poliaromáticos		Retardantes de chamas bromados e bisfenóis policlorados

³ EDCs do inglês endocrine-disrupting compounds

⁴ FRs do inglês flame retardants

⁵ ASWs do inglês artificial sweeteners

Tabela 1 (continuação)

Subgrupo	Uso	Exemplos
EDCs		
Compostos oxigenados	Plastificantes Produção industrial de policarbonatos e resinas epoxy	Ftalados Bisfenol A (BPA)
Pesticidas	Inseticidas, herbicidas, fungicidas	Atrazina, chlordane e trifluralino
Outros	Subprodutos de processos industriais e de combustão	Dioxinas e furanos
FRs		
Retardantes de chamas contendo halogênios (F, Cl, Br ou I)	FRs	Bisfenóis e fenóis bromados
Retardantes de chama a base de fósforo	FRs	Fósforo vermelho e fosfatos inorgânicos
Melamina FRs	FRs	Cianurata de melamina
Hidróxidos inorgânicos FRs	FRs	Hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio
Boratos FRs		Borato de sódio e ácido bórico
Silício FRs	FRs	
Sinergismo	FRs	Halogênios com antimônio e fósforo com nitrogênio
Pesticidas		
Carbamatos	Herbicidas, inseticidas e fungicidas	Carbendazim, benomil e carbaril
Cloroacetinalidas	Herbicidas preemergentes	Metoalchlor e alachor
Ácidos clorfenoxico	Herbicidas	Benyazona e triclopyr
Organoclorados	Inseticidas	DDT, dieldrin, endrin e endosulfano
Organofosfatos	Inseticidas	Diazinon, malation, cloropyrifos
Piretróides	Inseticidas	Bifentrina, cipermetrina e esfenvalerato
Triazinas	Herbicidas	Atrazina, cianazina e simazine
Outros pesticidas		Phenylurea herbicida isoproturon e mecoprop
ASWs		

Adoçantes artificiais

Substitutos de açúcares

Acesulfame, sacarina, cyclama, aspartame, neotame, neoesperidina e dihidroalcona

FONTE: SALIMI; ESRAFILI; GHOLAMI, 2017.

Entre os produtos farmacêuticos pertencentes à classe dos CECs, os ingredientes farmacêuticos ativos (APIs⁶) estão entre os compostos que mais têm sido identificados no meio ambiente, sendo encontrado majoritariamente nos ambientes aquáticos, o que justifica o fato de os APIs serem objetos de estudos de muitas pesquisas atualmente (KÜMMERER et al., 2008).

Os três principais meios de entrada dos produtos farmacêuticos no meio ambiente se dão por meio das estações de tratamento de efluentes (ETE), dos hospitais e das indústrias; visto que é de responsabilidade das ETE coletar e tratar à água das cidades, que, por sua vez, contém os APIs e os seus metabólitos que são excretados nas fezes e urina de pessoas e animais. Além do mais, o descarte inadequado dessas substâncias no meio ambiente assim como à alta concentração de APIs presentes nos efluentes dos hospitais e também das indústrias, são outros agravantes que têm colaborado e intensificado a contaminação dos ambientes aquáticos (SANGION; GRAMATICA, 2022).

Os APIs ao serem metabolizados passam por mudanças em sua estrutura química devido à ação de enzimas e/ou microrganismos; gerando ao final do metabolismo, metabólitos que se diferenciarão em suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, dependendo do fármaco que originou o APIs bem como a maneira com a qual a droga foi administrada ao paciente; dado que a via de absorção do medicamento influenciará no processo de metabolização do APIs, podendo resultar na excreção parcial ou total do medicamento (KÜMMERER et al., 2008).

Outro ponto a ser considerado, é que os metabólitos continuam a passar por alterações em sua estrutura química mesmo após a excreção, pois ao estarem disponíveis no meio ambiente, os metabólitos podem sofrer hidrólise, foto-oxidação ou alguma outra alteração na estrutura química do composto em função de transformações bióticas e abióticas (KÜMMERER et al., 2008).

De forma símile, os medicamentos de uso veterinário, como os antibióticos, que são amplamente utilizados na pecuária para aumentar a eficiência alimentar, evitar o

⁶ APIs do inglês active pharmaceutical ingredients

acometimento de infecções bacterianas e, assim, proporcionar o desenvolvimento saudável dos animais, também tem demonstrado ser um risco à saúde do meio ambiente, posto que, os excrementos dos animais são utilizados na agricultura como um tipo de fertilizante orgânico e, portanto, permitindo com que os antibióticos e outras substâncias derivadas do metabolismo desses medicamentos cheguem ao solo e ao ambiente aquático contaminando-os (SEO et al., 2007).

Dessa forma, a presença de resíduos de antibióticos no solo altera os microorganismos que ali vivem e modifica a capacidade desses organismos de degradar contaminantes, interferindo nos ciclos biogeoquímicos, por exemplo, no ciclo do nitrogênio. Como resultado, os antibióticos acabam se acumulando nas camadas superiores do solo e são posteriormente transportados para águas subterrâneas. Um exemplo de substância presente na água, é a classe das sulfonamidas, que tem sido detectada nas águas superficiais, nos lençóis freáticos, nos poros do solo e na água utilizada para o consumo (WEGST-UHRICH et al., 2014).

Como as substâncias passam por diversos processos ao adentrarem os diferentes compartimentos ambientais, logo, as mudanças na estrutura química da molécula resultarão em propriedades físico-químicas e farmacêuticas distintas daquelas do fármaco original. Em princípio, o metabolismo dos APIs tende a gerar compostos com baixa toxicidade, contudo, ocasionalmente, os produtos do metabolismo dos APIs produzem compostos mais ativos, como é o caso dos pró-fármacos, que são ativados após a sua biotransformação. Além do mais, a via metabólica da sulfatação dos medicamentos, pode, indiretamente, produzir compostos mutagênicos (KÜMMERER et al., 2008).

Análogo aos processos citados – biotransformação, foto-oxidação, hidrólise, processos bióticos e abióticos – que podem transformar um composto em outro, e, assim, influenciar a biodisponibilidade dessas partículas; a adsorção, isto é, a retenção de partículas líquidas ou gasosas à superfície de um sólido, também afeta o transporte e a disponibilidade de fármacos presentes no ambiente aquático, entretanto, essa relação de dependência poderá ser maior ou menor, conforme as espécies químicas presentes, o que em certos casos, dificulta a remoção dessas substâncias encontradas na água (KÜMMERER et al., 2008).

1.2 A técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica comparativamente fácil de ser executada e que permite ser aplicada a vários tipos de amostras – sólidos, líquidos, gases, semissólidos, pó, polímeros, orgânicos, inorgânicos, materiais biológicos, substâncias puras e misturas (SMITH, 2011) – seja para um teste simples de identificação ou mesmo para uma análise mais minuciosa. Essa técnica tem por objetivo estudar a interação da radiação com as vibrações moleculares, a qual, por meio da absorção da radiação, possibilita mensurar as transições entre os níveis de energia de vibração molecular, dado que os níveis de energia vibracional são característicos de cada molécula, conseqüentemente, dependem da massa dos átomos, da geometria molecular e da força das ligações químicas presentes em um composto. O espectro resultante dessa análise, fornece uma espécie de “impressão digital” da molécula que permitirá constatar a presença ou ausência de certos grupos funcionais (LARKIN, 2011).

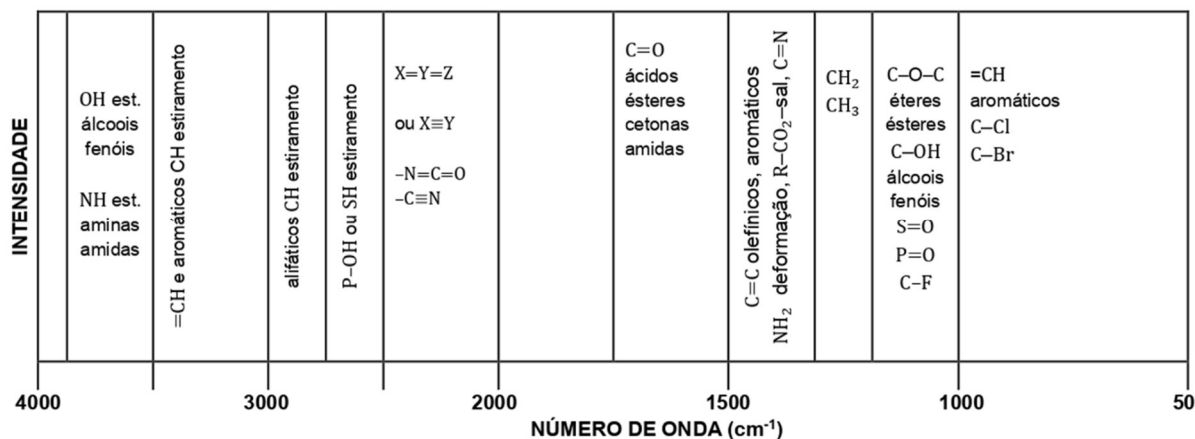
No que tange o estudo de sistemas biológicos mediante a técnica de FTIR, a região do espectro eletromagnético do infravermelho médio (MIR⁷) é a mais significativa para à análise. Essa região pode ser dividida em: região de estiramento X – H ($4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$); região das triplas ligações ($2500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$); região das duplas ligações ($2000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$); e região da “impressão digital” ($1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$) (MEYERS, 2004).

Embora essa técnica – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier – tenha sido aplicada majoritariamente para o estudo de moléculas isoladas, o escopo da sua aplicabilidade vem sendo ampliado a cada dia. Isso se deve ao desenvolvimento e ao aperfeiçoamento de novas tecnologias e softwares que têm facilitado o tratamento e à análise de dados, e, com isso, tem viabilizado o estudo de sistemas mais complexos, como, por exemplo, o estudo de problemas biológicos. Isto posto, mostra-se que a espectroscopia de infravermelho é uma técnica de grande importância na atualidade, tendo em vista o êxito no estudo de sistemas biológicos, biomoléculas, biomembranas, tecidos de animais, células de microrganismos e amostras clínicas (MEYERS, 2004).

⁷ MIR do inglês mid-infrared

A Figura 1 apresenta as regiões do espectro vibracional de acordo com a frequência característica de alguns grupos funcionais.

Figura 1 – Grupos funcionais com as suas respectivas regiões no espectro vibracional



FONTE: LARKIN, 2011.

Como funciona um FTIR?

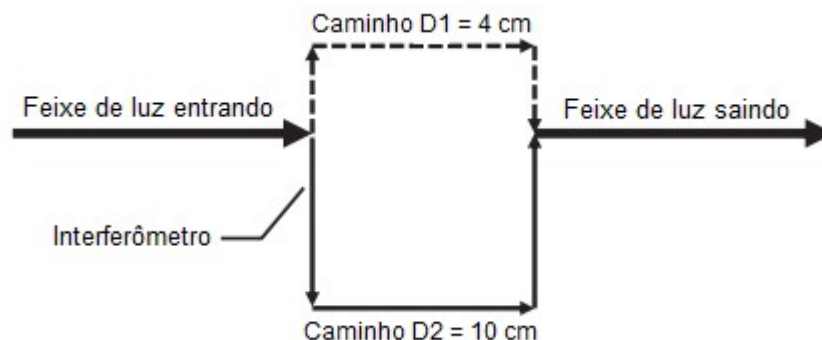
Em todo FTIR há um dispositivo óptico chamado interferômetro que mede o padrão de interferência entre dois feixes de luz. A técnica de FTIR baseia-se nessa interferência com a radiação que ocorre entre os dois feixes de luz para produzir um interferograma, isto é, um sinal que é gerado devido a mudança no caminho óptico entre os dois feixes de luz. Quando a luz de uma fonte de infravermelho entra em um interferômetro, o feixe de luz é dividido em dois (Figura 2). Então, o interferômetro faz com que ambos os feixes de luz percorram caminhos distintos. Após os feixes de luz terem passados por caminhos diferentes, os feixes são recombinados e, subsequentemente, deixam o interferômetro (SMITH, 2011).

Se dois feixes de luz passarem por trajetos diferentes, por exemplo, por um caminho D1 e D2 cujas medidas são respectivamente 4 e 10 cm, haverá uma diferença entre as distâncias percorridas pelos feixes de luz, a essa diferença na distância percorrida pelos feixes de luz intitula-se *diferença de caminho óptico* (δ). Todavia, se os feixes de luz percorrerem a mesma distância no interferômetro, essa diferença será nula. Quando isso ocorre, a diferença no trajeto percorrido, ou seja, a

ausência da diferença, é denominada de *diferença de caminho zero* (ZDP⁸) (SMITH, 2011).

A seguir, apresenta-se um diagrama simplificado de um interferômetro exemplificando o que foi descrito.

Figura 2 – Diagrama simplificado de um interferômetro



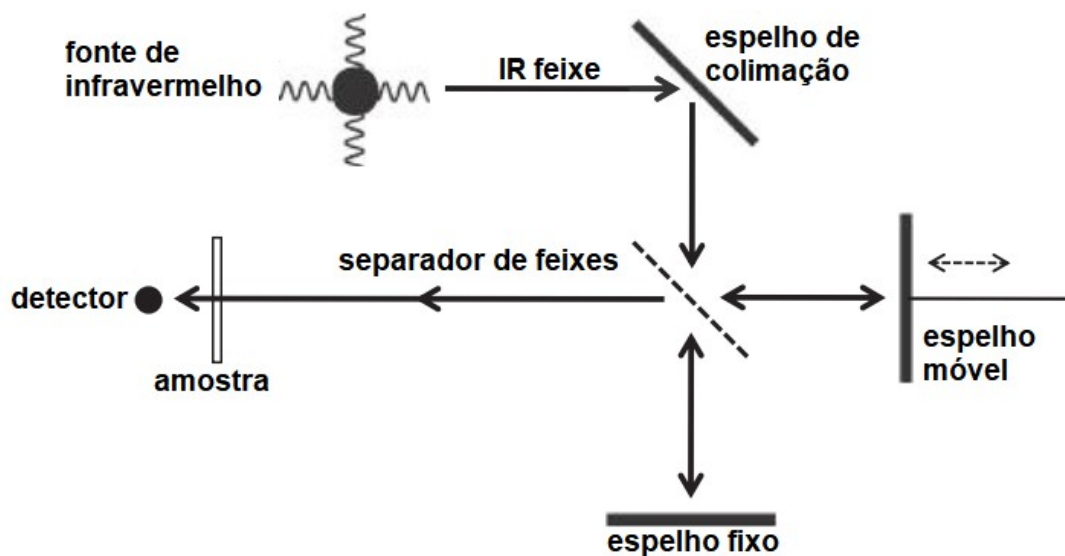
FONTE: SMITH, 2011.

O interferômetro⁹ (Figura 3) é formado por um separador de feixe (espelho semi-refletor) e por dois espelhos (um fixo e um móvel). Quando a radiação incide sobre o separador de feixes, ela se divide em duas partes iguais. Desse modo, a radiação transmitida pelo separador de feixes percorre até o espelho fixo ao passo que a radiação refletida vai em direção ao espelho móvel. Quando a radiação é refletida pelos espelhos (fixo e móvel), os feixes se reúnem ao se encontrarem no separador de feixes, em seguida, uma interferência devido a diferença de caminhos percorridos pelos feixes será produzida. Então, o feixe sai do interferômetro, interage com a amostra, atinge o detector, e permite medir o comprimento de onda (SMITH, 2011).

⁸ ZDP do inglês zero path difference

⁹ Link para o vídeo demonstrativo de um interferômetro: <https://youtu.be/6aHF0etDT18>

Figura 3 – Diagrama óptico de um interferômetro

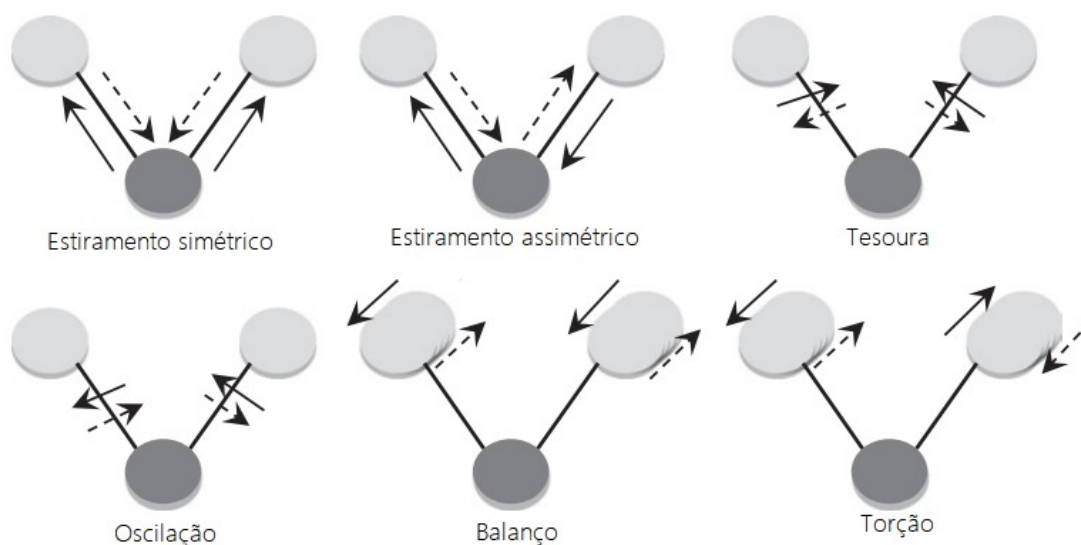


FONTE: SMITH, 2011.

A absorção da radiação infravermelha por uma molécula, é um processo quantizado, ou seja, nesse processo as moléculas são excitadas a um estado de maior energia. Para que isso ocorra, é necessário que a frequência da radiação infravermelha seja a mesma frequência da vibracional natural da molécula. Quando isso ocorre, tem-se o aumento da amplitude dos movimentos vibracionais das ligações químicas presentes. Todavia, não basta que as frequências sejam as mesmas para que uma ligação absorva energia infravermelha, pois a absorção só acontecerá efetivamente, se houver a variação do momento dipolo. Portanto, a radiação infravermelha não é absorvida por ligações químicas simétricas (PAIVA, 2015).

As vibrações moleculares são movimentos que os átomos que compõem a estrutura química de uma molécula realizam. Os modos de vibração molecular são classificados em: estiramento (simétrico e assimétrico), flexão (tesoura e oscilação), balanço e torção (MANICKAVASAGAN; JAYASURIYA, 2014).

Figura 4 – Formas de vibração molecular



FONTE: MANICKAVASAGAN; JAYASURIYA, 2014.

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR – aplicada ao estudo de amostras biológicas e aos contaminantes de preocupação emergentes – CECs

As técnicas de espectroscopia vibracional, como a de FTIR, têm demonstrado um potencial gigantesco no que se refere à análise e ao diagnóstico de tecidos biológicos. Em razão a isso, pesquisadores clínicos e não-clínicos ao redor do mundo têm-se motivado a estudarem e a explorarem campos de aplicação até então inexplorados por essa técnica (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008). Uma das áreas em que a técnica de FTIR tem apresentado bons resultados, é a ecotoxicologia, na qual vem sendo utilizada para a identificação de CECs. Essa ferramenta – FTIR – é a mais utilizada para a identificação, por exemplo, de microplásticos, compostos que são prejudiciais ao meio ambiente por causa da sua bioatividade (MILOLOŽA; KUČIĆ; BOLANČA et al., 2021).

Por ser uma técnica simples, não destrutiva para tecidos biológicos, de fácil reprodutibilidade e cuja necessidade de preparo da amostra é mínima; podendo ser executada com alguns nanogramas de amostra; a técnica de FTIR nos permite obter informações a nível molecular, possibilitando o estudo da sua composição química tanto quanto a presença ou ausência de determinadas funções orgânicas, os tipos de

ligações químicas presentes e também analisar a conformação desses átomos (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008).

Em uma análise de FTIR à amostra é irradiada com luz infravermelha com comprimento de onda definido e a absorbância da radiação infravermelha coletada pelo equipamento é dependente da composição e da estrutura química da amostra analisada. O pré-requisito para a absorção da radiação infravermelha é de que haja uma mudança no momento dipolo de uma ligação química (LI; LIU; PAUL, 2018).

1.3 A espécie *Lithobates catesbeianus*

A rã-touro-americana (*Lithobates catesbeianus*) (Figura 5), também conhecida como rã-touro-gigante, não é originária da fauna brasileira. Essa espécie foi introduzida no Brasil em 1935, trazida dos Estados Unidos com o intuito de ser comercializada para o consumo da sua carne, porém, em decorrência ao seu alto custo de produção e a falta de interesse por parte dos brasileiros em consumir esse tipo de carne, levou-se ao abandono de boa parte da atividade no país (INSTITUTO RÃ-BUGIO PARA A CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2022).

Figura 5 – Rã-touro-americana (*Lithobates catesbeianus*)



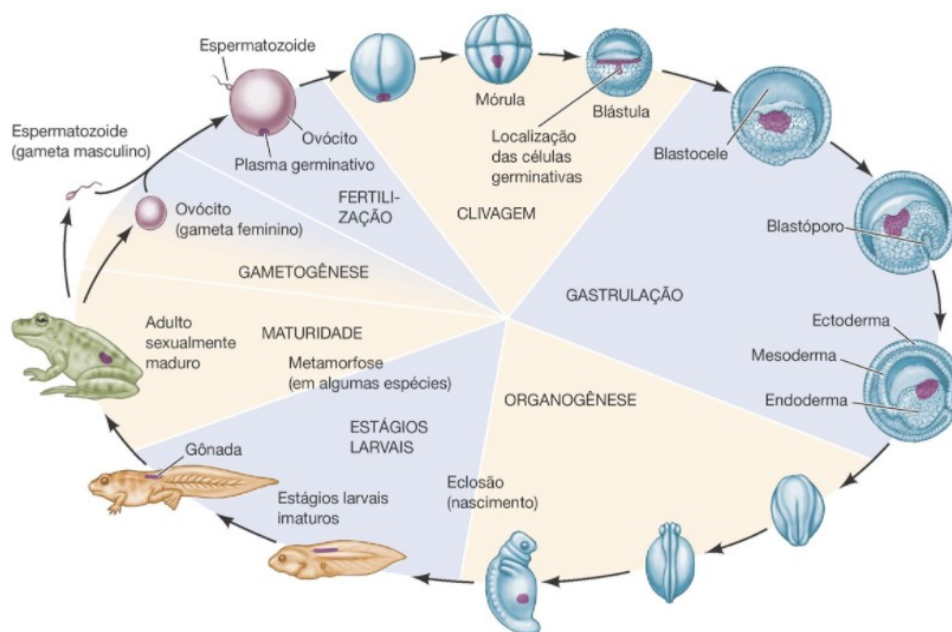
FONTE: VERMONT REPTILE & AMPHIBIAN ATLAS, 2022.

Para os anfíbios da ordem anura, a metamorfose é a transformação do seu estágio larval para a vida adulta, sendo marcado pela transição na qual deixa-se a vida no ambiente aquático e passa-se a viver no ambiente terrestre. Após iniciado esse processo de transformação, a exposição a predadores e outras formas de estresse diminuem, uma vez que esse animal não é mais totalmente aquático nem terrestre. A duração desse processo é específica de cada espécie e é geneticamente fixada, apesar disso, a duração da metamorfose pode sofrer variações, porque todos

os processos metabólicos são dependentes da temperatura. Por exemplo, para a rã-touro-americana, o processo de metamorfose pode variar de 3 meses a 3 anos dependendo da região em que se encontra a população desses animais (VITT et al., 2014).

Sendo assim, o desenvolvimento é o caminho em que um organismo percorre até atingir a sua vida adulta, indo do genótipo ao fenótipo, nos permitindo estudá-los em qualquer nível de organização, desde as moléculas que o compõe ao ecossistema em que está inserido. Esse processo de desenvolvimento ocorre de acordo com as seguintes etapas (Figura 6): gametogênese, fertilização, clivagem, gastrulação, organogênese e metamorfose (estágios larvais e maturidade) (GILBERT; BARRESI, 2019).

Figura 6 – Etapas do desenvolvimento de um anfíbio anuro



FONTE: GILBERT; BARRESI, 2019.

2.0 OBJETIVO GERAL

Analisar os tecidos do fígado de girinos de rã-touro-americana (*Lithobates catesbeianus*) por meio da técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR –, com intuito de identificar alterações moleculares a partir do espectro de infravermelho.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Relacionar as alterações moleculares observadas nos espectros com a presença de metais (Al, Mn, Cu e Zn) e propor a técnica de FTIR como ferramenta alternativa para o estudo de tecidos biológicos e ecotoxicológicos.

3.0 METODOLOGIA

3.1 Coleta das amostras de água

Coletou-se 120,0 L de água em dois pontos do rio Sorocaba, perto da cidade de Ibiúna (RI) – 23°27'27" latitude sul; 47°24'10.1" longitude oeste – e no Reservatório de Itupararanga (BV) – 23°38'11,3" latitude sul; 47°13'22,6" longitude oeste –, durante o mês de março (verão) de 2019. As amostras de água foram coletadas manualmente, armazenadas em galões com capacidade de 50,0 L e posteriormente transportadas para o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LaBioM) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus de Sorocaba, onde foram utilizadas para a exposição dos girinos de rã-touro-americana da espécie *Lithobates catesbeianus*. Antes e após à amostragem, determinou-se o pH e a temperatura da água. Esses valores encontram-se dispostos na Tabela 2.

3.2 Animais utilizados em laboratório

Os girinos utilizados nesse estudo foram obtidos do ranário Santa Rosa, situado na cidade de Santa Bárbara d'Oeste, São Paulo. A utilização desses animais se deu por meio da aprovação – nº 2578040219 – prévia do Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) da UFSCar (anexo I).

Inicialmente, alocou-se os girinos em aquários com capacidade de 50,0 L (Figura 7), onde manteve-se uma temperatura de $25,0 \pm 1,0$ °C, aeração $> 6,0$ mg O₂ L⁻¹ e fotoperíodo natural por 15 dias para aclimação dos animais. A dieta dos girinos consistiu em ração (Alcon Garden Basic Sticks®) comercial farelada com 25% de proteína bruta. Então, 48 h antes da exposição à água coletada, a alimentação dos girinos foi interrompida para que a mesma não absorvesse possíveis contaminantes que estivessem presentes na água.

A exposição à água coletada ocorreu em aquários de 16,0 L, sendo alocados por aquário, 12 girinos. Os aquários foram classificados em grupos da seguinte

maneira: ACL – aquários controles (A, B e C) – no qual a água era decolorada e sem contaminantes; PV – aquários (D, E e F) – no qual a água foi coletada da represa de Itupararanga em Votorantim (BV¹⁰); PI – aquários (G, H e I) – no qual a água foi coletada do reservatório de Itupararanga em Ibiúna (RI¹¹); ambos pontos de coleta de água fazem parte do rio Sorocaba. O experimento foi realizado em triplicata e as condições iniciais de temperatura, aeração e fotoperíodo foram mantidas até o final do experimento. Para esse estudo, seguiu-se os padrões estabelecidos pela Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM¹²).

Após o período de exposição (96 h), os girinos foram anestesiados com benzocaína 0,01% e, em seguida, dissecou-se os animais, retirando completamente o fígado. Após a retirada dos órgãos, as amostras foram armazenadas a – 80 °C. As amostras de fígado, com cerca de 50 mg cada, foram colocadas sob a janela de amostragem assim que houve o descongelamento parcial dos órgãos.

As amostras foram analisadas por meio da técnica de FTIR, em um equipamento modelo Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer pertencente ao Laboratório de Análise Instrumental da Faculdade de Engenharia de Sorocaba (FACENS). Não foi realizado nenhum preparo prévio dos órgãos para essa análise, ou seja, apenas aguardou-se o degelo dos órgãos para que as amostras fossem colocadas para análise no FTIR.

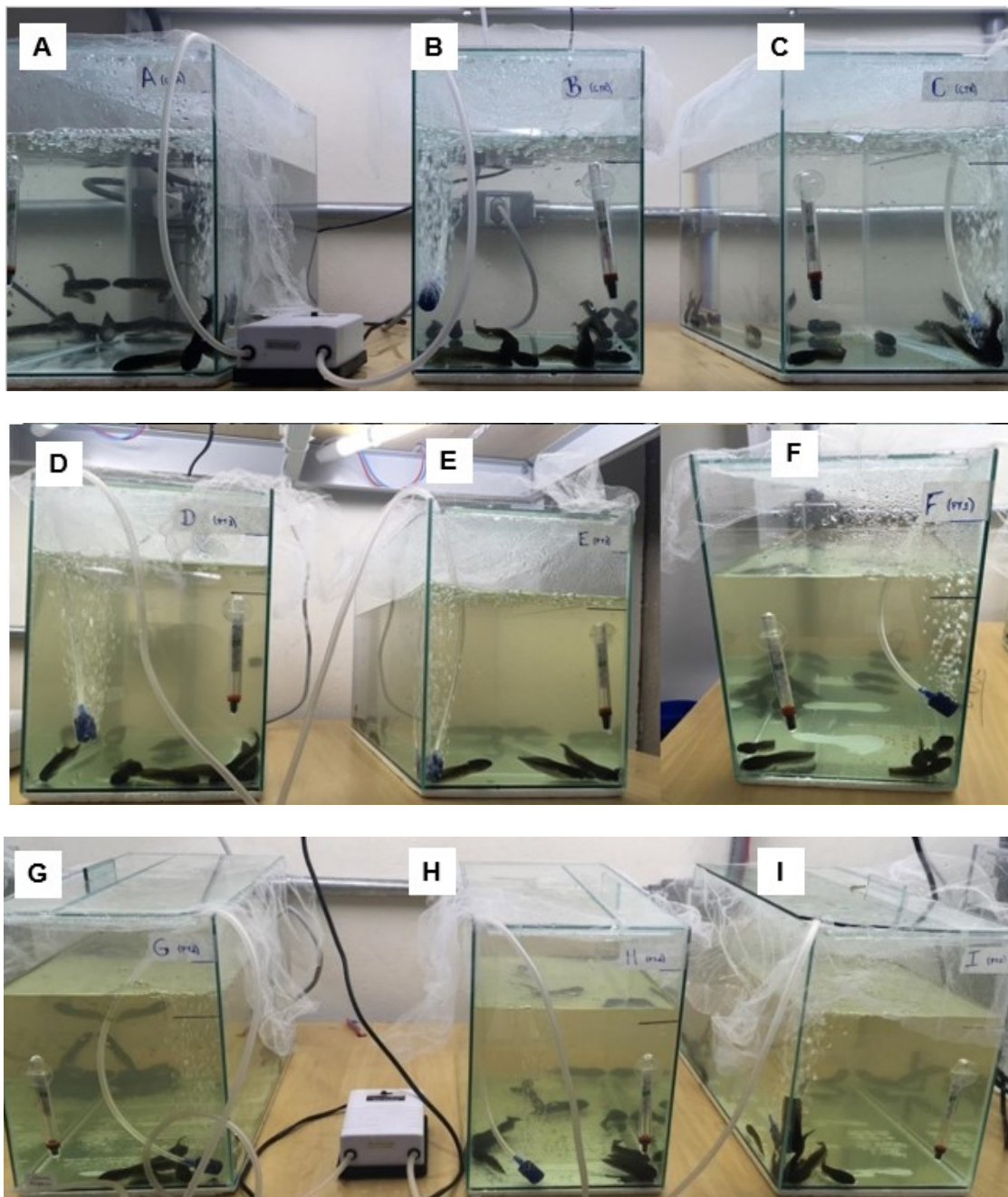
O FTIR utiliza uma fonte de luz infravermelha que atravessa à amostra em um detector que mede a quantidade de luz absorvida pela amostra, gerando um espectro único que pode ser utilizado para identificar a estrutura molecular de uma amostra.

¹⁰ BV – ponto de coleta de água: represa de Itupararanga em Votorantim

¹¹ RI – ponto de coleta de água: reservatório de Itupararanga em Ibiúna

¹² ASTM do inglês American Society for Testing and Materials

Figura 7 – Aquários contendo os girinos utilizados no experimento



Aquários: A, B e C – CONTROLE; D, E e F – PI (expostos à água coletada em Ibiúna); G, H e I – PV (expostos à água coletada em Votorantim).

FONTE: FERNANDES et al., 2020.

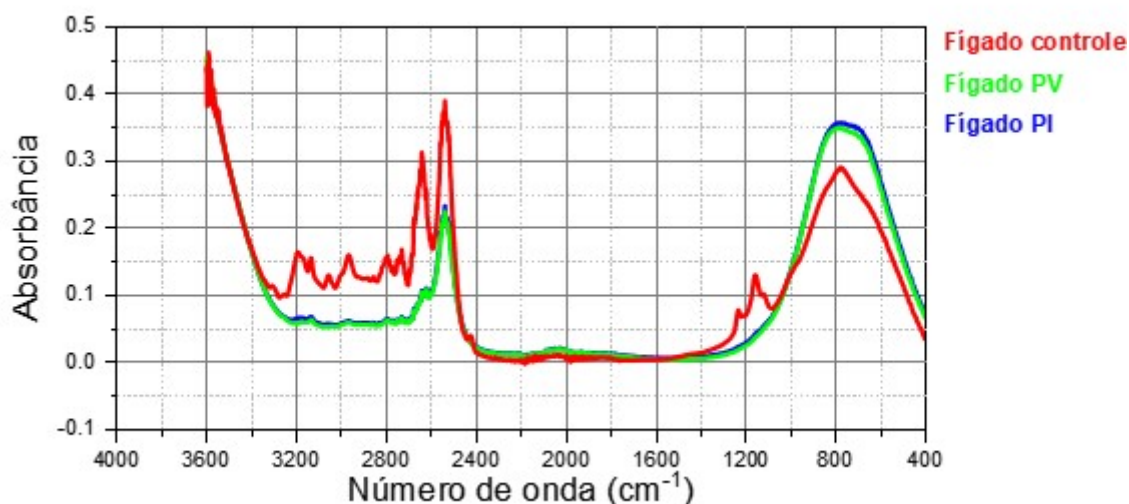
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análises das amostras de fígado

Em um primeiro momento, ao analisar os espectros sem se atentar para exatidão dos picos de cada um deles, nota-se uma semelhança entre os espectros

nas regiões as quais os picos são observados. O primeiro espectro (Figura 8), referente ao fígado controle, esse possui picos distintos dos observados nos espectros subsequentes – fígado PV e PI –, levando-se a intuir que o fígado dos girinos expostos à água do rio Sorocaba, possa ter sofrido alguma alteração em virtude do ambiente ao qual esses animais foram expostos, o que pode ser uma possível explicação para o que é observado nos espectros, isto é, o fato de que os picos que antes constavam no espectro para o fígado controle tenham diminuído de intensidades nos espectros seguintes.

Figura 8 – Espectros da análise do fígado dos girinos de rã-touro-americana: Fígado controle; Fígado PV – girinos expostos à água coletada em Votorantim; Fígado PI – girinos expostos à água coletada em Ibiúna.



FONTE: GARCIA, 2022.

Nota-se, nos três espectros, um pico em 3600 cm^{-1} . Esse pico pode ser atribuído ao estiramento da ligação entre os átomos de oxigênio e hidrogênio da hidroxila, que ocorre no intervalo de $3700 - 3600\text{ cm}^{-1}$ (MEYERS, 2004). Esse pico fino verificado no espectro, é característico do estiramento livre da hidroxila (PAIVA, 2015).

A largura do pico, assim como a intensidade e a posição das bandas em um espectro em que um álcool está presente são afetados pela quantidade de ligações de hidrogênio, isso ocorre, pois, a diferença de eletronegatividade existente entre os átomos de oxigênio e hidrogênio gera uma carga parcial negativa no oxigênio e uma

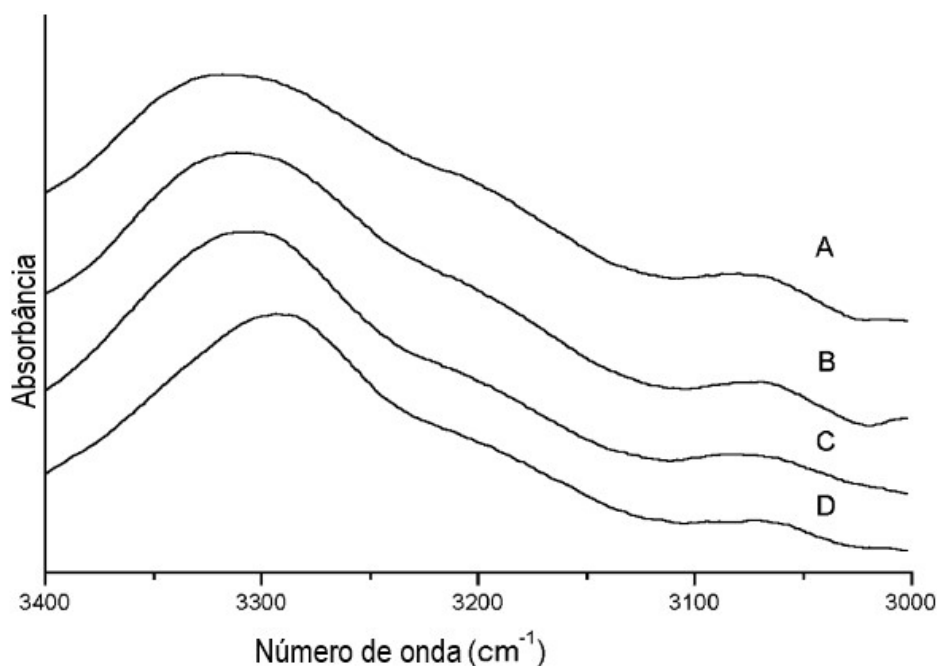
carga parcial positiva no hidrogênio, fazendo, portanto, com que o número e a força das ligações de hidrogênio não sejam constantes e uniformes em toda amostra (SMITH, 2011).

No que diz respeito aos picos observados nos espectros dos fígados dos girinos que foram expostos à água do rio Sorocaba, pode-se considerar que ambos são semelhantes, já que para o espectro Fígado PI os picos foram de 2619, 2537 e 772 cm^{-1} ; e, para o espectro do Fígado PV os picos foram de 2620, 2537 e 787 cm^{-1} ; ou seja, a variação entres os picos foram mínimas.

Sabe-se que se os picos, a largura e a intensidade de duas amostras corresponderem perfeitamente, isto significa que ambas amostras possuem mesma composição e concentração. Entretanto, como os picos e as bandas são característicos de cada molécula e, nesse caso, os picos e as bandas detectados não são idênticos, mas são bem próximos, isso pode significar, presumivelmente, que a composição e as alterações sofridas pelos órgãos dos girinos após à exposição à água coletada foram quase que equivalentes.

Segundo estudos espectroscópicos realizados por Eckel et al. (2001) com tecidos da mama humana com a finalidade de mostrar alterações intermoleculares tanto quanto o conteúdo relativo de proteínas e ácidos nucleicos, apontam que em tecidos carcinomatosos as bandas na região de 3600 – 3000 cm^{-1} (Figura 9) deslocam-se para frequências menores (ECKEL et al., 2001). Apesar do estudo em questão se tratar da análise de órgãos de girinos, o estudo citado (ECKEL et al., 2001) concatena com o comportamento observado nos espectros apresentados, pois, como foi visto, os picos detectados nessa região do espectro para os girinos do aquário controle, também se deslocaram para uma região de menor frequência igualmente ao que foi demonstrado no estudo para certos tipos de câncer de mama, o que possivelmente é um indicativo de que alguma alteração no fígado desses animais deve ter ocorrido. Não obstante, para que se possa comprovar o porquê dessas alterações, outros estudos complementares devem ser realizados.

Figura 9 – Espectroscopia da mama humana: (A) normal; (B) hiperplasia; (C) fibroadenoma e (D) carcinoma



FONTE: ECKEL et al., 2001.

Strong et al., (2016), utilizaram técnicas espectroscópicas para compreender as alterações moleculares nos órgãos e tecidos de girinos, analisando por meio da técnica de Reflexão Total Atenuada no Infravermelho com Transformada de Fourier – ATR-FTIR¹³ – o fígado de girinos de rã comum (*Rana temporária*) coletadas de duas lagoas distintas, uma localizada na zona rural e a outra na zona urbana, e mostraram alterações espectrais para a ribose C – O (991 cm^{-1}), carboidrato (1153 cm^{-1}), amida II (1516 cm^{-1}), C=N citosina (1601 cm^{-1}), amida I e folha- β (1624 cm^{-1}). Todavia, a principal diferença observada nos espectros foi na região dos lipídios.

Atentando-se novamente para o espectro “Fígado controle” pertencente ao, como já mencionado, houve-se o deslocamento dos picos, e, parte desses picos aos quais teve-se a variação, estão associados aos lipídios. Os lipídios são compostos quimicamente diversos, insolúveis em água e que desempenham um papel fundamental para a vida dos organismos. As gorduras e os óleos, por exemplo, servem como reserva energética. Já os fosfolipídios e os esteróis são elementos

¹³ ATR-FTIR do inglês Attenuated Total reflectance Fourier Transform Infrared

estruturais das membranas biológicas. Além, é claro, de outros lipídios que se encontram em menores quantidades, mas que são essenciais para os organismos, como os cofatores enzimáticos, os carreadores de elétrons e as chaperonas (NELSON; COX, 2013).

O espectro de infravermelho para os lipídios se dá basicamente das vibrações moleculares da cadeia de hidrocarbonetos, isto é, da parte apolar (hidrofóbica) da molécula; e da “cabeça” dos lipídios, a porção polar (hidrofílica) da molécula. As vibrações mais intensas para os lipídios ocorrem devido ao estiramento do CH_2 , cujas bandas localizam-se no espectro de infravermelho entre as regiões de 3100 – 2800 cm^{-1} . As frequências das bandas nessa faixa do espectro são sensíveis a mudanças na conformação da molécula e, dessa forma, respondem às alterações na relação trans/gauche nas cadeias aciladas dos lipídios (MEYERS, 2004). Para o espectro de que se fala, dentro das regiões mencionadas, observaram-se os picos 3052 e 2965 cm^{-1} .

O pico identificado na região de 2965 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação do C – H. Contudo, o estiramento OH – NH – CH presentes em moléculas de DNA e RNA também são localizados na região entre 3800 – 2300 cm^{-1} do espectro. Diante disso, os picos subsequentes – 2791, 2729, 2640 e 2537 cm^{-1} – identificados no espectro “Fígado controle” estão abarcados nessa zona do espectro (DOVBESHKO et al., 2000). Logo, pode-se inferir que ocorreu alguma alteração nesses polímeros biológicos presentes nos órgãos analisados, pois, como observado, os picos identificados no espectro “Fígado controle” quando comparado aos espectros “Fígado PI e PV”, tiveram os picos indicados anteriormente deslocados para uma região de frequência menor ou então não puderam ser detectados.

A Tabela 3 esboça algumas bandas que estão frequentemente presentes em um espectro de infravermelho para os lipídios.

Tabela 2 – Modos de vibração molecular comuns para os lipídios

Número de onda (cm^{-1})	Tipo de vibração molecular
3010	=C-H estiramento
2956	CH_3 estiramento assimétrico
2920	CH_2 estiramento assimétrico
2870	CH_3 estiramento simétrico
2850	CH_2 estiramento simétrico

1730	C=O estiramento
1485	(CH ₃) ₃ N ⁺ flexão assimétrica
Tabela 3 (continuação)	
Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração molecular
1473, 1472, 1468, 1463	CH ₂ tesoura ou dobramento angular
1460	CH ₃ dobramento assimétrico
1405	(CH ₃) ₃ N ⁺ dobramento simétrico
1378	CH ₃ dobramento simétrico
1400 – 1200	CH ₂ balanço
1228	PO ₂ ⁻ estiramento assimétrico
1170	CO – O – C estiramento assimétrico
1085	PO ₂ ⁻ estiramento simétrico
1070	CO – O – C estiramento simétrico
1047	CO – O – P estiramento simétrico
972	(CH ₃) ₃ N ⁺ estiramento assimétrico
820	P – O estiramento assimétrico
730, 720, 718	CH ₂ oscilação

FONTE: MEYERS, 2004.

A região do espectro compreendida entre 1500 – 400 cm⁻¹ é tida como a impressão digital de uma amostra. Geralmente, os picos encontrados nessa região do espectro ocorrem devido a deformações complexas originadas em resposta a simetria molecular e também as deformações simultâneas que acontecem nas ligações químicas.

A região entre 1000 – 700 cm⁻¹ está associada as torções moleculares fora do plano. Para os espectros analisados, os picos nessa região foram de 787, 773 e 772 cm⁻¹. Outro ponto em relação as absorções que ocorrem nessa região é que é possível encontrar uma razão entre os ácidos graxos saturados e os ácidos graxos cis monoinsaturados (SCHULZ; BARANSKA, 2007). Os cloretos alifáticos também absorvem radiação eletromagnética dentro da faixa mencionada anteriormente, particularmente de 785 a 545 cm⁻¹. No entanto, é difícil comprovar a presença ou ausência de um haleto por meio da espectroscopia de infravermelho (PAIVA, 2015).

Consoante ao que foi referido sobre às amostras não terem sido tratadas ou passadas por algum preparo antes das análises de FTIR, é possível que os espectros gerados tenham sido afetados ou que os mesmos pudessem ter sido diferentes dos

obtidos caso às amostras tivessem sido submetidas a algum tratamento, pois a forma como o tecido é tratado previamente à análise de FTIR assim como a espessura da amostra, a sua hidratação ou mesmo a presença de outras substâncias no meio influenciarão o estudo e, conseqüentemente, os espectros (GAZI, 2011). É preciso salientar também que mesmo à análise de moléculas isoladas podem produzir espectros complexos, o que torna o processo de interpretação dos espectros de amostras de tecidos biológicos mais complexo e moroso.

Ainda que às amostras não tenham sido submetidas a um tratamento antes da análise, é importante que se analise os tecidos sob diferentes condições de acordo com os objetivos do estudo a ser desenvolvido, haja vista que o tratamento pelo qual à amostra passará, interferirá na análise a ser realizada, pois como apontam, Shim e Wilson (1996), por exemplo, ao se desidratar os tecidos à temperatura ambiente, leva-se a uma diminuição na intensidade do pico de 930 cm^{-1} referente ao estiramento C – C dos aminoácidos prolina e valina em relação aos picos de 1655 cm^{-1} e de 1450 cm^{-1} . Esse comportamento, pode, portanto, estar associado a uma possível desnaturação das proteínas, as quais têm os seus modos vibracionais perturbados pela desidratação. Em contrapartida, os tecidos congelados em tampão fosfato-salino (PBS¹⁴), isto é, para a realização de análises em um outro momento, quando comparado os seus espectros com os espectros das análises de tecidos frescos, foi constatado resultados bem semelhantes (SHIM; WILSON, 1996).

Diferentemente do que foi notado por, Shim e Wilson (1996), Faoláin et al. (2005), analisaram e compararam espectros de tecidos congelados e frescos que apresentaram diferenças consideráveis nos espectros dessas amostras. Nesse estudo, constatou-se uma redução da intensidade nas bandas dos tecidos congelados em relação aos tecidos frescos. As bandas que sofreram redução na intensidade foram: 1002 cm^{-1} referente ao estiramento do anel aromático; 1447 cm^{-1} referente ao modo de torção do CH_2 presente na estrutura dos lipídios e das proteínas; e 1637 cm^{-1} da banda da amida I das proteínas (FAOLÁIN et al., 2005).

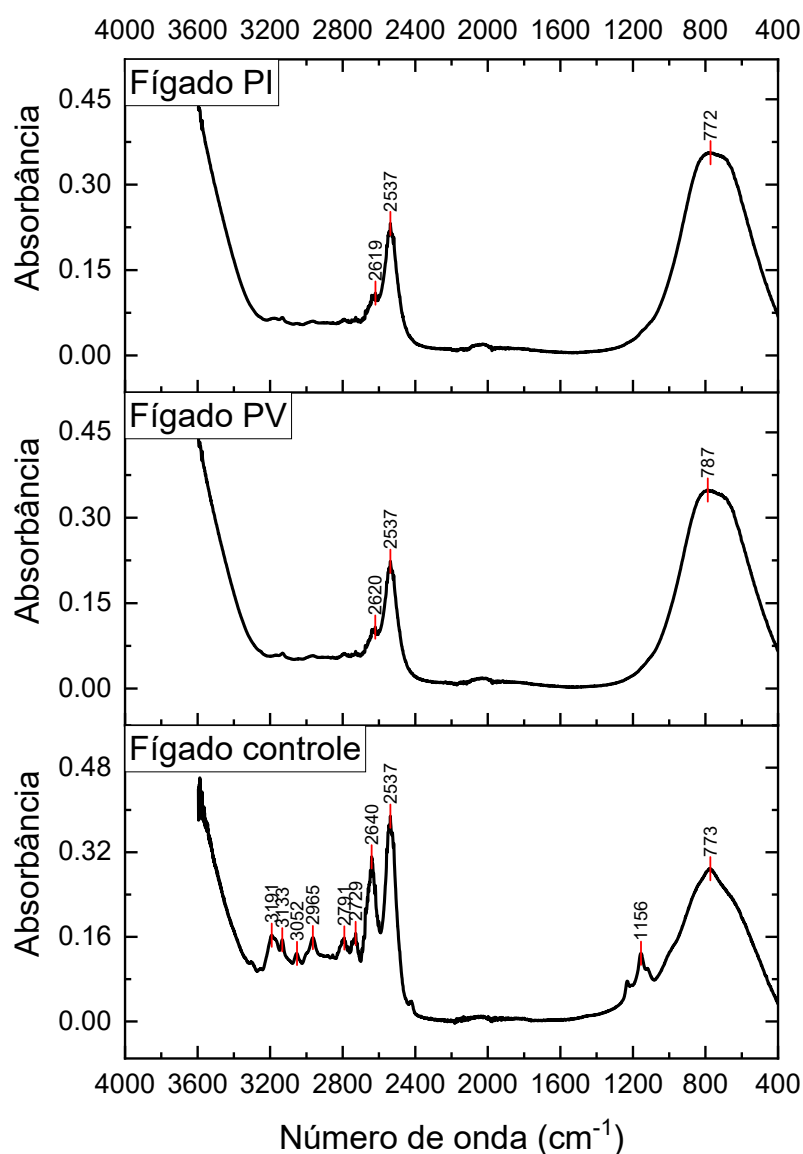
A técnica de FTIR também se limita a uma profundidade de penetração de 10 μm por causa da saturação do detector. Dessa forma, para se obter um melhor resultado, é preciso que se realize cortes finos nas amostras dos tecidos que serão

¹⁴ PBS do inglês phosphate buffered saline

analisados, ou então, que se utilize a espectroscopia de Refletância Total Atenuada (ATR¹⁵), a qual permite uma penetração de 3 μm a depender do comprimento de onda, do índice de refração da janela do infravermelho, do material da amostra e também da incidência do feixe de infravermelho no cristal (ZOHDI et. al., 2015).

Os picos identificados para os espectros das análises do fígado dos girinos do aquário controle e também para os girinos expostos à água coletada em Ibiúna (Fígado PI) e em Votorantim (Fígado PV), estão expostos na Figura 10.

Figura 10 – Espectros da análise do fígado dos girinos com suas respectivas bandas



FONTE: GARCIA, 2022.

¹⁵ ATR do inglês attenuated total reflectance

De acordo com o estudo realizado por Fernandes et al. (2021), paralelo à análise de FTIR a qual os animais deste trabalho foram submetidos, executou-se uma análise integrada de alguns biomarcadores bioquímicos e morfológicos para a espécie estudada. O estudo desenvolvido por Fernandes et al., (2021) constatou que os parâmetros físico-químicos estavam dentro dos padrões estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), com exceção para a amônia, o nitrato e o fosfato para o ponto RI e que a concentração de nitrato estava acima para à água coletada no ponto BV (FERNANDES et al., 2021).

No início do estudo, ou seja, antes da exposição dos animais à água do rio Sorocaba, Fernandes et al., (2021), detectou-se Al na água em ambos os pontos de coleta. Para o ponto RI a concentração de Al foi de $29,10 \mu\text{g L}^{-1}$ e para o ponto BV foi de $27,50 \mu\text{g L}^{-1}$. Após às 96 h de exposição, o valor médio máximo de Al detectado foi de $116,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para o ponto BV. Em relação ao Cd, não encontrou esse elemento nas amostras de água; no entanto, o Cu, estava presente em todos os grupos estudados, tanto no início quanto no final do período de exposição, exceto na água dos aquários em que os girinos foram expostos à água do ponto RI. Por outro lado, para o ponto BV, após esse mesmo período, foi notado um aumento na concentração de Cu ($1,6 \mu\text{g L}^{-1}$). No início da exposição, o Mn também foi detectado na água em todos os grupos estudados, exceto na água do grupo controle. A concentração de Mn presente na água para os dois pontos – RI e BV – foram as maiores durante o período inicial do estudo quando comparadas com as concentrações desse elemento para o grupo controle. As concentrações de Mn foram de $31,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $32,4 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente para à água dos pontos RI e BV. O Zn também foi detectado em todos os grupos, porém, em uma concentração menor do que a encontrada para o controle ($79,6 \mu\text{g L}^{-1}$). No início da exposição, as concentrações de Zn para à água dos pontos RI e BV foram de $6,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $5,2 \mu\text{g L}^{-1}$; já no final da exposição, teve-se um aumento na concentração de Zn na água, passando para $38,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para o ponto RI e $32,6 \mu\text{g L}^{-1}$ para o ponto BV (FERNANDES et al., 2021).

Durante o inverno, período referente a coleta de água realizada no mês de agosto, a ocorrência dos metais se deu da seguinte forma: no início da exposição, a concentração de Al > Mn para à água do ponto RI; após a exposição, a concentração

Al > Mn > Zn > Cu para essa mesma água. Para o ponto BV, no início, a concentração de Mn > Al e no final a concentração Mn > Zn > Cu. O Al foi detectado em todos os grupos, exceto para o grupo controle no início da exposição e para os grupos expostos à água do ponto BV. A concentração de Al teve um aumento para a água do ponto RI durante o período inicial de exposição quando comparado com a concentração de Al para o grupo controle; e a concentração de Al diminuiu em 80% após às 96 h de exposição ao compará-la com a concentração desse elemento no início da exposição. O Cd também não foi detectado para essas amostras coletadas nesse período. Constatou-se Cu na água do grupo controle, porém, não se teve variações significativas durante o experimento para esse grupo. Após às 96 h, para ambos os pontos, notou-se um aumento de Cu em relação ao grupo controle e também em relação aos seus respectivos grupos de exposição. O Mn também foi detectado em todos os grupos, exceto para o grupo controle durante o início da exposição. A concentração de Mn para RI (93,64 µg L⁻¹) e BV (86,78 µg L⁻¹) também era maior no início da exposição do que após às 96 h. O Zn não foi detectado inicialmente nas amostras de água em ambos os pontos, mas foi identificado após às 96 h de exposição com concentrações de 11,56 µg L⁻¹ para RI e 4,20 µg L⁻¹ BV. Comparando-se a concentração dos metais presentes na água durante os dois períodos de coleta, verificou-se que as concentrações de Al e Mn foram maiores durante o inverno do que no verão, seguido pelas concentrações de Zn e de Cu. (FERNANDES et al., 2021). A Tabela 2 sumariza esses dados.

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos e concentrações dos metais (µg L⁻¹) presentes nas amostras de água coletada do rio Sorocaba nos pontos em Votorantim (BV) e Ibiúna (RI) durante as estações de verão e de inverno de 2019 e os valores estabelecidos pela resolução 357/2005 do CONAMA.

VERÃO	CONAMA	CONTROLE		RI		BV	
	-----	0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
T °C	-----	25 ± 1,0	23,6 ± 1,4	26,5 ± 2,3	24,1 ± 1,5	24,4 ± 1,0	22,7 ± 1,5
pH	6,0 – 9,0	6,8	6,6	7,7	6,7	6,7	6,7
Dureza (mg L ⁻¹)	-----	50	50	50	50	50	57
NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	0,02	< 0	4,5 ± 0,3 ↑	< 0	4,5 ± 0,0 ↑	< 0	6,5 ± 0,5 [#] ↑
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	10	< 0	6,67 ± 0,03 ↑	5,0 ± 0,02 ↑	10,0 ± 0,02 ↑	< 0	20 ± 0,03 [#] ↑
HNO ₂ (mg L ⁻¹)	1	< 0	0,25 ± 0,00	< 0	0,5 ± 0,02	< 0	1,25 ± 0,32 [#] ↑
PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	0,15	1,5 ± 0,03	1,17 ± 0,06	0,1 ± 0,00	1,67 ± 0,32 ↑	0,1 ± 0,00	1,67 ± 0,29 ↑
Al (µg L ⁻¹)	100	< LQ	< LQ	29,10 ± 1,15	< LQ	27,5 ± 0,98	116,5 ± 0,32 [#] ↑
Cd (µg L ⁻¹)	1	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cu (µg L ⁻¹)	9	1,3 ± 0,03	2,2 ± 0,15 ↑	1,5 ± 0,05	< LQ	1,0 ± 0,10	1,6 ± 0,09 [#] ↑

Mg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	100	< LQ	25,1 \pm 1,45 \uparrow	31,3 \pm 2,01	28,2 \pm 1,52	32,4 \pm 2,62	28,2 \pm 1,89
Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	180	79,6 \pm 3,35	71,8 \pm 2,34	6,5 \pm 0,45	38,3 \pm 2,81 \uparrow	5,2 \pm 0,89	32,6 \pm 1,9 \uparrow
	CONAMA	CONTROLE		RI		BV	
INVERNO	-----	0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
pH	6,0 – 9,0	6,7	6,8	7,3	6,9	8,0	6,9 \downarrow
Dureza (mg L^{-1})	-----	45	46	28	32	41 $\#$	46 $\#$ \uparrow
NH ₄ ⁺ (mg L^{-1})	0,02	0,29 \pm 0,04	1,32 \pm 0,04	0,04 \pm 0,00	1,65 \pm 0,24 \uparrow	0,02 \pm 0,00	1,20 \pm 0,42 \uparrow
NO ₃ ⁻ (mg L^{-1})	10	0,20 \pm 0,05	0,44 \pm 0,03 \uparrow	0,10 \pm 0,01	0,32 \pm 0,02 \uparrow	0,32 \pm 0,02 \uparrow	1,92 \pm 0,03 $\#$ \uparrow
HNO ₂ (mg L^{-1})	1	9,86 \pm 1,30	4,46 \pm 1,37 \downarrow	7,79 \pm 2,05	2,96 \pm 0,87 $\#$ \downarrow	2,08 \pm 0,36 $\#$	4,84 \pm 0,61 \uparrow
PO ₄ ³⁻ (mg L^{-1})	0,15	0,06 \pm 0,02	0,56 \pm 0,01 \uparrow	0,20 \pm 0,00	0,24 \pm 0,03	0,07 \pm 0,00	0,48 \pm 0,06 $\#$ \uparrow
Al ($\mu\text{g L}^{-1}$)	100	< LQ	3,42 \pm 5,92 \uparrow	111,79 \pm 0,59	20,47 \pm 3,93 \downarrow	54,32 \pm 0,59 $\#$ \downarrow	< LQ
Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	9	4,97 \pm 0,90	4,72 \pm 1,0	< LQ	2,45 \pm 0,66	< LQ	2,27 \pm 0,23 \uparrow
Mg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	100	< LQ	27,72 \pm 7,67 \uparrow	93,64 \pm 9,75	18,27 \pm 8,37 \downarrow	86,78 \pm 6,65	28,47 \pm 1,41 \uparrow
Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	180	15,97 \pm 1,29	23,85 \pm 2,83 \uparrow	< LQ	11,56 \pm 0,59 $\#$ \downarrow	< LQ	4,20 \pm 0,26 $\#$ \downarrow

Legenda: LQ = limite de quantificação; \uparrow = aumento da concentração em relação ao tempo de exposição; \downarrow diminuição da concentração em relação ao tempo de exposição; # indica uma diferença significativa de concentração entre os pontos BV e RI.

FONTE: FERNANDES et al., 2021

O fígado dos vertebrados é órgão onde os xenobióticos são metabolizados, portanto, em resposta aos contaminantes ambientais, é esperado que mudanças ocorram nesse órgão, visto que além de metabolizar tais substâncias, também é no fígado onde se concentra a reserva energética que será disponibilizada para o girino no decorrer do seu desenvolvimento (STRONG et al., 2016).

Fernandes et al., (2021), também mostraram que o fígado dos animais expostos à água coletada no ponto RI teve uma diminuição na enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx). Porém, observaram-se o aumento da glutathiona S-transferase (GST) que é uma enzima envolvida no processo de desintoxicação do fígado. Também se constataram o aumento das proteínas carboniladas (PCO). Para o fígado dos animais expostos à água coletada no ponto BV, observaram-se o aumento da glutathiona reduzida (GSH) e, em compensação, houve-se a diminuição da catalase (CAT), GPx, GST, PCO e da superóxido desmutase (SOD) (FERNANDES et al., 2021).

Strong et al., (2016), demonstraram que o tamanho do fígado pode ser um reflexo das alterações bioquímicas que ocorrem nesse órgão, como uma tentativa do

organismo em manter a homeostase e, tal efeito, tem sido associado a exposição de espécies aquáticas a contaminantes ambientais, incluindo os anfíbios (STRONG et al., 2016).

Essas variações nos parâmetros bioquímicos mostraram que os metais apresentam um efeito tóxico para esses animais e que o fígado é um órgão alvo para esses contaminantes, tendo em vista que a função do fígado é a de desintoxicar e excretar substâncias nocivas ao organismo. A redução da atividade enzimática da CAT e da SOD podem estar correlacionados ao aumento de radicais superóxidos devido a uma interrupção das defesas antioxidantes do organismo (FERNANDES et al., 2021).

Também é importante destacar que o custo para a realização de análises químicas ainda é elevado e, por esse motivo, para o estudo citado (FERNANDES et al., 2021), apenas realizou-se testes para os metais referidos. Outro ponto a ser considerado é que a concentração para os metais analisados foi inferior ao limite aceito pela resolução 357/2005 do CONAMA, o que mostra que mesmo em concentrações baixas, a presença desses metais tem um efeito prejudicial para os girinos.

Além disso, é sabido que o uso excessivo de produtos químicos para os mais variados fins tem cooperado para a presença de diversos poluentes indesejáveis que podem estar presentes na água, mas que para detectá-los é necessário a realização de testes específicos, como é o caso dos CECs.

5.0 CONCLUSÃO

Deste modo, pode-se concluir que há muito o que ser explorado pela técnica de FTIR, que vem sendo utilizada para o estudo de amostras biológicas e também para estudos ecotoxicológicos. Neste trabalho, constatou-se alterações moleculares no intervalo de $3200 - 2600 \text{ cm}^{-1}$, para os espectros do fígado dos girinos expostos à água do rio Sorocaba. Essas alterações observadas, podem estar associadas a presença dos metais estudados por Fernandes et al., (2021), pois como foi apontado em seu estudo, os metais apresentam um efeito tóxico para o fígado, desencadeando mudanças no metabolismo de enzimas presentes nesse órgão, como a CAT e a SOD, que podem estar correlacionadas ao aumento de radicais superóxidos. Além do fato

de que o fígado é o responsável por metabolizar os xenobióticos, sendo esperado, portanto, alterações nesse órgão devido a presença de contaminantes ambientais. É preciso ressaltar que as alterações também podem estar relacionadas a outros contaminantes, para os quais não puderam ser incluídos nesse estudo.

Embora muito promissora a técnica de FTIR, para que se confirme as alterações observadas nos espectros gerados por essa técnica, é importante que ao se analisar uma determinada amostra, busque-se por diferentes parâmetros e análises complementares, para que então, seja possível a confirmação e a validação do que é observado em um dado espectro, pois como apontado por Shim e Wilson (1996), o preparo prévio da amostra influencia os espectros gerados, o que não foi considerado durante à análise de FTIR dos fígados dos girinos.

No mais, buscou-se apontar a técnica de FTIR, sugerindo-a como uma ferramenta experimental aplicada a áreas de estudos pouco exploradas por ela, como a ecotoxicologia.

6.0 ANEXO I

Pró Reitoria *Comissão de Ética no Uso de Animais*
 Pesquisa Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação ecotoxicológica da água do rio Sorocaba utilizando uma análise integrada de biomarcadores bioquímicos e morfológicos em girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw,1802).", protocolada sob o CEUA nº 2578040219 (ID 001135), sob a responsabilidade de **Cleoni dos Santos Carvalho e equipe; Lilian Franco Belussi; Marisa Narciso Fernandes; Heidi Samantha Moraes Utsunomiya** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 26/02/2019.

We certify that the proposal "Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba river using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw,1802).", utilizing 216 Amphibians (males and females), protocol number CEUA 2578040219 (ID 001135), under the responsibility of **Cleoni dos Santos Carvalho and team; Lilian Franco Belussi; Marisa Narciso Fernandes; Heidi Samantha Moraes Utsunomiya** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 02/26/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2019](#) a [03/2021](#) Área: [Biologia](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Anfíbios](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) idade: [10 a 16 dias](#) N: [216](#)

Linhagem: [Lithobates catesbeianus](#) Peso: [2 a 4 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LaBioM) e sala de coleções, Universidade Federal de São Carlos campus Sorocaba;

São Carlos, 27 de fevereiro de 2019

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
 Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de São Carlos

7.0 BIBLIOGRAFIA

A AMPLITUDE DO LASER. **Interferômetro de Michelson**. www.youtube.com. Disponível em: <<https://youtu.be/6aHF0etDT18>>. Acesso em: 6 abr. 2022.

DAVID LEE NELSON; COX, Michael M. Lehninger Principles of Biochemistry. 6. ed. New York, N.Y.: W.H. Freeman, 2013.

DOVBESHKO, G. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta*, v. 53, n. 1, p. 233–246, 2000.

ECKEL, Rainer; HUO, Hong; GUAN, Hong-Wei; *et al.* Characteristic infrared spectroscopic patterns in the protein bands of human breast cancer tissue. *Vibrational Spectroscopy*, v. 27, n. 2, p. 165–173, 2001.

FAOLÁIN, Eoghan Ó; HUNTER, Mary B.; BYRNE, Joe M.; *et al.* Raman Spectroscopic Evaluation of Efficacy of Current Paraffin Wax Section Dewaxing Agents. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 53, n. 1, p. 121–129, 2005.

FERNANDES, Isabela Ferreira; UTSUNOMIYA, Heidi Samantha Moraes; DE LACERDA VALVERDE, Bruno Serra; *et al.* Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (). *Chemosphere*, v. 275, n. 130000, p. 130000, 2021.

FERNANDES, Isabela Ferreira. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE CAMPUS SOROCABA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO AMBIENTAL ISABELA FERREIRA FERNANDES. [s.l.: s.n.], 2020. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/12840/Isabela%20Ferreira%20Fernandes%20-%20Biomarcadores%20Bioqu%C3%ADmicos%20em%20f%C3%ADgado%20de%20Ogirinos%20de%20r%C3%AAs-touro.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 28 Mar. 2022.

GAZI, F; GARDNER, E. Preparation of Tissues and Cells for Infrared and Raman Spectroscopy and Imaging in D. Moss (ed) Biomedical Applications of Synchrotron Infrared Microspectroscopy. RSC Analytical Spectroscopy Monographs, n. 11, p. 147–185, 2011. Disponível em: <<https://arrow.tudublin.ie/cgi/viewcontent.cgi?article=1001&context=radrep>>. Acesso em: 23 Mar. 2022.

GILBERT, Scott F; BARRESI, Michael J F. Biologia do Desenvolvimento. 11. ed. São Paulo, Artmed, Inc, 2019.

KLAUS KÜMMERER. Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks; with 62 tables. Berlin: Springer, 2008.

LARKIN, Peter. Infrared and raman spectroscopy: principles and spectral interpretation. Amsterdam; Boston; Heidelberg Etc: Elsevier, Cop, 2011.

LI, Jingyi; LIU, Huihui; PAUL CHEN, J. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. Water Research, v. 137, p. 362–374, 2018.

MANICKAVASAGAN, Annamalai; JAYASURIYA, Hemantha (Orgs.). Imaging with Electromagnetic Spectrum. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.

MEYERS, Robert A. Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine. Weinheim: Wiley-Vch Verlag, 2004.

MILOLOŽA, Martina; KUČIĆ GRGIĆ, Dajana; BOLANČA, Tomislav; *et al.* Ecotoxicological Assessment of Microplastics in Freshwater Sources—A Review. Water, v. 13, n. 1, p. 56, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4441/13/1/56>>.

MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; UR REHMAN, Dr. Ihtesham. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 43, n. 2, p. 134–179, 2008.

PAIVA, Donald. *Introduction to spectroscopy*; donald I. pavia ... et al. [s.l.]: Stamford Cengage Learning, 2015.

RÃ-BUGIO, Instituto. Instituto Rã-bugio para Conservação da Biodiversidade. www.ra-bugio.org.br. Disponível em: http://www.ra-bugio.org.br/ver_especie.php?id=556>. Acesso em: 25 Mar. 2022.

SALIMI, Maryam; ESRAFILI, Ali; GHOLAMI, Mitra; *et al.* Contaminants of emerging concern: a review of new approach in AOP technologies. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 189, n. 8, 2017.

SANGION, Alessandro; GRAMATICA, Paola. Hazard of pharmaceuticals for aquatic environment: Prioritization by structural approaches and prediction of ecotoxicity. *Environment International*, v. 95, n. 414 (2017), p. 131–143, 2016.

SAUVÉ, Sébastien; DESROSIERS, Mélanie. A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, v. 8, n. 1, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3938815/>>.

SCHULZ, Hartwig; BARANSKA, Malgorzata. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, v. 43, n. 1, p. 13–25, 2007.

SEO, Young-Ho; CHOI, Jun-Keun; KIM, Seung-Kyeong; *et al.* Prioritizing Environmental Risks of Veterinary Antibiotics Based on the Use and the Potential to Reach Environment. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, v. 40, n. 1, p. 43–50, 2007. Disponível em: <https://koreascience.or.kr/article/JAKO200728066505757.page?msclkid=219cc3a0a6ea11ecb45d45f4258920c4>>. Acesso em: 27 Jan. 2022.

SHIM, Martin; WILSON, Brian. The Effects of ex vivo Handling Procedures on the Near-Infrared Raman Spectra of Normal Mammalian Tissues. *Photochemistry and Photobiology*, [S. l.], ano 1996, v. 63, p. 662-671, 16 maio 1996.

SMITH, Brian C. *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. Boca Raton, Fl: Crc Press, 2011.

STARLING, Maria Clara V. M.; AMORIM, Camila C.; LEÃO, Mônica Maria D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 372, p. 17–36, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389418302759>>.

STRONG, Rebecca J.; HALSALL, Crispin J.; FERENČÍK, Martin; *et al.* Biospectroscopy reveals the effect of varying water quality on tadpole tissues of the common frog (*Rana temporaria*). *Environmental Pollution*, v. 213, p. 322–337, 2016.

VERMONT REPTILE & AMPHIBIAN ATLAS. Rã-touro-americana (*Lithobates catesbeianus*). Disponível em: <<https://www.vtherpatlas.org/wp2016/wp-content/uploads/L.-catesbeianus.jpg>>. Acesso em: 30 mar. 2022.

VITT, Laurie J; CALDWELL, Janalee P. *Herpetology an introductory biology of amphibians and reptiles*. [s.l.]: San Diego, Calif. Academic Press, 2014.

WEGST-UHRICH, Stacia R; NAVARRO, Divina AG; ZIMMERMAN, Lisa; *et al.* Assessing antibiotic sorption in soil: a literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides. *Chemistry Central Journal*, v. 8, n. 1, 2014.

ZOHDI, Vladislava; WHELAN, Donna R.; WOOD, Bayden R.; *et al.* Importance of Tissue Preparation Methods in FTIR Micro-Spectroscopical Analysis of Biological Tissues: “Traps for New Users.” *PLOS ONE*, v. 10, n. 2, p. e0116491, 2015.

