UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental

Priscila dos Santos Sepúlveda

**Uso da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier na
avaliação de efeitos ecotoxicológicos subletais sobre Ostracodes
*Chlamydoteca sp.***

São Carlos - SP

2018

PRISCILA DOS SANTOS SEPÚLVEDA

**Uso da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier na
avaliação de efeitos ecotoxicológicos subletais sobre Ostracodes
*Chlamydoteca sp.***

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia Ambiental

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Felipe Mendes de Gusmão

São Carlos - SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

D479u dos Santos Sepúlveda, Priscila
Uso da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier na avaliação de efeitos ecotoxicológicos subletais sobre Ostracodes Chlamydoteca sp. / Priscila dos Santos Sepúlveda; orientador Luiz Felipe Mendes de Gusmão. São Carlos, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Elementos-traço. 2. Efeitos subletais. 3. FTIR. 4. Ostracoda . 5. Perfil Macromolecular. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: **PRISCILA DOS SANTOS SEPÚLVEDA.**

Título da dissertação: " Uso da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier na avaliação de efeitos ecotoxicológicos subletais sobre Ostracodes *Chlamydoteca sp.*".

Data da defesa: 30/07/2018.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. **LUIZ FELIPE MENDES DE GUSMÃO (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Profª. Drª. **TATIANA MARTELLI MAZZO**
(Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP)

Profª. Drª. **MARIA DA GRAÇA GAMA MELÃO**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Resultado:

APROVADA *flb*

APROVADA *Mazzo*

APROVADA *Melão*

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Associado **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Felipe Gusmão, meu orientador e amigo, por ter sempre acreditado e depositado sua confiança em mim. Sem a sua orientação, apoio e amizade, não somente neste trabalho, mas em todo o caminho percorrido até aqui, nada disso seria possível.

À Profa. Dra. Eny Maria Vieira pelo acolhimento no Laboratório de Química Ambiental (IQSC) e colaboração com as análises químicas.

À professora Dra. Odete Rocha pelos conselhos, sugestões e acolhimento no Laboratório de Ecotoxicologia da UFSCar.

Às professoras Dra. Maria da Graça G. Melão e Dra. Tatiana Martelli Mazzo, membros da banca de Defesa de Mestrado, pelo interesse em contribuir para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Júlio César, pela colaboração em todos os experimentos, sem sua ajuda teria sido impossível a concretização deste trabalho. Muito obrigada!

Ao técnico Aldimar por todo aprendizado e colaboração nas análises de espectroscopia.

À minha mãe Isa por ser a minha melhor amiga e por acreditar em mim mais do que qualquer outra pessoa nesse mundo e ao meu irmão Magno pelo carinho, compreensão, incentivo e apoio em todas as horas.

Ao meu amor Cooper, pelo seu amor e carinho, pelo apoio e boa vontade em me ajudar em todos os momentos.

Às amigas Letícia Fernanda, Thaís Lopes e Vanessa Lima que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim, independente da distância entre nós.

Ao meu amigo Marcos Vinícius que esteve sempre ao meu lado, pronto para me ajudar sempre que necessário.

À minha amiga Talita Gagliardi por dividir comigo angústias e alegrias e por sempre torcer por mim. Foi bom poder contar com você!

À minha amiga Márcia, com quem compartilhei tantas preocupações e aflições, quanto descobertas e conquistas durante esta caminhada. Obrigada pela amizade!

À CAPES pelo auxílio financeiro.

*“Gosto dos caminhos que se abrem no meio das matas
espessas, na subida das montanhas. Dos que abrem
passagem nas rochas, dos que beiram as estradas com
espinhos. Dos caminhos que me sugerem outra direção,
mas que por teimosia, prefiro prosseguir...”*

Tâmara Rossene

RESUMO

SEPÚLVEDA, P.S. **Uso da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier na avaliação de efeitos ecotoxicológicos subletais sobre Ostracodes *Chlamydoteca sp.*** 2018. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Com o crescimento populacional e aumento das atividades humanas, grandes quantidades de poluentes são despejadas diariamente no meio ambiente. Nos ecossistemas aquáticos, organismos são expostos por longos períodos à baixas concentrações de contaminantes. Assim estudos que focam em novas metodologias que sejam rápidas e não invasivas, são necessários para a avaliação de efeitos subletais. Um exemplo é a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Esta técnica é capaz de detectar alterações macromoleculares em amostras biológicas de forma rápida e não destrutiva, sendo uma ferramenta atrativa para análises ecotoxicológicas. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a aplicabilidade do FTIR como metodologia alternativa, utilizando perfis de composição macromoleculares como indicadores de efeitos subletais, em organismos expostos a elementos-traço. Para tal, ostrácodes (*Chlamydoteca sp.*) foram expostos aos elementos Cu, Cd, Hg e Mn. As alterações em perfis biomoleculares foram avaliadas em ostrácodes expostos por 48h ao Mn. Os resultados revelaram uma correlação negativa entre concentração de exposição e proporção de ácidos graxos saturados e insaturados com relação à proteína em organismos expostos ao Mn e a mesma correlação foi observada para o conteúdo de ácidos nucleicos. Isto sugere que os organismos tiveram seu metabolismo lipídico e sua capacidade de produção de proteína celular alterados devido à exposição ao Mn. Ademais, foram realizados testes crônicos (9 dias) com ostrácodes expostos ao Cu, Cd, Hg e Mn. Foi observada a diminuição de lipídios saturados e insaturados em relação à proteína em organismos expostos ao Cd, sugerindo o uso de reservas lipídicas devido ao estresse fisiológico. Ostrácodes expostos ao Cu, tiveram o aumento dos ácidos nucleicos, no qual o DNA pode ter sido o componente dominante. Alterações significativas relacionadas ao conteúdo de carbonato de cálcio foram reveladas nos organismos expostos ao Cd e ao Cu, o que sugere mudanças na composição da carapaça e possível alteração na capacidade de muda e crescimento dos organismos. Portanto, este estudo permite concluir que a espectroscopia de FTIR é capaz de detectar indícios de efeitos subletais em organismos expostos a contaminantes e que as alterações de composição macromolecular são uma ferramenta complementar promissora para futuras avaliações ecotoxicológicas.

Palavras-chave: Elementos-traço. Efeitos subletais. FTIR. Ostracoda. Perfil macromolecular

ABSTRACT

SEPÚLVEDA, P.S. **Use of Fourier-transform infrared spectroscopy in the assessment of sublethal ecotoxicological effects on Ostracods *Chlamydoteca sp.*** 2018. Dissertation (MSc) – School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2018.

With population growth and increases in human activities, large amounts of pollutants are released daily into the environment. In aquatic ecosystems organisms are exposed for long periods at low concentrations of contaminants. Therefore, studies that focus on fast and non-invasive new methodologies are necessary for the assessment of sublethal effects in organisms. An example is the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). This technique can detect macromolecular changes of biological samples in a fast, inexpensive and non-destructive way, all of which lend to the attractiveness of this methodology for ecotoxicological analyzes. Thus, the aim of this study was to verify the applicability of FTIR as an alternative methodology, using the composition of macromolecular profiles as an indicator of sublethal effects in organisms exposed to trace elements. For this, ostracods (*Chlamydoteca sp.*) were exposed to the elements Cu, Cd, Hg and Mn. Changes in biomolecular profiles were evaluated in ostracods exposed for 48h to Mn. The results showed a negative correlation between the concentration of exposure and the proportion of saturated and unsaturated fatty acids for protein in organisms exposed to Mn and the same correlation was observed for the content of nucleic acids. This suggests that the organisms had their lipid metabolism and their cellular protein production capacity altered due to Mn exposure. In addition, four chronic tests (9 days) were performed on ostracods exposed to the trace elements Cu, Cd, Hg and Mn. A decrease in saturated and unsaturated lipids in relation to the protein was observed in organisms exposed to Cd, suggesting that the use of lipid reserves was due to the physiological stress. Ostracods exposed to Cu had an increase in nucleic acids, in which DNA may have been the dominant component. Significant changes related to the calcium carbonate content were revealed in the organisms exposed to Cd and Cu, which suggests changes in carapace composition and the possible alteration in the organism capacity of molting and growth. Therefore, this study concludes that FTIR spectroscopy can detect indications of sublethal effects in organisms exposed to contaminants and that changes in macromolecular composition are a promising complementary tool for future ecotoxicological assessments.

Keywords: Trace elements. Sublethal effects. FTIR. Ostracoda. Macromolecular Profile

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do espectrômetro com transformada de Fourier	15
Figura 2 - Espectro típico de FTIR de uma amostra biológica demonstrando os picos e grupos macromoleculares equivalentes	16
Figura 3 - A) Tanques da Estação Experimental de Aquicultura da UFSCar. B) Bandeja com ostrácodes <i>Chlamydoteca sp.</i> aclimatados para os ensaios ecotoxicológicos.....	20
Figura 4 - Aspectos gerais do ostrácodo <i>Chlamydoteca sp</i>	21
Figura 5 - Ostrácodes <i>Chlamydoteca sp.</i> na técnica “blot dry” de secagem.....	22
Figura 6 - Liofilização das amostras de ostrácodes <i>Chlamydoteca sp.</i> (Liofilizador Liotop, Modelo L202).....	23
Figura 7 - Molde evacuável de empastilhamento, esquerda vista lateral e direita corte transversal	24
Figura 8 - A) Mistura da amostra com KBr em almofariz e pistilo de ágata. B) Molde evacuável para empastilhamento. C) Prensa hidráulica. D) Pastilha de KBr com amostra.....	24
Figura 9 - Espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR Shimadzu IRAffinity-1S).....	25
Figura 10 - Lâmina com pastilha de KBr no sensor do FTIR.....	25
Figura 11 - Espectros de ostrácodes expostos por 48h ao sulfato de manganês (40, 42, 44, 46, 48 e 50 mg/L) e um controle (0 mg/L)	28
Figura 12 - Relação entre a transmitância relativa (espectros com transmitância normalizada para Amida I) para oito picos dos espectros dos organismos e as diferentes concentrações de sulfato de manganês (40, 42, 44, 46, 48 e 50 mg / L) nas quais os ostrácodes foram expostos.....	30
Figura 13 - Relação entre condição individual e exposição ao sulfato de manganês.....	31
Figura 14 - Aspecto geral dos testes de exposição realizados com os metais Cu, Cd, Hg e Mn.....	39
Figura 15 - Espectro gerado pelo FTIR a partir de ostrácodes expostos durante nove dias a diferentes concentrações de sulfato de cobre (CuSO ₄) e controle.....	43
Figura 16 - Espectro gerado pelo FTIR a partir de ostrácodes expostos durante nove dias a diferentes concentrações de cloreto de cádmio (CdCl ₂) e controle.	44

Figura 17 - Espectro gerado pelo FTIR a partir de ostrácodes expostos durante nove dias a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (HgCl_2) e controle.	45
Figura 18 - Espectro gerado pelo FTIR a partir de ostrácodes expostos durante nove dias a diferentes concentrações de sulfato de manganês (MnSO_4) e controle.	46
Figura 19 - Escalonamento multidimensional não métrico (similaridade de Bray-Curtis) calculado a partir de doze picos dos espectros gerados pelo FTIR para ostrácodes expostos por 9 dias a diferentes concentrações dos metais cobre, cádmio, mercúrio e manganês e controle.	47
Figura 20 - Absorbância relativa (absorbância normalizada para amida I) de doze picos presentes nos espectros de ostrácodes expostos por 9 dias a diferentes concentrações de sulfato de cobre (0,004; 0,034; 0,064; 0,094; 0,12; 0,14 mg/L) e controle	54
Figura 21 - Absorbância relativa (absorbância normalizada para amida I) de doze picos presentes nos espectros de ostrácodes expostos por 9 dias a diferentes concentrações de cloreto de cádmio (0,001; 0,0025; 0,004; 0,0055; 0,008; 0,01 mg/L) e controle.....	55
Figura 22 - Absorbância relativa (absorbância normalizada para amida I) de doze picos presentes nos espectros de ostrácodes expostos por 9 dias a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (0,009; 0,018; 0,027; 0,036; 0,045; 0,054 mg/L) e controle	56
Figura 23 - Absorbância relativa (absorbância normalizada para amida I) de doze picos presentes nos espectros de ostrácodes expostos por 9 dias a diferentes concentrações de sulfato de manganês (6,39; 12,76; 19,13; 25,5; 31,87; 38,24 mg/L) e controle.....	57
Figura 24 - Relação entre condição individual e exposição de ostrácodes aos elementos Cobre, Cádmio, Mercúrio e Manganês.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações empregadas para cada metal nos testes agudos (mg/L).....	38
Tabela 2 - Concentrações empregadas para cada metal nos testes crônicos (mg/L).	39
Tabela 3 - Resultados da análise one-way ANOSIM para fator concentração-amostra. Elemento Cobre. Sig%: nível de significância em porcentagem.	49
Tabela 4 - Resultados da análise one-way ANOSIM para fator concentração-amostra. Elemento Cádmio. Sig%: nível de significância em porcentagem	50
Tabela 5 - Resultados da análise one-way ANOSIM para fator concentração-amostra. Elemento Mercúrio. Sig%: nível de significância em porcentagem.....	51
Tabela 6 - Resultados da análise one-way ANOSIM para fator concentração-amostra. Elemento Manganês. Sig%: nível de significância em porcentagem.	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
Objetivo Geral.....	16
Capítulo 1: Avaliação espectroscópica de alterações macromoleculares em ostrácodes <i>Chlamydoteca sp.</i> após exposição aguda ao sulfato de manganês.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
Objetivo Específico.....	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
2.1. Cultivo e manutenção dos organismos-teste.....	20
2.2. Teste de sensibilidade dos organismos-teste	20
2.3. Teste preliminar agudo	21
2.4. Preparação das amostras para análise de espectroscopia FTIR.....	22
24.1. Preparação das pastilhas de Brometo de Potássio (KBr).....	23
2.5. Análises de Espectroscopia FTIR	25
2.6. Análise de dados.....	26
3. RESULTADOS	27
4. DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÃO	33
Capítulo 2: Avaliação espectroscópica de alterações macromoleculares em Ostrácodes <i>Chlamydoteca sp.</i> após exposição crônica ao Cd, Cu, Hg e Mn	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
Objetivo Específico.....	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
2.1. Cultivo e sensibilidade dos organismos-teste.....	37
2.2. Testes de toxicidade aguda.....	37
2.3. Testes de exposição prolongada	38
2.4. Preparação das amostras para análise de espectroscopia FTIR	39
2.5. Análise de espectroscopia FTIR.....	40
2.6. Análise de dados.....	40
4. DISCUSSÃO	60
5. CONCLUSÃO	62
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, as atividades antropogênicas relacionadas com a indústria, com a agricultura e com o comércio vêm afetando de maneira significativa o meio ambiente. Portanto, o entendimento dos efeitos causados por diferentes tipos de compostos químicos lançados aos ecossistemas é cada vez mais necessário (FILSER, 2008). Sabe-se que cerca de duas mil novas substâncias químicas são disponibilizadas ao mercado anualmente e a toxicidade da maioria delas ainda não é totalmente conhecida. Isto ocorre devido ao fato de que muitos destes compostos são testados de acordo com o seu uso e, muitas vezes, o processo pelo qual eles são absorvidos pelos solos, diluídos pela água ou dispersos pelo ar, não são completamente compreendidos antes de serem lançados ao ambiente. (FREITAS et al., 2002).

O uso de métodos analíticos físicos e químicos não são suficientes para a avaliação dos efeitos adversos da grande variedade de substâncias químicas existente, uma vez que tais análises indicam o estado instantâneo em um dado ambiente em pontos de amostragem específicos, que podem estar muito distantes da fonte poluidora, fazendo com que as perturbações mais sutis não sejam detectadas (BUSS et al., 2003). Por outro lado, estudos toxicológicos podem evidenciar, de forma bem eficiente, os efeitos de diversos poluentes presentes no meio ambiente. Metodologias biológicas são capazes de avaliar uma poluição menos pontual e, para as avaliações em escala regional, isto é muito importante. Normalmente essa metodologia engloba testes ecotoxicológicos que utilizam organismos vivos para determinar em que tempo e em quais concentrações um poluente pode ser prejudicial à saúde de uma espécie (CARNIATO et al., 2007).

Existem dois tipos de testes ecotoxicológicos, o de toxicidade aguda e o de toxicidade crônica. Testes ecotoxicológicos de toxicidade aguda, por exemplo, são testes de curta duração que oferecem repostas mais rápidas na avaliação de efeitos tóxicos letais de um contaminante sobre organismos aquáticos. O principal objetivo deste tipo de teste é determinar as concentrações letais médias (CL50), ou seja a concentração da substância tóxica em que há a mortalidade de 50% dos organismos. Esses testes agudos são considerados importantes, pois fornecem informações básicas para que haja estudos mais aprofundados, como testes de toxicidade crônica, que tem maior duração e visa avaliar os efeitos que não são letais nos organismos, através de ensaios de exposição prolongada com concentrações menores do que aquelas aplicadas em testes de toxicidade aguda (RAND, 1995).

Nos ambientes aquáticos os efeitos crônicos em organismos são frequentemente observados devido à diluição do contaminante proveniente de águas de contribuição, à

associação rápida que ocorre entre partículas e matéria húmica e à sedimentação dos sólidos em suspensão (STEPHAN & MOUNT, 1973). Todos estes processos fazem com que os organismos fiquem expostos à baixas concentrações de poluentes, acarretando ao longo do tempo efeitos subletais. Dentre os poluentes que se encontram diluídos na água, estão os elementos-traço, tais como o cádmio, cobre, mercúrio e manganês, que são amplamente utilizados em atividades humanas. A contaminação a partir de atividades que produzem esses elementos é muito preocupante, pois apesar de alguns deles serem essenciais para a manutenção da vida, muitos podem ser tóxicos em quantidades elevadas.

O cádmio é um elemento não essencial, com efeitos teratogênicos, carcinogênicos e altamente nefrotóxicos sobre os organismos vivos (EISLER 1985). O cádmio é frequentemente usado em várias atividades industriais como a produção de ligas, pigmentos e baterias (WILSON, 1998). Um uso recente do cádmio é na fabricação de nanopartículas (como seleneto de cádmio ou sulfureto de cádmio). Os efeitos ecológicos e toxicológicos destes materiais emergentes para os organismos aquáticos são em grande parte desconhecidas. A demanda por cádmio tem aumentado com base no seu uso em baterias de NiCd, enquanto usos mais tradicionais de cádmio em tintas, pigmentos e estabilizadores diminuiu devido à preocupações ambientais e de saúde (USGS 2013).

O cobre é comumente encontrado no meio ambiente e é essencial para o crescimento e o metabolismo de todos os organismos vivos (EISLER 1998). Segundo Ahsanullah e Ying (1995) o cobre pode ser extremamente tóxico em altas concentrações no ambiente. As atividades humanas responsáveis pela introdução de cobre nos ecossistemas aquáticos são: corrosão de tubos de cobre por águas ácidas, o uso de algicidas e fungicidas na preservação de madeira e resíduos provenientes da indústria de mineração, fundição, galvanoplastia e refino (ALEXANDRE & SZIKSZAY, 1999). Óxidos e sulfatos de cobre são usados como pesticidas, fungicidas e algicidas (EYSINK et al, 1988). O cobre está ainda presente nas principais minas de extração de outros metais, associados a estes, na forma de sulfetos, óxidos e carbonato (ESTEVES, 1998).

O manganês é um metal elementar abundante que não existe naturalmente na sua forma pura, encontra-se como um componente de mais de 100 minerais. É também um nutriente essencial para o organismo, sendo necessário em pequenas quantidades. Este metal está presente naturalmente no solo, ar, água e alimentos em níveis baixos. São utilizados principalmente na produção de ligas de ferro, fertilizantes, fungicidas e na alimentação do gado (ATSDR, 2000). Todos os usos deste metal poderão resultar em versões substanciais de manganês para o meio ambiente. O manganês é listado como um elemento químico do

Inventário de Emissões Tóxicas (TRI) e seu lançamento ocorre em maior parte no solo, embora possa também ocorrer no ar, nas águas superficiais e subterrâneas (ATSDR, 2000).

O mercúrio é uma substância tóxica e os seres vivos são expostos à várias formas químicas deste elemento no ambiente. O mercúrio induz alterações graves nos tecidos do corpo e provoca uma ampla gama de efeitos adversos (SARKAR,2005). Este elemento é utilizado na indústria elétrica (interruptores, termostatos, baterias), na odontologia, em processos industriais, em reatores nucleares, como agentes antifúngicos para processamento de madeira, como um solvente para metais preciosos e como um conservante de produtos farmacêuticos. A procura industrial de mercúrio declinou entre 1980 e 1994, como resultado de proibições federais sobre aditivos de mercúrio em tintas, pesticidas e da redução do seu uso em baterias (TCHOUNWOU, 2013).

Pelo fato de serem persistentes e possuírem propriedades de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar, os elementos-traço podem comprometer o funcionamento metabólico e o sistema imune de um organismo, podendo afetar o seu crescimento, a sua fecundidade, a sua reprodução e a sua sobrevivência (SOUZA, 2010; VERSLYCKE et al. 2003). Ademais, em casos mais sérios, os elementos-traço presentes na água podem atravessar a membrana celular e entrar na célula por processos de fagocitose ou pinocitose, acarretando danos à estrutura da molécula de DNA (AMARAL et al., 2007). Portanto, é necessário que os efeitos subletais sejam avaliados de forma mais específica, através de análises moleculares, histológicas e comportamentais, para a detecção de distúrbios fisiológicos, de crescimento e reprodução do organismo (LOMBARDI, 2007).

Hoje é bem evidente que os métodos que utilizam organismos-teste evoluíram muito e a cada ano eles são aperfeiçoados. Pesquisas recentes apresentam inúmeras variações de metodologias padronizadas. Todo esforço dos pesquisadores encontra-se na tentativa de ampliar cada vez mais a precisão dos métodos, tendo em vista a complexa e heterogênea composição da biota nas áreas de estudo (RUBINGER, 2009). Testes ecotoxicológicos padronizados são muito importantes em avaliações de risco ambiental, porém ainda são limitados no que diz respeito a capacidade de avaliar prováveis efeitos subletais em organismos expostos a contaminantes. Nesse contexto, na busca por novos métodos biológicos para avaliação toxicológica, alguns pesquisadores começaram a desenvolver trabalhos que utilizam espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para definir perfis de composição macromolecular (AKKAS e SEVERCAN,2012) (Figure 1).

Figura 1 - Esquema do espectrofotômetro com transformada de Fourier (Fonte: Solomons & Fryhle, 2005).

Essa técnica basicamente detecta vibrações moleculares decorrentes de forças inter e intra moleculares (SHARMA; UTTAM, 2016) que permitem a determinação de um perfil macromolecular do material em estudo (TREVISAN et al., 2012; ZOHDİ et al., 2015). O uso do espectrofotômetro FTIR em componentes biológicos ainda é incipiente, pois apesar de seus princípios matemáticos serem estabelecidos há mais de um século, apenas nas últimas décadas com o avanço da tecnologia computacional, esta ferramenta se tornou disponível para aplicação em amostras biológicas (TREVISAN et. al, 2012). Para Baker et. al (2014) o FTIR é um excelente método para análises biológicas, pois ele permite que a informação bioquímica seja adquirida para avaliação da funcionalidade das células de uma forma não perturbativa.

Estudos tem demonstrado que o FTIR é capaz de diferenciar o estado geral de células, com diversas pesquisas que visam avaliar os mecanismos celulares (AMI et. al 2011; WHELAN et. al, 2013), o diagnóstico de doenças humanas (MORDECHAI et al, 2004), a identificação taxonômica de microrganismos (REBUFFO et. Al 2006; WENNING et.al 2002; OBERREUTER et.al 2002), o estudo de plantas (IVANOVA & SINGH, 2003; YANG & YEN, 2002; BAĞCIOĞLU et al., 2017) e avaliações de diferentes tipos de estresse ambiental (SZEHALMI et. al, 2007; PERROMAT et. al 2003).

Portanto, o FTIR produz uma “impressão digital” da composição macromolecular do material que está sendo estudado. Os picos demonstrados no perfil macromolecular representam as ligações químicas que ocorrem em uma amostra biológica (Figura 2). Independente do material utilizado, todas as amostras são examinadas pelo equipamento de maneira rápida. Além disso, as análises de FTIR são relativamente baratas e elas podem ser

feitas de forma automatizada sem comprometimento das amostras (TREVISAN et al, 2012). Logo, o FTIR é uma técnica complementar promissora e atrativa para diversos tipos de diagnósticos (ZOHDI et al, 2015).

Figura 2 - Espectro típico de FTIR de uma amostra biológica demonstrando os picos e grupos macromoleculares equivalentes (Fonte: Baker et. al 2014).

Apesar do grande potencial que análises de FTIR oferecem para compreensão da condição do material biológico, o uso desta técnica para avaliar os efeitos tóxicos de contaminantes em organismos aquáticos ainda é raro (BEZIRCI et. al, 2011). Portanto, este estudo teve como objetivo verificar a aplicabilidade do FTIR como metodologia alternativa para identificar efeitos subletais em animais expostos a contaminantes. Para atingir este objetivo experimentos de curta e longa duração foram realizados com ostrácodes *Chlamydoteca sp.* expostos a elementos-traço e as alterações da composição macromolecular resultantes desta exposição foram avaliadas através da análise do perfil de FTIR.

Objetivo Geral

Avaliar a aplicabilidade da espectroscopia FTIR e o uso de perfis de composição macromolecular como indicadores de efeitos ecotoxicológicos subletais em ostrácodes *Chlamydoteca sp.*

Capítulo 1: Avaliação espectroscópica de alterações macromoleculares em ostrácodes *Chlamydoteca sp.* após exposição aguda ao sulfato de manganês.

Resumo : O uso de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para análises ecotoxicológicas é relativamente novo. Esta técnica permite que a determinação do perfil macromolecular do material em estudo seja feita de forma rápida, barata e não destrutiva, o que a torna uma ferramenta atrativa para diversas avaliações ambientais. Assim, este estudo teve como principal objetivo avaliar alterações em perfis biomoleculares de ostrácodes (*Chlamydoteca sp.*) após exposição de curto prazo ao sulfato de manganês utilizando a espectroscopia de FTIR. Os organismos foram expostos por 48h a seis concentrações de sulfato de manganês (40, 42, 44, 46, 48 e 50 mg/L) mais um controle. Os espectros de FTIR revelaram diferenças consistentes nos perfis macromoleculares do controle e ostrácodes expostos ao sulfato de manganês. Foi observada uma correlação negativa entre concentração de exposição e a proporção de ácidos graxos insaturados em relação a proteína (Kendall tau -0,64, $p = 0,07$) e ácidos graxos saturados para proteína (CH_2 assimétrica, Kendall tau -0,84, $p < 0,01$; CH_2 simétrica, Kendall tau -0,81, $p < 0,05$). A diminuição na proporção de lipídios em relação a proteína sugere que os ostrácodes usaram suas reservas lipídicas quando encontrados sob estresse fisiológico devido à exposição aos contaminantes. Uma forte relação negativa foi observada também entre as bandas de ácidos nucleicos e fosfolipídios e a concentração de Mn do meio (Kendall tau -0,79 $p < 0,05$), indicando um impacto da exposição de Mn na capacidade de produção de proteína celular dos ostrácodes. O presente estudo demonstra que a espectroscopia de FTIR pode fornecer um meio inovador e eficiente para avaliar mudanças nos perfis biomoleculares que podem refletir mudanças na condição fisiológica de organismos expostos a contaminantes. Além disso, os efeitos subletais dos ostrácodes expostos por um curto prazo ao sulfato de manganês destacam o potencial dos efeitos de longo prazo deste e outros contaminantes sobre esses organismos.

1. INTRODUÇÃO

As avaliações ecotoxicológicas padronizadas muitas vezes dependem de um conjunto limitado de *endpoints*, como a sobrevivência, crescimento e reprodução de indivíduos. Estes são considerados ótimos *endpoints* devido à sua simplicidade de medição e à necessidade de reprodutibilidade em avaliações padronizadas. No entanto, embora esses *endpoints* sejam de clara relevância biológica no nível individual, eles limitam a compreensão dos mecanismos subjacentes da ação tóxica e as possíveis consequências, resultantes da exposição, em outros níveis da organização biológica. Consequentemente, esses parâmetros podem mascarar respostas biológicas potencialmente relevantes e até inesperadas em avaliações ambientais (RUDÉN et al., 2017). Assim sendo, uma estratégia para lidar com esse problema seria o uso de *endpoints* alternativos, como os *endpoints* de alterações em níveis macromoleculares, que potencialmente podem complementar informações fornecidas por outros *endpoints* utilizados em diversas avaliações padronizadas.

Dentre as mais recentes tecnologias utilizadas para determinar alterações de composição macromolecular, encontra-se a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Entretanto, apesar do grande potencial que a espectroscopia FTIR oferece para a compreensão do estado geral dos compostos biológicos, o uso desta técnica só foi recentemente implementado em estudos ecotoxicológicos (LI et al., 2010; NOVAK et al., 2013; PALANIAPPAN; PRAMOD, 2010; STRONG et al., 2016). Por este motivo, este estudo visou avaliar o uso de alterações de composição macromolecular, determinada por espectroscopia FTIR, como um indicador para o estresse fisiológico de organismos aquáticos devido à exposição a um agente tóxico. Para atingir tal objetivo, experimentos foram feitos expondo os microcrustáceos ostrácodes ao sulfato de manganês.

Os ostrácodes têm sido comumente usados em estudos ecotoxicológicos como organismos modelo de teste para avaliações paleoambientais e monitoramento do impacto ambiental e de poluição (ANADÓN; GLIOZZI; MAZZINI, 2002; PASCUAL et al., 2002; SÁNCHEZ-BAYO, 2006). Ostrácodes são microcrustáceos, bivalves, com carapaça de calcita com baixo teor de Mg. Estes organismos estão presentes em ambientes transicionais, dulciaquícolas e marinhos. São principalmente bentônicos, comuns em corpos d'água rasos e formam um componente importante na cadeia alimentar de alguns peixes. Ostrácodes bênticos são principalmente detritívoros e também se alimentam de animais mortos. Ostrácodes de água doce se reproduzem sexualmente e por partenogênese. As fêmeas são mais abundantes do que os machos e têm ovos resistentes às condições ambientais adversas. Esses organismos podem

ficar dormentes ou hibernar como estágios larvais resistentes. Como é um crustáceo, o seu processo de muda passa por oito estágios para atingir a idade adulta, e seu ciclo de vida pode durar meses ou mais de dois anos (BERGUE, 2006; SHUHAIMI-OTHMAN et al., 2011).

Ostrácodes são considerados excelentes bioindicadores das condições físicas e químicas do entorno, sendo altamente sensíveis a pesticidas, derramamentos de óleo e poluição por metais (KHANGAROT; DAS, 2009; RUIZ et al., 2013). Sendo assim, o metal manganês foi escolhido por ser usado em diversos produtos de consumo e, apesar de vários estudos de toxicidade de metais terem sido realizados com ostrácodes nos últimos anos, poucos deles retratam os efeitos agudos do manganês (CHIAL; PERSOONE, 2003; KHANGAROT; DAS, 2009; SEVILLA; NAKAJIMA; YAMAMOTO, 2013; SHUHAIMI-OTHMAN et al., 2011). Portanto, este capítulo tem como objetivo verificar a aplicabilidade da espectroscopia FTIR como ferramenta para detectar alterações no perfil macromolecular em ostrácodes *Chlamydoteca sp.* após a exposição de curto prazo ao sulfato de manganês e determinar como essas mudanças são refletida nas respostas fisiológicas destes organismos.

Objetivo Específico

Avaliar as alterações nos perfis macromoleculares de ostrácodes *Chlamydoteca sp.* após exposição aguda ao sulfato de manganês.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo e manutenção dos organismos-teste

Os cultivos dos ostrácodes *Chlamydoteca sp.* foram realizados em tanques de 3000 litros na Estação Experimental de Aquicultura (EEA) do Departamento de Hidrobiologia na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva DEBE/UFSCar. Os organismos foram acondicionados em bandejas plásticas (29 x 34 x 6,7 cm) e aclimatados as condições de teste. O meio de cultivo foi água reconstituída com pH entre 6,0 e 9,0, dureza 90 a 400 mg CaCO₃/L e condutividade elétrica de 150 a 350 μScm^{-1} . Os organismos foram mantidos sob fotoperíodo de 16:8h claro/escuro, em temperatura de 22 °C (± 2 °C) com alimentação *ad libitum* em densa suspensão de *Chlorella sorokiniana* (Figure 3).

A)

B)

Figura 3 - A) Tanques da Estação Experimental de Aquicultura da Universidade Federal de São Carlos. B) Bandeja com ostrácodes *Chlamydoteca sp.* aclimatados para os ensaios ecotoxicológicos (Foto: Priscila S. Sepúlveda, 2017).

2.2. Teste de sensibilidade dos organismos-teste

Em colaboração com o Laboratório de Ecotoxicologia (DEBE/UFSCar) foram realizados testes de sensibilidade para verificar se o cultivo inicial dos Ostrácodes *Chlamydoteca sp.* (Figura 4) estava dentro da faixa de sensibilidade da carta controle do laboratório. As faixas de sensibilidade foram determinadas por meio de testes de toxicidade aguda com o metal Cobre. O composto de referência utilizado foi o sulfato de cobre (CuSO₄; CAS nº: 7758-98-8; marca Dinâmica) por ser um composto muito utilizado em estudos de toxicidade com Ostracoda (SEVILLA; NAKAJIMA; YAMAMOTO, 2013; SHUHAIMI-OTHMAN et al., 2011;

VARDIA; DURVE, 1988) e no total foram realizados vinte testes de sensibilidade. A faixa de sensibilidade foi estabelecida de acordo com um modelo desenvolvido pela (U.S.EPA, 2005) em que a linha de tendência central é igual a média dos vinte valores de CL_{50} - 48h obtidos (limite superior é igual média dos vinte valores de CL_{50} - 48h mais duas vezes o valor do desvio-padrão e o limite inferior é igual a média dos vinte valores de CL_{50} - 48h menos duas vezes o valor do desvio-padrão).

Uma solução-estoque de sulfato de cobre foi preparada na concentração de 10 mg/L e a partir desta foram preparadas as soluções-teste em seis concentrações (0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 mg/L) e um controle. Foram estabelecidas quatro réplicas por concentração em recipientes contendo 10 ml da solução-teste e cinco ostrácodes *Chlamydoteca sp.* (tamanho $\cong 3,93 \text{ mm} \pm 0,33 \text{ mm}$) em cada réplica. Os testes tiveram duração de 48 horas e foram mantidos no escuro sob a temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os organismos não foram alimentados. As variáveis pH, dureza, condutividade elétrica e temperatura das soluções-teste foram medidas a cada 24 horas.

Figura 4 - Aspectos gerais do ostrácode *Chlamydoteca sp.* (foto: Priscila S. Sepúlveda, 2017).

2.3. Teste preliminar agudo

Para a validação do método, um teste preliminar de toxicidade aguda foi realizado com ostrácodes *Chlamydoteca sp.* expostos ao sulfato de manganês (MnSO_4 ; CAS no: 1034-96-5; marca Carlo Erba Reagents) seguindo a mesma metodologia dos testes de sensibilidade. Os organismos foram expostos a seis concentrações de sulfato de manganês (40; 42; 44; 46; 48 e 50 mg/L) e um controle. As faixas de concentrações do teste foram estabelecidas de acordo com testes preliminares e os resultados foram expressos em CL_{50} - 48h (ABNT, 2004), com intervalo

de confiança de 95%, utilizando-se o programa estatístico PriProbit 1.63 (FUNG, 1989). As unidades experimentais consistiram em quatro réplicas, realizadas em pequenos recipientes plásticos contendo 10 ml da solução teste e cinco Ostrácodes (tamanho $\cong 3,93 \text{ mm} \pm 0,33 \text{ mm}$) para cada réplica. O teste teve duração de 48 horas, foi mantido sob a temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro e sem alimentação dos organismos. As características físicas e químicas da água de tratamento (pH, dureza, condutividade, temperatura) foram medidas a cada 24 horas.

2.4. Preparação das amostras para análise de espectroscopia FTIR

Após a finalização do teste de exposição preliminar, todos os organismos sobreviventes foram coletados imediatamente, gentilmente lavados com água destilada, secos em papel absorvente por 2 minutos (técnica “blot dry”) e congelados a temperatura de -20°C (Figura 5). Todos os organismos foram identificados e armazenados para a posterior análise espectroscópica.

Figura 5 - Ostrácodes *Chlamydoteca sp.* na técnica “blot dry” de secagem (foto: Priscila S. Sepúlveda, 2017).

Para que as análises de espectroscopia de FTIR fossem realizadas, todos os organismos anteriormente congelados foram liofilizados (Liotop, modelo L202) (Figura 6), por um período de 12 horas, para a remoção de qualquer vestígio de água presente nas amostras, reduzindo assim a contribuição da absorção de água nas bandas do espectro infravermelho. Após liofilizadas, as amostras foram separadas em conjuntos de aproximadamente 10 indivíduos para cada tratamento (um a dois conjuntos por tratamento e controle, dependendo do número de animais disponíveis) para a preparação das amostras.

Figura 6 - Liofilização das amostras de ostrácodes *Chlamydoteca sp.* (Liofilizador Liotop, Modelo L202) (Foto: Priscila S. Sepúlveda, 2017).

24.1. Preparação das pastilhas de brometo de potássio (KBr)

Na espectroscopia de FTIR o KBr é um composto químico comumente utilizado na etapa de preparação de amostras sólidas. Isto deve-se ao fato de que o KBr é completamente transparente na região do infravermelho e é relativamente mais barato comparado a outros compostos químicos utilizados em análises espectroscópicas (SMITH, 1996). Assim, pastilhas de brometo de potássio (KBr) foi o reagente escolhido para a preparação das amostras deste estudo. Por ser altamente higroscópico (absorve água da atmosfera), o KBr a ser utilizado foi previamente seco em uma estufa a 110 °C por aproximadamente três horas e depois de seco o pó foi guardado em um dessecador até que fossem preparadas as pastilhas (SHIMADZU IRAFFINITY-1, 2012).

Os conjunto de amostras liofilizadas de cada tratamento foram pesadas e colocadas em um almofariz de ágata e com um pistilo de ágata a amostra foi triturada firmemente até que fosse reduzida a um pó fino. O almofariz e pistilo de ágata são considerados os instrumentos ideais para o preparo deste tipo de amostra pelo fato da ágata não absorver na região do infravermelho e portanto ela não interfere no resultado da amostra. Assim, após serem trituradas, 1 mg do pó resultante de cada amostra foi misturado com 100 mg de KBr seco (proporção 1:100 mg). Rapidamente a mistura foi colocada em um molde de aço inoxidável previamente montado como mostra a figura 7.

Figura 7 - Molde evacuável de empastilhamento, esquerda vista lateral e direita corte transversal (Fonte: Adaptado de Salim, 2017).

Após as duas porções do molde (superior e inferior) serem conectadas, a pastilha de aço inferior foi posicionada dentro do orifício do molde, a amostra foi transferida para o orifício e então a pastilha superior foi posicionada, fazendo com que a amostra ficasse entre as duas pastilhas de aço. O compactador foi inserido no molde até tocar a parte inferior. O molde então foi colocado na prensa hidráulica e foi aplicada uma pressão de 8 tons por 3-4 minutos. A pressão foi retirada lentamente e o molde foi retirado da prensa. Com o molde invertido a parte inferior foi removida juntamente com a pastilha inferior, o compactador foi empurrado para que a pastilha superior movesse a pastilha KBr com a amostra para a superfície. As pastilhas de KBr eram transparentes e tinham aproximadamente 13 mm de diâmetro e 1 mm de espessura (Figura 8). Cada conjunto de amostras de cada tratamento deu origem a uma pastilha de KBr.

Figura 8 - A) Mistura da amostra com KBr em almofariz e pistilo de ágata. B) Molde evacuável para empastilhamento. C) Prensa hidráulica. D) Pastilha de KBr com amostra (Foto: Priscila S. Sepúlveda, 2017).

2.5. Análises de Espectroscopia FTIR

As análises espectroscópicas foram realizadas no espectrofotômetro FTIR (Shimadzu IRAffinity-1S) usando pastilhas de KBr (Figura 9). Cada espectro resultou de 32 *scans* a uma resolução espectral de 4 cm^{-1} . Os espectros cobriam um intervalo de número de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} . Para cada amostra submetida, dois espectros de transmitância foram obtidos com duas pastilhas diferentes. Medições de fundo foram feitas com pastilhas de KBr puro, nas mesmas condições das amostras, e subtraídas automaticamente dos espectros das amostras.

Figura 9 - Espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR Shimadzu IRAffinity-1S) (Foto: Priscila S. Sepúlveda, 2017).

Para a análise de espectroscopia FTIR, as pastilhas de KBr foram gentilmente acondicionadas sobre uma lâmina contendo ímãs e posicionadas na direção do sensor do equipamento (Figura 10). A mensuração da transmitância foi realizada após o comando feito pelo software IR solution, no computador conectado ao equipamento. O perfil de infravermelho gerado pelo equipamento foi corrigido para o perfil brando do sensor limpo sem amostra.

Figura 10 - Lâmina com pastilha de KBr no sensor do FTIR (Foto: Priscila S. Sepúlveda, 2017).

2.6. Análise de dados

Os espectros do FTIR foram processados no pacote ChemoSpec disponível no software estatístico R. Uma correção de linha de base foi aplicada para cada um dos espectros. A normalização do espectro para banda de Amida I e a redução do ruídos foram realizadas através do processo de *binning*, onde a média dos valores de transmitância é calculada para bins específicos (BEZIRCI et al., 2012; HANSON, 2014; LLABJANI et al., 2011), gerando assim um espectro de transmitância relativo a Amida I. Um índice de condição (razão entre ácidos graxos e proteína) foi calculado com base na razão entre a transmitância relativa da banda olefinica ($\sim 3011\text{ cm}^{-1}$ - teor de ácidos graxos insaturados) e bandas CH_2 ($\sim 2924\text{ cm}^{-1}$ assimétrica e $\sim 2855\text{ cm}^{-1}$ simétrico – teor de ácidos graxos saturados) para a banda Amida I ($\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ – teor de proteína) (BEZIRCI et al., 2012). A diminuição na concentração de ácidos graxos é normalmente causada pela peroxidação lipídica (SEVERCAN, 2003) e, por essa razão, a área do espectro onde se encontra a banda de lipídios foi utilizada como indicadora de condição individual neste estudo.

Os picos mais significativos foram visualmente identificados, e seu valor de transmitância relativo extraído. Esses valores foram então utilizados em todas as análises estatísticas subsequentes. A relação entre concentração de exposição e transmitância relativa foi avaliada para todos os índices de condição e para todos os picos relevantes por meio de regressão linear e através do cálculo do coeficiente de correlação não-paramétrica de Spearman (R_s de Spearman). A similaridade entre espectros foi avaliada por meio de escalonamento multidimensional não-métrico (MDS) baseado no índice de similaridade de Bray-Curtis calculado a partir de valores de transmitância transformados em raiz quadrada. Todos os espectros de FTIR foram processados no pacote ChemoSpec e todas as análises estatísticas foram feitas em R.

3. RESULTADOS

As análises dos espectros revelaram picos de transmitância marcantes nas bandas: ~ 711 , ~ 881 , ~ 1081 , ~ 1637 , ~ 1799 ~ 1937 , ~ 2516 , ~ 3442 cm^{-1} de todos os espectros. Nos espectros de organismos expostos ao sulfato de manganês foram observadas mudanças significativas nas intensidades de picos de transmitância nas regiões associadas com ácidos nucleicos ($1300 - 900$ cm^{-1}), amida I e II de proteínas ($1800 - 1700$ cm^{-1}) e lipídios ($3600 - 2800$ cm^{-1}). A análise de escalonamento multidimensional não-métrico baseado na similaridade de Bray-Curtis, demonstra uma separação consistente de todos os espectros de organismos expostos ao sulfato de manganês dos espectros de organismos do controle. As maiores distâncias observadas foram entre o controle e os espectros de concentrações mais elevadas ($46, 48$ e 50 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$) (Figura 11).

Figura 11 - Espectros de ostrácodes expostos por 48h ao sulfato de manganês (40, 42, 44, 46, 48 e 50 mg/L) e um controle (0 mg/L). O eixo das ordenadas é a transmitância relativa (todos os espectros com transmitância normalizada para Amida I) e o eixo das abcissas o número de onda cm⁻¹. O quadrado à direita é o gráfico de escalonamento multidimensional não-métrico, baseado na similaridade de Bray-Curtis, de transmitância relativa (transformada em log) de todos os espectros.

Uma relação global negativa entre o pico de transmitância relativa e a concentração da exposição foi observada para a região espectral de 711 cm^{-1} (Kendall tau $-0,54$ $p = 0,14$), 881 cm^{-1} (Kendall tau $-0,57$ $p=0,11$), 1081 cm^{-1} (Kendall tau $-0,79$ $p<0,05$), 1799 cm^{-1} (Kendall tau $-0,68$ $p=0,05$), 1937 cm^{-1} (Kendall tau $-0,66$ $p=0,06$) e 2516 cm^{-1} (Kendall tau $-0,56$ $p=0,13$). Dentre os picos analisados, observa-se uma forte relação negativa e uma diferença significativa entre a banda de ácidos nucleicos e fosfolipídios (1081 cm^{-1}) e a concentração de Mn no meio (Figura 12). Foram observadas também alterações significativas nas intensidades de picos de transmitância nas regiões associadas aos lipídios. Os organismos expostos ao Sulfato de Manganês apresentaram baixa transmitância relativa no alongamento assimétrico de lipídios ($\sim 2924\text{ cm}^{-1}$) e alongamento simétrico de lipídios ($\sim 2855\text{ cm}^{-1}$) quando comparado aos controles. Adicionalmente também foi observada uma correlação negativa entre concentração de exposição e proporção de ácidos graxos insaturados para proteína (Kendall tau $-0,64$, $p = 0,07$) e ácidos graxos saturados para proteína (CH_2 assimétrica, Kendall tau $-0,84$, $p < 0,01$; CH_2 simétrica, Kendall tau $-0,81$, $p < 0,05$) (Figura 13).

Figura 12 - Relação entre a transmitância relativa (espectros com transmitância normalizada para Amida I) para oito picos dos espectros dos organismos e as diferentes concentrações de sulfato de manganês (40, 42, 44, 46, 48 e 50 mg / L) nas quais os ostrácodes foram expostos. Os pontos fechados são os valores de tratamento com sulfato de manganês usados na estimativa da relação. Os pontos abertos mostram a transmitância relativa dos controles (observe que esses pontos são mostrados apenas como referência e eles representam os controles (0 mg / L), eles não são dimensionados em relação ao eixo das abscissas e não são usados no cálculo da relação). As curvas são a regressão linear entre as concentrações do tratamento com sulfato de manganês (exceto controles) e a transmitância relativa, a área cinza representa o intervalo de confiança de 95%, e os números mostram a correlação não paramétrica de Spearman (Rô de Spearman) e a significância estatística para cada relação.

Figura 13 - Relação entre condição individual e exposição ao sulfato de manganês. Os índices de condição (eixo das ordenadas) são a razão entre os valores de transmitância relativa (espectros com transmitância normalizada para Amida I) para a banda olefinica ($\sim 3011 \text{ cm}^{-1}$ teor de ácidos graxos insaturados) e bandas CH_2 ($\sim 2924 \text{ cm}^{-1}$ assimétrica e $\sim 2855 \text{ cm}^{-1}$ simétrica – teor de ácidos graxos saturados) para a banda Amida I ($\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ teor de proteína). Pontos abertos e fechados conforme a figura 2. Curvas são a regressão linear entre as concentrações dos tratamentos com sulfato de manganês (exceto controles) e a razão, a área cinza representa o intervalo de confiança de 95%, e os números mostram a correlação não-paramétrica de Spearman (Rô de Spearman) e a significância estatística para cada relação.

4. DISCUSSÃO

Os resultados sugerem que a exposição a concentrações crescentes de manganês foi seguida por mudanças na proporção das macromoléculas dos ostrácodes. A magnitude das alterações na composição macromolecular foi consistente com o gradiente de exposição ao Mn. Evidências relatadas por outros autores, sugerem que a absorção de Mn pelos ostrácodes está diretamente relacionada com a concentração desse elemento no meio. Por exemplo, a bioconcentração de Mn e outros metais (Cu, Cd, Pb, Zn, Ni, Fe, Al) em ostrácodes *Stenocypris major* foi positivamente relacionada à concentração desses elementos no meio ao qual os organismos foram expostos (SHUHAIMI-OTHTMAN et al., 2011). Consequentemente, se a biodisponibilidade interna do Mn induz alterações na fisiologia do organismo, uma mudança gradual na composição macromolecular associada a essas respostas fisiológicas provavelmente estará correlacionada com a concentração da exposição, como foi observado neste experimento.

As mudanças observadas na composição macromolecular de ostrácodes provavelmente representam mudanças subjacentes na condição fisiológica do organismo devido ao estresse induzido pela exposição ao Mn. Isso ficou evidente nas bandas de FTIR associadas a lipídios e ácidos nucleicos, nas quais as variações observadas são consistentes com as mudanças fisiológicas normalmente induzidas pelo estresse. Se assumirmos que o conteúdo de proteína é relativamente constante durante o experimento, a correlação negativa da razão entre lipídios e proteína com a concentração de Mn no meio (Figura 3) provavelmente representa um consumo crescente de lipídios com o aumento do estresse (concentração de Manganês).

Os resultados obtidos corroboram os de outros estudos de espectroscopia FTIR, que mostram uma relação negativa entre o conteúdo lipídico e a concentração de exposição em organismos de água doce. Por exemplo, Bezirci et al., (2012) observaram uma diminuição nas bandas de FTIR associadas ao conteúdo lipídico insaturado em Cladocera *Daphnia pulex* exposta a concentrações crescentes de NaCl. Palaniappan e Pramod (2010) mostraram que os tecidos de brânquias do peixe-zebra *Danio rerio*, expostos ao dióxido de titânio (TiO₂) apresentaram maiores intensidades nas bandas de amida I e amida II, porém um menor alongamento de lipídios (CH₂ simétrico e assimétrico - ácidos graxos saturados) quando comparado ao controle. Portanto, a diminuição na proporção de lipídios em relação a proteína observada nos ostrácodes expostos ao Mn, foi provavelmente um resultado do uso de reservas lipídicas para energia ou peroxidação lipídica devido ao estresse fisiológico.

As mudanças nos espectros também sugerem um impacto da exposição de Mn na capacidade de produção de proteína celular dos ostrácodes. A banda ~ 1081 cm⁻¹ é atribuída a

ácidos nucleicos e fosfolipídios (ÇAKMAK et al., 2003, Tabela I) e de acordo com os resultados existe uma relação negativa consistente entre o pico da banda $\sim 1081\text{ cm}^{-1}$ e a concentração de Mn do meio (Kendall tau -079 p <0,05). Se assumirmos que o número de células é constante durante o experimento, devido ao curto período de duração dos testes, então o conteúdo de DNA provavelmente também é estável, e a variação observada no conteúdo de ácido nucleico pode ter sido principalmente devido à variação no conteúdo total de RNA. Como o conteúdo de RNA da célula está positivamente associado ao crescimento (eg GUSMÃO; MCKINNON, 2011) e à produção de proteína em microcrustáceos (YEBRA et al., 2017), uma diminuição no conteúdo de RNA provavelmente representa uma taxa de crescimento reduzida e produção de biomassa em ostrácodes expostos ao Mn. Este achado é consistente com o de Palaniappan e Pramod (2010), que relataram uma diminuição da intensidade das bandas assimétricas de fosfato nos tecidos cerebrais do peixe-zebra que foram expostos à nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO_2). Além disso, Llabjani et al. (2011) observaram que misturas de poluentes orgânicos persistentes (POPs) induziram efeitos na região de DNA/RNA ($\sim 1425 - 900\text{ cm}^{-1}$) dos extratos de ovos do Ganso-patola (*Morus bassanus*), com alterações específicas em bandas de fosfato simétricas e assimétricas, associadas aos níveis médios de PCB e BDE.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostra o potencial da espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier para análises ecotoxicológicas. Esta técnica pode detectar, de maneira não destrutiva e rápida, as alterações macromoleculares que podem refletir a condição fisiológica de organismos expostos a contaminantes. Os resultados obtidos indicam que os ostrácodes *Chlamydoteca sp.* foram adversamente afetados quando expostos ao sulfato de manganês em diferentes concentrações. As mudanças consistentes no conteúdo bioquímico como lipídios em relação a proteínas e ácidos nucleicos foram observadas em organismos expostos de acordo com as concentrações crescentes de sulfato de manganês. As evidências deste estudo sugerem que alterações no perfil FTIR podem detectar precocemente o estresse devido à exposição a contaminantes, podendo assim ser usados para desenvolver um *endpoint* quantificável para avaliar efeitos subletais em incubações laboratoriais de curto prazo.

Capítulo 2: Avaliação espectroscópica de alterações macromoleculares em Ostrácodes *Chlamydoteca sp* após exposição crônica ao Cd, Cu, Hg e Mn.

Resumo: Os ecossistemas aquáticos estão sendo submetidos à constante perturbação antrópica. Impactos causados por substâncias tóxicas como elementos-traço, tornaram-se um problema universal, uma vez que esses elementos são tóxicos em altas concentrações e bioacumulam na biota aquática. Testes de toxicidade padronizados são essenciais em avaliações ambientais, porém metodologias complementares são indispensáveis para uma melhor compreensão dos efeitos subletais desses contaminantes. Este estudo teve como objetivo avaliar alterações em perfis biomoleculares de ostrácodes (*Chlamydoteca sp.*) após a exposição prolongada aos elementos-traço Cu, Cd, Hg e Mn, utilizando como metodologia a espectroscopia de FTIR. Os organismos foram expostos por nove dias a seis concentrações de cada elemento e mais os controles. Os resultados obtidos indicaram que os ostrácodes foram adversamente mais afetados quando expostos aos elementos Cu e Cd do que aos elementos Hg e Mn. Foram observadas mudanças consistentes no conteúdo bioquímico dos ostrácodes com a diminuição no conteúdo de lipídios saturados e insaturados em relação à proteína nos organismos expostos ao Cd, o que sugere o uso de reservas lipídicas ou peroxidação lipídica devido a um estresse fisiológico. Além disso foi observado um aumento dos ácidos nucleicos nos organismos expostos ao Cu, no qual o DNA pode ter sido o componente dominante. Foram encontradas alterações significativas no conteúdo relativo ao carbonato de cálcio nos espectros de ostrácodes expostos ao Cd e ao Cu, o que pode representar mudanças na composição da carapaça e ainda indicar uma possível alteração na capacidade de muda e crescimento dos organismos expostos a esses elementos. Sendo assim, o presente estudo demonstra que a espectroscopia de FTIR é capaz de detectar efeitos subletais em organismos expostos a diferentes tipos de contaminantes e que as alterações de composição macromolecular podem ser uma ferramenta promissora em avaliações ecotoxicológicas.

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos, especificamente os ecossistemas de água doce, são o recurso mais importante para a saúde e o bem-estar dos seres humanos, porém as águas, os sedimentos e a biota desse ecossistema estão ameaçados devido às atividades antropogênicas (SAUNDERS; MEEUWIG; VINCENT, 2002). O uso diário de milhares de substâncias e a criação acelerada de novas tecnologias representam um importante risco ecológico no meio aquático. Elementos-traço como Cd, Cu, Hg e Mn são provenientes de fontes naturais, assim como da atividade humana. O impacto causado por esses elementos no meio ambiente é um problema crescente em todo o mundo devido à sua potencial bioacumulação e toxicidade em diversos organismos (LAWRENCE; MASON, 2001; PERROT et al., 2010; SHUHAIMI-OTHMAN et al., 2011).

Em avaliações ambientais padronizadas, os testes de toxicidade são fundamentais para o estudo de efeitos agudos e crônicos de contaminantes em organismos aquáticos. Muitos destes experimentos são realizados na tentativa de identificar quais as espécies de organismos são sensíveis o suficiente para serem consideradas como biomarcadores. Sendo assim, muitos pesquisadores têm focado em diferentes grupos de organismos para a avaliação de impactos ambientais. Dentre os organismos mais aplicados encontram-se invertebrados aquáticos como gastrópodes (MOOLMAN; VUREN; WEPENER, 2007; RAGI et al., 2017), mexilhões (ANGELO et al., 2007; ZHELYAZKOV et al., 2018), anfípodes (BROOKS; MILLS, 2003; LOTUFO et al., 2000)(LOTUFO et al., 2000), cladocera (ZEMAN et al., 2008) e ostrácodes (CHIAL; PERSOONE, 2003; SÁNCHEZ-BAYO, 2006).

Ostrácodes tem sido comumente utilizado como um organismo modelo para estudos ecotoxicológicos de diversos elementos-traço (KHANGAROT; DAS, 2009; RUIZ et al., 2013; SEVILLA; NAKAJIMA; YAMAMOTO, 2013). Embora estudos de toxicidade aguda e crônica tenham sido realizados com ostrácodes de água doce expostos a diferentes elementos-traço, são raros os trabalhos que retratam os possíveis efeitos subletais causados por uma exposição prolongada a esses contaminantes. Além disso nenhum estudo relacionado com toxicidade foi encontrado na literatura para ostrácodes do gênero *Chlamydoteca*, especialmente com elementos-traço. Sendo assim, este capítulo tem como objetivo avaliar as alterações na composição macromolecular e identificar possíveis efeitos subletais em ostrácodes *Chlamydoteca sp.* após a exposição crônica desses organismos aos elementos traço Cd, Cu, Hg

e Mn, utilizando como metodologia principal a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Objetivo Específico

Avaliar as alterações nos perfis macromoleculares de Ostrácodes *Chlamydoteca sp.* após exposição crônica aos elementos-traço Cd, Cu, Hg e Mn.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo e sensibilidade dos organismos-teste

Conforme descrito no **capítulo 1** (pág.20), os cultivos de *Chlamydoteca sp.* foram realizados na Estação Experimental de Aquicultura do Departamento de Hidrobiologia na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva DEBE/UFSCar. As características físicas e químicas da água reconstituída utilizada como meio de cultivo foram pH entre 6,0 e 9,0, dureza 90 a 400 mg CaCO₃/L e condutividade elétrica de 150 a 350 µScm⁻¹. Os organismos foram mantidos em bandejas, sob fotoperíodo de 16:8h claro/escuro, em temperatura de 22 °C (± 2 °C), com alimentação *ad libitum* em densa suspensão de *Chlorella sorokiniana*.

Testes de sensibilidade foram realizados para verificar se o cultivo estava dentro da faixa de sensibilidade da carta controle do laboratório. O sulfato de cobre (CuSO₄) foi utilizado como substância tóxica de referência em todos os testes. Os testes consistiam na exposição dos organismos a seis concentrações do CuSO₄ (0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 mg/L) e um controle em quatro réplicas. Os recipientes-testes continham 10 ml da solução teste e cinco ostrácodes adultos (tamanho $\cong 3,93 \text{ mm} \pm 0,33 \text{ mm}$) em cada réplica. Os testes tiveram 48 horas de duração, com fotoperíodo de 16:8h claro/escuro, sem alimentação e teve como *endpoint* a imobilidade dos organismos.

2.2. Testes de toxicidade aguda

Em colaboração com o Laboratório de Ecotoxicologia (DEBE/UFSCar), testes de toxicidade aguda foram realizados para que as concentrações dos testes de exposição prolongada fossem definidas. Os compostos utilizados foram o sulfato de cobre (CuSO₄; CAS n°: 7758-98-8; marca Dinâmica), cloreto de cádmio (CdCl₂; CAS no: 35658-65-2; marca Carlo Erba Reagents), cloreto de mercúrio (HgCl₂; CAS no: 7487-94-7; marca Merck) e o sulfato de manganês (MnSO₄; CAS no: 1034-96-5; marca Carlo Erba Reagents). Foram realizados cinco testes de toxicidade aguda para cada um dos metais, utilizando a mesma metodologia dos testes de sensibilidade descrita no **capítulo 1**. As concentrações testadas foram estabelecidas de acordo com testes preliminares e os resultados foram expressos em CL₅₀-48h (ABNT, 2004), com um intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o programa estatístico PriProbit 1.63.

Os testes tiveram duração de 48 horas e os valores de CL_{50} encontrados foram calculados separadamente em cada um dos testes. Os organismos foram expostos a seis concentrações e um controle (Tabela 1) em quatro réplicas, em recipientes com 10 ml da solução-teste e cinco ostrácodes em cada réplica. Os testes foram mantidos em temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, no escuro e sem alimentação. A cada 24 horas foram medidas as variáveis pH, condutividade elétrica e temperatura das soluções-teste.

Tabela 1 - Concentrações empregadas para cada metal nos testes agudos (mg/l).

CuSO₄	CdCl₂	MnSO₄	HgCl₂
0,3	0,005	40	0,01
0,4	0,01	42	0,25
0,5	0,05	44	0,50
0,6	0,10	46	1,0
0,7	0,15	48	2,0
0,8	0,20	50	4,0

2.3. Testes crônicos

Os testes de exposição prolongada foram realizados para Ostrácodes *Chlamydoteca sp.* com base na metodologia dos testes de toxicidade aguda. Nos testes foram utilizados os mesmos compostos químicos apresentados anteriormente (CuSO₄; CdCl₂; MnSO₄; HgCl₂). No total foram realizados quatro testes de exposição prolongada, sendo um teste para cada elemento. As concentrações testadas foram estabelecidas a partir dos resultados dos testes de toxicidade aguda (CL_{50-48h}), calculadas com o programa estatístico PriProbit 1.63.

Os organismos foram expostos a seis concentrações (Tabela 2) e um controle em todos os testes. As unidades experimentais consistiram em três réplicas, realizadas em pequenos recipientes plásticos contendo 20 ml da solução teste e quatro Ostrácodes (tamanho $\cong 3,93 \text{ mm} \pm 0,33 \text{ mm}$) para cada réplica (Figura 14). Os testes tiveram duração total de nove dias, foram mantidos sob a temperatura controlada de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, no escuro, com alimentação (microalga *Chlorella sorokiniana*) e troca de solução a cada 48 horas. As características físicas e químicas da água de tratamento (pH, dureza, condutividade, temperatura) foram medidas a cada três dias, em todos os experimentos.

Tabela 2 - Concentrações empregadas para cada metal nos testes crônicos (mg/L).

CuSO₄	CdCl₂	MnSO₄	HgCl₂
0,004	0,001	6,39	0,009
0,034	0,0025	12,76	0,018
0,064	0,004	19,13	0,027
0,094	0,0055	25,5	0,036
0,12	0,008	31,87	0,045
0,14	0,01	38,24	0,054

Figura 14 - Aspecto geral dos testes de exposição realizados com os metais Cu, Cd, Hg e Mn (Foto: Priscila S. Sepúlveda, 2017).

2.4. Preparação das amostras para análise de espectroscopia FTIR

O mesmo método de preparação de amostras descrito no **capítulo 1** foi utilizado para as análises espectroscópicas deste capítulo. Com a finalização dos testes de exposição prolongada, os organismos sobreviventes foram coletados, lavados com água destilada, secos por técnica “blot dry” e congelados a temperatura de -20 °C. Para as análises de FTIR, todos os organismos congelados anteriormente, tiveram que ser liofilizados (liofilizador Liotop, modelo L202), por um período de 12 horas. Após serem liofilizados, os organismos foram separados individualmente, pesados em balança analítica e identificados para as análises espectroscópicas.

Cada amostra liofilizada foi colocada em um almofariz de ágata limpo e com um pistilo de ágata a amostra foi triturada firmemente até que fosse reduzida a um pó fino. Após serem trituradas, 1 mg do pó resultante de cada amostra foi misturado com 100 mg de KBr seco (proporção 1:100 mg). Rapidamente a mistura foi despejada em um molde de aço inoxidável montado. Em seguida o mesmo foi colocado na prensa hidráulica à uma pressão de 8 tons por 3-4 minutos, produzindo assim as pastilhas transparentes de KBr com amostra (13 mm de diâmetro e 1 mm). Cada amostra (com um organismo), deu origem a uma pastilha.

2.5. Análise de espectroscopia FTIR

Todas as análises espectroscópicas foram realizadas no espectrofotômetro FTIR (Shimadzu IRAffinity-1S). Cada espectro resultou de 32 scans a uma resolução espectral de 4 cm^{-1} . Os espectros cobriam um intervalo de número de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} . Foram submetidas três amostras para cada tratamento e assim três espectros de absorbância foram obtidos com três pastilhas diferentes. Medições de fundo foram feitas com pastilhas de KBr puro, nas mesmas condições das amostras e subtraídas automaticamente dos espectros das amostras. Para a medição, cada pastilha de KBr foi acondicionada sobre uma lâmina com ímãs e posicionada na direção do sensor do equipamento. A mensuração da absorbância foi realizada após o comando feito pelo software IR solution, no computador conectado ao equipamento. O perfil de infravermelho gerado foi corrigido para o perfil brando do sensor limpo sem amostra.

2.6. Análise de dados

Os espectros gerados pelo FTIR foram processados e uma correção de linha de base foi aplicada em cada um dos espectros. Através do processo de *binning* a normalização para banda de Amida I e a redução dos ruídos dos espectros foram realizadas, resultando em espectros de absorbância relativa a Amida I. Os picos mais significativos foram visualmente identificados, e seu valor de absorbância relativa extraído. Esses valores foram então utilizados em todas as análises estatísticas subsequentes. Um índice de condição (razão entre ácidos graxos e proteína) foi calculado com base na razão entre a absorbância relativa da banda olefinica ($\sim 3009 \text{ cm}^{-1}$ - teor de ácidos graxos insaturados) e bandas CH_2 ($\sim 2925 \text{ cm}^{-1}$ assimétrica e $\sim 2855 \text{ cm}^{-1}$ simétrico – teor de ácidos graxos saturados) para a banda Amida I ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ – teor de proteína).

A relação entre concentração de exposição e absorbância relativa foi avaliada para os índices de condição e para todos os picos relevantes. Os valores de absorbância foram

inicialmente transformados utilizando a raiz quadrada e depois foram comparados utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Após encontradas diferenças consistentes nos valores de absorvência, foram realizadas comparações por pares utilizando o teste de Conover Iman, sem o ajustamento e com o ajustamento dos valores de p feito através do método FDR (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

Análises não paramétricas foram feitas usando o pacote conover test em R. A similaridade entre espectros foi avaliada por meio de escalonamento multidimensional não-métrico (MDS) baseado no índice de similaridade de Bray-Curtis, calculado a partir de valores de absorvência transformados em raiz quadrada. A análise de similaridade (ANOSIM) também foi utilizada para testar a significância entre as concentrações das amostras, com fator agrupado por amostras para a concentração dos elementos. O valor de R da análise ANOSIM foi usado para avaliar a magnitude da separação entre grupos: $R > 0,75$ claramente separados, $0,75 > R > 0,25$ grupos separados com alguma sobreposição e $R < 0,25$ com sobreposição ou grupos pouco separados (CLARKE; GORLEY, 2006). Todos os espectros de FTIR foram processados no pacote ChemoSpec e todas as análises estatísticas foram feitas em R.

3. RESULTADOS

As análises dos espectros gerados pelo FTIR revelaram doze principais picos de absorbância relativa. Esses picos foram detectados nas bandas: ~ 710 , ~ 880 , ~ 1081 , ~ 1243 , ~ 1412 ~ 1544 , ~ 1798 , ~ 2516 , ~ 2871 , ~ 2932 , ~ 2963 , ~ 3426 cm^{-1} dos perfis de organismos expostos ao Cu, Cd, Hg e Mn. As mudanças nas intensidades dos picos de absorbância foram observadas nas mesmas regiões em todos os espectros analisados (Figuras 15, 16, 17 e 18). Os picos na região de (1300 - 900 cm^{-1}) são associados aos ácidos nucleicos, os picos na região de (1500 - 1700 cm^{-1}) são normalmente atribuídos à amida I e II de proteínas e os picos na região (3600 - 2800 cm^{-1}) são associados aos lipídios (PALANIAPPAN; PRAMOD, 2010) e os picos nas regiões das bandas ~ 712 , ~ 875 , ~ 1793 , ~ 2516 são associadas ao carbonato de cálcio (REIG; ADELANTADO; MOYA MORENO, 2002; NASRAZADAN et al., 2010)

O gráfico de escalonamento multidimensional não-métrico (similaridade de Bray-Curtis), demonstra uma separação consistente entre os espectros dos organismos expostos as diferentes concentrações do elemento Cobre, e os espectros dos organismos do controle. Observa-se uma distância considerável entre os espectros do controle e os de menor concentração (0,004 mg/L) e o agrupamento dos demais espectros de concentrações mais elevadas. No gráfico nMDS do elemento Cádmio também se observa uma clara separação entre os espectros dos organismos controle e os espectros dos organismos expostos as diferentes concentrações de Cd. Os espectros das concentrações mais elevadas encontram-se agrupados e a maior distância observada foi entre o controle e os espectros de menor concentração (0,001 mg/L). Os resultados do nMDS dos elementos Mercúrio e Manganês não demonstraram um claro padrão de separação entre os espectros das concentrações e dos controles (Figura 19).

Figura 15 - Espectro gerado pelo FTIR a partir de ostrácodes expostos durante nove dias a diferentes concentrações de sulfato de cobre (CuSO_4) e controle.

Figura 16 - Espectro gerado pelo FTIR a partir de ostrácodes expostos durante nove dias a diferentes concentrações de cloreto de cádmio (CdCl_2) e controle.

Figura 17 - Espectro gerado pelo FTIR a partir de ostrácodes expostos durante nove dias a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (HgCl₂) e controle.

Figura 18 - Espectro gerado pelo FTIR a partir de ostrácodes expostos durante nove dias a diferentes concentrações de sulfato de manganês (MnSO_4) e controle.

Figura 19 - Escalonamento multidimensional não métrico (similaridade de Bray-Curtis) calculado a partir de doze picos dos espectros gerados pelo FTIR para ostrácodes expostos por nove dias a diferentes concentrações dos metais cobre, cádmio, mercúrio e manganês e o controle.

Adicionalmente, os resultados das análises de similaridade ANOSIM também revelaram a separação entre os grupos de organismos expostos as diferentes concentrações de Cobre e os grupos dos organismos dos controles (Tabela 3). Os grupos expostos as concentrações 0,034; 0,064; 0,094 e 0,12 mg/L de Cobre tiveram uma clara separação dos grupos dos controles ($R > 0,75$). Os grupos de menor concentração (0,004 mg/L) e de maior concentração (0,14 mg/L) tiveram uma separação consistente, porém com alguma sobreposição ($0,75 > R > 0,25$). Observou-se também uma separação clara entre os grupos das concentrações 0,034; 0,064; 0,094, 0,14 mg/L e os grupos de menor concentração 0,004 mg/L ($R > 0,75$).

As análises de similaridade ANOSIM dos organismos expostos ao elemento Cádmio revelaram que as separações mais distintas ocorreram entre os grupos de organismos expostos às concentrações 0,0025; 0,0055 e 0,01 mg/L e o grupos de organismos expostos a menor concentração (0,001mg/L) ($R > 0,75$). Nos grupos expostos às concentrações 0,004; 0,008 mg/L foi observada uma separação com sobreposição, dos grupos de concentração 0,001 mg/L ($0,75 > R > 0,25$). Separações com sobreposição foram também observadas entre os grupos de concentrações 0,004; 0,0055 e 0,01 mg/L e os grupos de controles e entre os grupos de maior concentração (0,01mg/L) e os grupos de concentração 0,008 mg/L (Tabela 4).

Os resultados das análises de similaridade ANOSIM não revelaram separações claras ($R > 0,75$) entre os grupos dos organismos expostos ao elemento Mercúrio. Entretanto foram observadas separações com sobreposição entre grupos de concentrações 0,018; 0,045 e 0,054 mg/L e os grupos de concentração 0,027 mg/L de Hg (Tabela 5). As análises também não demonstraram separações distintas entre os grupos dos organismos expostos ao Manganês, mas foram observadas separações com sobreposição entre grupos de concentrações 12,76 e 19,13 mg/L e os grupos de maior concentração (38,24 mg/L) de Mn (Tabela 6).

Tabela 3 - Resultados da análise one-way ANOSIM para fator concentração-amostra. Elemento Cobre. Sig%: nível de significância em porcentagem.

Elemento Cobre					
Grupo A	Grupo B	Estatística R	Sig %	Permutações	Número >=
0.000	0.004	<u>0.722</u>	2.9	35	1
0.000	0.034	0.907	2.9	35	1
0.000	0.064	0.759	2.9	35	1
0.000	0.094	0.833	2.9	35	1
0.000	0.12	0.875	2.9	35	1
0.000	0.14	<u>0.741</u>	2.9	35	1
0.004	0.034	0.889	10	10	1
0.004	0.064	0.815	10	10	1
0.004	0.094	1	10	10	1
0.004	0.12	0.296	11.4	35	4
0.004	0.14	0.852	10	10	1
0.034	0.064	-0.074	60	10	6
0.034	0.094	-0.333	90	10	9
0.034	0.12	0.185	20	35	7
0.034	0.14	0.185	20	10	2
0.064	0.094	-0.148	90	10	9
0.064	0.12	0.148	22.9	35	8
0.064	0.14	-0.074	70	10	7
0.094	0.12	0.241	14.3	35	5
0.094	0.14	-0.037	60	10	6
0.12	0.14	0.111	40	35	14

Tabela 4 - Resultados da análise one-way ANOSIM para fator concentração-amostra. Elemento Cádmio. Sig%: nível de significância em porcentagem.

Elemento Cádmio					
Grupo A	Grupo B	Estatística R	Sig %	Permutações	Número >=
0.001	0.0025	0.963	10	10	1
0.001	0.004	<u>0.37</u>	20	10	2
0.001	0.0055	0.926	10	10	1
0.001	0.008	<u>0.519</u>	20	10	2
0.001	0.01	0.963	2.9	35	1
0.001	0	0.833	2.9	35	1
0.0025	0.004	0.037	40	10	4
0.0025	0.0055	0.037	40	10	4
0.0025	0.008	0.111	30	10	3
0.0025	0.01	-0.111	68.6	35	24
0.0025	0	0.185	22.9	35	8
0.004	0.0055	-0.111	90	10	9
0.004	0.008	-0.259	90	10	9
0.004	0.01	0.13	22.9	35	8
0.004	0	<u>0.333</u>	8.6	35	3
0.0055	0.008	0.148	40	10	4
0.0055	0.01	0	45.7	35	16
0.0055	0	<u>0.315</u>	11.4	35	4
0.008	0.01	<u>0.426</u>	5.7	35	2
0.008	0	0.222	22.9	35	8
0.01	0	<u>0.281</u>	11.4	35	4

Tabela 5 - Resultados da análise one-way ANOSIM para fator concentração-amostra. Elemento Mercúrio. Sig%: nível de significância em porcentagem

Elemento Mercúrio					
Grupo A	Grupo B	Estatística R	Sig %	Permutações	Número >=
0	0.009	-0.204	85.7	35	30
0	0.018	-0.056	62.9	35	22
0	0.027	0.204	22.9	35	8
0	0.036	-0.074	65.7	35	23
0	0.045	-0.214	80	15	12
0	0.054	0.093	31.4	35	11
0.009	0.018	-0.185	80	10	8
0.009	0.027	0.222	30	10	3
0.009	0.036	-0.148	80	10	8
0.009	0.045	-0.5	100	10	10
0.009	0.054	-0.037	50	10	5
0.018	0.027	<u>0.444</u>	10	10	1
0.018	0.036	-0.037	70	10	7
0.018	0.045	-0.083	60	10	6
0.018	0.054	0.148	30	10	3
0.027	0.036	0.222	20	10	2
0.027	0.045	<u>0.25</u>	20	10	2
0.027	0.054	<u>0.259</u>	20	10	2
0.036	0.045	-0.417	100	10	10
0.036	0.054	-0.074	80	10	8
0.045	0.054	-0.25	70	10	7

Tabela 6 - Resultados da análise one-way ANOSIM para fator concentração-amostra. Elemento Manganês. Sig%: nível de significância em porcentagem.

Elemento Manganês					
Grupo A	Grupo B	Estatística R	Sig %	Permutações	Número >=
0	12.76	-0.019	62.9	35	22
0	19.13	0.241	14.3	35	5
0	25.5	0.056	31.4	35	11
0	31.87	-0.222	85.7	35	30
0	38.24	-0.278	100	35	35
0	6.39	-0.019	60	35	21
12.76	19.13	0.037	40	10	4
12.76	25.5	-0.296	90	10	9
12.76	31.87	-0.259	90	10	9
12.76	38.24	<u>0.407</u>	20	10	2
12.76	6.39	0.074	30	10	3
19.13	25.5	0.074	40	10	4
19.13	31.87	0.222	30	10	3
19.13	38.24	<u>0.481</u>	20	10	2
19.13	6.39	0.037	40	10	4
25.5	31.87	-0.037	60	10	6
25.5	38.24	0.185	20	10	2
25.5	6.39	0	40	10	4
31.87	38.24	-0.148	60	10	6
31.87	6.39	0	50	10	5
38.24	6.39	0	50	10	5

Os resultados das análises estatísticas (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Conover Iman) revelaram as diferenças significativas entre grupos de concentração de exposição e absorvância relativa para os picos (~ 710 , ~ 880 , ~ 1081 , ~ 1243 , ~ 1412 ~ 1544 , ~ 1798 , ~ 2516 , ~ 2871 , ~ 2932 , ~ 2963 , ~ 3426 cm^{-1}) presentes nos espectros de ostrácodes expostos à diferentes concentrações de Cu, Cd, Hg, Mn e nos espectros controles.

Nos espectros de organismos expostos ao elemento cobre as diferenças significativas foram observadas entre as seguintes concentrações de exposição e os controles: banda ~ 710 , ~ 2516 e 2871 (0,034; 0,064, 0,094; 0,12 e 0,14 mg/L); banda ~ 880 e 1412 (0,004; 0,034; 0,064, 0,094; 0,12 mg/L); banda ~ 1081 todas as concentrações; banda ~ 1243 (0,004; 0,034; 0,094; 0,12 e 0,14 mg/L); banda ~ 1544 e 3426 (0,004 mg/L); banda ~ 1798 (0,004; 0,12 e 0,14 mg/L). Nas bandas ~ 2932 e 2963 as diferenças significativas foram observadas entre a menor concentração e todas as outras concentrações analisadas, exceto o controle (Figura 20).

Nos espectros de organismos expostos ao elemento Cádmio as diferenças significativas foram observadas entre as seguintes concentrações de exposição e os controles: banda ~ 710 (0,001 mg/L); bandas ~ 880 e 1412 (0,001; 0,0025 e 0,004 mg/L); banda ~ 2516 (0,001; 0,0025; 0,004; 0,0055 e 0,008 mg/L); banda ~ 2871 (0,001; 0,0025; 0,008 e 0,01 mg/L); bandas ~ 2932 e 2963 (0,001; 0,004; 0,0055 e 0,008 mg/L). Na banda ~ 1544 as diferenças significativas foram observadas entre a menor concentração e todas as outras concentrações analisadas, exceto o controle (Figura 21). Nos espectros de organismos expostos ao elemento Mercúrio as diferenças significativas foram observadas entre a menor concentração de exposição e os controles nas bandas ~ 1544 e 3426 (Figura 22). Nos espectros de organismos expostos ao elemento Manganês as diferenças significativas foram observadas entre as seguintes concentrações de exposição e os controles: bandas ~ 1081 e 1243 (12,76 mg/L) e banda ~ 3426 (6,39; 12,76; 19,13 e 25,5 mg/L) (Figura 21).

Figura 20 - Absorbância relativa (absorbância normalizada para amida I) de doze picos presentes nos espectros de ostrácodes expostos por 9 dias a diferentes concentrações de sulfato de cobre (0,004; 0,034; 0,064; 0,094; 0,12; 0,14 mg/L) e controle. As letras representam a diferença significativa entre os grupos (Teste de Conover).

Figura 21 - Absorbância relativa (absorbância normalizada para amida I) de doze picos presentes nos espectros de ostrácodes expostos por 9 dias a diferentes concentrações de cloreto de cádmio (0,001; 0,0025; 0,004; 0,0055; 0,008; 0,01 mg/L) e controle. As letras representam a diferença significativa entre os grupos (Teste de Conover).

Figura 22 - Absorbância relativa (absorbância normalizada para amida I) de doze picos presentes nos espectros de ostrácodes expostos por 9 dias a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (0,009; 0,018; 0,027; 0,036; 0,045; 0,054 mg/L) e controle. As letras representam a diferença significativa entre os grupos (Teste de Conover).

Figura 23 - Absorbância relativa (absorbância normalizada para amida I) de doze picos presentes nos espectros de ostrácodes expostos por 9 dias a diferentes concentrações de sulfato de manganês (6,39; 12,76; 19,13; 25,5; 31,87; 38,24 mg/L) e controle. As letras representam a diferença significativa entre os grupos (Teste de Conover).

Os resultados dos índices de condição demonstraram que os organismos expostos ao Cádmio apresentaram uma menor razão entre a absorbância relativa da banda olefinica ($\sim 3009\text{ cm}^{-1}$ - ácidos graxos insaturados) e das bandas CH_2 ($\sim 2925\text{ cm}^{-1}$ assimétrica e $\sim 2855\text{ cm}^{-1}$ simétrica - ácidos graxos saturados) para a banda Amida I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ - proteína) quando comparados aos controles. Foi observada uma diferença significativa na proporção de ácidos graxos saturados para proteína entre as concentrações de exposição (0,001; 0,0025; 0,004; 0,0055; 0,008 mg/L) e o controle na banda $\sim 2855\text{ cm}^{-1}$, e entre as mesmas concentrações (exceto 0,0025mg/l) e o controle na banda $\sim 2925\text{ cm}^{-1}$. Houve também uma diferença significativa na proporção de ácidos graxos insaturados ($\sim 3009\text{ cm}^{-1}$) para proteína entre as concentrações (0,001; 0,004; 0,008 mg/L) e o controle.

Nos organismos expostos ao elemento Cobre, foi observada uma diferença significativa na proporção de ácidos graxos saturados para proteína entre as concentrações de exposição (0,064; 0,094 e 0,12 mg/L) e o controle, na banda CH_2 ($\sim 2855\text{ cm}^{-1}$) (Figure 24). As análises estatísticas não revelaram diferenças significativas na razão de ácidos graxos e proteína entre organismos expostos a diferentes concentrações de Mercúrio e de Manganês e os organismos controles.

Figura 24 - Relação entre condição individual e exposição de ostrácodes aos elementos cobre, cádmio, mercúrio e manganês. Os índices de condição (eixo das ordenadas) são a razão entre os valores de absorvância relativa (absorvância normalizada para Amida I) para a banda olefinica ($\sim 3009 \text{ cm}^{-1}$ - teor de ácidos graxos insaturados) e bandas CH_2 ($\sim 2925 \text{ cm}^{-1}$ assimétrica e $\sim 2855 \text{ cm}^{-1}$ simétrica – teor de ácidos graxos saturados) para a banda Amida I ($\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ teor de proteína). As letras apresentadas na figura indicam os grupos com diferença significativa (Teste de Conover).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo os ostrácodes *Chlamydoteca sp.* foram investigados por espectroscopia de FTIR após serem expostos aos elementos-traço Cu, Cd, Hg e Mn. De uma forma geral, os resultados mostraram que as diferenças entre os grupos de concentração de exposição e os grupos controles foram mais significativas para os Ostrácodes expostos aos elementos Cobre e Cádmio do que para os organismos expostos ao Mercúrio e ao Manganês. Muitos estudos já demonstraram que o Cu e Cd estão entre os elementos-traço mais tóxicos para espécies aquáticas. Por exemplo, observaram que em concentrações crescentes de Cu e maior acidez das águas, a mortalidade nas populações da espécie de Ostracoda *Cypris subglobosa* aumentava consideravelmente. Resultados similares foram reportados por Shuhaimi-Othman et al. (2011) e entre oito metais estudados (Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Fe, Al, e Mn), o Cu foi o mais tóxico para a espécie de Ostracoda *Stenocypris major*, seguido pelo Cd. Neste mesmo estudo o fator de bioconcentração entre metais também foi analisado e os elementos Cu e o Cd foram os mais acumulados nestes organismos. Igualmente, estudos realizados com o crustáceo anfípode de água doce *Hyalella azteca*, revelaram que o Cd teve o maior fator de bioconcentração, seguido por Cu and Zn (SHUHAIMI-OTHMAN; PASCOE, 2007).

As alterações observadas na composição macromolecular de ostrácodes podem indicar alterações fisiológicas causadas pelo estresse, induzido pela exposição prolongada destes organismos aos elementos Cu e Cd. Neste estudo, as diferenças significativas entre organismos expostos aos contaminantes e os organismos controles estão em sua grande parte associadas ao conteúdo de lipídios e ácidos nucleicos, o que é uma resposta característica de organismos que estão sob estresse fisiológico. De acordo com os resultados obtidos, a razão entre a absorbância relativa da banda olefinica $\sim 3009\text{ cm}^{-1}$ (alongamento CH de grupos HC=CH) para a banda Amida I $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ (alongamento C=O de proteína) foi menor em organismos expostos ao Cádmio em relação aos indivíduos dos controles. O mesmo foi observado na razão entre absorbância relativa das bandas ~ 2855 (alongamento simétrico de CH₂) e ~ 2925 (alongamento assimétrico de CH₂) para a banda Amida I. O que sugere que o conteúdo de lipídios saturados e insaturados, em relação à proteína, foi reduzida nos organismos expostos ao Cd.

Ainda em relação ao conteúdo lipídico, observou-se também a diminuição na absorbância relativa das bandas associadas aos lipídios (~ 2871 , ~ 2932 e ~ 2963) em organismos expostos ao elemento Cd. Alguns lipídios e as proteínas amida I estão associadas principalmente à membrana celular e as alterações espectrais observadas nessas regiões podem estar relacionadas a rupturas na estrutura e integridade da membrana, o que indicaria uma

peroxidação lipídica (RIDING et al., 2012; SEVERCAN, 2003). Em seu estudo Strong et al. (2016) relataram que células epiteliais de rim do anfíbio *Xenopus laevis* expostas ao fungicida Carbendazim, também exibiram alterações nas regiões associadas aos lipídios o que pode indicar um efeito significativo nas membranas celulares, incluindo a bicamada fosfolipídica. Segundo os autores, os efeitos nas membranas celulares, determinado por alterações nas regiões lipídica e proteica do espectro de infravermelho, provavelmente foram resultado da peroxidação lipídica. Resultados similares foram observados em estudos com cladocera (BEZIRCI et al., 2012) e peixes (PALANIAPPAN; PRAMOD, 2010). Sendo assim, a diminuição na proporção de lipídios para proteína observada nos ostrácodes expostos ao Cd podem ter sido resultado do uso de reservas lipídicas para energia ou peroxidação lipídica devido ao estresse fisiológico.

Outra observação interessante foi o aumento das absorbâncias relativas nas bandas associadas aos ácidos nucleicos (~ 1081 e ~1243) nos espectros de organismos expostos ao elemento Cobre quando comparados aos espectros dos controles. Esta alteração pode estar relacionada ao aumento considerável do conteúdo total de RNA e/ou de DNA celular. Considerando que os espectros dos organismos expostos ao Cu não revelaram alterações significativas nas bandas associadas à proteínas, e que supostamente a capacidade de produção de proteína desses organismos não foi afetada, o DNA pode ter sido o componente dominante nas bandas de ácidos nucleicos observadas nos espectros. Este resultado é consistente com o de Çakmak et al. (2003) que relatam um aumento no conteúdo relativo dos ácidos nucleicos, especialmente DNA, nos tecidos de fígado da Truta-Arco-Íris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados com Nonilfenóis. De acordo com os resultados observados o aumento de DNA pode ser explicado pelas diferenças na morfologia, organização e arquitetura nuclear entre as células dos organismos expostos aos tratamentos e as células dos organismos controles.

Alterações macromoleculares significantes foram observadas também nas regiões das bandas ~ 710, ~ 880, ~1798 e ~ 2516 cm⁻¹ de organismos expostos ao Cd e ao Cu. Estas bandas são normalmente usadas para examinar o conteúdo de carbonato de cálcio presentes em diferentes amostras de materiais, entretanto elas ainda não são amplamente conhecidas em estudos com amostras biológicas (REIG et al., 2002; SEIFOLLAH et al., 2010). Os ostrácodes são microcrustáceos caracterizados por uma carapaça protetora dorsal, bivalve composta de quitina e fortemente impregnada com carbonato de cálcio (RESH, 2009). Sendo assim, alterações relacionadas ao conteúdo de carbonato de cálcio podem representar mudanças associadas a composição das carapaças dos organismos expostos ao Cd e Cu. De modo geral, estudos relacionados a alterações em carapaças de crustáceos englobam apenas as concentrações dos elementos bioacumulados nos organismos, como por exemplo, os estudos

de Soegianto et al. (1999), que reporta o aumento significativo (168 %) da concentração de Cu nas carapaças de camarões *Penaeus japonicus* em relação aos controles e o de Qoraychy et al. (2015) que mostra que a concentração de Cobre é maior na carapaça do que no corpo do lagostim *Procambarus clarkia*. O conteúdo de carbonato de cálcio de carapaças raramente é mensurado em estudos de exposição e, portanto, pouco se sabe sobre os impactos da exposição ao Cd e Cu sobre o conteúdo de carbonato de cálcio de organismos.

Uma vez que em crustáceos as carapaças estão relacionadas com o processo de muda e crescimento, estudos que visam entender melhor os efeitos de contaminantes nos conteúdos de carbonato de cálcio, são extremamente necessários. Por exemplo, o estudo de Moreno et al. (2003), demonstra que os caranguejos *Chasmagnathus granulata* expostos ao Cd sofrem uma inibição do processo de muda. Segundo os autores, os organismos expostos ao Cd não apresentaram diferença significativa no conteúdo de cálcio da carapaça em relação aos controles, mas a inibição foi relacionada ao controle hormonal do processo de muda. Diferentemente, os resultados do presente estudo revelaram um aumento do carbonato de cálcio em organismos expostos ao Cu e uma diminuição do carbonato de cálcio em organismos expostos ao Cd, quando comparados aos controles. Assim, as alterações nas bandas de carbonato de cálcio podem representar mudanças na composição da carapaça de organismos expostos ao Cu e Cd, porém estudos adicionais são necessários para avaliar se essas bandas podem indicar alterações na capacidade de muda e crescimento destes organismos.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a exposição prolongada dos ostrácodes *Chlamydoteca sp.* a doses subletais de Cu e Cd induziu alterações significativas na composição macromolecular destes organismos. Foram observadas mudanças consistentes no conteúdo bioquímico como a diminuição de lípidios em relação à proteína nos ostrácodes expostos ao Cd e o aumento dos ácidos nucléicos nos organismos expostos ao Cu. Além disso, foi encontrado pela primeira vez alterações significativas no conteúdo relativo ao carbonato de cálcio nos espectros de ostrácodes expostos ao Cu e ao Cd. Portanto, este estudo mostra que a espectroscopia de FTIR é um instrumento capaz de detectar indícios de efeitos subletais em organismos expostos a diferentes tipos de contaminantes e mostra também que as alterações de composição macromolecular podem ser uma ferramenta complementar muito promissora em avaliações ecotoxicológicas.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Através dos resultados do presente trabalho pode-se concluir que a espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier é uma metodologia válida para análises ecotoxicológicas. O FTIR pode ser utilizado diretamente em bioensaios, como observado neste estudo, ou como metodologia preliminar ou complementar em análises que investigam mecanismos de respostas de organismos expostos a substâncias tóxicas e/ou condições de estresse. A espectroscopia FTIR oferece a vantagem de ser um procedimento rápido, não destrutivo e reproduzível. Além disso, as alterações de perfis de composição macromolecular podem detectar o estresse causado pela exposição do organismo ao contaminante, tornando possível o desenvolvimento de um novo *endpoint* quantificável para avaliação de efeitos subletais em testes laboratoriais de longo e curto prazo.

Os resultados demonstrados indicam que os ostrácodes *Chlamydoteca sp.* foram adversamente afetados na exposição de curto prazo ao Mn, com uma correlação negativa entre concentração de exposição e a proporção de ácidos graxos insaturados e saturados para proteína e o conteúdo de ácidos nucleicos em organismos expostos a esse elemento. Na exposição prolongada foram observadas a diminuição no conteúdo de lipídios saturados e insaturados em relação à proteína e no conteúdo relativo ao carbonato de cálcio nos ostrácodes expostos ao Cd. Adicionalmente, foram observados o aumento de conteúdo de ácidos nucleicos e carbonato de cálcio em organismos expostos ao Cu.

Todas essas alterações na proporção lipídio/proteína, peroxidação lipídica, ácidos nucleicos e conteúdo de carbonato de cálcio foram interpretadas como respostas indicativas de estado não homeostático que antecedem as respostas tóxicas observáveis nos organismos. Sendo assim, este estudo revela apenas indícios de alterações metabólicas causados pela exposição do organismo ao contaminante e pesquisas adicionais são necessárias para demonstrar os reais efeitos nos processos metabólicos. Portanto, futuros estudos bioquímicos que sejam mais aprofundados, juntamente com análises de bioconcentração de metais nos organismos e estudos comportamentais, são indispensáveis para verificar se as “impressões digitais do estresse” aqui identificadas, são compatíveis ou não com os efeitos observáveis nos testes laboratoriais.

REFERÊNCIAS

- ANADÓN, P.; GLIOZZI, E.; MAZZINI, I. Paleoenvironmental reconstruction of marginal marine environments from combined paleoecological and geochemical analyses on ostracods. **Geophysical Monograph Series**, v. 131, p. 227–247, 2002.
- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS- ABNT- NBR 15088. **Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. São Paulo: ABNT, 2004.
- AHSANULLAH, M.; YING, W. Toxic effects of dissolved copper on *Penaeus merguensis* and *Penaeus monodon*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.55, p.81-88, 1995.
- AKKAS, S.B., SEVERCAN, F. Diagnosis and Screening of Aquatic Environments by Vibrational Spectroscopy, in: Feride Severcan, P. I. Harris (Eds.), **Vibrational Spectroscopy in Diagnosis and Screening**. IOS Press, pp. 321–349, 2012.
- ALEXANDRE, G.A.L. & SZIKSZAY, M. O Comportamento Geoquímico do As, Cu, Pb e Zn em Solos com Culturas de Uvas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 1999.
- AMARAL, A. de M.; BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J.C.; BARROS, L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**. v. 20, n.1 e 2, p. 65-72, 2007.
- AMI, D.; MEREGHETTI, P.; NATALELLO, A.; DOGLIA, S.M.; ZANONI, M.; REDI, C.A.; MONTI, M. FTIR spectral signatures of mouse antral oocytes: molecular markers of oocyte maturation and developmental competence. **Biochim. Biophys. Acta**, 1813, pp. 1220–1229, 2011.
- ANGELO, R. T. et al. Residual effects of lead and zinc mining on freshwater mussels in the Spring River Basin (Kansas, Missouri, and Oklahoma, USA). **Science of the Total Environment**, v. 384, n. 1–3, p. 467–496, 2007.
- ATSDR. Toxicological Profile for Manganese (Final). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, Atlanta, GA, 2000.
- BAĞCIOĞLU, M. et al. Monitoring of plant–environment interactions by high-throughput FTIR spectroscopy of pollen. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 8, n. 7, p. 870–880, 2017.
- BAKER, M.J. et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature Protocols**. Vol.9 n.8, 2014.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society B**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.
- BERGUE, C. T. A aplicação dos ostrácodes (Crustacea) em pesquisas paleoceanográficas e paleoclimáticas. **Terrae Didactica**, v. 2, n. 1, p. 54–66, 2006.
- BEZIRCI, G.; AKKAS, S.B.; RINKE, K.; YILDIRIM, F.; KALAYLIOĞLU, Z.; SEVERCAN, F.; BEKLIOĞLU, M. Impacts of salinity and fish-exuded kairomone on the survival and

macromolecular profile of *Daphnia pulex*. **Ecotoxicology**. 21:601–614, 2012.

BROOKS, S. J.; MILLS, C. L. The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 135, n. 4, p. 527–537, 2003.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, p. 465 – 473, 2003.

CARNIATO, J.G.; GERALDO, S. M.; *et al.* Avaliação da Toxicidade de Percolado de Resíduos Sólidos Pós Tratamento Biológico e Fotocatalítico. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**. v. 4, n. 2, p. 92-101, 2007

CHIAL, B.; PERSOONE, G. Cyst-based toxicity tests XV - Application of ostracod solid-phase microbiotest for toxicity monitoring of contaminated soils. **Environmental Toxicology**, v. 18, n. 5, p. 347–352, 2003.

CLARKE, K.R., GORLEY, R.N. **PRIMER V6: user manual-tutorial**. Plymouth Marine Laboratory, 2006.

ÇAKMAK, G. *et al.* FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol. **Applied Spectroscopy**, v. 57, n. 7, p. 835–841, 2003.

EISLER, R. Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Geological Survey. **Biological Science Report** USGS/BRD/BSR1997/0002, 1998.

ESTEVES, F. A. Fundamentos de limnologia. 2a Edição. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 602p. 1998.

EYSINK, G.J.; PADUA, H.B.; PIVA-BERTOLETTI, S.A.E.; MARTINS, M.C; PEREIRA, D.N. Metais pesados no Vale do Ribeira e em Iguape- Cananéia. **Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 6-13, 1988.

FILSER, J. Ecotoxicology and ecosystems: Relevance, restrictions, research needs. **Basic and Applied Ecology**. Issue 4, v.9, p.333-336, 2008.

FREITAS, C. M. D.; PORTO, M. F. S.; MOREIRA, J. C.; PIVETTA, F.; MACHADO, J. M. H.; FREITAS, N. B. B. D.; ARCURI, A. S. Segurança química, saúde e ambiente: perspectivas para a governança no contexto brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**. v.18, p.249-256, 2002.

FUNG, K.P. A computer program in BASIC for estimation of ED50 and LD50. **Computers in biology and medicine**, v19, n 2, p.131-135, 1989.

GUSMÃO, L. F. M.; MCKINNON, A. D. Nucleic acid indices of egg production in the tropical copepod *Acartia sinjiensis*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 396, n. 2, p. 122–137, 2011.

HANSON, B. A. ChemoSpec : An R Package for Chemometric Analysis of Spectroscopic Data and Chromatograms (Package version 2 . 0-2). p. 1–41, 2014.

HERKOVITS, J.; HELGUERO, L.A. Copper toxicity and copper-zinc interactions in amphibians embryos. **Sci. Total Environ.**, v.221, p.1-10, 1998.

IVANOVA, D.G; SINGH, B.R. Nondestructive FTIR monitoring of leaf senescence and elicitor-induced changes in plant leaves **Biopolymers**, 72, pp. 79–85, 2003.

KHANGAROT B.S, RAY P.K. The response to a fresh-water ostracod (*Cypris subglobosa* Sowerby) exposed to copper at different pH levels. **Acta Hydrochim Hydrobiol** 15:553–558, 1987.

KHANGAROT, B. S.; DAS, S. Acute toxicity of metals and reference toxicants to a freshwater ostracod, *Cypris subglobosa* Sowerby, 1840 and correlation to EC50 values of other test models. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2–3, p. 641–649, 2009.

LAWRENCE, A.; MASON, R. Factors controlling the bioaccumulation of mercury and methylmercury by the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. **Environmental Pollution**, v. 111, p. 217–231, 2001.

LI, Z. et al. Evaluating the function of calcium antagonist on the Cd-induced stress in sperm of Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 4, p. 373–375, 2010.

LLABJANI, V. et al. Differential Effects in Mammalian Cells Induced by Chemical Mixtures in Environmental Biota As Profiled Using Infrared Spectroscopy. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 24, p. 10706–10712, 2011.

LOTUFO, G. R. et al. Comparative toxicity and toxicokinetics of DDT and its major metabolites in freshwater amphipods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 368–379, 2000.

MOOLMAN, L.; VUREN, J. H. J. VAN; WEPENER, V. Comparative studies on the uptake and effects of cadmium and zinc on the cellular energy allocation of two freshwater gastropods. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, p. 443–450, 2007.

MORDECHAI, S.; SAHU, R.K; HAMMODY, Z. et al. Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma. **J. Microsc.** 215,86–91, 2004.

OBERREUTER, H.; SEILER, H.; SCHERER, S. Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 52, pp. 91–100, 2002.

PALANIAPPAN, P. L. R. M.; PRAMOD, K. S. FTIR study of the effect of nTiO₂ on the biochemical constituents of gill tissues of Zebrafish (*Danio rerio*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8–9, p. 2337–2343, 2010.

PASCUAL, A.; RODRIGUEZ-LAZARO, J.; WEBER, O. and JOUANNEAU, J.M. Late Holocene pollution in the Gernika estuary (southern Bay of Biscay) evidenced by the study of Foraminifera and Ostracoda. **Hydrobiologia**, 475(1), pp.477–491, 2002.

PERIN, G. **Ecotoxicologia: Integrada Quantitativa**. Joinville. SC: UNIVILLE. 356 p, 2005.

PERROMAT, A.; MELIN, A.; LORIN, C.; DELERIS, G. Fourier transform IR spectroscopic appraisal of radiation damage in *Micrococcus luteus*. **Biopolymers**, 72, pp. 207–216, 2003.

PERROT, V. et al. Tracing sources and bioaccumulation of mercury in fish of Lake Baikal--

Angara River using Hg isotopic composition. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 21, p. 8030–8037, 2010.

QORAYCHY, I. EL et al. Accumulation of Copper , Lead , Chrome , Cadmium in Some Tissues of *Procambarus clarkii* in Rharb Region in Morocco. n. October, p. 74–81, 2015.

RAGI, A. S. et al. Heavy metal concentrations in some gastropods and bivalves collected from the fishing zone of South India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 118, n. 1–2, p. 452–458, 2017.

RAND, G.M. Fundamental Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment, 2a ed, **Taylor & Francis**: USA, cap 31, 1995.

REBUFFO, C.A; SCHMITT, J. WENNING, M.; VON STETTEN, F.; SCHERER, S. Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. **Appl. Environ. Microbiol.**, 72, pp. 994–1000, 2006.

REIG, F. B.; ADELANTADO, J. V. G.; MOYA MORENO, M. C. M. FTIR quantitative analysis of calcium carbonate (calcite) and silica (quartz) mixtures using the constant ratio method. Application to geological samples. **Talanta**, v. 58, n. 4, p. 811–821, 2002.

RESH, V. H. **Encyclopedia of Insects**. Burlington, MA: Academic Press, 2009.

RIDING, M. J. et al. Concentration-dependent effects of carbon nanoparticles in gram-negative bacteria determined by infrared spectroscopy with multivariate analysis. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 226–234, 2012.

RODRÍGUEZ MORENO, P. A.; MEDESANI, D. A.; RODRÍGUEZ, E. M. Inhibition of molting by cadmium in the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda Brachyura). **Aquatic Toxicology**, v. 64, n. 2, p. 155–164, 2003.

RUBINGER, C. F. Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte/MG. 2009.

RUDÉN, C. et al. Assessing the relevance of ecotoxicological studies for regulatory decision making. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 13, n. 4, p. 652–663, 2017.

RUIZ, F. et al. Freshwater ostracods as environmental tracers. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 10, n. 5, p. 1115–1128, 2013.

NOVAK, S. et al. Effect of ingested tungsten oxide (WO_x) nanofibers on digestive gland tissue of porcellio scaber (Isopoda, Crustacea): Fourier transform infrared (FTIR) imaging. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 19, p. 11284–11292, 2013.

SALIM, H.A.M. **Infrared Spectroscopy: Analyze the functional groups of benzoic acid**. Disponível em: <<https://www.slideshare.net/HaydarKovly/infrared-spectroscopy-analyse-the-functional-groups-of-benzoic-acid>> Acesso em: 03 Dezembro 2017.

SÁNCHEZ-BAYO, F. Comparative acute toxicity of organic pollutants and reference values for crustaceans. I. Branchiopoda, Copepoda and Ostracoda. **Environmental Pollution**, v. 139, n. 3, p. 385–420, 2006.

SARKAR, B.A. Mercury in the environment: Effects on health and reproduction. **Rev Environ Health** -20:39–56, 2005.

SAUNDERS, D. L.; MEEUWIG, J. J.; VINCENT, A. C. J. Freshwater Protected Areas: Strategies for Conservation Áreas Protegidas de Agua Dulce: Estrategias para la Conservación. **Conservation Biology**, v. 16, n. 1, p. 30–41, 2002.

SEIFOLLAH N.; MIELKE D.; SPRINGFIELD T.; AND RAMASAMY N. Practical Applications of FTIR to Characterize Paving Materials. p. 0–5, 2010.

SEVERCAN, F. Fourier transform infrared spectroscopic studies of diabetic rat heart crude membranes. v. 17, p. 569–577, 2003.

SEVILLA, J. B., NAKAJIMA, F., and YAMAMOTO, K. Effect of food and light on the sensitivity of copper and zinc to freshwater benthic ostracod *Heterocypris incongruens*. **Journal of Water and Environment Technology**, 11(3), 249-261, 2013.

SHARMA, S.; UTTAM, K. N. Investigation of the manganese stress on wheat plant by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Spectroscopy Letters**, v. 49, n. 8, p. 520–528, 2016.

__SHIMADZU IRAFFINITY-1. n. April, 2012.

SHUHAIMI-OTHMAN, M.; PASCOE, D. Bioconcentration and depuration of copper, cadmium, and zinc mixtures by the freshwater amphipod *Hyaella Azteca*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 66, no. 1, pp. 29–35, 2007.

SHUHAIMI-OTHMAN, M. et al. Toxicity of metals to a freshwater ostracod: *Stenocypris major*. **Journal of Toxicology**, v. 2011, 2011.

SMITH, B. **Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy**, Second Edition, CRC PressINC, 1996.

SOEGIANITO. A.; CHARMANTIER-DAURES, M.; TRILLES J.P.; CHARMANTIER, G. Impact of cadmium on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda) **Aquat. Living Resour**, 12 pp. 57-70, 1999

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**, v.1, 8ª edição, LTC, 2005.

SOUZA, V. M. Bioindicadores animais de metais poluentes. Dissertação de Mestrado. Pontificia Universidade Católica de Goiás. Goiânia/GO. 67 p, 2010.

STRONG, R. J. et al. Infrared spectroscopy detects changes in an amphibian cell line induced by fungicides: Comparison of single and mixture effects. **Aquatic Toxicology**, v. 178, p. 8–18, 2016.

SZEGHALMI, A.; KAMINSKYJ, S.; GOUGH, K.M. A synchrotron FTIR microspectroscopy investigation of fungal hyphae grown under optimal and stressed conditions. **Anal. Bioanal. Chem.**, 387, pp. 1779–1789, 2007.

TCHOUNWOU, P.B.; AYENSU, W.K.; NINASHVILLI, N.; SUTTON, D. Environmental exposures to mercury and its toxicopathologic implications for public health. **Environ Toxicol.** - 18:149–175, 2003.

TREVISAN, J.; ANGELOV, P.P.; CARMICHAEL, P.L.; SCOTT, A.D. and MARITIN, F. L. Extracting biological information with computational analysis of Fourier transform infrared (FTIR) biospectroscopy datasets: current practices to future perspectives. The Royal Society of Chemistry. **Analyst** 137, 3202, 2012.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). Draft Proposed Revisions to the “Guidelines for Deriving Numerical National Water Quality Criteria for the Protection of Aquatic Organisms and Their Uses”. **Components**, v. 304, p. 1–5, 2005.

U.S. Geological Survey (USGS). Mineral commodity summaries 2013. U.S. Department of the Interior. U.S. **Geological Survey**. Reston, VA, 198 pp, 2013

VARDIA, H. K.; DURVE, V. S. Effect of copper , cadmium and zinc on fish-food organisms *Daphnia Jumholtzi* and *Cypris* sub. v. 97, n. 2, p. 175–180, 1988.

VERSLYCKE, T.; VANGHELUWE, M.; HEIJERICK, D.; DE SCHAMPHELAERE, K.; VAN SPRANG, P.; JANSSEN, C. R. The toxicity of metal mixtures to the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) under changing salinity. **Aquatic Toxicology**. Issue 3, v.64, p.307-315, 2003.

WENNING, M.; SEILER, H.; SCHERER, S. Fourier-transform infrared spectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68, pp. 4717–4720, 2002.

WHELAN, D.R.; BAMBERY; K.R., Puskar L.; McNAUGHTON D.; WOOD, B.R. Synchrotron Fourier transform infrared (FTIR) analysis of single living cells progressing through the cell cycle. **Analyst** 138, 3891–3899, 2013.

WILSON, D.N. Association Cadmium. Cadmium - market trends and influences; London. Cadmium 87 Proceedings of the 6th International Cadmium Conference; pp. 9–16, 1988.

YANG, J.; YEN, H.E. Early salt stress effects on the changes in chemical composition in leaves of ice plant and *Arabidopsis*. A Fourier transform infrared spectroscopy study. **Plant Physiol** 130: 1032–1042, 2002.

YEBRA, L., KOBARI, T., SASTRI, A.R., GUSMÃO, F., HERNÁNDEZ-LEÓN, S. Advances in Biochemical Indices of Zooplankton Production, in: Curry, B.E. (Ed.), *Advances in Marine Biology*. **Academic Press**, pp. 157–240, 2017.

ZEMAN, F. A. et al. Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 370–378, 2008.

ZHELYAZKOV, G. et al. Risk assessment of some heavy metals in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and veined rapa whelks (*Rapana venosa*) for human health. **Marine Pollution Bulletin**, v. 128, n. October 2017, p. 197–201, 2018.

ZOHDI, V., WHELAN, D.R., WOOD, B.R., PEARSON, J.T., BAMBERY, R., BLACK, M.J. Importance of Tissue Preparation Methods in FTIR Micro Spectroscopical Analysis of Biological Tissues: ‘Traps for New Users. **PLOS ONE**, 2015.