



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Unidade Universitária de Dourados
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

**DETERMINAÇÃO DA DIFUSIVIDADE TÉRMICA E
EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE LUMINESCÊNCIA DE
ESCAMAS DE PEIXES POR ESPECTROSCOPIA
FOTOACÚSTICA**

Victor Dengo Sabino

Dourados – MS

Abril 2019





Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Unidade Universitária de Dourados
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

**DETERMINAÇÃO DA DIFUSIVIDADE TÉRMICA E
EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE LUMINESCÊNCIA DE
ESCAMAS DE PEIXES POR ESPECTROSCOPIA
FOTOACÚSTICA**

Acadêmico: Victor Dengo Sabino

Orientador: Junior Reis Silva

“Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais”.

Dourados – MS

Abril 2019



S121d Sabino, Victor Dengo

Determinação da difusividade térmica e eficiência quântica de luminescência de escamas de peixes por espectroscopia fotoacústica/ Victor Dengo Sabino. – Dourados, MS: UEMS, 2019.

88p.

Dissertação (Mestrado) – Recursos Naturais – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Junior Reis Silva.

1. Difusividade térmica 2. Escama 3. Eficiência quântica
I. Silva, Junior Reis II. Título

CDD 23. ed. - 543

VICTOR DENGO SABINO

**DETERMINAÇÃO DA DIFUSIVIDADE TÉRMICA E
EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE LUMINESCÊNCIA DE
ESCAMAS DE PEIXES POR ESPECTROSCOPIA
FOTOACÚSTICA**

Este exemplar compreende a redação final da dissertação de mestrado defendida por Victor Dengo Sabino.

Dourados/MS, 30 de abril de 2019.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Junior Reis Silva – Presidente



Prof. Dr. Fábio Alencar dos Santos



Prof. Dr. Yzel Rondon Suárez

Dourados/MS, abril de 2019.

EPÍGRAFE

Quando uma porta se fecha outra se abre, mas nós quase sempre olhamos tanto e de maneira tão arrependida para a que se fechou, que não vemos aquelas que foram abertas para nós.

Alexander Graham Bell, 1962.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao Deus, a força, dedicação e apoio inabalável de meus pais, Maria Goreti Dengo Sabino e Nilson José Sabino e minha esposa Synailla Nayara da Silva Dengo.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos que ingressaram comigo ao mestrado e aos que vieram na turma seguinte: Tatiane Oliveira Pereira, Rita Andrade da Silva, Marcelo Vieira da Silva, Adriana do Carmo Capiotto e Sirlene Sales Nogueira.

Aos amigos do Doutorado que com grande paciência me ajudaram: Ana Paula Langaro, Simone Finoto, Cristiane Ávila Santana, Dinorah Vaz de Lima, Claudio Yamamoto Morassuti e Ana Kely Rufino Souza.

Aos amigos que durante o desenvolvimento de suas respectivas graduações estiveram presentes no dia-a-dia: Guilherme Santos Macedo, Marcos Renan de Freitas Devechi, Bruno Araújo Silva, Vitor de Lima Reis e Paula Amorim.

Às Doutoradas e amigas Maryleide Ventura da Silva e Francylaine Silva de Almeida Brito pelas correções durante essa jornada. Ao amigo Dr. Alex Pereira Rocha pelas conversas no início da caminhada.

Ao professor Dr. Luis Humberto da Cunha Andrade pelas dicas, correções, inspirações, café e amizade.

De maneira especial agradeço ao meu orientador Junior Reis Silva pela paciência e sabedoria dedicada e ao coorientador Sandro Marcio Lima pelas contribuições precisas e atentas ao bom desenvolvimento do trabalho.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais.

À CAPES pela bolsa de fomento durante o desenvolvimento do mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
CAPÍTULO 2 – INTRODUÇÃO	3
2.1 Região Hidrográfica do Paraguai	3
2.1.2 Bacia hidrográfica do Apa.....	4
2.1.3 Bacia hidrográfica do Miranda.....	5
2.2. Região Hidrográfica do Paraná	7
2.2.1 Bacia Hidrográfica do Ivinhema	8
2.3 O gênero Astyanax	9
2.4 Escamas	10
2.5 Parâmetros abióticos e bióticos	12
2.4 Espectroscopia fotoacústica.....	14
2.4.1 História e sinal acústico de Alexander Graham Bell.....	14
2.4.2 Modelo Teórico de Rosencwaig e Gersho.....	19
2.4.3 Efeito fotoacústico aplicado em sistemas biológicos	23
2.5 Luminescência e eficiência quântica	25
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Locais de coleta dos peixes	26
3.2 Coleta e preparo das escamas	27
3.3 Espectroscopia fotoacústica.....	28
3.4 Análise paisagística.	29
3.5 Extração da Hidroxiapatita e Colágeno.....	29
3.7 Espectroscopia de excitação-emissão.....	31
3.8 Espectroscopia fotoacústica de luminescência do colágeno	31
3.9 Determinação da eficiência quântica de luminescência	33

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Espectroscopia fotoacústica.....	34
4.2 Faces interna e externa das escamas.....	36
4.3 Miranda	38
4.3.1 Difusividade térmica e Análise paisagística.....	39
4.3.2 Parâmetros de qualidade de água	41
4.4 Apa	43
4.4.1 Parâmetros de qualidade de água	45
4.5 Ivinhema.....	46
4.5.1 Parâmetros de qualidade de água	48
4.6 Difusividade térmica e parâmetros ambientais.....	51
4.7 Difusividade térmica de escamas	53
4.8 Eficiência quântica da escama de <i>Astyanax lacustris</i>	54
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	59
CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS	60

RESUMO

Os ambientes naturais estão sujeitos aos impactos ambientais e podem ser avaliados por meio de parâmetros ambientais que estão alicerçados em variáveis químicas e físicas, por parâmetros que descrevem a cobertura do solo, como o Índice de Vegetação da Diferença Normalizada (NDVI) e principalmente por investigação direta de atributos das comunidades biológicas, como por exemplo, as escamas de peixes. O objetivo dessa pesquisa foi determinar a difusividade térmica de escamas de peixes da espécie *Astyanax lacustris* coletados nas bacias hidrográficas do rio Miranda, Apa e Ivinhema e posteriormente investigar se a difusividade térmica poderia ser relacionada à integridade ambiental dos riachos por meio de parâmetros ambientais. Além disso, também atendemos o objetivo de calcular a eficiência quântica da escama de *Astyanax lacustris* e de colágeno extraído de escamas de peixe da espécie *Tilapia rendalli*. Para a difusividade térmica, os dados foram obtidos por meio da técnica de espectroscopia fotoacústica considerando o modelo matemático de Rosencwaig-Gersho. Para o cálculo de eficiência quântica utilizamos o espectro do sinal fotoacústico e o sinal de luminescência da amostra de colágeno para uma faixa de excitação de 380 a 450 nm. Os resultados demonstraram não haver diferença para a difusividade térmica entre as faces interna $(1,8 \pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ e externa $(1,7 \pm 0,6) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ das escamas dos peixes. Os valores de difusividade térmica para os indivíduos da bacia hidrográfica do rio Miranda, Apa e Ivinhema foram respectivamente $(1,8 \pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$, $(3,0 \pm 1,5) \times 10^{-3}$ e $(3,7 \pm 0,4) \times 10^{-3}$. Desta maneira, adotamos que o valor calculado para a difusividade térmica de escamas de *Astyanax lacustris* é de $(2,8 \pm 0,8) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$. A bacia hidrográfica do rio Apa e Miranda apresentaram diferença para a difusividade térmica, porém os parâmetros ambientais não demonstraram diferença significativa, não podendo ser atribuída essa diferença às variáveis ambientais, mas sim às características próprias do peixe e sua escama. Para a amostra de colágeno extraído de escamas de *Tilapia rendalli* relatamos ocorrência de fluorescência para um intervalo espectral a partir de 394 nm a 490 nm para uma fonte de excitação que varia de 325 a 410 nm. O máximo de fluorescência ocorreu em duas regiões: a primeira com excitação em 350 nm e emissão em torno de 420 nm e a segunda com excitação em 380 nm e emissão em 475 nm. A eficiência quântica calculada foi de 80%.

Palavras-chave: difusividade térmica, escama, eficiência quântica, colágeno.

ABSTRACT

The natural environments are liable to environmental impacts and can be assessed by environmental parameters, which are based on physical and chemical variables, by parameters that describe soil cover, such as the Normalized Difference of Vegetation Index (NDVI) and mainly by direct investigation of ichthyofauna attributes, for example, fish scales. The aim of this study was to determine the thermal diffusivity of fish scales from *Astyanax lacustris* collected in the watershed of the Miranda, Apa and Ivinhema rivers and afterwards to investigate if the thermal diffusivity could be related to river integrity through environmental parameters. In addition, the purpose of calculating the quantum efficiency of collagen extracted from scales of the *Tilapia rendali* species was also met. For thermal diffusivity, the data were obtained by using photoacoustic spectroscopy technique considering the Rosencwaig-Gersho mathematical model. For quantum efficiency calculation, photoacoustic spectrum and luminescence signal were considered from collagen sample for an excitation range from 380 to 450 nm. The results showed no difference for the thermal diffusivity between inner $(1.8 \pm 0.7) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ and outer $(1.7 \pm 0.6) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ fish scale faces. The thermal diffusivity values of fish scale for individuals of watersheds from Miranda, Apa and Ivinhema rivers were $(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$, $(3.0 \pm 1.5) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ and $(3.7 \pm 0.4) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$, respectively. Therefore, it was assumed that the calculated value for thermal diffusivity of *Astyanax lacustris* scales should be $(2.8 \pm 0.8) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$. The hydrographic basin of Miranda and Apa rivers presented differences for the thermal diffusivity, but the environmental parameters did not show significant difference, consequently that difference cannot be attributed to the environmental variables, but to the fish features itself and its scales. For the collagen sample extracted from *Tilapia rendalli* scales, it was reported the occurrence of fluorescence for a spectral range from 394 to 490 nm for an excitation source ranging from 325 to 410 nm. The maximum fluorescence occurred in two regions: the first one with excitation at 350 nm and emission at 420 nm and the second one with excitation at 380 nm and emission at 475 nm. The calculated quantum efficiency was 80%.

Keywords: Thermal diffusivity, scale, quantum efficiency, collagen.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os riachos e rios são corpos d'água que estão em constante movimento (Cunha & Gerra, 2008) e o conjunto desses corpos hídricos de diferentes ordens formam as bacias hidrográficas (Finkler, 2013). As bacias hidrográficas funcionam singularmente, isto é, estão sujeitas aos aspectos ambientais em que seus cursos de água são expostos, passando por ambientes conservados ou degradados (Cunha & Guerra, 2013). Os organismos aquáticos, como por exemplo, os peixes também estão sujeitos ao regime de conservação do ambiente em que estão inseridos e esses ambientes podem sofrer várias alterações, geralmente declaradas como impactos ambientais, e que por vezes, podem alterar a qualidade do ambiente aquático. Sendo assim, ao estudar os peixes ou componentes de seus corpos, por exemplo, as escamas, pode-se ter acesso a informações ambientais referentes à condição do ambiente. Além disto, parâmetros de qualidade das águas como oxigênio dissolvido, condutividade elétrica da água e avaliações quantitativas da vegetação são apoiadores essenciais para entender o nível de conservação destes ambientes.

No campo das ciências há um entendimento comum de que as áreas do conhecimento necessitam manter uma relação interdisciplinar. Este fato, no âmbito do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, tem motivado o desenvolvimento de pesquisas que utilizam escamas de peixes para buscar compreender aspectos ambientais. Sendo assim, a proposta desse trabalho está fundamentada na visão do Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (GEOF) que tem utilizado metodologias espectroscópicas aplicadas em recursos naturais para que por meio do conhecimento das propriedades das amostras sejam conhecidos aspectos ambientais.

Portanto, as metodologias espectroscópicas que estudam os diferentes tipos de interação entre energia e matéria foram aplicadas para o desenvolvimento dessa pesquisa, em especial, a espectroscopia fotoacústica na região do ultravioleta-visível (UV-VIS). Essa metodologia baseia-se na absorção de fótons pelo material analisado, e na posterior conversão de parte dessa energia luminosa em energia térmica, o que provoca uma variação de temperatura da amostra e do ar na sua circunvizinhança. Assim, a partir de uma excitação modulada, um sinal sonoro pode ser detectado. Ainda, aliada a espectroscopia fotoacústica, foi utilizada nesse trabalho a espectroscopia de fluorescência

para determinar o potencial do material estudado para aplicações fotônicas. Essa metodologia, por sua vez, analisa a parte da luz que foi emitida pelo material.

Os objetos de estudo escolhidos foram escamas de peixe da espécie *Astyanax lacustris*, uma espécie de ampla distribuição nas bacias hidrográficas dos rios Paraná e Paraguai e com ampla valência ecológica, ocorrendo desde nascentes bem preservadas até riachos urbanos altamente impactados. Soma-se ainda o fato de o GEOF já desenvolver estudos com esse material. Já para avaliar o potencial das escamas para aplicações fotônicas foram selecionadas escamas de peixe da espécie de *Tilapia rendali*, contribuindo para trabalhos que estão sendo desenvolvidos no âmbito do PGRN pelo GEOF. Considerando o caráter inédito da pesquisa, os dados foram discutidos de acordo com o mais próximo possível encontrado na literatura.

Dito isto, cabe então finalizar esse capítulo informando que a presente dissertação apresenta mais 04 capítulos, a saber:

- Capítulo 2 – Introdução: apresenta a localização da região hidrográfica do Paraguai com destaque para as bacias hidrográficas do Miranda e Apa. Também é apresentada a localização da região hidrográfica do Paraná com destaque para bacia hidrográfica do rio Ivinhema. Para essas bacias hidrográficas é feita uma descrição das principais características. Posteriormente é feita uma abordagem sobre a espécie *Astyanax lacustris* e parâmetros abióticos e bióticos. O capítulo é encerrado apresentando a espectroscopia fotoacústica e de fluorescência.

- Capítulo 3 – Material e métodos: É descrito o conjunto de métodos utilizados ao longo do trabalho.

- Capítulo 4 – Resultados e discussão: Nesse capítulo é descrito o resultado para os experimentos da espectroscopia fotoacústica com excitação em 532 nm para determinar a difusividade térmica das escamas e se há alguma relação entre essa difusividade térmica e parâmetros ambientais. Soma-se a isto, a divulgação de nossos dados referentes à medida do espectro fotoacústico na região UV-VIS aliada as medidas dos espectros de emissão para o colágeno do tipo I e a determinação da eficiência quântica de luminescência desses materiais.

- Capítulo 5 – Conclusão: apresenta-se o entendimento sobre os resultados demonstrados considerando o atendimento aos objetivos propostos. Além disso, é descrito as perspectivas geradas para pesquisas futuras.

CAPÍTULO 2 – INTRODUÇÃO

2.1 Região Hidrográfica do Paraguai

A bacia hidrográfica do Alto Paraguai (Figura 1) possui cerca de 600.000 km² dispostos em parte do território do Brasil, Paraguai e Bolívia (ANA, 2017). De acordo com o Instituto SOS Pantanal e WWF – Brasil (2015), em território brasileiro apresenta os biomas de Amazônia, Cerrado, Pantanal e encaves de Mata Atlântica. A Região Hidrográfica do Paraguai, no Brasil, possui 362.376 km², abrange o estado de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul que respectivamente detém 48% e 52% da sua área (ANA et al., 2004). Essa Região Hidrográfica, no estado de Mato Grosso do Sul, é formada pelas bacias hidrográficas dos rios Correntes, Taquari, Negro, Miranda, Nabileque e Apa (SEMAC, 2010), representando aproximadamente 61% de sua área total (ANA, 2017).

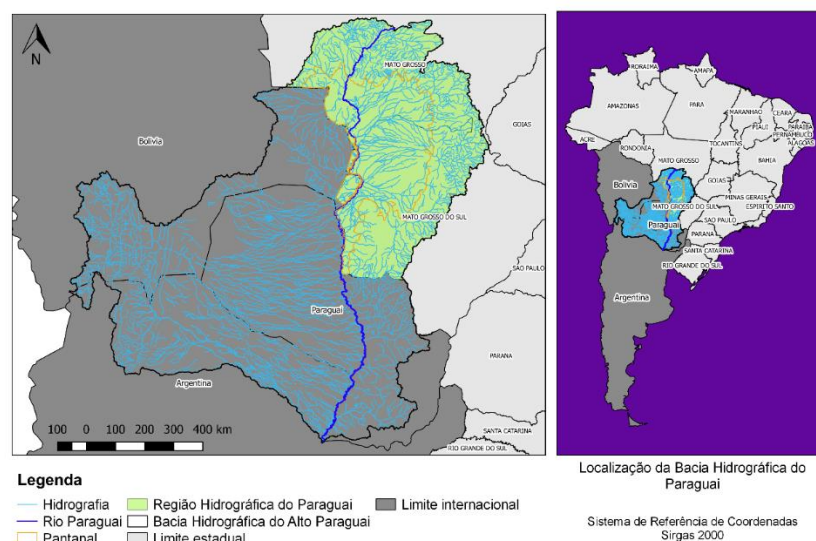


Figura 1. Mapa de localização da Região Hidrográfica do Paraguai na Bacia Hidrográfica do Alto Paraguai no território nacional e internacional. Fonte. Próprio autor.

A bacia hidrográfica do Alto Paraguai apresenta importância estratégica para a gestão dos recursos hídricos do Brasil, Bolívia e Paraguai por incluir o Pantanal, que é um conector entre o Cerrado brasileiro e o Chaco boliviano e paraguaio (ANA et al., 2004).

Na Região Hidrográfica do Paraguai estão localizadas as bacias hidrográficas do rio Apa e do rio Miranda. Essas duas bacias hidrográficas possuem uma dinâmica ecológica

singular, isso é, estão localizadas em duas grandes unidades de relevo, o Planalto e a planície do Pantanal. As águas do Planalto escoam em direção ao Pantanal, e nesse movimento, ocorre a lixiviação dos solos, desprendendo partículas que são despejadas no Pantanal por meio dos cursos hídricos (ANA et al., 2004).

Por sua vez, o Pantanal, por ser uma planície, possui um escoamento superficial lento, favorecendo a sedimentação dessas partículas. O Planalto ocupa 59% da Região Hidrográfica do Paraguai e o Pantanal 41%. Enquanto o Planalto possui terras acima de 200 m de altitude e que podem atingir mais de 1.100 m, incluindo depressões, chapadas e planaltos, o Pantanal possui terras baixas, úmidas e com altitude máxima de 200 m (ANA, 2017).

2.1.2 Bacia hidrográfica do Apa

A bacia hidrográfica do rio Apa (Figura 2) está localizada entre as coordenadas geográficas 21° 00' 00'' e 22° 30' 00'' de Latitude Sul e 55° 30' 00'' e 58° 00' 00'' de Longitude Oeste, na região sudoeste do estado de Mato Grosso do Sul (Mato Grosso do Sul, 2005) e possui uma área de drenagem de 17.016,693 km² (SEMAC, 2010). O principal curso d'água é o rio Apa que tem sua nascente na serra de Maracaju, a uma altitude de 600 m, e sua foz no rio Paraguai a uma altitude de 60 m e seus principais afluentes são o rio Perdido e rio Caracol. A bacia do Apa, ao norte, faz divisa com as bacias dos rios Nabileque e Miranda, ao leste, com a bacia do rio Ivinhema e, ao sul e oeste, com o Paraguai (Mato Grosso do Sul, 2005).

Sul, 2005) e possui uma área de drenagem de 43.663,571 km² (SEMAC, 2010). No estado de Mato Grosso do Sul, essa bacia hidrográfica é a única a dispor de um Comitê Estadual de Bacia Hidrográfica (Comitê de Bacia Hidrográfica do Rio Miranda – CBH-Miranda) (SEMAC, 2010).

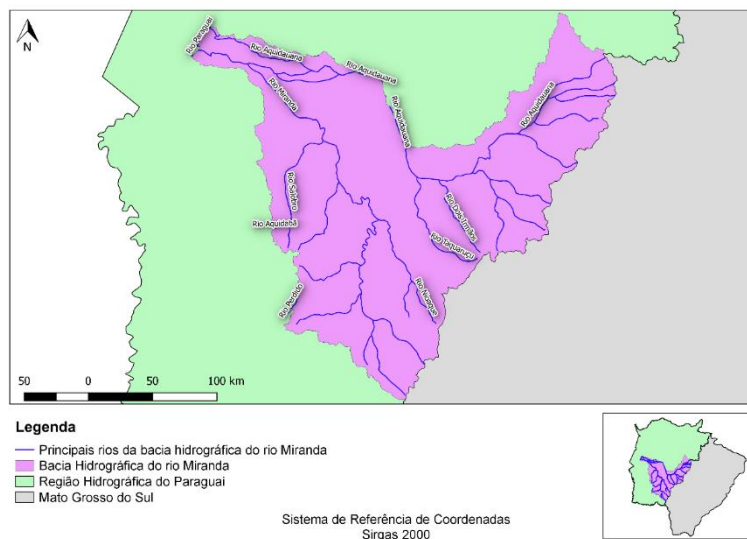


Figura 3. Mapa de localização da bacia hidrográfica do rio Miranda localizada na Região Hidrográfica do Paraguai no estado de Mato Grosso do Sul. Destaque para os principais rios. Fonte. Próprio autor.

O principal curso d'água é o rio Miranda (756,65 km de extensão), sua nascente está localizada nos limites municipais de Ponta Porã, Guia Lopes da Laguna e Jardim e sua foz ocorre em Corumbá no rio Paraguai e seus principais afluentes pela margem direita são o rio Aquidauana, rio Taquaruçu, Agachi e o rio Nioaque. Pela margem esquerda os principais afluentes são o rio Salobra, rio Formoso, rio da Prata, rio Chapena e rio do Peixe. A bacia do Miranda, ao norte, faz divisa com as bacias dos rios Taquari e Negro, ao sul, com a bacia do Apa e ao oeste, com a Nabileque (IMASUL, 2016).

A bacia hidrográfica do Miranda, definida no Plano Estadual de Recursos Hídricos de Mato Grosso do Sul como Unidade de Planejamento e Gerenciamento Miranda, possui vazões máximas que apresentam maiores variações nos meses de janeiro e dezembro, entre, aproximadamente, 100 m³/s a 400 m³/s. As maiores vazões ocorrem em dezembro, janeiro e fevereiro, atingindo 650 m³/s e os menores valores ocorrem entre setembro e outubro, chegando a 18,5 m³/s (SEMAC, 2010).

Os dados do Plano Estadual de Recursos Hídricos de Mato Grosso do Sul demonstram que essa bacia hidrográfica possui disponibilidade hídrica em situação de

confortável ($> 1.700 \text{ m}^3/\text{hab}/\text{ano}$) com relação entre vazão média e vazão de retirada em estado de excelente ($<5\%$), relação entre a vazão de retirada e vazão de permanência em estado de confortável ($<5\%$) e relação entre a vazão de retirada e vazão mínima em estado de confortável (5 a 10%) (MATO GROSSO DO SUL, 2005).

2.2. Região Hidrográfica do Paraná

A Região Hidrográfica do Paraná (Figura 4) compreende o trecho brasileiro de uma das unidades hidrográficas da Bacia do Rio da Prata, o Alto Paraná, que por sua vez tem sua nascente na Serra da Mata da Corda em Minas Gerais e sua foz no rio Iguçu, na tríplice fronteira Brasil – Argentina – Paraguai. Essa Região Hidrográfica possui uma área de 879.860 km^2 , representando 10% do território nacional. Faz limites ao sul com as Região Hidrográfica do Uruguai, a sudeste com Atlântico Sul, a sudeste e leste com Atlântico Sudeste, a leste e nordeste com São Francisco, ao norte com Tocantins-Araguaia, a noroeste com a Região Hidrográfica do Paraguai, a oeste com a Região Hidrográfica do Paraguai e sudoeste com a Argentina (IBAMA, 2006).

Nos domínios dessa Região Hidrográfica, em território brasileiro ocorrem os biomas de Cerrado e Mata Atlântica e está disposta nos territórios dos estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Distrito Federal (SNIRH, 2016). Essa Região Hidrográfica, no estado de Mato Grosso do Sul, é formada pelas bacias hidrográficas dos rios Aporé, Sucuriú, Verde, Pardo, Ivinhema, Amambai e Iguatemi, representando aproximadamente 47,46% da área total do Mato Grosso do Sul (MATO GROSSO DO SUL, 2005).

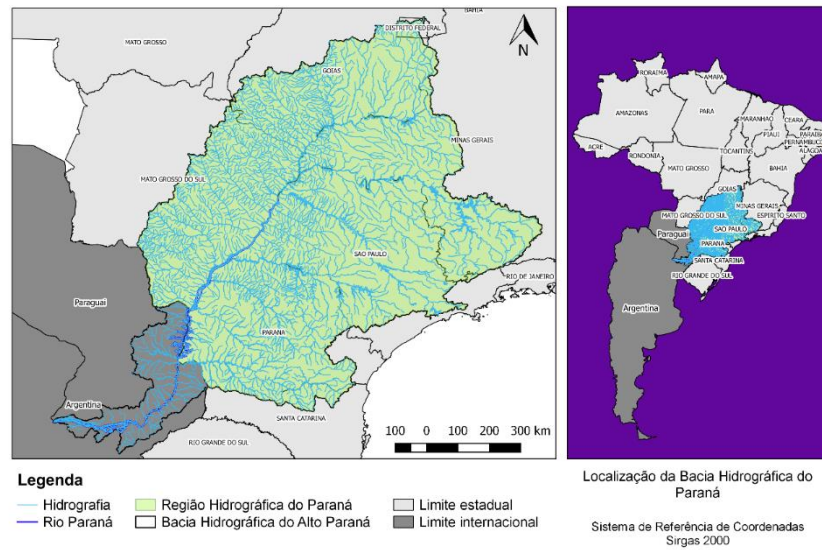


Figura 4. Mapa de localização da Região Hidrográfica do Paraná na Bacia Hidrográfica do Alto Paraná no território nacional e internacional. Fonte. Próprio autor.

2.2.1 Bacia Hidrográfica do Ivinhema

A bacia hidrográfica do rio Ivinhema (Figura 5) está limitada a oeste pela Serra de Maracaju e a leste pela calha do rio Paraná o que lhe dá uma área de drenagem de 46.668,75 km² (IMASUL, 2015).

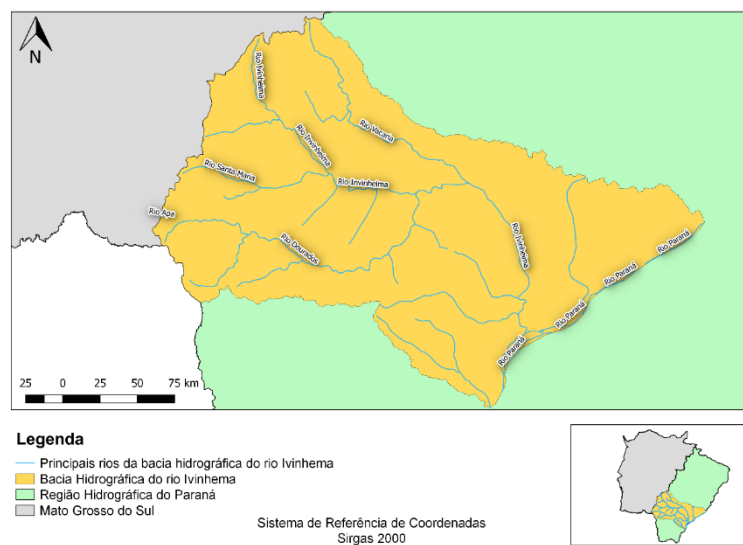


Figura 5. Mapa de localização da bacia hidrográfica do rio Ivinhema localizada na Região Hidrográfica do Paraná no estado de Mato Grosso do Sul. Destaque para os principais rios. Fonte. Próprio autor.

O principal curso d'água é o rio Ivinhema (491,65 km de extensão), sua nascente está localizada nos limites municipais de Rio Brilhante, Angélica e Nova Alvorada do Sul e sua foz ocorre em Naviraí no rio Paraná. Como principais afluentes tem-se os rios Dourados, Brilhante e Vacaria (IMASUL, 2014).

Entre as sub-bacias hidrográficas que formam a bacia hidrográfica do rio Ivinhema, a sub-bacia hidrográfica do rio Dourados abriga o riacho Água Boa que tem sua nascente localizada no interior do Parque Antenor Martins e ao longo do percurso até a foz no rio Dourados recebe contribuições dos riachos Rego D'água e Paragem (PEREIRA, 2007) e a sub-bacia hidrográfica do rio Brilhante abriga o riacho Laranja Doce que tem sua nascente no interior do território indígena da Aldeia Bororó (COSTA et al, 2014). Ambos riachos estão localizados no município de Dourados, Mato Grosso do Sul.

2.3 O gênero *Astyanax*

A ictiofauna brasileira é composta por aproximadamente 3.000 espécies de água doce (BRASIL, 1998). Mesmo assim, a riqueza total de espécies deve superar o valor mencionado anteriormente, pois o conhecimento sobre a diversidade das espécies da ictiofauna ainda é incompleto (Rosa e Lima, 2008). Desta maneira, conforme explica Froehlich et al., (2017), o Brasil abriga cerca de 10% das espécies de peixes do mundo, já que se estima a existência de 28.000 espécies de peixe no mundo.

Para Mato Grosso do Sul há registro de 358 espécies de peixes, pertencentes a 11 ordens, com certa predominância para Characiformes e Siluriformes, e 43 famílias, sendo a Characidae e Loricariidae as que apresentam maiores números de espécies (FROEHLICH et al., 2017). Entre as espécies de ocorrência no Mato Grosso do Sul, destaca-se a espécie *Astyanax lacustris*. O gênero *Astyanax* foi descrito por Baird e Girard (1854), a partir da espécie *Astyanax argentatus*, atualmente reconhecida como *Astyanax mexicanus*. Esse gênero é um dos mais enganosos da família Characidae, pois as espécies possuem semelhanças morfológicas (ROSSINI, 2015; ROSSINI et al. 2016). A espécie *Astyanax lacustris* (Figura 6) foi descrita por Lutken (1875), com as seguintes características: 6-7 fileiras de escamas entre a nadadeira dorsal e na linha lateral, e também entre a linha lateral e a nadadeira pélvica, ausência de dentes no maxilar e uma mancha escura arredondada

horizontalmente na região umeral. Apresenta maior altura do corpo na origem da nadadeira dorsal, na nadadeira anal com 25-34 raios ramificados e uma faixa estreita que se estende do meio até o final do corpo, tornando-se mais conspícua na mancha do pedúnculo caudal (NUNES, 2012).



Figura 6. Exemplar de *Astyanax lacustris*. Fonte. Próprio autor.

Recentemente Lucena e Soares (2016) revisaram as espécies do subgrupo *Astyanax bimaculatus* das drenagens dos rios da Prata e São Francisco e dos sistemas costeiros do Sul do Brasil e Uruguai. Esses autores definiram que o *Astyanax lacustris* e *A. abramis*, *Astyanax jacuhiensis*, *A. asuncionensis* e *A. altiparanae* são reconhecidos como sinônimos de *Astyanax lacustris*.

2.4 Escamas

Escamas são elementos ósseos encontrados em peixes e são derivações da derme com origem no interior da pele (SIRE & AKIMENKO, 2004). Podem ser consideradas tecidos especiais por exibirem diferenças ou por demonstrarem características homogêneas entre espécies ou grupos específicos (ROBERTS, 1993). Essas estruturas que nos peixes desenvolvem funções de proteção e hidrodinâmica podem ser classificadas em diferentes tipos, como por exemplo, em cosmoide, ganoide e leptoide, sendo essa última subclassificada em ctenoide e cicloide (MORI et al., 2012). As escamas de *A. altiparanae* ou *lacustris* estão inseridas no subgrupo cicloide (SANTANA, 2014; SIRE & AKIMENKO, 2004).

Escamas de peixe são formadas por uma matriz extracelular composta principalmente por fibras de colágeno tipo I e por hidroxiapatita deficiente em cálcio. Juntas formam uma estrutura tridimensional altamente ordenada que apresentam duas

regiões distintas: uma camada externa (óssea) e uma placa fibrilar interna (Olson e Watabe, 1980).

A camada óssea apresenta uma composição inorgânica indicando a presença de fase mineral composta por apatita, especificamente hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (VIEIRA et al., 2009; MORI et al., 2013) e apresenta relação de Ca/P de aproximadamente 1,67%, característica comum às escamas de peixes (DIAS, 2007; DEER, HOWIE, ZUSSMAN, 2000; MAVROPOULOS, 1999). Especificamente para escamas de *Astyanax altiparanae*, Lima (2015) relata que para a fase inorgânica os elementos químicos encontrados são C, N, O, Na, Mg, P, K, Ca.

Já a placa fibrilar interna é responsável pela fase orgânica composta basicamente por colágeno que é um bastão helicoidal com três filamentos com cerca de 300 nm (STRYER, 1992; BIRK & BRUCKNER, 2005) e nessa fase são encontrados os elementos C, N, O, Ca, S (LIMA, 2015). O colágeno é uma proteína composta por várias moléculas, sendo que cada molécula é formada por um entrelaçamento de cadeias polipeptídicas denominadas cadeias alfa que formam uma tripla hélice (VARGAS, AUDÍ, CARRASCOSA, 1997). Nas cadeias alfas do colágeno tipo I são encontrados diversos aminoácidos, a saber: a) aminoácidos ácidos – ácido aspártico, ácido glutâmico; b) aminoácidos básicos – histidina, lisina e arginina; c) aminoácidos hidrofóbicos – valina, metionina, leucina, isoleucina (GOISSIS, 2007).

O Colágeno do tipo I está presente em todos os vertebrados e pode ser encontrado em escamas de peixes (GOISSIS, 2007; KIMURA, MIYAUCHI, UCHIDA, 1991). Entre os tipos de colágeno, o tipo I é o mais importante por desenvolver função mecânica na matriz extracelular (RAMACHANDRAN, 1967).

Sendo assim, as escamas de peixes ao longo dos anos tem sido alvo de diversos estudos para entender a formação desses elementos (OLSON & WATEBE, 1980), para verificar comparações morfológicas entre escamas (ROBERTS, 1993) bem como fazer caracterizações química (SANTOS, 2009) física (VERNEREY & BARTHELAT, 2010). Além disso, estudos diversos são aplicados às escamas de peixes e apresentam importância na área das ciências ambientais por permitirem análises eficientes, sobretudo, quando completadas por técnicas espectroscópicas, por exemplo, para distinguir populações de peixes da mesma espécie (ALMEIDA et al, 2016) e para analisar a integridade ambiental de riachos (SANTANA et al, 2015).

A presença de colágeno e de hidroxiapatita nas escamas tem demonstrado potencial para aproveitamento na área da saúde que visualiza a aplicação da hidroxiapatita na condição de biomaterial para auxiliar na recuperação de tecidos ósseos (PON-ON et al, 2016; SANTANA, 2018) e do colágeno para o desenvolvimento e reconstrução de tecidos em sistemas curativos (Pati, Adhikari, Dhara, 2010).

2.5 Parâmetros abióticos e bióticos

Em ambientes aquáticos, as características ambientais, isto é, o tipo de rocha, solo, clima e vegetação determinam os parâmetros abióticos e bióticos do ambiente (OLIVEIRA & FERREIRA, 2003). Além dessas características que podem determinar a composição química dos corpos hídricos, há de se considerar as contribuições ou perturbações humanas no ciclo hidrológico (MARGALEF, 1983; VON SPERLING, 2007).

As intervenções humanas são capazes de alterar a qualidade ambiental dos corpos hídricos e podem ocorrer de forma difusa quando o estabelecimento da relação causa e efeito é mais complexa ou ocorrem de forma pontual quando essa relação é de fácil estabelecimento (Finkler, 2013).

Para avaliar a qualidade ambiental é comum que a atividade de monitoramento faça uso de diversos parâmetros que juntos possam descrever a condição ambiental. Estudos que buscam diagnosticar as condições de rios ou bacias hidrográficas tem usado diversos parâmetros, como Oxigênio Dissolvido, Potencial Hidrogeniônico (pH), Sólidos Totais, Condutividade Elétrica, Temperatura, entre outros (TOMAZELA, 2008; IMASUL 2014; PIRATOBA et al, 2017).

O oxigênio dissolvido é um dos parâmetros mais utilizados e mais importante para caracterizar e conhecer a dinâmica de um ecossistema aquático (ESTEVES, 1998). A condutividade elétrica além de indicar a quantidade de sais presente na água é capaz de expressar fenômenos importantes que ocorrem no ambiente e ainda pode permitir uma correlação com a disponibilidade de nutrientes presente no corpo hídrico (TUNDISI & TUNDISI, 2008).

No Brasil os parâmetros físicos e químicos são estabelecidos pelo arcabouço jurídico. A Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional de Meio

Ambiente estabelece o enquadramento dos corpos de água em classes conforme o uso preponderante e determina que para águas doces o parâmetro de oxigênio dissolvido seja:

Classes de água doce	Oxigênio Dissolvido mg/L O ₂
Classe I	≥ 6
Classe II	≥ 5
Classe III	≥ 4
Classe IV	> 2

Quadro 1. Classes de enquadramento de corpos d'água em função do parâmetro de oxigênio dissolvido O₂ (mg/L) conforme Resolução Conama 357/2005.

Já a condutividade elétrica da água não é estabelecida em jurisdição federal, porém, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB tem um entendimento que valores de condutividade acima de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ indicam ambientes impactados (CETESB, 2018). No entanto, valores de condutividade acima de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ podem ser verificados em rios ou riachos conservados pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Miranda, como por exemplo, o rio Formoso que apresenta alto grau de conservação, na região do Planalto de Bodoquena, rico em rocha calcária (MEDINA JÚNIOR, 2007).

Embora o monitoramento ambiental baseado em parâmetros de qualidade de água possam demonstrar uma resposta consideravelmente efetiva, Vieira & Shibata (2007) descrevem que estes parâmetros estão direcionados ao descritivo de qualidade de água para o consumo humano e não à conservação da biota aquática.

Sendo assim, a utilização de indicadores biológicos como os peixes torna-se fundamental para alcançar maior entendimento das condições de ambientes aquáticos (Wooton 1990, Castro & Cassatti 1997, Smith et al, 1997, Karr 1981).

A importância da utilização de peixes para demonstrar o grau de qualidade ambiental de ambientes aquáticos já está estabelecida, tanto é que, após a criação do Índice de Integridade Biótica de James R. Karr em 1981, todos os estados americanos e todos os continentes, exceto o Alaska, passaram a fazer adaptações deste (DRAKE & PEREIRA, 2003). Posteriormente outros índices multimétricos passam a ser adaptados para outros componentes biológicos e outros propósitos (JARAMILLO-VILLA & CARAMASCHI, 2008).

2.4 Espectroscopia fotoacústica

A espectroscopia é um termo geral aplicado à ciência que estuda a interação de diferentes tipos de radiação com a matéria (SKOOG et al., 2002; Rosencwaig, 1978). De acordo com Bosquet (1971) citado por Rosencwaig (1978) a espectroscopia óptica convencional pode ser dividida em duas categorias, a saber: uma primeira categoria, que envolve o estudo de fótons que não interagem com o material e uma segunda categoria, que estuda os fótons que sofrem alguma interação com o material, de modo que a maioria das técnicas utilizadas são variações desses modelos.

A espectroscopia fotoacústica estuda a interação da energia com a matéria, porém se diferencia por estudar a interação dos fótons com a amostra por meio da medida direta da energia absorvida pelo material como resultado de sua interação com o feixe de fótons. O resultado dessa interação é a geração do efeito fotoacústico que de maneira simplificada é um som resultante do aquecimento periódico de uma amostra por uma fonte de luz modulada (CESAR, 1979).

Conforme explica Neri (1986) após a teorização por Rosencwaig e Gersho a espectroscopia fotoacústica passou a ser utilizada com sucesso para investigar propriedades térmicas e elásticas de reações químicas, de processos radiativos, de eficiência quântica entre outras possibilidades que consideram diversos tipos de materiais inorgânicos, como também em materiais biológicos.

2.4.1 História e sinal acústico de Alexander Graham Bell

A percepção de um efeito sonoro emitido por um material após este ser exposta à luz foi primeiramente relatado por Alexander Graham Bell em 1880 (PATEL, 2013). Conforme explica Rosencwaig e Gersho (1976), Alexander Graham Beel descobriu esse efeito quando fez incidir um feixe de luz solar com interrupções periódicas em uma amostra posicionada no interior de uma célula fechada conectada a um tubo auditivo.

Ao perceber esse efeito por meio de seu experimento, Alexander Graham Bell publicou junto a “*American Association for the Advancement of Science*” um artigo

intitulado em “*On the production and reproduction of sound by light*” descrevendo que havia encontrado uma propriedade em diferentes materiais, tais como o ouro, prata, platina, ferro, marfim, celulose, borracha, madeira, papel, vidro entre outros. A propriedade a qual Alexander Graham Bell se referia como efeito fotofônico, isto é, transmissão de som pela luz, resultava da exposição da amostra ao feixe de luz e a intensidade do som dependia da frequência de mudança na luz (BELL, 1880).

O experimento inicial de Alexander Graham Bell desenvolvido conjuntamente com Sumner Tainter objetivou criar um telefone capaz de garantir a comunicação entre pessoas utilizando o som da voz falada, algo ainda inédito para os anos de 1880. O aparato inicial para tal experimento está representado na Figura 7.

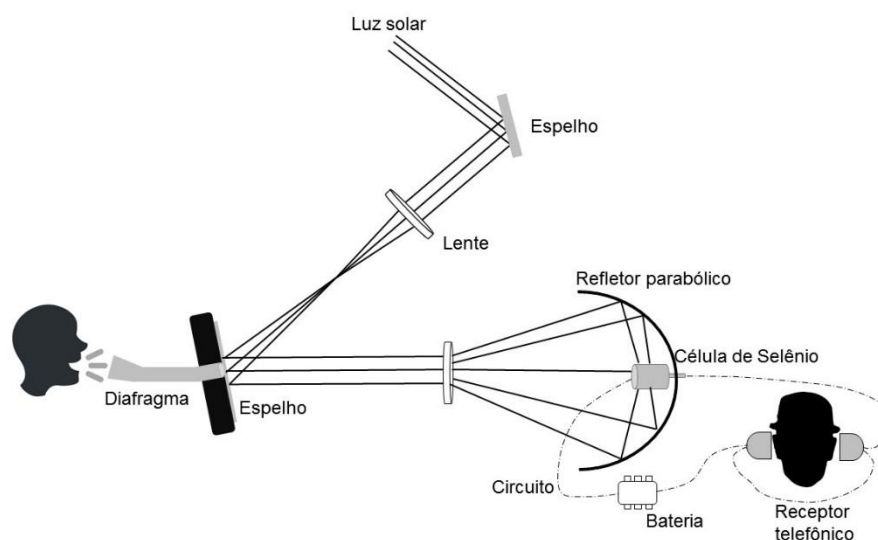


Figura 7. Demonstração do aparato experimental utilizado por Alexander Granham Bell e Sumner Tainter em 1880. Descoberta do sinal acústico e invenção do aparelho chamado de Fotofone. Fonte. Bell (1880).

Para a realização do experimento exemplificado acima, Sumner Tainter operou o transmissor que estava localizado na Franklin School House, Washington, ou seja, foi o responsável pela produção da fala que deveria ser ouvida por Alexander Granham Bell que havia se posicionado com o receptor telefônico em seu laboratório a uma distância de 213 metros. Desta maneira, o experimento consistiu em garantir que um feixe de luz solar fosse concentrado através de uma lente sobre o espelho do diafragma enquanto o senhor Tainter emitia sons vocais pela fala. Após a reflexão nesse espelho, esse feixe foi novamente tornado paralelo ao passar por outra lente. O refletor parabólico que recebeu o feixe (posicionado a 213 metros do transmissor) converteu-os para o centro, onde estava

posicionada uma sensível célula de selênio e que por sua vez estava conectada em um circuito local com uma bateria e um telefone (BELL, 1880). Uma vez que a resistência do Selênio varia com a intensidade da luz, o feixe de luz solar modulada resultou em um discurso vocal eletricamente reproduzido (Rosencwaig, 1941). Como resultado, o senhor Bell escutou a seguinte frase: “*Sr. Bell, se você ouve o que digo, venha até a janela e agite seu chapéu*” (BELL, 1880).

Considerando o princípio de que a energia contida na luz poderia causar perturbações no arranjo molecular de materiais como por exemplo o ferro e gerar um sinal acústico, Bell passou a aceitar que tais perturbações também poderiam ser observadas em selênio cristalino. Sendo assim, foi organizado outro experimento para testar os receptores fotônicos (Figura 8) (Bell, 1880).

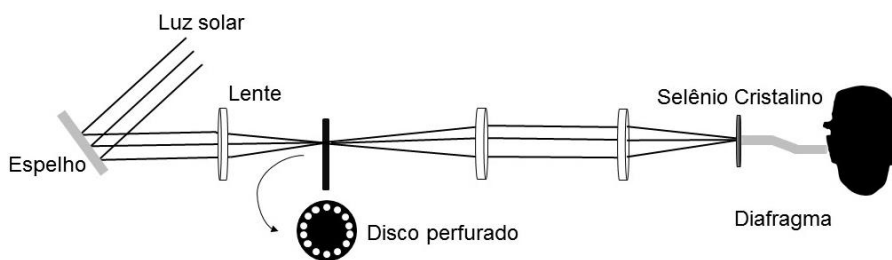


Figura 8. Demonstração do aparato experimental utilizado por Alexander Granham Bell e Sumner Tainter para testar receptores fotônicos selênicos. Fonte. Bell (1880).

A partir deste ponto, o experimento passou a testar diversos receptores, por isso, Bell e Tainter passaram a investigar se distintas amostras poderiam reagir emitindo algum som quando excitadas por uma fonte de luz sem a prévia presença de som vocal. Desta forma, a Luz solar era direcionada por um espelho à uma lente, após isso, na região focal, o feixe era interrompido por um disco perfurado que exercia um movimento rotativo para posteriormente ser direcionada ao fino disco de selênio cristalino e ter seu sinal captado pelo diafragma (BELL, 1880).

Analisando o Selênio cristalino e outras amostras sólidas, Bell concluiu que os sons podiam ser produzidos pela ação de uma luz variável absorvida pela amostra e que a intensidade do sinal dependia da intensidade da luz incidente sobre a amostra e o quanto de luz era absorvida pelo material. Além disso, ficou evidenciado que o sinal podia ser ampliado quando aplicado um fino diafragma ou ainda quando esse diafragma fosse produzido com o material alvo da análise (BELL, 1880 ROSENCWAIG, 1978).

Uma vez relatado o efeito fotoacústico para amostras sólidas, Alexander Graham Bell e outros pesquisadores passaram a investigar esse fenômeno em sólidos, líquidos e gases. Então, já em 1881 trabalhos sobre fotoacústica foram publicados por Alexander Graham Bell, John Tyndall, William Henry Preece e Wilhelm Conrad Röntgen demonstrando que o efeito fotoacústico não estava limitado aos sólidos, mas que também ocorria em líquidos e gases (THOEN, 1997).

Para amostras líquidas Bell montou um aparato experimental de maneira a permitir que um foco intermitente de luz solar fosse incidido na porção média de um tubo de ensaio preenchido com o líquido. Entre os líquidos utilizados (água limpa, água descolorida por tinta, Mercúrio, Éter Sulfúrico, Amônia, Sulfato de Amônio de Cobre, Tinta de Escrita, Índigo em Ácido Sulfúrico e Cloreto de Cobre) Bell pode classificar os líquidos em pelo menos quatro ordens de sinais: 1 – sem sinal audível; 2 – som fraco; 3 – nenhum som ouvido; 4 – Som fraco, mas distinto. Desta maneira, conclui-se que embora ocorra o efeito em amostras líquidas, esse é muito enfraquecido (BELL, 1881).

Para amostras gasosas, Bell seguiu as sugestões de John Tyndall para preparar um tubo de ensaio preenchido com vapor de éter sulfuroso (bom absorvedor de calor) e um outro tubo com vapor de bissulfeto de carbono (pobre absorvedor de calor). Ambos apresentaram um sinal fotoacústico, porém foi maior no éter sulfuroso. Posteriormente, ainda analisou vapores de água, gás de carvão, éter sulfuroso, álcool - amônia, amileno, brometo de etila, dietilamina, mercúrio, iodo e peróxido de nitrogênio. Os sons mais altos foram obtidos a partir de iodo e peróxido de nitrogênio (BELL, 1881).

Posteriormente às publicações de Bell sobre o Fotôfone (*Photofone*) e o efeito fotoacústico em gases e vapores, Tyndall (1881) que estudava as relações do calor em gases por meio de um termômetro para gases (*Termopile - Thermopile; Galvanômetro - Galvanometer*), passou a considerar que as descobertas de Alexander Graham Bell poderiam ser aplicadas em seus experimentos para fornecer os resultados esperados. Sendo assim, Tyndall montou um experimento seguindo os princípios já considerados para gases e vapores e concluiu que para ambos ocorria a emissão de sons, porém em gases havia maior intensidade.

Röntgen (1881) também se dedicou ao estudo da capacidade dos gases serem aquecidos quando excitados por uma fonte de luz. Em um experimento, percebeu que quando um feixe de luz era incidido em um tubo preenchido com algum gás, ocorria um aumento de pressão e que ao cessar esse feixe de luz a pressão diminuía, podendo essa

variação de pressão ser registrada por um manômetro. Além disso, descreveu que o aumento da pressão era menor para o ar quando comparado com outros gases fortemente absorvedores. Após isso, considerou os conhecimentos relatados por Beel em 1880 sobre o Fotôfone (*Photofone*) e elaborou um aparato experimental capaz de incidir luz intermitente em amostras de gás e vapor e concluiu que os sons emitidos não eram propriedades dos raios de luz e sim do resultado de aquecimento e expansão produzidos pela absorção, e o subsequente resfriamento e contração do copo absorvente.

Preece (1881) explicou por meio de seus experimentos que o efeito sonoro se originava de uma transmissão de calor da amostra sólida para o gás contido em uma câmara fechada devido à expansão desse gás absorvente sob a influência do calor e que quanto maior for a eficiência nessa transferência, maior seria o sinal sonoro.

Sendo assim, tornou-se estabelecido no meio científico que os sons eram produzidos pela ação direta de uma luz incidida de forma intermitente em uma amostra líquida, sólida ou gasosa. Após esses eventos, pode-se considerar que as pesquisas acerca do efeito fotoacústico tenham perdido força, sobretudo, pelo fato de que o receptor desse sinal era o ouvido humano, não permitindo calibrações (ROSENCWAIG, 1978). Então, o efeito fotoacústico voltou a ser investigado cientificamente na década de 1970, quando se chegou a um entendimento adequado do efeito na matéria condensada e então ao longo dos anos diversas técnicas com variadas fontes de excitação e aplicações passaram a ser desenvolvidas e aplicadas (THOEN, 1997).

Atualmente o entendimento sobre o efeito fotoacústico está consolidado e é explicado por meio de um fenômeno que resulta da absorção e conversão de energia luminosa em energia térmica, sendo essa energia térmica resultante do processo de desexcitação não-radiativa que produz o aquecimento do meio. Somando a isso uma fonte de luz intermitente, assume-se que o aquecimento também terá esse comportamento e irá gerar a variação de pressão no ar adjacente à amostra, o que resulta no sinal fotoacústico (SAWADA, 2000).

2.4.2 Modelo Teórico de Rosencwaig e Gersho

Ao longo dos anos, a espectroscopia fotoacústica pode responder qualitativamente por meio dos espectros de absorção óptica. Porém, ainda havia uma lacuna sobre a interpretação da resposta quantitativa acerca do sinal fotoacústico. Buscando preencher essa lacuna, Rosencwaig e Gersho desenvolveram um modelo teórico para explicar esse efeito, isto é, compreender a grandeza do sinal fotoacústico por meio de um modelo matemático.

Para esse modelo teórico assume-se uma célula fotoacústica com diâmetro d e comprimento L , como mostrado na Figura 9. O comprimento L é pequeno comparado ao comprimento de onda do sinal acústico e o microfone detectará a pressão média produzida. A amostra tem diâmetro d e espessura l . A amostra é posicionada na célula fotoacústica de maneira que uma face fique exposta ao gás (ar) dentro da célula e outra face fique em contato com um suporte de espessura l_b .

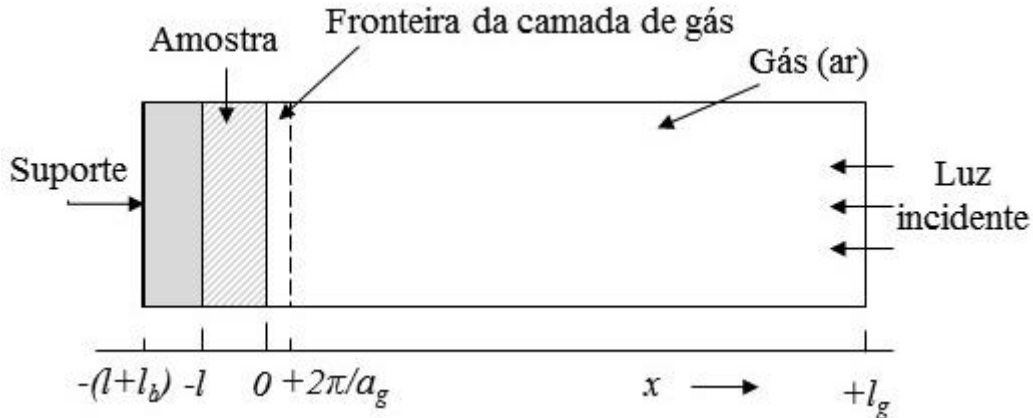


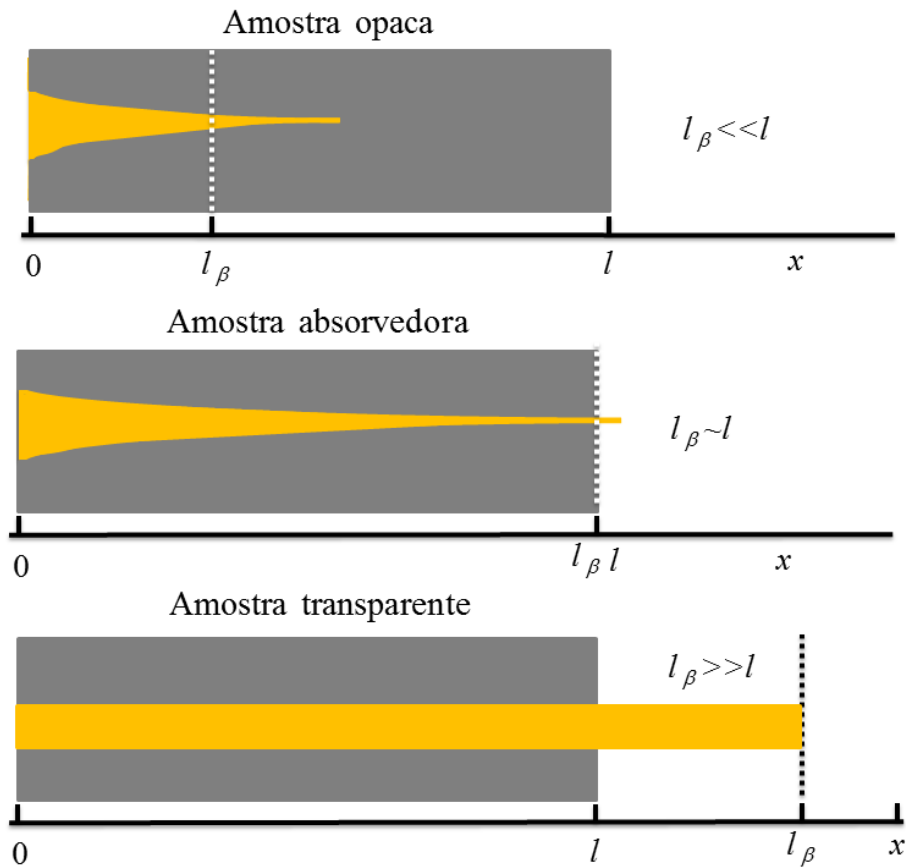
Figura 9. Corte transversal ilustrativo de uma célula fotoacústica cilíndrica. Demonstração das posições do suporte, amostra, fronteira da camada de gás, coluna de gás e local de entrada da luz. Fonte: Rosencwaig e Gersho (1976).

Adota-se que a amostra se estende de $x = 0$ a $x = -l$, a coluna de gás (ar) se estende de $x = 0$ a $x = +l_g$ e o suporte de $x = -l$ para $x = -(l+l_b)$ devendo haver certa continuidade de temperatura e fluxo de calor nos limites $x = 0$ e $x = -l$.

Nesse modelo, a fonte do sinal se origina do fluxo de calor periódico do sólido para o gás circundante à medida que o sólido é ciclicamente aquecido pela luz modulada. A camada de ar que responde termicamente ao fluxo de calor é relativamente fina, e

compreende a $2\pi/a_g$, o que em geral corresponde a algo em torno de 1 mm de espessura para uma frequência de 100 Hz, sendo $a_g = (\omega/2D_g)^{1/2}$ o coeficiente de difusão térmica do gás, ω a frequência angular e D_g a difusividade térmica do gás. Devido à expansão e contração dessa camada de ar é que se pode considerar um modelo de pistão vibratório no restante da coluna de gás (ar), assim, criando o sinal fotoacústico que percorre toda a extensão dessa camada de ar. A flutuação periódica de pressão na célula fotoacústica é proporcional a quantidade de calor que a amostra emite. Desta forma, há uma relação entre a intensidade do sinal e a quantidade de luz absorvida, ou seja, amostras altamente absorvedoras irão ter sinal acústico maior em relação a amostras menos absorvedoras conforme Bell (1881) e Tyndall (1881) já haviam mencionado (ROSENCWAIG E GERSHO, 1976; ROSENCWAIG, 1978).

Uma amostra sólida pode ser considerada opticamente transparente ou opaca, podendo apresentar um desempenho fotoacústico ou não. Para amostras sólidas transparentes ou opacas, a luz é absorvida ao longo de sua espessura (Rosencwaig e Gersho, 1976; Rosencwaig, 1978). O parâmetro utilizado para expressar essa penetração de luz é denominado comprimento de absorção óptica, l_β , isto é, $l_\beta = 1/\beta$, sendo β o coeficiente de absorção óptica da amostra. Sendo assim, a amostra pode ser classificada por meio de uma relação do comprimento de absorção óptica (l_β) em função da espessura da mesma (l) (Figura 10) (MORISHITA, 2014).



54

Figura 10. Classificação da absorção óptica l_β em função da distância e da espessura l que a radiação luminosa penetra na amostra. Fonte. Adaptado de Bento (1990).

Em uma amostra opaca, a luz incidente em $x = 0$ penetra a amostra até determinado ponto da espessura, sendo assim, o comprimento de absorção (l_β) é menor ou muito menor que a espessura da amostra (l). Já para a amostra absorvedora, a luz percorre toda a sua espessura, ou seja, o comprimento de absorção óptica (l_β) é aproximadamente igual à espessura da amostra (l) e em uma amostra transparente a luz passa completamente através da amostra sem ser absorvida ou tendo apenas uma parcela muito pequena absorvida, sendo assim, tem-se que o comprimento de absorção óptica (l_β) é muito maior que a espessura da amostra (l).

Além dessa permissibilidade de entendimento (l_β em função de l) também é possível considerar uma relação do comprimento de difusão térmica (μ_s) em função da espessura da amostra (l) conforme exemplificado na Figura 11 (ROSENCWAIG e GERSHO, 1976; ROSENCWAIG, 1978).

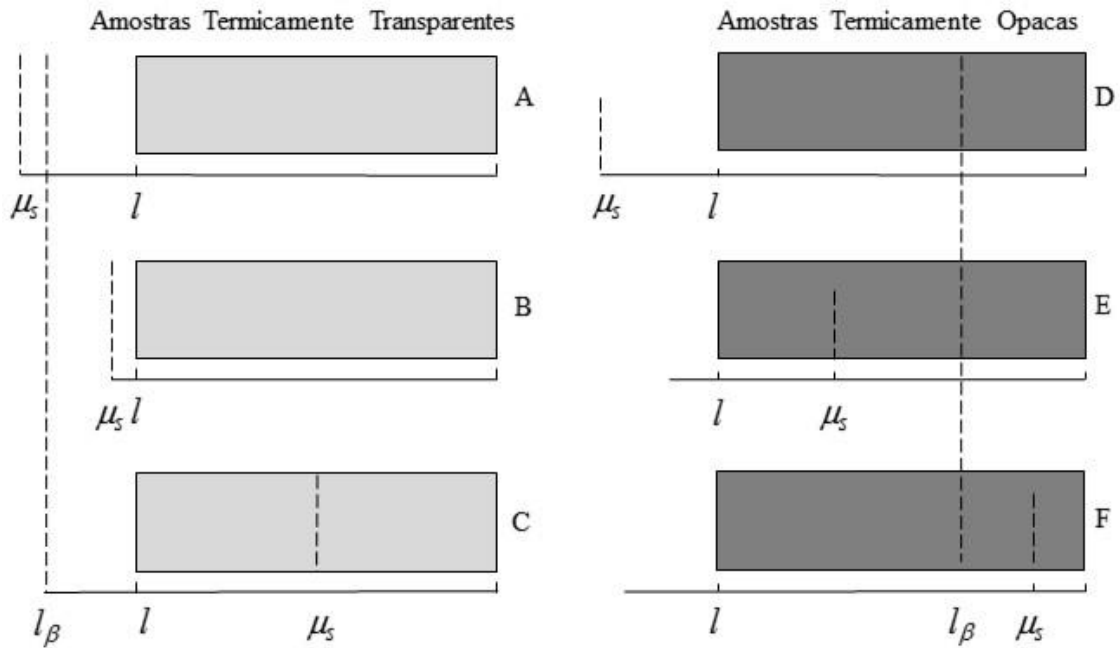


Figura 11. Classificação da difusão térmica μ_s em função da espessura l . Comparação entre amostras termicamente transparente e opacas. Adaptado de Bento (1990).

Em amostras termicamente transparentes, no caso A, o comprimento de difusão térmica ($\mu_s = 1/as$) é muito maior que a espessura (l), podemos então considerar essa amostra termicamente fina ($\mu_s \gg l$). Para a amostra B o comprimento de difusão térmica (μ_s) é maior que a espessura da amostra (l), indicando que também há um regime termicamente fino ($\mu_s > l$). Já para a amostra C o comprimento de difusão térmica (μ_s) é menor que a espessura da amostra (l), definindo um regime termicamente grosso para a amostra ($\mu_s < l$) (ROSENCWAIG e GERSHO, 1976; ROSENCWAIG, 1978).

Para as amostras termicamente opacas, a luz é absorvida a uma pequena distância em comparação à espessura da amostra. Então no caso D, o comprimento de difusão térmica (μ_s) é muito maior que a espessura (l), podemos então considerar essa amostra termicamente fina ($\mu_s \gg l$). Para a amostra E, o comprimento de difusão térmica (μ_s) é menor que a espessura da amostra (l), indicando que há um regime termicamente grosso ($\mu_s < l$). Já para a amostra F, o comprimento de difusão térmica (μ_s) é muito menor que a espessura da amostra (l), definindo um regime termicamente grosso ($\mu_s \ll l$) (ROSENCWAIG e GERSHO, 1976; ROSENCWAIG, 1978).

Assumindo alguns limites na teoria de Rosencwaig-Gersho é possível encontrar condições que simplificam a análise dos dados experimentais a partir do modelo matemático. Dentre esses casos especiais, temos um no regime de transparência da

amostra, isto é, $l\beta = 1/\beta \gg l$. Para amostras com baixa absorção, na frequência de transição do regime termicamente fino para o grosso temos $al \approx 1$, sendo a o coeficiente de difusão térmica da amostra. Assim é possível escrever uma expressão para essa frequência de transição, também chamada de frequência característica (f_c):

$$f_c = \frac{D}{\pi l^2} \quad (1)$$

em que D é a difusividade térmica do material.

A mudança de regime térmico em uma amostra opticamente transparente pode ser observada pelo gráfico do sinal fotoacústico em função da frequência por meio de uma mudança de inclinação na linearidade da curva¹. Assim, utilizando a equação (1) é possível determinar a difusividade térmica do material por meio da adequação da espessura da amostra ao regime de frequências utilizadas ou vice-versa.

A difusividade térmica é um parâmetro que possui uma unidade de área por tempo (área/tempo) e demonstra como o calor se difunde em um material. Considerando que os materiais são diferentes, a difusividade térmica deve ser compreendida como uma propriedade intrínseca do mesmo (SAWADA, 2000).

2.4.3 Efeito fotoacústico aplicado em sistemas biológicos

No campo das ciências ambientais a espectroscopia demonstra capacidade de aplicação em diversos estudos para diferentes objetivos. Por isso a espectroscopia fotoacústica como ciência aplicada ao estudo de amostras biológicas tem sido usada há anos. Esse método aplicado aos sistemas biológicos demonstra vantagens, sobretudo, por não haver necessidade de realizar tratamentos prévios nas amostras e além disso a técnica permite aplicação em uma larga faixa do espectro (luz visível, UV, IV, raio-x, micro-ondas).

Há mais de 30 anos, por exemplo, a espectroscopia fotoacústica já havia sido empregada por Neri (1986) em que por meio de medidas do sinal fotoacústico em função da frequência investigou mudanças na estrutura das folhas vegetais após aplicação de defensivos agrícolas. Com o uso dessa técnica, o autor realizou uma microscopia

¹ Ver Figura 15 no capítulo 3.

espectroscópica variando a frequência da fonte de luz, ou seja, ocasionou uma variação no comprimento de difusão térmica (μs) permitindo varrer a espessura de sua amostra.

Mais recentemente, diversas pesquisas investigaram diferentes atributos com o uso da espectroscopia fotoacústica. Pedrochi, (2004) determinou a umidade de grãos de milho. Freitas, (2009) acompanhou a evolução da ferrugem asiática na cultura da soja. Melo et al., (2010) identificou compostos no solo. Doreto, (2012) diferenciou espécies de plantas aquáticas. Monteiro, (2015) avaliou as propriedades térmicas de fibras fabricadas a partir da bananeira (*Musa ssp.*).

Especificamente na investigação de propriedades de materiais biológicos, é possível mencionar a aplicação da fotoacústica diretamente ao Homem por meio dos estudos de Castro, (2015) que mediu as mudanças estruturais da dentina cariada, de Moraes (2012) que avaliou a taxa de difusão de compostos fármacos em feridas cutâneas em ratos, de Barja (2012) que avaliou a absorção de luz solar na pele humana.

Na investigação de sistemas biológicos para a compreensão de possíveis interações entre ecossistemas e indivíduos, a espectroscopia fotoacústica apresenta aplicações, por exemplo, para avaliar a relação entre a dieta e composição química da cutícula em formigas (*Ectatomma brunneum* Smith) (BERNARDI, 2014), para verificar variações intraespecíficas entre formigas (*Ectatomma brunneum* Smith) por meio da caracterização do veneno (BERNARDI, 2017).

Mais ao campo próprio de estudo apresentado nessa dissertação, é possível destacar trabalhos que buscaram de alguma maneira realizar investigações por meio de material biológico ictiológico. Nesse sentido, o trabalho de Almeida (2012) aplicando a espectroscopia fotoacústica objetivou identificar diferenças entre 19 espécies de peixes através do estudo de escamas. Lima (2015) aplicou a técnica de espectroscopia fotoacústica em escamas para diferenciar populações de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* e Santana (2014) estudou a integridade ambiental de riachos aplicando espectroscopia fotoacústica em escamas de *Astyanax altiparanae* que são iguais às de *lacustris*.

2.5 Luminescência e eficiência quântica

Conforme explica Lakowicz (2006) a luminescência ocorre a partir dos estados eletronicamente excitados e pode ser compreendida como a emissão de luz em qualquer substância. Dessa maneira, quando as moléculas são excitadas, isso é, recebem energia, por exemplo, como radiação eletromagnética, os elétrons passam de um nível de energia fundamental para um nível excitado e ao retornarem ao seu estado fundamental podem emitir calor ou luz (luminescência) (HOLLER et al., 2009; SOTOMAYOR et al, 2008).

As substâncias fluoróforas admitem a luminescência por vários mecanismos com distinção no tempo de vida. As substâncias que emitem luz através do mecanismo de fluorescência apresentam tempo de vida próximo a 10 ns (10×10^{-9} s) enquanto que a fosforescência (ou luminescência persistente) em torno de 10^3 para 10 s. (LAKOWCIZ, 2006).

Os resultados de técnicas que fazem uso da luminescência são analisados por meio da interpretação de espectros, permitindo relacionar a intensidade da luz emitida em função do comprimento de onda (LOPES, 2014). Ternane salienta que a utilização da espectroscopia de fluorescência objetiva conhecer o comprimento de onda de emissão dos elementos estudados e podem ser aplicados a fins diversos, como por exemplo, na determinação da eficiência quântica de luminescência (TERNANE *et al.*, 2002; FENG *et al.*, 2011). Esse parâmetro é fundamental no processo de caracterização de um material que pretende-se utilizar em aplicações fotônicas.

A eficiência quântica do processo de fluorescência é definida por meio da relação do número de fótons emitidos em relação ao número de fótons absorvidos (MARCU, FRENCH e ELSON, 2015). O primeiro relato de eficiência quântica foi feito por Shore e Pardee, em 1956, oportunidade em que anunciaram a eficiência quântica dos aminoácidos triptofano (20%), tirosina (21%) e fenilalanina (4%) (CHEN, 1967). Nos anos seguintes diversos estudos continuaram a explorar a eficiência quântica destes e outros aminoácidos. Estes passaram a ser os mais descritos na literatura, e por vezes são relacionados aos diversos tipos de colágeno. Estudos mais recentes determinaram a eficiência quântica de triptofano (13%), tirosina (14%) e fenilalanina (2,4%), podendo ter desvios de acordo com comprimentos de onda de excitação e técnica de detecção (BEREZIN & ACHILEFU, 2010; GHISAIDOOBE & CHUNG, 2014).

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de coleta dos peixes

Os peixes utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa foram coletados no estado de Mato Grosso do Sul, em três diferentes bacias hidrográficas pertencentes à região hidrográfica do Paraguai e do Paraná, como mostrado na Figura 12.

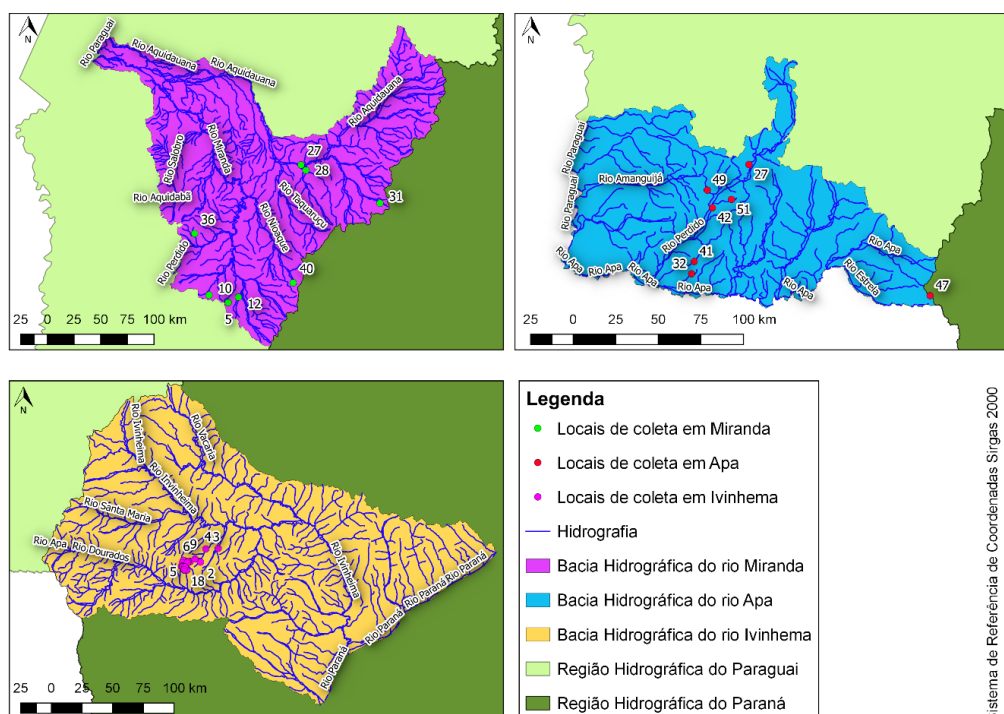


Figura 12. Localização das bacias hidrográficas dos rios Miranda, Apa e Ivinhema. Fonte. Próprio autor.

Da bacia hidrográfica do rio Miranda, foram coletados peixes nos riachos Areia, Rio Verde, Gardinha, Paxixi, Dois Irmãos, Canastrão, Queima Boca e Córrego das Moças. Já para a bacia hidrográfica do rio Apa foram coletados peixes em diferentes riachos, no entanto, apenas o Rio Perdido é identificado. Para a bacia do rio Ivinhema foram coletados peixes nos riachos Água Boa e Laranja Doce. O quadro abaixo apresenta os locais com seus respectivos códigos utilizados nesse trabalho.

Locais de coleta					
Bacia do Rio Miranda		Bacia do Rio Apa		Bacia do Rio Ivinhema	
Código	Nome do riacho	Código	Nome do Riacho	Código	Nome do Riacho
B05	Areia	Apa 27	Rio Perdido	AB	Água Boa
B10	Rio Verde	Apa 32	Sem identificação	LD	Laranja Doce
B12	Guardinha	Apa 42	Rio Perdido		
B27	Paxixi	Apa 47	Sem identificação		
B28	Dois Irmãos	Apa 49	Sem identificação		
B31	Canastrão				
B36	Queima Boca				
B40	Córrego das Moças				

Quadro 2. Discriminação das bacias hidrográficas dos riachos em que os peixes da espécie *Astyanax lacustris* foram coletados. Fonte. Próprio autor.

3.2 Coleta e preparo das escamas

Os peixes foram organizados conforme local de coleta, desta maneira, de cada riacho da bacia hidrográfica do rio Miranda e da bacia hidrográfica do rio Apa foram separados 03 indivíduos que tiveram seus tamanhos medidos. Posteriormente, de cada indivíduo foram retiradas 03 escamas da região umeral. Essas escamas foram higienizadas em água destilada, secas em papel toalha, medidas as espessuras e armazenadas entre lâminas de vidro. O quadro 3 exemplifica o esquema organizacional para as amostras.

Local	Indivíduo	Escama	Face
B05	01	001	Interna ou Externa
		002	Interna ou Externa
		003	Interna ou Externa
	02	001	Interna ou Externa
		002	Interna ou Externa
		003	Interna ou Externa
	03	001	Interna ou Externa
		002	Interna ou Externa
		003	Interna ou Externa

Quadro 3 - Esquemática para organização das amostras conforme local, indivíduo, escama e face interna e externa. Fonte. Próprio autor.

Para a bacia hidrográfica do rio Ivinhema, microbacias do riacho Água Boa e Laranja Doce, foram separados 10 indivíduos de cada riacho que foram submetidos a mesma sistemática anteriormente descrita.

3.3 Espectroscopia fotoacústica

As análises foram realizadas por meio da técnica de espectroscopia fotoacústica composta pelo seguinte aparato experimental: laser Verdi G Series (532 nm), amplificador lock-in Stanford Research Systems, model SR810 DSP, um osciloscópio Tektronix TDS 2022B, um chopper e uma célula fotoacústica MTEC-300. Nessa célula, uma janela permite a passagem da luz do laser e um microfone detecta a variação de pressão do gás gerado no interior da célula fotoacústica devido a geração de calor na amostra conforme Figura 13.

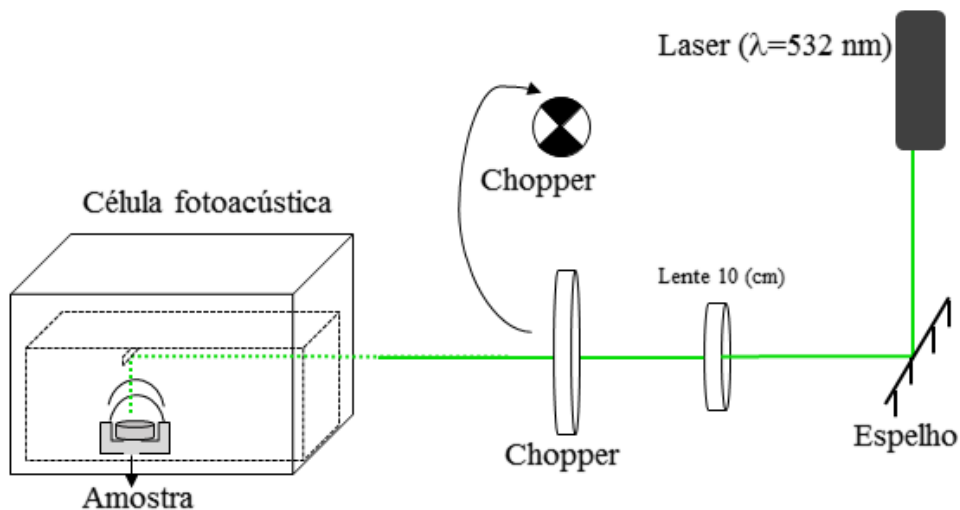


Figura 13. Exemplificação de aparato experimental utilizado para aquisição do sinal fotoacústico.
Fonte. Próprio autor.

Cada escama (amostra) foi inserida individualmente na célula fotoacústica considerando a posição da mesma em relação à incidência do laser. Foram feitas medidas a partir de 10 até 70 Hz. De 10 até 25 Hz, variou-se a frequência de modulação em passos de 5 Hz. A partir de 30 até 56 Hz a frequência de modulação obedeceu à variação de 2 Hz. Posteriormente em 60 Hz até atingir a frequência máxima de 70 Hz as variações voltaram a ser feitas a cada 5 Hz. As diferenças nas variações de frequências foram realizadas a fim de minimizar ruídos ao longo da faixa de frequências analisadas.

3.4 Análise paisagística.

Anteriormente à elaboração do Índice de Vegetação da Diferença Normalizada (NDVI) foi necessário delimitar as bacias hidrográficas. Para delimitação das bacias hidrográficas foi utilizada imagens de Modelo Digital de Elevação (MDE) disponíveis pelo projeto Topodata. O procedimento foi realizado no Software QGIS 2.18 por meio do algoritmo *Taudem*.

A vegetação possui uma assinatura espectral característica e quando está verde e sadia demonstra um contraste entre a região do visível, especificamente no vermelho, e do infravermelho próximo, e quanto maior for esse contraste, maior será o vigor da vegetação na área (Moreira, 2004)

Para a elaboração do Índice de Vegetação da Diferença Normalizada (NDVI) foram utilizadas as bandas 04 (RED - vermelho) e 05 (NIR – infravermelho próximo) das imagens de satélite LandSat8, resolução espacial de 30 metros, ano de 2016.

O procedimento operacional para obtenção desse índice foi executado no software QGIS 2.18 por meio do operador da Calculadora Raster conforme Rouse et al. (1973) utilizando a seguinte equação:

$$\text{NDVI} = (\text{NIR} - \text{RED}) / (\text{NIR} + \text{RED}) \quad (3)$$

Os valores de NDVI variam entre -1 e 1 de maneira que os valores mais próximo de 1 indicam maior quantidade de vegetação, enquanto valores mais próximos a -1 indicam menor quantidade de vegetação (PONZONI e SHIMABUKURO, 2007).

3.5 Extração da Hidroxiapatita e Colágeno

A fim de investigar a luminescência da hidroxiapatita e do colágeno foi necessário realizar a extração desses componentes das escamas. Portanto, foram utilizadas escamas de *Tilápia rendali* nos procedimentos de extração descritos abaixo.

A parte inorgânica referente à hidroxiapatita das escamas foram obtidas por meio do procedimento de calcinação nas temperaturas de 700, 900 e 1100°C, sendo utilizadas 20

g de escamas para cada temperatura. A calcinação foi realizada em uma mufla com rampa de aquecimento de 5°C/min permanecendo por 1h na temperatura de calcinação. Posteriormente as escamas foram trituradas com o auxílio de um pistilo em porcelana. Para cada temperatura espera-se um rendimento de ~ 30% de pó a partir do peso inicial.

Os procedimentos para a extração da parte orgânica referente ao colágeno das escamas foram realizados em triplicata, na temperatura de 4°C. As escamas (aproximadamente 5,0 g) foram secas e por 3 dias foram tratadas com 0,1 mol de NaOH (40 ml) para remover proteínas não colágenas e pigmentos, alterando a solução uma vez ao dia, depois foram lavadas com água destilada, secas e armazenadas a temperatura de -85°C até serem utilizadas. A matéria foi extraída com 0,5 mol de ácido acético (40 ml) durante 3 dias e após isso o extrato foi centrifugado por 30 minutos. Os sobrenadantes foram retirados e adicionados a NaCl (20 ml) até uma concentração final de 0,9 mol. A matéria resultante, foi obtida por centrifugação por 30 minutos e descalcificado com 4 ml de 0,05 mol Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,5 mol de EDTA-4Na durante 2 dias e depois foi desagregado com 4 ml de 0,1 mol de Tris-HCl (pH 8,0) contendo 0,5 mol de NaCl, 0,05 mol de EDTA-2Na e 0,2 mol de 2-mercaptoetanol (2-ME) por 3 dias. Após coletar as fibras de colágeno, o resíduo foi lavado com água destilada por 2 dias, mudando a água uma vez por dia. O resíduo obtido passou pelo processo de liofilização. O material liofilizado foi suspenso a 1 ml de 0,5 mol de ácido acético com 10% (p / p) de pepsina (EC 3.4.23.1; 2x cristalizada, 3085 U mg⁻¹) Sigma, este processo foi mantido na temperatura de 4°C por 24 h. O colágeno solubilizado com pepsina foi centrifugado por 30 minutos, o sobrenadante foi dialisado com 4 ml de Na₂HPO₄ 0,02 mol (pH 7,2) por 3 dias, mudando a solução uma vez por dia. O precipitado resultante foi obtido por centrifugação durante 30 minutos e dissolvido em 0,5 mol de ácido acético (1ml), adicionando NaCl a um final de concentração de 0,9 mol. Seguida pela precipitação do colágeno pela adição de uma concentração final de 2,4 mol NaCl (0,8ml) a pH neutro. O precipitado resultante foi obtido por centrifugação durante 30 minutos, dissolvido em 0,5 mol de ácido acético (1ml) e depois liofilizado (NAGAI *et al.*, 2004).

3.6 Espectroscopia de excitação-emissão

As medidas de excitação e emissão foram realizadas para permitir conhecer a faixa espectral de absorção e emissão das amostras. Além disso, o mapa de excitação-emissão como produto oriundo desse procedimento permitiu selecionar uma faixa de excitação para a luminescência, conforme apresentado na seção 4.8.

Para realizar a análise de fluorescência foram utilizadas escamas de Tilápia (*Tilapia rendalli*) que tiveram o colágeno e hidroxiapatita extraídos e mantidos em pó. As amostras foram colocadas individualmente em um recipiente próprio que foi inserido no suporte do aparato do Fluorímetro Perkin Elmer LS 55. Para obter os espectros e o mapa de excitação-emissão das amostras de colágeno e hidroxiapatita em pó foram utilizados os parâmetros listados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros configurados para obtenção dos espectros e dos mapas de excitação-emissão das amostras de colágeno e hidroxiapatita extraídas das escamas de Tilápia. Fonte. Próprio autor.

Amostra	Comprimento de onda de excitação (nm)	Comprimento de onda de emissão (nm)	Filtro	Fenda (nm)
Colágeno	200 - 500	350-700	350 nm	5
Hidroxiapatita	200 - 500	350-700	Ausente	10* 3**

*excitação; **emissão.

3.7 Espectroscopia fotoacústica de luminescência do colágeno

Nessa fase o objetivo foi obter o espectro fotoacústico de duas amostras, uma de colágeno e outra de carvão. Também foi obtido o espectro de luminescência da amostra de colágeno.

Para gerar o sinal fotoacústico das amostras de carvão e do colágeno foi utilizada uma lâmpada de Xenônio (X_e) acoplada ao monocromador IHR 320, configurado para a grade de 500 mm, com intervalo de 300 a 450 nm. Cada amostra foi inserida individualmente na célula fotoacústica. A Figura 17 apresenta a montagem experimental.

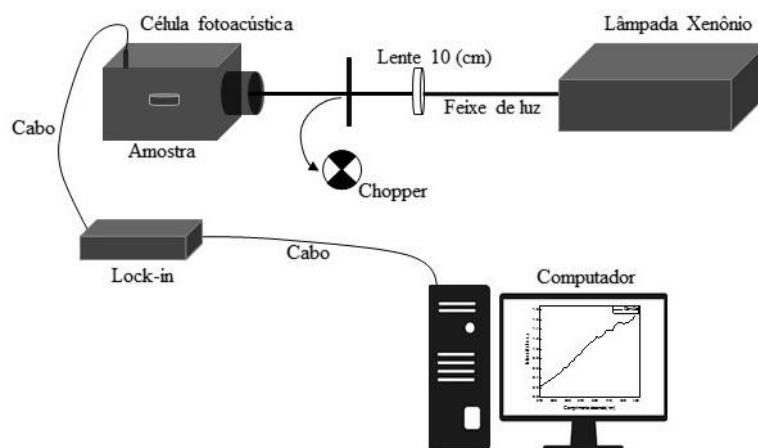


Figura 17. Exemplificação do aparato experimental utilizado para obtenção do sinal fotoacústico das amostras de carvão e de colágeno Tipo I oriundo das escamas de Tilápia. Fonte. Próprio autor.

Afim de obter o sinal de luminescência da amostra de colágeno tipo I, utilizamos como fonte de excitação uma lâmpada de Xenônio (X_e) acoplada em um monocromador (Newport Cornerstone 260) com rede de difração de 500 mm.

A amostra foi posicionada no interior da célula fotoacústica para receber a emissão de luz da lâmpada de Xenônio. Com a lâmpada acoplada ao monocromador, foi estabelecido o intervalo espectral de excitação de 320 a 450 nm. A fluorescência foi capturada por uma fibra óptica, posicionada próxima à janela da célula fotoacústica sem haver interrupção do feixe de luz incidente e direcionada à um espectrômetro e então os dados foram armazenados por um software no computador. A faixa de 320 a 450 nm obedeceu um intervalo de 10 nm, de maneira que registramos a intensidade do sinal de luminescência para cada intervalo. A Figura 18 demonstra o aparato experimental.

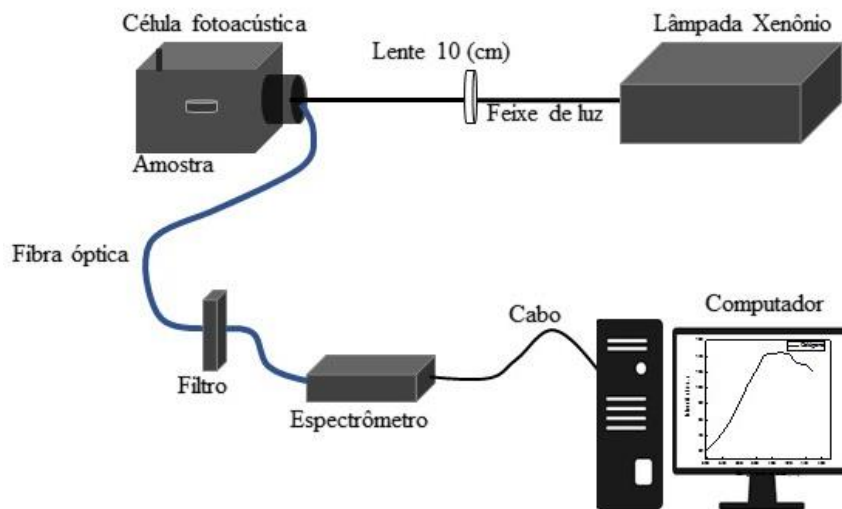


Figura 18. Aparato experimental utilizado para capturar a luminescência da amostra de colágeno Tipo I oriunda de escamas de Tilápia. Fonte. Próprio autor.

Posteriormente, o espectro do sinal fotoacústico do colágeno foi normalizado pelo espectro fotoacústico do carvão, gerando um espectro de absorção. Após isso, para a faixa de 320 a 450 nm com intervalos de 10 nm foi feita uma normalização do espectro de absorção do colágeno pelo espectro da intensidade de luminescência, para determinar a eficiência quântica de luminescência da amostra.

3.8 Determinação da eficiência quântica de luminescência

Para determinar o parâmetro de eficiência quântica de luminescência utilizamos o procedimento de Muñoz, Tocho e Cussó (1998). Os autores consideram que a razão entre o sinal fotoacústico e a luminescência exibe uma dependência linear com o comprimento de onda de excitação, podendo então ser calculada por meio da seguinte equação:

$$\frac{SFA}{LUM} = C \left[1 - \eta \frac{\lambda_{exc}}{\langle \lambda_{em} \rangle} \right]$$

(4)

sendo que SFA é o sinal fotoacústico, LUM é o sinal de luminescência, C é uma constante, η é a eficiência quântica de luminescência, λ_{exc} é o comprimento de excitação, e $\langle \lambda_{em} \rangle$ é o comprimento médio de emissão.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espectroscopia fotoacústica

Na teoria de Rosencwaig e Gersho (1976), ao passo que se aumenta a frequência de modulação da luz, conforme foi feito, o material passa do regime termicamente fino ($l < \mu_s$) – em que o calor se transmite significativamente através da amostra, para o regime termicamente grosso ($l > \mu_s$) – em que o calor não se transmite significativamente através da amostra (SILVA, 2006). Assim, a medida que se aumenta a frequência de modulação, o sinal fotoacústico apresenta uma diminuição, como demonstrado na Figura 19.

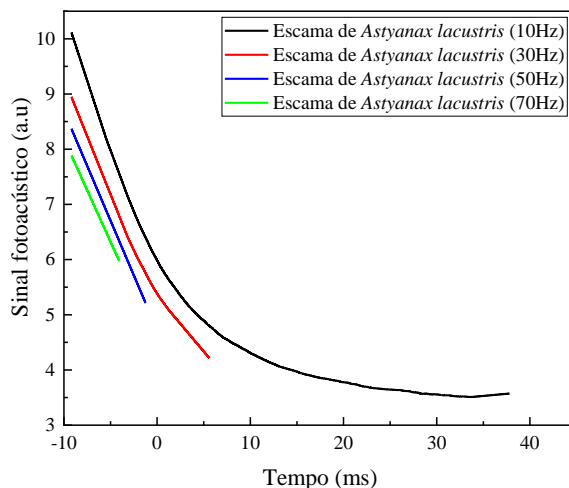


Figura 19. Sinal fotoacústico de escama de *Astyanax lacustris* para diferentes frequências de modulação do laser. Fonte. Próprio autor.

A Figura 20 mostra a curva experimental obtida com 10 Hz de frequência para uma das amostras de escama analisada neste trabalho. Após o ajuste (com uma equação

arbitrária que seja capaz de fornecer a amplitude do sinal transiente) a amplitude do sinal fotoacústico para essa frequência foi obtido.

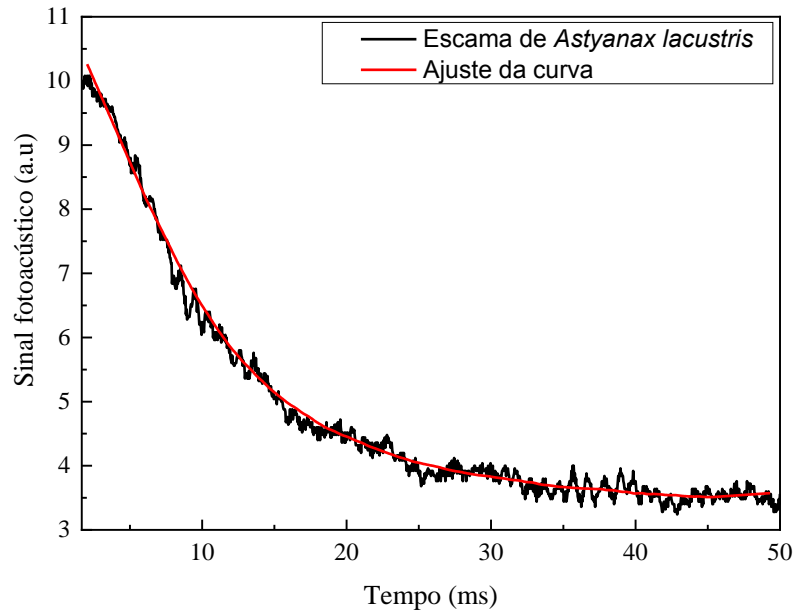


Figura 20 – Sinal Fotoacústico da face interna da escama de *Astyanax lacustris* coletado na bacia hidrográfica do rio Miranda, para frequência de 10Hz. Fonte. Próprio autor.

Após realizar os ajustes e obter os valores das amplitudes para os dados de cada frequência é possível visualizar a relação entre o sinal fotoacústico e a frequência, como apresentado na Figura 21. Sendo assim, obtivemos um gráfico no qual é possível visualizar o ponto de mudança de linearidade do sinal fotoacústico, ou seja, a frequência característica da amostra, momento em que admite-se $l/\mu_s = 1$ (mudança de regime térmico do fino para o grosso em uma amostra opticamente transparente). Uma vez conhecida a frequência característica e a espessura das escamas é possível calcular a difusividade térmica de cada escama por meio da equação (1).

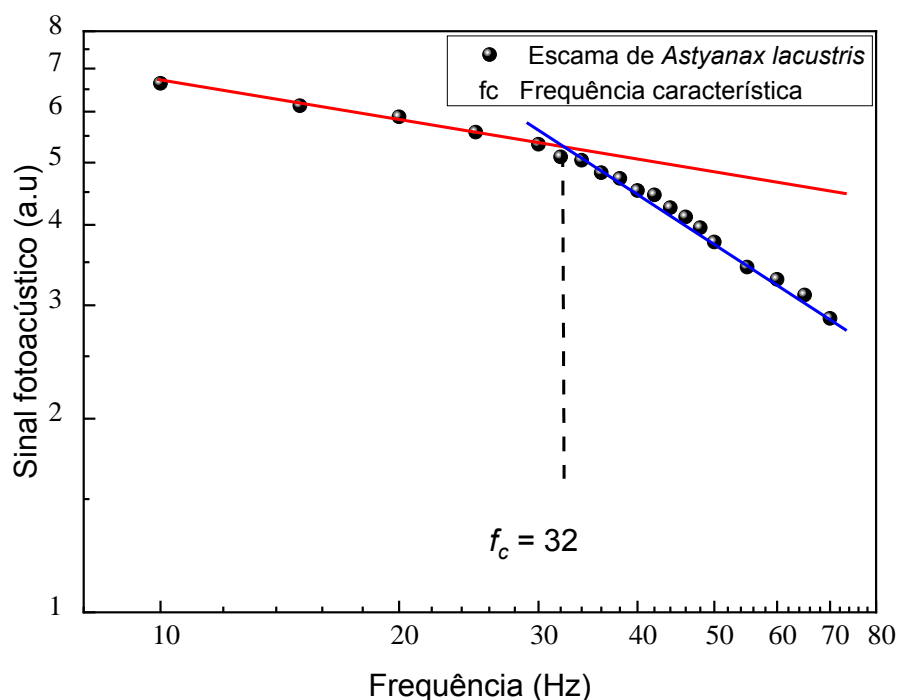


Figura 21 – Sinal fotoacústico da face externa da escama de *Astyanax lacustris* coletado na bacia hidrográfica do rio Miranda. Destaque para quebra de linearidade no sinal ao qual é determinado a frequência característica. Biota 28, indivíduo 02, escama 001. Fonte. Próprio autor.

4.2 Faces interna e externa das escamas

Primeiramente, realizamos medidas para verificar a difusividade térmica das faces interna (maior ocorrência de colágeno) e externa (maior ocorrência de hidroxiapatita) de escamas. Para isto, utilizamos escamas de peixes (*Astyanax lacustris*) coletados na bacia hidrográfica do rio Miranda. Organizamos os dados para investigar se havia diferença nos valores de difusividade térmica das escamas entre os indivíduos coletados no mesmo riacho. Entre os 24 peixes, apenas um peixe (indivíduo 1) coletado no riacho B12 (Guardinha) demonstrou diferença para o valor de difusividade térmica entre as faces interna $(2,9 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ e externa $(2,3 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ conforme demonstrado na Figura 22. Para os demais indivíduos (23 peixes, 69 escamas) não ocorreu diferença significativa entre os valores de difusividade térmica para as faces. Além disso, observamos um padrão em que todas as escamas apresentaram valores de difusividade térmica levemente maior para a face interna.

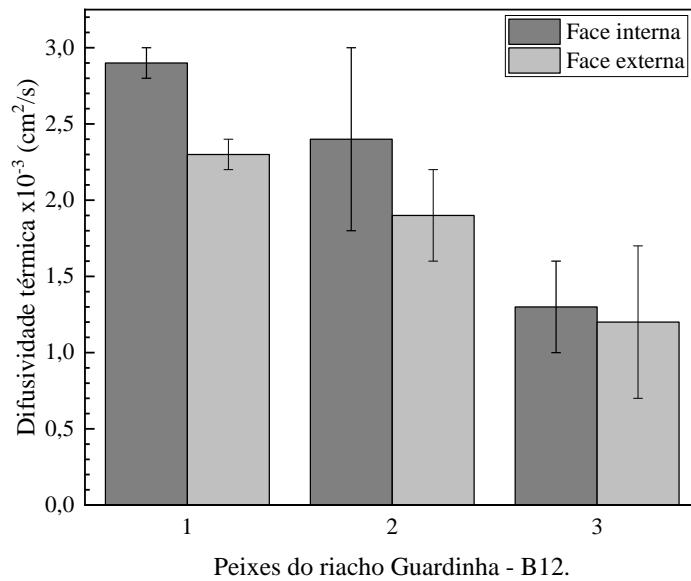


Figura 22. Comparação dos valores de difusividade térmica das faces interna e externa das escamas de três peixes coletados na bacia hidrográfica do rio Miranda. Fonte. Próprio autor.

Entre todos os peixes da bacia hidrográfica do rio Miranda, os valores de difusividade térmica para a face interna das escamas variaram de $(1,0 \pm 0,7) \times 10^{-3}$ a $(5,0 \pm 0,8) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$. Para a face externa, o valor de difusividade térmica variou de $(1,0 \pm 0,6) \times 10^{-3}$ a $(4,7 \pm 0,9) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$. Após isto, calculamos os valores médios de difusividade térmica para cada uma das faces. Os valores médios foram de $(1,8 \pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ para a face interna e de $(1,7 \pm 0,6) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ para a externa como é possível visualizar na Figura 23.

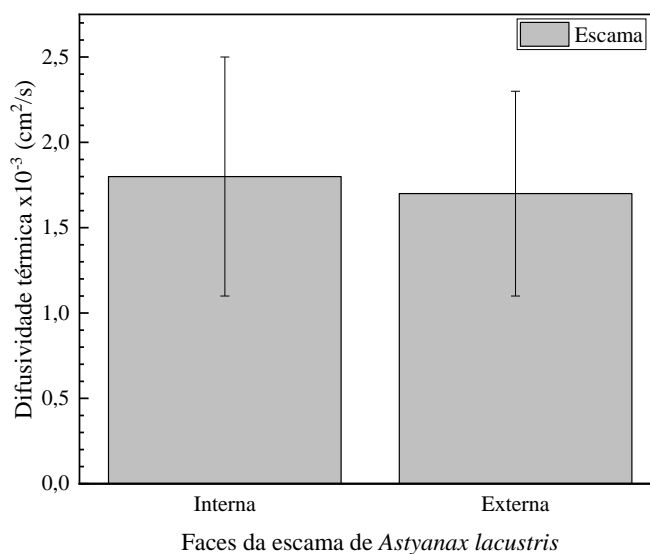


Figura 23. Valores de difusividade térmica para faces das escamas de *Astyanax lacustris* coletados nos riachos da bacia hidrográfica do rio Miranda. Fonte. Próprio autor.

Embora as faces das escamas apresentem uma composição distinta, essa diferença entre colágeno e hidroxiapatita dispostas nas escamas não foi suficiente para expressar diferença significativa nos valores de difusividade térmica quando verificada uma população amostral. A ausência de diferença entre as faces das escamas pode ser explicada pela condição limite que dá origem a possibilidade de determinar a difusividade térmica por meio da frequência característica de modulação. Como já mencionado nas seções anteriores, para uma amostra em regime óptico de transparência, quando essa passa do regime termicamente fino para o grosso, temos que $l/\mu_s = 1$, de acordo com a teoria de Rosencwaig e Gersho. Sendo assim, é evidente que a frequência característica, da qual depende o método para determinação de D , é sempre obtida quando $\mu_s = l$, condição na qual todo calor gerado na amostra contribui para o sinal fotoacústico, e que independe da face do material a qual está exposta a luz incidente.

4.3 Miranda

Na bacia hidrográfica do rio Miranda foram coletados 21 peixes de 7 riachos. Os dados apresentados na Figura 24 demonstram os valores médios de difusividade térmica das escamas dos peixes coletados nestes riachos.

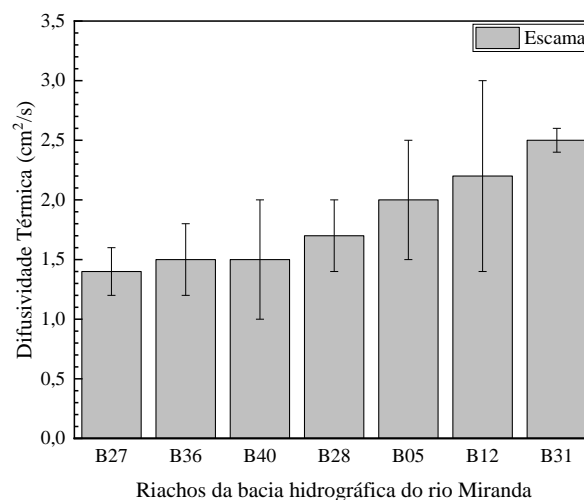


Figura 24. Valores de difusividade térmica para escamas de *Astyanax lacustris* coletados nos riachos da bacia hidrográfica do rio Miranda. Fonte. Próprio autor.

Os valores médios de difusividade térmica das escamas de peixes agrupados conforme locais de coleta variaram de $(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ a $(2,5 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$. O valor médio foi de $(1,8 \pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$. Apresentou diferença significativa o riacho B31 em relação aos riachos B27, B36, B40 e B28. A discussão sobre a relação entre a difusividade térmica e os parâmetros ambientais para buscar explicar as diferenças ocorridas aqui são apresentadas nas seções seguintes referentes ao NDVI, oxigênio e condutividade térmica.

4.3.1 Difusividade térmica e Análise paisagística

Os valores de difusividade térmica foram relacionados aos valores de Índice de Vegetação da Diferença Normalizada (NDVI) para verificar possível relação. Após o geoprocessamento dos dados o resultado é expresso em um mapa, exemplificado pela Figura 25.

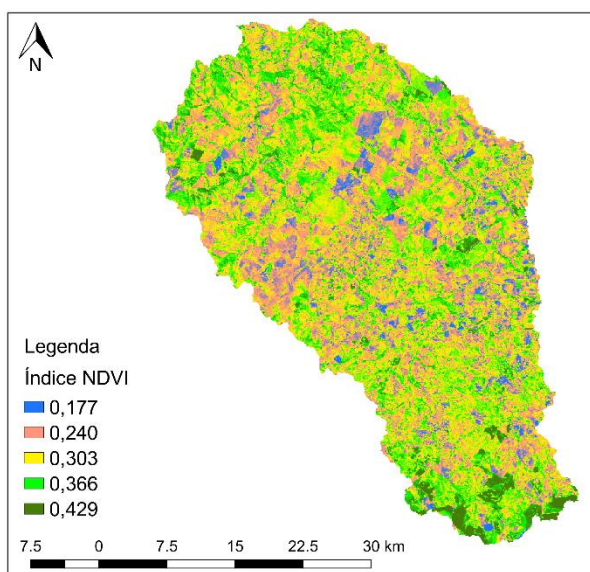


Figura 25. Mapa do NDVI da microbacia hidrográfica do riacho Dois Irmãos (B28) exemplificando produto cartográfico gerado para todas as microbacias da bacia hidrográfica do Rio Miranda. Fonte. Próprio autor.

Além da expressão em mapa, os valores de NDVI podem ser categorizados em classes numéricas, como mostrado na Tabela 2, de maneira que valores mais próximos de 1 indicam maior quantidade de vegetação, enquanto valores mais próximos a -1 indicam menor quantidade de vegetação (PONZONI e SHIMABUKURO, 2007).

Tabela 2. Valores de NDVI para a microbacia hidrográfica do riacho Dois Irmãos, bacia hidrográfica do rio Miranda. Exemplificação de valores de NDVI gerado para todas as microbacias da bacia hidrográfica do Rio Miranda. Fonte. Próprio autor.

Microbacia hidrográfica	NDVI
	0.177
	0.240
B28 – Riacho Dois Irmãos	0.303
	0.366
	0.429
Média	0.303

Para o agrupamento de dados conforme os riachos da bacia hidrográfica do rio Miranda, os valores médios do índice NDVI variaram de $(0,30 \pm 0,09)$ a $(0,51 \pm 0,07)$. Com respeito a distinção de locais, os dados demonstram haver diferença do riacho B40 em relação aos riachos B27, B36, B28 e B31, como visto na Figura 26.

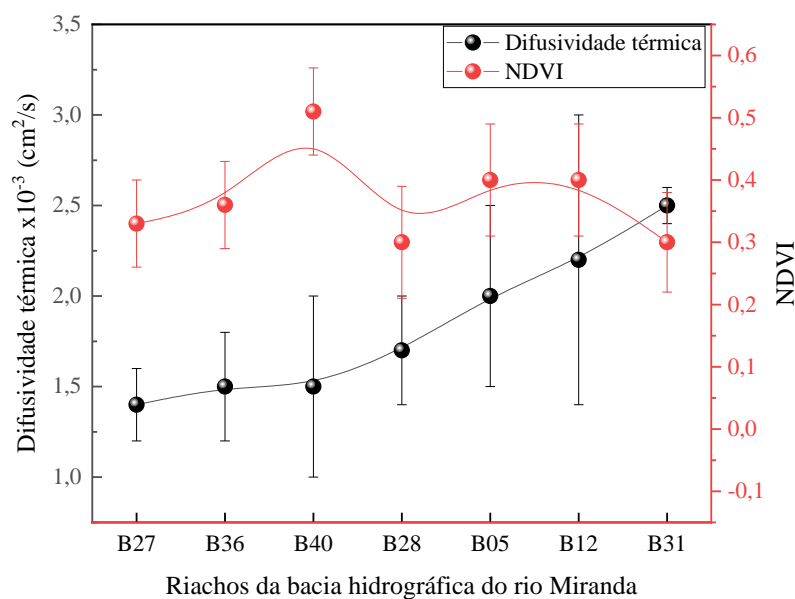


Figura 26. Valores de difusividade térmica e de índice NDVI dos riachos da bacia hidrográfica do rio Miranda. Fonte. Próprio autor.

Os riachos desta bacia hidrográfica, locais de coleta dos peixes, estão bem distribuídos na bacia hidrográfica, além disso, estão localizados em sub-bacias hidrográficas distintas. A diferença geográfica também pode ser destacada pelo NDVI e a difusividade térmica quando se observa o riacho B31 em relação ao B40 por serem diferentes nestes indicadores. Considerando a distribuição espacial, Almeida et al. (2012) descreveu que peixes da mesma espécie, porém de locais heterogêneos, podem apresentar

diferenças na composição química de escamas devido à alimentação o que poderia gerar uma resposta diferente em relação à difusividade térmica, uma vez que esse parâmetro depende da densidade do material. No entanto, esse trabalho não utilizou métodos para identificação dos elementos químicos presentes nas escamas ou da alimentação dos peixes.

Embora tenha ocorrido diferença no NDVI, o comportamento geral deste indicador ambiental não permite relacionar que microbacias hidrográficas à nível de riachos, que apresentam maior índice de vegetação, estejam diretamente ligadas a maiores ou menores valores de difusividade térmica em escamas de peixes. De fato, observando a Figura 26 é possível observar comportamentos distintos para esses dois parâmetros, uma vez que o NDVI indica um comportamento quase que constante, enquanto a difusividade térmica apresenta um comportamento ascendente para a sequência de locais arranjada no gráfico.

Sendo assim, não é possível estabelecer o NDVI como variável ambiental para explicar os valores de difusividade térmica de escamas de *Astyanax lacustris* a nível de comparação entre riachos da bacia hidrográfica do rio Miranda. O valor médio de NDVI foi de $(0,37 \pm 0,07)$ para a bacia hidrográfica do rio Miranda.

4.3.2 Parâmetros de qualidade de água

A fim de verificar se outros parâmetros ambientais podem apresentar uma resposta relacionada ao comportamento da difusividade térmica avaliamos dados referentes ao oxigênio dissolvido e condutividade da água dos riachos. A Figura 27 mostra os valores de difusividade térmica e de oxigênio dissolvido na água para os riachos da bacia hidrográfica do rio Miranda. O riacho B05 apresentou o menor valor de oxigênio dissolvido (6,14 mg/L) enquanto o maior foi de 8,6 mg/L para o riacho B27. Para os valores de oxigênio dissolvido, fica evidente a ausência de uma relação determinante para o estabelecimento dessa variável como um indicador relacionado diretamente à difusividade térmica das escamas. Isso é evidenciado pelo fato de que o riacho B27 apresentou o maior valor de oxigênio dissolvido 8,6 mg/L e o menor valor de difusividade térmica. Por outro lado, o riacho B31 tem um valor muito próximo para oxigênio dissolvido (8,5 mg/L) enquanto o valor de difusividade térmica é o mais elevado em comparação entre os riachos. É possível

notar que todos os riachos da bacia do Miranda analisados nesse trabalho apresentam níveis de oxigênio sugeridos para águas de classe I (Quadro 1).

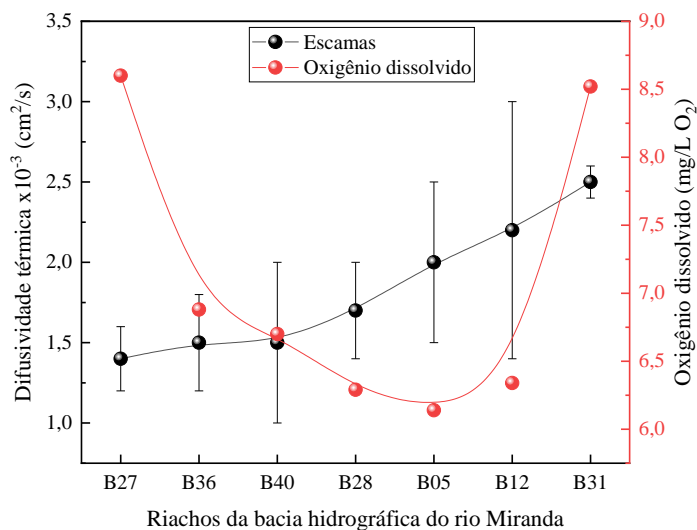


Figura 27. Difusividade térmica de escamas de *Astyanax lacustris* em relação ao oxigênio dissolvido dos riachos da bacia hidrográfica do rio Miranda. Fonte. Próprio autor.

A condutividade elétrica da água é outro parâmetro que exprime a qualidade ambiental em corpos hídricos. A Figura 28 mostra os valores de difusividade térmica e de condutividade elétrica da água para os riachos da bacia hidrográfica do rio Miranda.

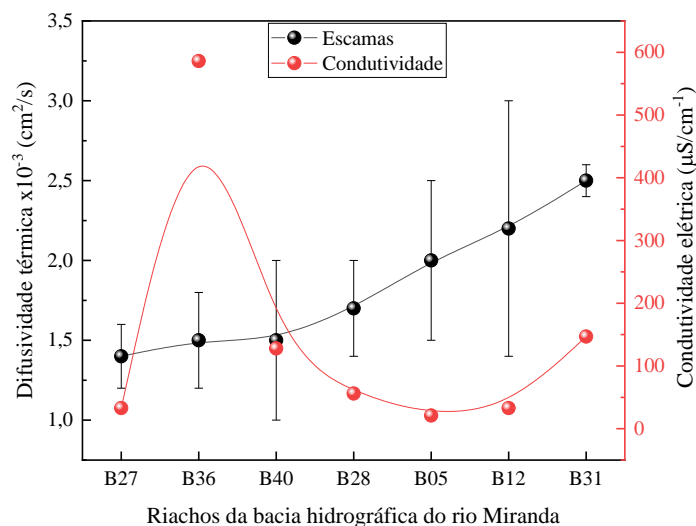


Figura 28. Difusividade térmica de escamas de *Astyanax lacustris* em relação à condutividade elétrica dos riachos da bacia hidrográfica do rio Miranda. Fonte. Próprio autor.

O riacho B05 apresentou o menor valor de condutividade ($21 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$) enquanto o maior, foi identificado no riacho B36 ($586 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$). Para locais como os riachos B36 e

B40 que apresentaram para as escamas dos indivíduos valores iguais de difusividade térmica $(1,5 \pm 0,8) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ não foi possível identificar um comportamento similar em relação a condutividade elétrica. De fato, foram bem diferentes, respectivamente $586 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ e $128 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$, uma diferença de $458 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$.

Enquanto é possível organizar as respostas de difusividade térmica de forma crescente, os respectivos dados de condutividade elétrica da água não apresentaram um comportamento que seja capaz de demonstrar uma relação entre indicadores a nível de riachos dispostos na bacia hidrográfica do Miranda. Sendo assim, esse parâmetro também não foi capaz de demonstrar relação com os dados de difusividade térmica das escamas dos peixes ali coletados.

4.4 Apa

Os dados apresentados neste tópico consideraram 5 riachos e 15 peixes coletados na bacia hidrográfica do rio Apa. A Figura 29 demonstra os valores médios de difusividade térmica das escamas dos peixes coletados nestes riachos.

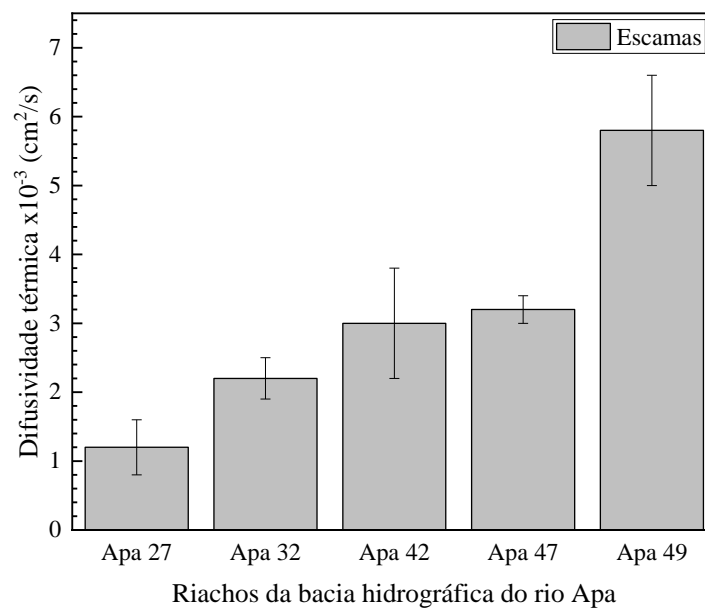


Figura 29. Difusividade térmica de escamas de *Astyanax lacustris* coletados em 05 riachos pertencentes à bacia hidrográfica do rio Apa. Fonte. Próprio autor.

Os valores médios de difusividade térmica das escamas variaram de $(1,2 \pm 0,4) \times 10^{-3}$ a $(5,8 \pm 0,8) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$. O valor médio foi de $(3,1 \pm 1,5) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$. Os valores de difusividade térmica das escamas dos peixes coletados nos riachos apresentaram diferença em relação ao local de coleta. Foram diferentes entre si os riachos Apa 27, Apa 32, Apa 47 e Apa 49. A diferença na difusividade térmica das escamas dos peixes deve ser entendida como uma condição genética dos peixes. Desta maneira, supõe-se que as escamas podem apresentar composição química distinta devido ao local de coleta e sobretudo à dieta alimentar (ALMEIDA et al. 2012).

A Figura 30 apresenta os valores médios de difusividade térmica e de NDVI para os riachos, sendo que o NDVI variou de $(0,36 \pm 0,13)$ a $(0,38 \pm 0,09)$ enquanto que a média foi de $(0,37 \pm 0,01)$. Embora ocorra diferença entre os valores de difusividade térmica das escamas dos peixes coletados em diferentes locais, o índice NDVI não foi capaz de demonstrar algum comportamento que justifique essa diferença, pois permaneceu praticamente igual em todos os riachos. Essa ausência de mudança no NDVI demonstra que as microbacias apresentam uma dinâmica paisagística semelhante. Essas observações nos levam a acreditar que o estado de conservação da paisagem não pode ser substituído pela variável de difusividade térmica com o intuito de indicar a conservação do ambiente.

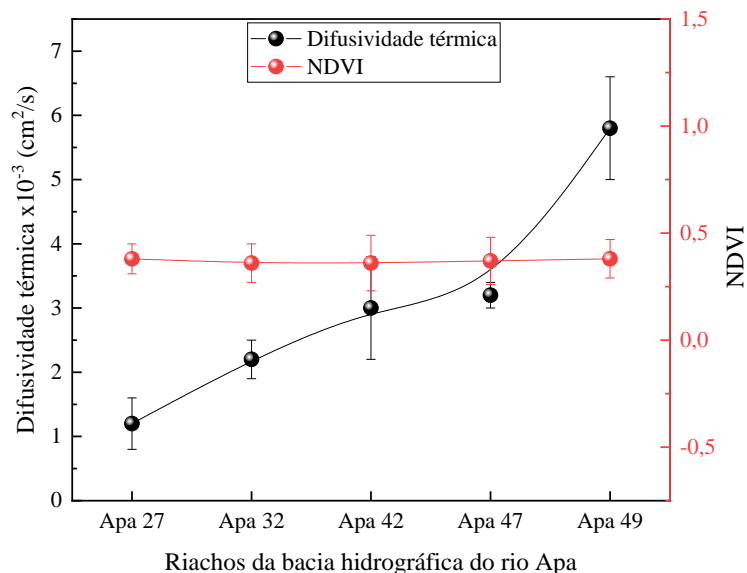


Figura 30. Difusividade térmica das escamas dos peixes coletados em diferentes riachos da bacia hidrográfica do rio Apa em relação ao Índice NDVI. Fonte. Próprio autor.

4.4.1 Parâmetros de qualidade de água

Para os riachos da bacia hidrográfica do rio Apa, os valores de difusividade térmica e oxigênio dissolvido na água estão expressos na Figura 31. Podemos observar que o riacho Apa 32 apresentou o menor valor de oxigênio dissolvido (5,41 mg/L) enquanto o maior foi de 6,61 mg/L para o riacho Apa 42. O riacho Apa 27 foi o local em que as escamas apresentaram a menor difusividade térmica ($1,2 \pm 0,4$) $\times 10^{-3}$ cm^2/s) e teve um valor intermediário de oxigênio dissolvido (6,18 mg/L). O valor mais baixo para oxigênio dissolvido (5,41 mg/L) foi visto no riacho Apa 32 que tem valor de difusividade térmica maior que o Apa 27. Enquanto os locais Apa 42, 47 e 49 demonstraram estabilidade em 6,6 mg/L de oxigênio dissolvido na água, a difusividade térmica demonstrou uma variação maior, na verdade, o valor de difusividade térmica dobrou se compararmos os locais Apa 42 e Apa 49. Sendo assim, enquanto riachos diferentes podem apresentar valores de oxigênio dissolvido muito próximos devido às características ambientais, os valores de difusividade térmica não necessariamente seguem essa tendência. Desta forma, pontuamos que entre os riachos da bacia hidrográfica do rio Apa, não se pode prever níveis de conservação ambiental por meio da observação ou relação direta de difusividade térmica e oxigênio dissolvido na água.

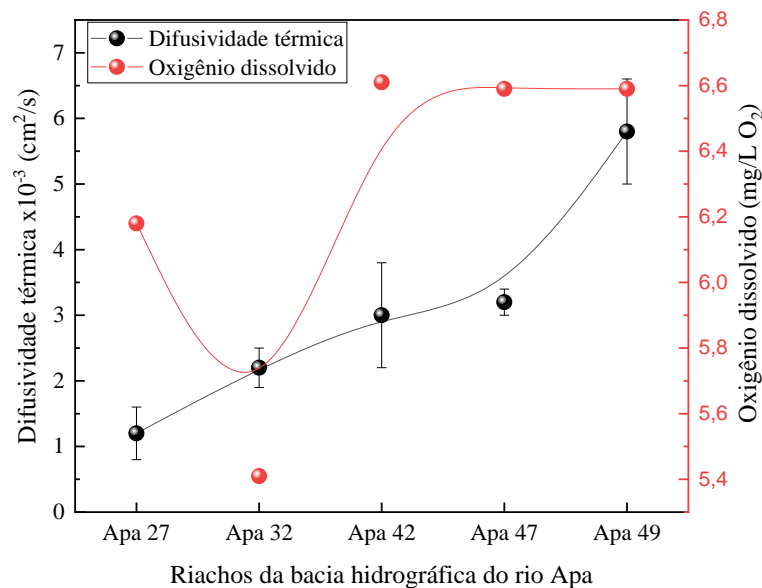


Figura 31. Difusividade térmica de escamas de *Astyanax lacustris* em relação ao oxigênio dissolvido dos riachos da bacia hidrográfica do rio Apa. Fonte. Próprio autor.

Para a condutividade elétrica da água os dados estão apresentados na Figura 32. Ali podemos observar que entre os riachos, o Apa 32 apresentou o menor valor de condutividade ($30 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$) enquanto o maior, foi identificado no riacho Apa 49 ($587 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$). A condutividade elétrica da água apresentou variação entre os locais, ficando na maioria destes acima de $100 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$. Embora graficamente seja perceptível visualizar que os valores de condutividade aumentaram, sobretudo, se compararmos os locais Apa 27 ($48 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$) e Apa 49 ($587 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$), também é importante salientar que os valores apresentam oscilações, ou seja, ora estão mais elevados, ora estão menos elevados em relação à difusividade térmica. Contudo, considerando a ordem de apresentação dos dados de difusividade térmica, observamos que para estes há uma classificação crescente e que quando comparados com os dados de condutividade elétrica parece haver uma relação entre eles, uma vez que a condutividade também apresenta um comportamento crescente.

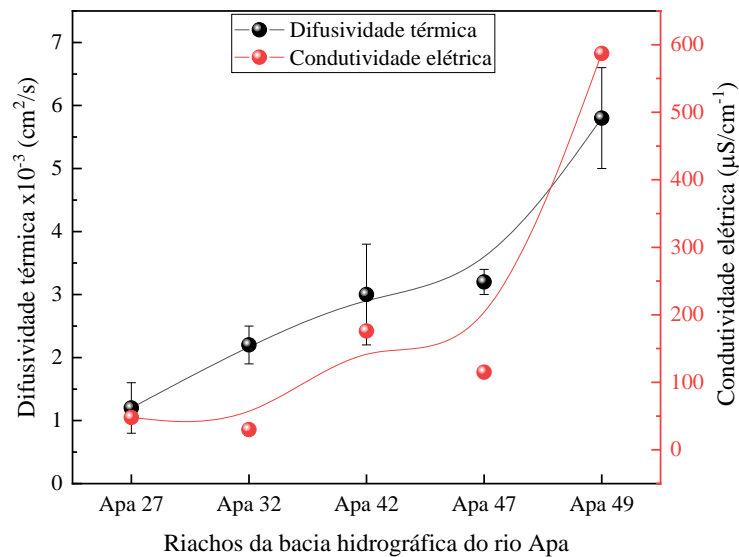


Figura 32. Difusividade térmica de escamas de *Astyanax lacustris* em relação à condutividade elétrica dos riachos da bacia hidrográfica do rio Apa. Fonte. Próprio autor.

4.5 Ivinhema

Aqui são apresentados os resultados referentes as análises das escamas de 20 peixes (*Astyanax lacustris*) coletados em 2 riachos da bacia hidrográfica do rio Ivinhema, o riacho

Água Boa e Laranja Doce. A Figura 33 demonstra os valores médios de difusividade térmica das escamas dos peixes em função dos locais de coletada.

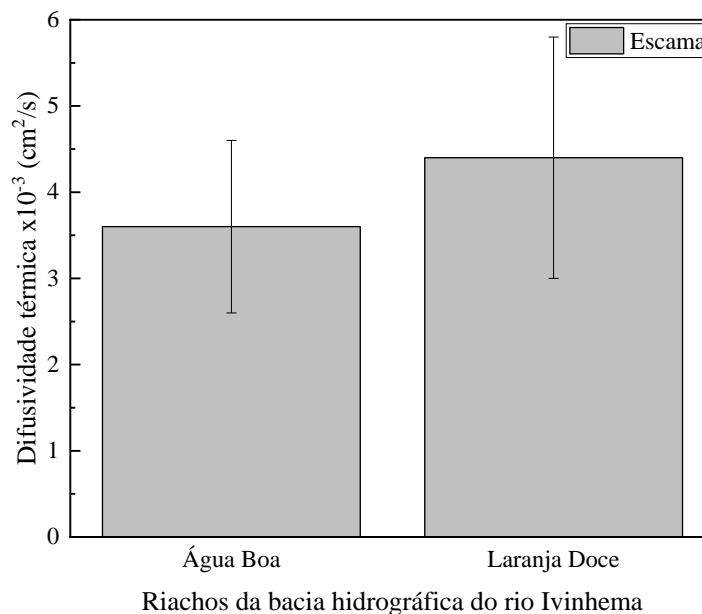


Figura 33. Difusividade térmica média de escamas de *Astyanax lacustris* coletados nos riachos Água Boa e Laranja Doce. Fonte. Próprio autor.

Os valores médios de difusividade térmica das escamas dos indivíduos coletados na bacia hidrográfica do Ivinhema, variaram de acordo com o local de coleta de $(3,6 \pm 1,0) \times 10^{-3}$ a $(4,4 \pm 1,4) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$. O valor médio calculado da difusividade térmica para as escamas dos peixes oriundos dos riachos Água Boa e Laranja Doce, pertencentes à bacia hidrográfica do rio Ivinhema foi de $(3,7 \pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Os valores médios de NDVI para os riachos Água Boa e Laranja Doce foram iguais $(0,35 \pm 0,02)$, consequentemente a média foi de $(0,35 \pm 0,00)$. Entre esses dois riachos não ocorreu diferença significativa para os valores de difusividade térmica das escamas dos peixes e o índice NDVI também não apresentou diferença entre as duas microbacias hidrográficas como é possível visualizar na Figura 34. Portanto, para estes dois locais, primariamente é possível dizer que há uma concordância entre os dados de difusividade térmica e NDVI.

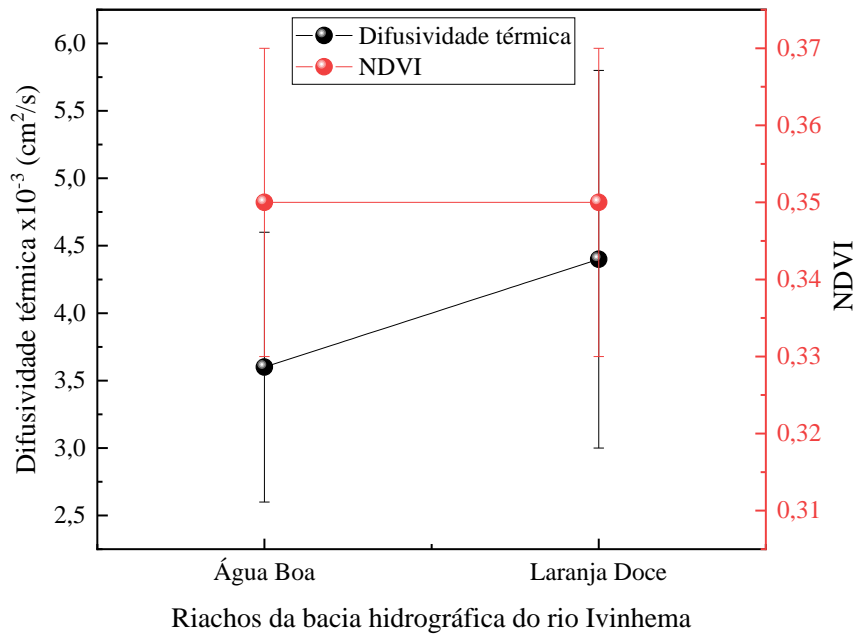


Figura 34. Difusividade térmica das escamas dos peixes coletados em diferentes riachos da bacia hidrográfica do rio Ivinhema em relação ao Índice NDVI. Fonte. Próprio autor.

A uniformidade para os dados de NDVI ocorre pelo fato das duas microbacias hidrográficas estarem localizadas no mesmo município e por terem sido submetidas à mesma sistemática de uso e ocupação do solo. Nessas condições é comum que unidades hídricas experimentem processos de alteração do solo com mudanças do aspecto natural para o antropizado urbano ou rural. Por esse motivo é possível destacar que a microbacia do riacho Laranja Doce apresenta cerca de 78% de sua área ocupada por atividade antrópica de origem urbana ou rural (SOARES FILHO, COMUNELLO, SOARES, 2009) e a microbacia hidrográfica do córrego Água Boa tem aproximadamente 85% de sua área ocupada por atividades antrópicas (PEREIRA, 2007) justificando assim, a equidade ocorrida no NDVI.

4.5.1 Parâmetros de qualidade de água

A Figura 35 apresenta os resultados para a difusividade térmica e os parâmetros ambientais para os riachos Água Boa e Laranja Doce. O riacho Água Boa apresenta menor valor de oxigênio dissolvido (5,4 mg/L O₂) e um maior valor de condutividade da água (342 μS/cm⁻¹) em relação ao riacho Laranja Doce que respectivamente apresenta valores

de 6,9 mg/L e 161 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$. O valor de difusividade térmica das escamas dos peixes coletados nesses riachos pode ser considerado igual.

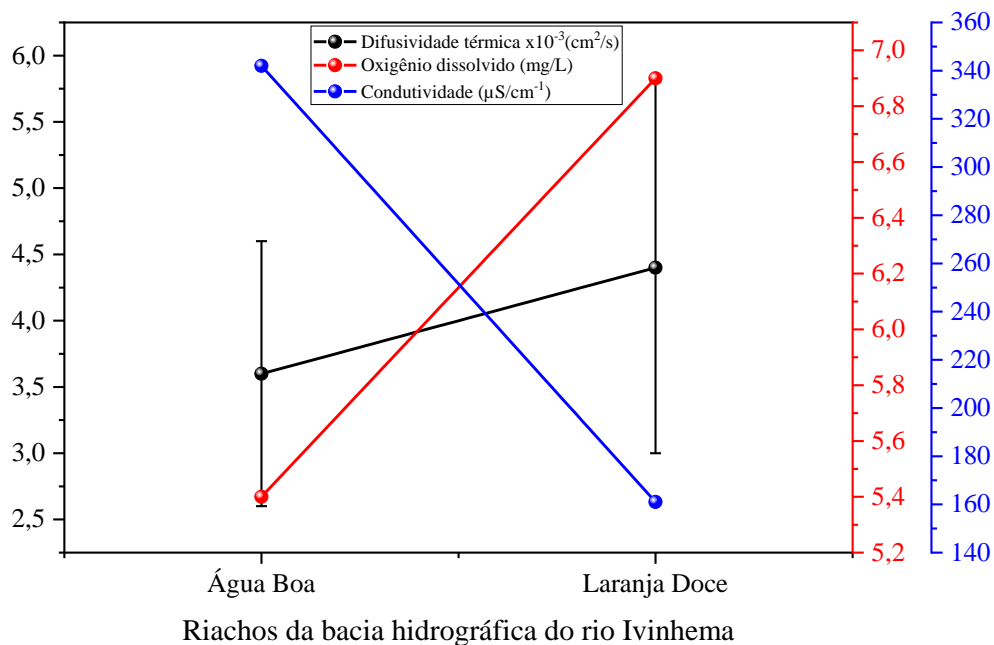


Figura 35. Difusividade térmica das escamas de *Astyanax lacustris* e variáveis ambientais de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica da água dos riachos Água Boa e Laranja Doce. Fonte. Próprio autor.

Observando a Figura 35 é possível visualizar um comportamento nos dados para os dois riachos da bacia hidrográfica do rio Ivinhema (Água Boa e Laranja Doce), a saber: condição #1 menor difusividade térmica resulta em menor oxigênio dissolvido e maior condutividade elétrica da água; e condição #2 maior difusividade térmica resulta em maior oxigênio dissolvido e menor condutividade elétrica da água. Visto isso, é necessário abrir um paralelo comparativo para verificar se os dois comportamentos ditos anteriormente podem ser observados para as demais escamas dos peixes das outras duas bacias hidrográficas.

Para verificar que a condição apresentada entre os riachos da bacia hidrográfica do rio Ivinhema não é absoluta, é necessário comparar os dados dos riachos dessa bacia hidrográfica com os riachos das outras duas bacias hidrográficas (Miranda e Apa). Dessa forma, enquanto as escamas dos peixes do riacho Laranja Doce apresentaram difusividade térmica de $(4,4 \pm 1,4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s})$, oxigênio dissolvido na água de (6,9 mg/L) e condutividade elétrica da água de $(161 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1})$, as escamas dos peixes do riacho Apa 42 demonstraram valor igual para difusividade térmica $(3,0 \pm 0,8 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s})$, oxigênio

dissolvido na água muito próximo (6,61 mg/L O₂) e condutividade elétrica de (176 μS/cm⁻¹). Porém, quando se observa os outros riachos da bacia hidrográfica do rio Apa é possível verificar valores maiores de difusividade térmica e também de condutividade elétrica em relação ao Apa 42, o que não deveria ocorrer se valores maiores de difusividade térmica realmente resultassem em menores valores de condutividade elétrica da água, como visto no comportamento dos dados da bacia hidrográfica do rio Ivinhema.

Já para oxigênio dissolvido, ao olhar para a bacia do Ivinhema, desprende-se a ideia de que maiores valores de difusividade térmica resultam em maiores valores de oxigênio dissolvido na água, porém, na bacia hidrográfica do rio Apa é possível ver que o riacho Apa 32 apresenta difusividade térmica maior e menor oxigênio na água do que o riacho Apa 27, demonstrando o inverso ao ocorrido nos riachos Água Boa e Laranja Doce (condição #2).

A comparação final entre as bacias hidrográficas dos rios Ivinhema e Miranda deixa claro que não se deve adotar como absoluta a condição #2 de que maiores valores de difusividade térmica resultam em maiores valores de oxigênio dissolvido e menores valores de condutividade elétrica, sobretudo, pelo fato de que os riachos da bacia hidrográfica do rio Miranda apresentam o menor e maior valor de difusividade térmica como o mesmo valor de oxigênio dissolvido e conforme os valores de difusividade térmica aumentam, os valores de oxigênio diminuem e aumentam. Já para a condutividade elétrica da água, observa-se que enquanto o menor valor de difusividade térmica apresenta o menor valor de condutividade elétrica da água, o maior valor de difusividade térmica apresenta condutividade elétrica mais elevada, desobedecendo o que foi presumido para o comportamento dos dados da bacia hidrográfica do Ivinhema (riachos Água Boa e Laranja Doce), condição #1 menor difusividade resulta em menor oxigênio e maior condutividade e condição #2 maior difusividade resulta em maior oxigênio e menor condutividade na água.

Assim sendo, é importante mencionar que ao relacionar difusividade térmica aos parâmetros de qualidade de água é fundamental observar vários riachos e evitar comparações com apenas peixes de dois riachos para que não haja uma conclusão equivocada. Além disso, os valores de difusividade térmica para as escamas dos indivíduos dos riachos Água Boa e Laranja Doce podem ser considerados iguais devido aos desvios, reforçando a inviabilidade de análise em pares.

4.6 Difusividade térmica e parâmetros ambientais

Foi aplicada a Análise de Covariância (ANCOVA) para verificar se a difusividade térmica das escamas referente as três bacias hidrográficas (Miranda, Apa e Ivinhema) poderia demonstrar algum padrão explicativo em relação aos parâmetros ambientais de oxigênio dissolvido, condutividade elétrica da água e Índice de Vegetação da Diferença Normalizada (NDVI).

Os dados foram organizados de maneira a introduzir as médias das variáveis para um total de 47 indivíduos que representaram as três bacias hidrográficas amostradas neste trabalho. A Tabela 3 exemplifica a organização.

Tabela 3. Exemplo de variáveis selecionadas para análise de covariância. Fonte. Própria autor.

Indivíduo	Bacia Hidrográfica	Riacho	Difusividade térmica cm²/s	O2 Mg/L	Condutividade μS/cm⁻¹	NDVI
1	Miranda	B05	0,003	6,14	21	0,402
2	Miranda	B05	0,002	6,14	21	0,402
3	Miranda	B05	0,001	6,14	21	0,402
4	Miranda	B12	0,003	5,95	52	0,348

Analisando os dados resultantes da ANCOVA, e por meio da observação dos gráficos constantes na Figura 36, relatamos que há diferença significativa para a difusividade térmica entre as bacias hidrográficas, isto é, entre Miranda, Apa e Ivinhema ($F = 11,611$; $p < 0,001$). Não ocorreu diferença significativa para oxigênio dissolvido ($F = 1,142$; $p = 0,291$), para condutividade elétrica ($F = 0,184$; $p = 0,670$) e para NDVI ($F = 0,354$; $p = 0,555$) relacionados aos valores de difusividade térmica.

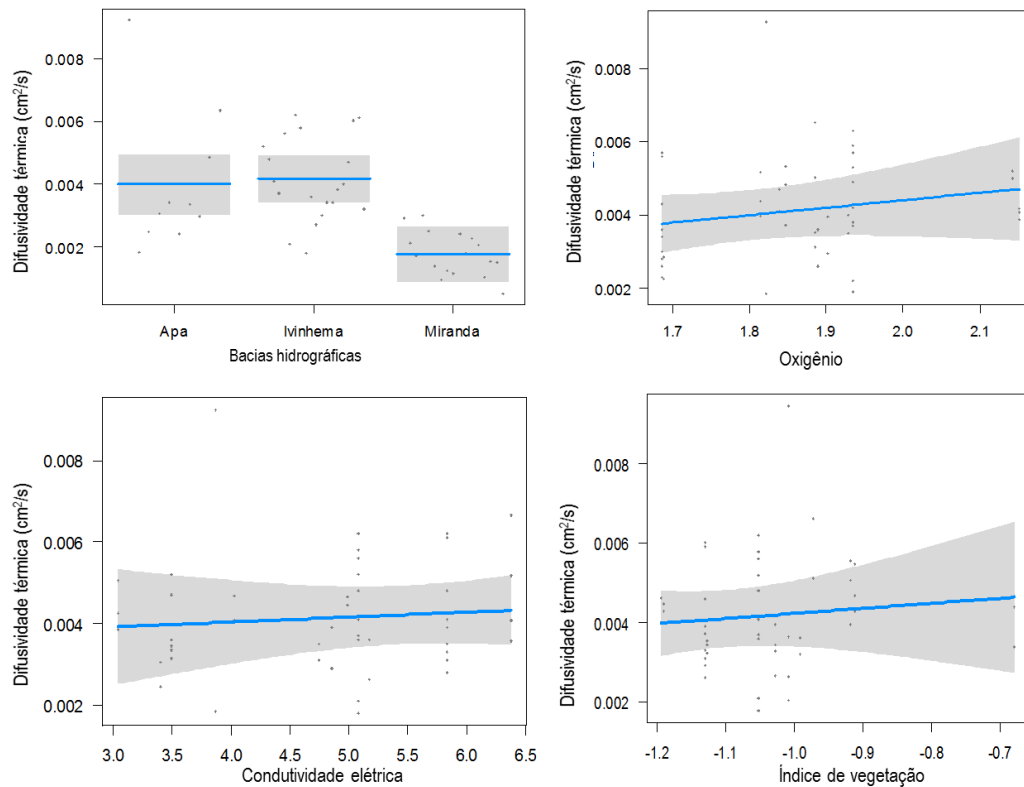


Figura 36. Valores médios e intervalos de confiança de difusividade térmica para as escamas dos peixes coletados nas bacias hidrográficas amostradas e relação de oxigênio, condutividade elétrica e índice de vegetação. Fonte. Próprio autor.

A difusividade térmica para as escamas dos indivíduos coletados na bacia hidrográfica do rio Miranda foi a de menor valor ($1,8 \pm 0,4$) $\times 10^{-3}$ cm^2/s , enquanto as bacias hidrográficas dos Rios Apa e Ivinhema apresentaram valores maiores ($3,1 \pm 1,5$) $\times 10^{-3}$ e ($3,7 \pm 0,4$) $\times 10^{-3}$ respectivamente.

A difusividade térmica das escamas de *Astyanax lacustris* oriundos da bacia hidrográfica do rio Ivinhema foi diferente significativamente em relação a bacia hidrográfica do rio Miranda. Embora ocorra essa diferença significativa, os parâmetros ambientais que avaliam a conservação do ambiente não demonstraram influência em relação à difusividade térmica.

Posteriormente foi verificado se algum dos parâmetros poderiam diferenciar as bacias hidrográficas. Para isso foi realizada a análise de variância para as variáveis de difusividade térmica, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica da água e NDVI. Como resposta, obteve-se que a difusividade térmica foi a única variável capaz de diferenciar as bacias hidrográficas dos rios Miranda, Apa e Ivinhema ($F = 6,646$; $p = 0,001$) enquanto que para oxigênio dissolvido na água ($F = 1,491$; $p = 0,267$), condutividade elétrica da

água ($F = 0,134$; $p = 0,875$) e NDVI ($F = 0,3489$; $p < 0,713$) não foram observadas diferenças significativas.

Estudos que utilizaram relações entre descritores ambientais para verificar integridade ambiental, já chegaram a apontar a baixa resposta do NDVI e do oxigênio dissolvido na água para diferenciar riachos com baixo ou médio nível de impacto ambiental. No entanto, a condutividade elétrica da água já foi aplicada como um fator que melhor diferenciou níveis de integridade ambiental para riachos, podendo fornecer alguma relação para com outros parâmetros ambientais (VIANA, SUÁREZ e LIMA-JUNIOR, 2013; SANTANA et al. 2015). Embora a condutividade elétrica da água seja utilizada para determinar categorias de integridade ambiental é necessário tomar cuidado ao utilizar esse descritor, pois não é condição mandatória que riachos com elevada condutividade elétrica estejam poluídos. Rios pertencentes a bacia hidrográfica do Miranda são capazes de apresentar condutividade $> 100 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e não estão sob condições de poluição (MEDINA JÚNIOR, 2007). Por esse motivo, nesse trabalho a condutividade elétrica da água não foi utilizada como fator para determinar categorias de integridade ou conservação ambiental, mas sim como um parâmetro que em conjunto a outros pudesse indicar uma relação com a difusividade térmica das escamas.

Considerando este resultado, adotamos que a difusividade térmica das escamas medida via espectroscopia fotoacústica é um parâmetro mais sensível para distinção entre bacias hidrográficas do que os outros parâmetros ambientais utilizados.

4.7 Difusividade térmica de escamas

Considerando os dados que foram apresentados, adotamos que a difusividade térmica calculada para as escamas dos peixes é de $(2,8 \pm 0,8) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$. Os dados apresentados na literatura sobre difusividade térmica de escamas de peixes são escassos (de fato, não foram encontrados resultados publicados em revistas internacionais), no entanto, é possível encontrar publicações sobre propriedade térmicas e ópticas de vários materiais. Nesse sentido, a partir dos dados na literatura, pode-se encontrar que a difusividade térmica para compostos presentes nas escamas, por exemplo, a hidroxiapatita é de $(2,89 \pm 0,45) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ (BENTO, 1996) e para colágeno do tipo I hidratado é de $(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-3}$

$3 \text{ cm}^2/\text{s}$) (MILNER, 1996). Nossos estudos demonstraram que a difusividade térmica da face interna da escama (predominância de colágeno) é ligeiramente maior do que na face externa (predominância de hidroxiapatita) o mesmo comportamento foi verificado por Qu (2014) em que colágeno apresentou difusividade térmica discretamente maior em relação à hidroxiapatita, respectivamente ($3,1 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ e $2,9 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$). Essa pequena diferença no valor de difusividade térmica pode estar relacionada ao conteúdo proteico colagênico (MILNER, 1996).

Os valores médios encontrados neste trabalho vão ao encontro de valores de difusividade térmica publicados por outros autores para amostras que contém colágeno e/ou hidroxiapatita, a saber: para ossos residuais de peixe ($2,01 \pm 0,10 \text{ cm}^2/\text{s}$) (COELHO et al., 2007); para esmalte ($(4,00 - 4,48) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$), para dentina ($2,49 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$) (BRADEN, 1964 e EL-Brolossy, 2005) e para ossos de bovinos ($(3,1 - 5,4) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$) (RODRÍGUEZ, 2001). O mais próximo ao realizado a essa pesquisa é o trabalho de Santana et al., (2015) em que apresenta que para escamas de peixe da espécie *Astyanax altiparanae*, atualmente considerado a mesma espécie que *Astyanax lacustris*, estima-se que a difusividade térmica esteja em torno de $2,2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$, valor que corrobora nossos dados.

4.8 Eficiência quântica da escama de *Astyanax lacustris*

Um estudo recente de Santana et al. (2016) demonstrou que escamas de peixe podem apresentar luminescência. Portanto, neste trabalho, passamos a considerar a determinação da eficiência quântica para escama de *Astyanax lacustris*. A fim de validar o sistema empregado para a determinação da eficiência quântica, utilizamos uma amostra em pó de sulfeto de zinco com cobre e alumínio (ZnS:Cu,Al). A eficiência quântica calculada para a referida amostra foi de 90%, mostrando compatibilidade com o que se encontra na literatura (90%) (KUBONIWA KAWAI e HOSHINA, 1980).

A Figura 37 (a) demonstra os espectros dos sinais fotoacústico e de luminescência, enquanto em 37 (b) demonstra o comportamento da relação SFA/LUM para a escama de *Astyanax lacustris* em um intervalo de comprimento de onda de 300 a 480 nm.

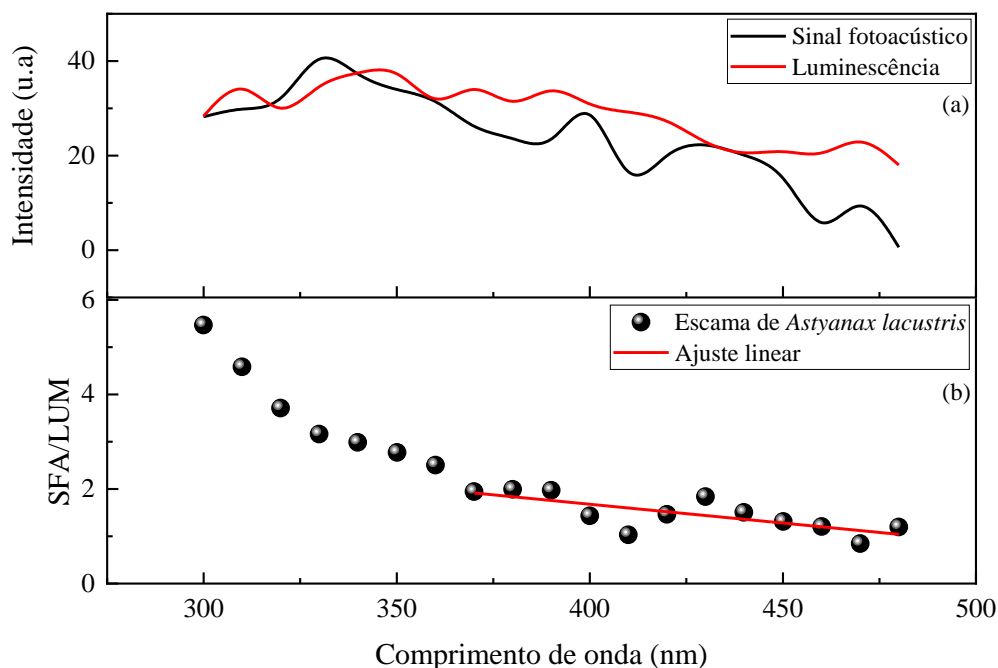


Figura 37. (a). Espectro do sinal fotoacústico e luminescência da escama de *Astyanax lacustris*. (b). Sinal fotoacústico normalizado pela luminescência da escama de *Astyanax lacustris*. Fonte. Próprio autor.

Observando a relação de sinal fotoacústico e luminescência apresentada na Figura 37 (b) é possível notar pelo menos dois comportamentos lineares, indicando que pode haver emissão a partir de mais de um estado de energia. Contudo, o modelo de Muñoz, Tocho e Cussó (1998) admite apenas um estado de emissão. Por isso foi feito um ajuste linear para o comportamento SFA/LUM que considerou a linearidade apresentada de 370 a 480 nm. Posteriormente, a eficiência quântica foi calculada por meio da equação (4) de maneira que ao fazer a razão entre o coeficiente angular e o linear obtido do ajuste da Figura 37 (b) é possível obter $\eta/\langle\lambda_{em}\rangle$. Multiplicando essa razão pelo valor do comprimento de onda de emissão médio 432 nm, encontramos $\eta = 0,7 \pm 0,1$.

Inicialmente cogitou-se que um comportamento capaz de apresentar uma linearidade de 300 a 360 nm e outra de 370 a 480 nm estaria ocorrendo devido aos componentes da escama, isto é, hidroxiapatita e colágeno. Portanto, buscou-se verificar qual componente apresentava maior contribuição para a luminescência da amostra.

A Figura 38 apresenta o mapa de excitação-emissão da amostra de colágeno tipo I extraído das escamas de *Tilapia rendali*. Os dados demonstram haver emissão mais intensa em um intervalo espectral a partir do comprimento de onda de 394 a 490 nm para uma fonte de excitação que varia de 325 a 410 nm. O máximo de emissão de fluorescência

ocorreu em duas regiões, um primeiro em 420 nm com excitação em 350 nm e um segundo estado em 475 nm com excitação 380 nm.

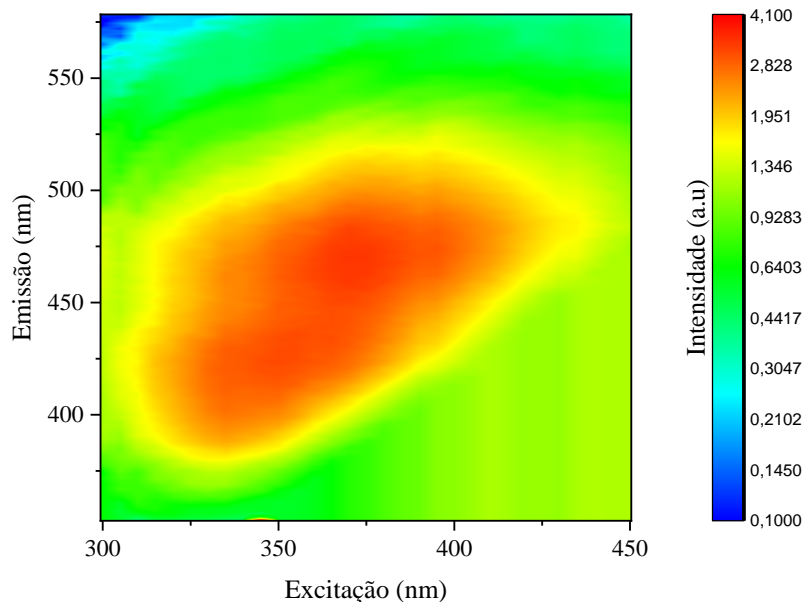


Figura 38. Mapa de excitação e emissão da amostra de colágeno tipo I extraído de escamas de Tilápia. Fonte. Próprio autor.

A emissão de luz em colágeno pode ocorrer em uma faixa espectral a partir do comprimento de onda de 200 nm até 600 nm (RYBCZYNSKI et al. 2014). Além disso, para a região em que relatamos a fluorescência (394 a 490 nm) há vários autores que também relatam o fenômeno para essa região espectral como Georgakoudi (2002) que descreveu emissão de luz em um intervalo espectral de 370 a 470 nm, com um máximo de intensidade em torno de 400 nm para colágeno comercial em pó, ou Yova (2000) que observou emissões para colágeno seco nos comprimentos de onda de 387, 405, 440 e 480 e também Lakowicz (2006) que descreveu que a proteína apresenta um espectro de emissão de 325 a 490 nm.

A ocorrência de fluorescência em uma proteína é devida aos fluoróforos denominados aminoácidos, tais como o triptofano, tirosina e fenilalanina. Em proteínas, geralmente a fluorescência decorre de moléculas aromáticas como mencionado anteriormente, por exemplo, o aminoácido aromático triptofano, porém não se deve atribuir a fluorescência apenas a essa ou outra molécula e sim ao conjunto que forma uma estrutura capaz de emitir luz. Além disso, na maioria das proteínas existem diversos aminoácidos fluoróforos (LAKOWICZ, 2006).

O colágeno tipo I é uma proteína que não possui conteúdo de triptofano (GOISSIS, 2007) sendo assim, a fluorescência aqui relatada não pode ser atribuída a este aminoácido. Logo, é possível que a emissão em colágeno do tipo I possa ser atribuída a tirosina e resíduos (YOVA, 2000; AGUIAR, 2007) e conforme explica Yoava (2000) um largo espectro de emissão como relatado em nosso trabalho indica que vários cromóforos são responsáveis por absorver e emitir nas regiões espectrais.

Por fim, Santana et al. (2016) reportou para escamas de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* que é considerada igual à espécie *Astyanax lacustris* a ocorrência de emissão entre os comprimentos de onda de 370 e 550 nm demonstrando certa coerência com o que apresentamos nesse trabalho, sobretudo quando compara-se os máximos de emissão do referido autor, 440 e 490 nm com os relatados aqui 420 e 475 nm, reforçando a hipótese de contribuição da tirosina para a fluorescência do colágeno tipo I oriundo de escamas e também pelo fato da literatura atribuir a fluorescência de colágeno em luz azul à tirosina e ditirosina (MENTER, 2006; MENTER, CHU e MARTIN, 2009).

A hidroxiapatita não apresentou emissão para a região estudada, indicando que o colágeno é o único responsável pela emissão na escama quando excitada na região entre 300 e 480 nm. Por isso, acredita-se que na escama a emissão ocorra devido ao conteúdo de colágeno e a dupla linearidade vista na Figura 37 (b) está relacionada a estados de emissão do próprio colágeno.

A Figura 39 (a) demonstra os espectros dos sinais fotoacústico e de luminescência, enquanto em 39 (b) é demonstrado o comportamento da relação SFA/LUM para o colágeno em pó em um intervalo de comprimento de onda de 320 a 450 nm. Adotamos essa região para o ajuste dos dados experimentais por apresentar um comportamento linear, sem uma sobreposição significativa da primeira região emissora, como pode ser observado pelo mapa de excitação-emissão (Figura 38). O método utilizado considera a determinação de apenas um estado de emissão como já mencionado, o que visualmente não ocorreria se tomássemos toda a faixa desde 320 nm para determinar a eficiência quântica de luminescência. O fato da curva experimental na Figura 39 (b) apresentar mais de um comportamento linear pode indicar a presença de mais estados emissores, o que compromete o formato do método para determinação do parâmetro. Comportamentos que distorcem a linearidade da curva poderiam sugerir a presença de outros agentes capazes de gerar sinal fotoacústico, como por exemplo, absorção parasita e/ou absorção de estado excitado. Portanto, foi feito um ajuste linear para o espectro do Sinal Fotoacústico em

relação à Luminescência (SFA/LUM) apenas nesta região de 380 a 450 nm, e posteriormente calculada a eficiência quântica por meio da equação (4). Assim, fazendo a razão entre o coeficiente angular e o linear obtido do ajuste da Figura 39 (b) é possível obter $\eta/\langle\lambda_{em}\rangle$. Multiplicando essa razão pelo valor de 432 nm (comprimento médio de emissão), encontramos $\eta = 0,8 \pm 0,1$.

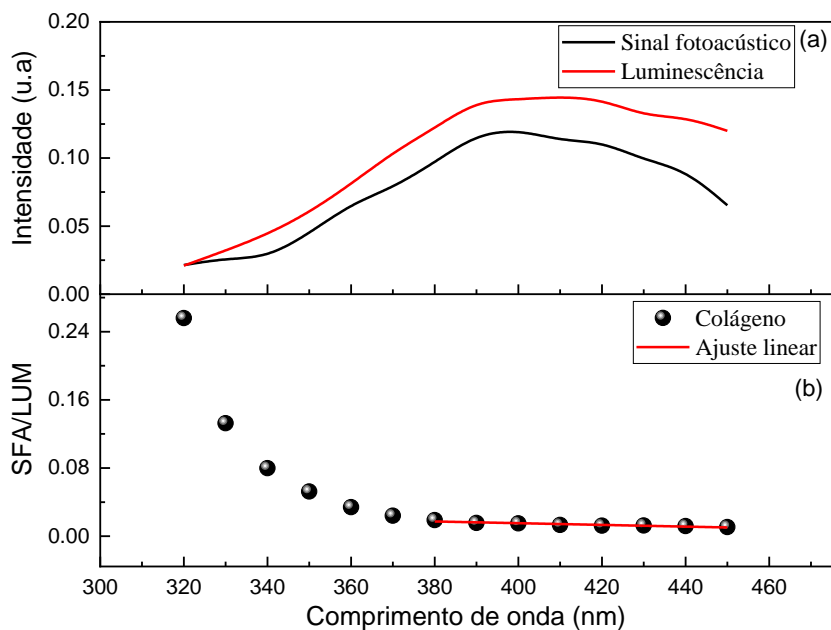


Figura 39. (a). Espectro de luminescência do colágeno e espectro do sinal fotoacústico do colágeno normalizado pelo carvão. (b). Sinal fotoacústico do colágeno normalizado pela luminescência do colágeno com destaque para ajuste linear de 320 nm a 450 nm para determinar a eficiência quântica de luminescência. Fonte. Próprio autor.

Como mencionado anteriormente, a emissão não se deve a um único aminoácido. Além disso, ao observar os valores de eficiência quântica para aminoácidos, reforçamos a ideia de que a fluorescência é resultante de uma estrutura composta por vários fluoróforos.

Embora os aminoácidos sejam citados exaustivamente na literatura, estudos sobre eficiência quântica de colágeno são escassos, deixando uma lacuna. Por esse motivo, cabe-nos confrontar os dados aqui apresentados à outras proteínas estruturantes ou outras categorias de compostos que fluorescem. Estudos demonstram que proteínas apresentam eficiência quântica diversificada, a exemplo das seguintes proteínas: ECFP (40%) (PATTERSON, RICH e PISTON, 2001), EGFP (60%) (PATTERSON, RICH e PISTON, 2001; PATTERSON et., al 1997), mCitrina (76%) (BRIESBECK et., al 2001), mCherry (22%) (SHANER et. al, 2008).

Por fim, é válido mencionar que Zhou et., al (2018) ao estudar a fluorescência de glicosaminoglicano percebeu influência do colágeno na eficiência quântica de sua amostra, oportunidade em que relatou qualitativamente que a eficiência quântica do colágeno é alta. Por sua vez, Berezin (2010) descreveu que se pode considerar alta a eficiência quântica quando supera 50%. Visto isto, é possível considerar alta a eficiência quântica do colágeno extraído de escamas de Tilápia calcula em 80% e também da escama de *Astyanax lacustris* em 70%.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

As avaliações ambientais sempre buscam investigar os ambientes por meio de parâmetros que indicam a qualidade ambiental, tais como os apresentados aqui neste trabalho. Nós buscamos inovar incluindo a difusividade térmica como um parâmetro para verificar relações com outros indicadores ambientais. Sendo assim, os resultados demonstram que a espectroscopia fotoacústica aliada ao modelo matemático de Rosenwaic-Gersho é eficiente em determinar a difusividade térmica de escamas de peixe da espécie *Astyanax lacustris* para ser utilizada como um parâmetro ambiental.

Enquanto os parâmetros ambientais não demonstraram diferença significativa entre riachos e bacias hidrográficas a difusividade térmica das escamas apresentou diferença significativa para indivíduos coletados em uma mesma bacia hidrográfica ou entre bacias hidrográficas. Isso indica que a difusividade térmica pode ser mais representativa em relação aos parâmetros ambientais de oxigênio dissolvido na água, condutividade elétrica da água e NDVI para estudos que buscam diferenciar populações de peixes ou bacias hidrográficas. Além disso, os parâmetros ambientais não demonstraram relação explicativa para o comportamento dos dados de difusividade térmica. Por esse motivo, acreditamos que as variações possam estar sujeitas à genética dos peixes. Ademais, os dados abrem perspectivas para pesquisas futuras que considerem a caracterização das escamas para entender os aspectos envolvidos na formação dessas estruturas ósseas e buscar identificar os aspectos que expliquem as variações de difusividade térmica. Desse modo, se deve buscar relacionar a difusividade térmica com parâmetros que consideram a dieta dos

peixes, a idade, a identificação dos elementos químicos presentes nas escamas, bem como a relação Ca/P e a densidade.

Já para a espectroscopia fotoacústica aliada à espectroscopia de fluorescência aplicada à escama de *Astyanax lacustris* foi observado que a eficiência quântica é alta, cerca de 70% e que na escama o colágeno é o principal responsável pela emissão de luz. Além disso, o colágeno extraído de escamas de *Tilapia rendali* possui alta eficiência quântica de luminescência, aproximadamente 80% dentro de uma faixa de excitação de 380 a 450 nm. Esse aspecto evidencia o potencial de aplicação fotônica para a escama e para o colágeno do tipo I, podendo ter aplicações nas áreas das ciências da saúde para identificar anomalias celulares entre outras finalidades.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS

AGUIAR, R. R.; LIMA, A.; SOUZA, A. R.; RODRIGUES, M. R.; CODOGNOTO, L.; OLIVEIRA, H. P. M. Análise de cerveja nacional por espectroscopia de fluorescência. In: **XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação**, 2007, São José dos Campos. Anais de Resumos em meio eletrônico, 2007.

ALMEIDA, F. S. **Aplicação das técnicas de espectroscopia óptica vibracional em compostos químicos e biológicos**. 2012, 74p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2012.

ALMEIDA, F.S.; SANTANA, C.A.; LIMA, D.M.V.; ANDRADE, L.H.C.; SÚAREZ, Y.R.; LIMA, S.M. Discrimination of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae) populations by applying Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy in the fish scales. **Infrared Physics & Technology**, v. 76, p. 303-307, 2016.

ANA. Agência Nacional de Águas. Plano de recursos hídricos da região hidrográfica do Paraguai – PRH Paraguai, produto parcial PP-02 – Diagnóstico Consolidado da Região

Hidrográfica do Rio Paraguai. Engecorps engenharia S.A. Brasília: ANA/SPR, 2017. 347 p.

ANA. Agência Nacional de Águas; Fundo Mundial para o Meio Ambiente; Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente; Organização dos Estados Americanos. Implementação de práticas de gerenciamento integrado de bacia hidrográfica para o Pantanal e bacia do Alto Paraguai ANA/GEF/PNUMA/OEA: programa de ações estratégicas para o gerenciamento integrado do Pantanal e bacia do Alto Paraguai: Relatório Final. ANA. Brasília: TDA Desenho & Arte Ltda., 2004.

BARJA, P. R.; MOTA, J. P.; CARVALHO, J. L. C. Identification of skin phototypes through *in vivo* photoacoustic measurements. **Brazilian Journal of Biomedical Engineering**, v 28, n 3, p. 288-293, 2012.

BELL, A. G. On the production and reproduction of sound by light. **American Association for the Advancement of Science**, in Boston, 1880.

BELL, A. G. Upon the production of sound by radiant energy. **Philosophical Magazine Series**, 5, 11:71, 510-528, 1881.

BENTO, A.C.; ALMOND, D.P.; BROWN, S. R.; TURNER, I. G. Thermal and optical characterization of the calcium phosphate biomaterial hydroxyapatite, **J. Appl. Phys.** 79, 6848 (1996).

BEREZIN, M, Y.; ACHILEFU, S. Fluorescence lifetime measurements and biological imagin. **Chem. Ver.** 2010, 110, 2641-2684.

BERNARDI, R. C.; FIRMINO, E. L. B.; MENDONÇA, A.; ANTONIO, D. S.; PEREIRA, M. C.; ANDRADE, L. H. C.; ANTONIALLI JUNIOR, W. F.; LIMA, S. M. Intraspecific variation and influence of diet on the venom chemical profile of the *Ectatomma brunneum*

Smith (Formicidae) ant evaluated by photoacoustic spectroscopy. **Journal of Photochemistry & Photobiology**. 175, 200-206. 2017.

BERNARDI, R. C.; FIRMINO, E. L. B.; PEREIRA, M. C.; ANDRADE, L. H. C.; CARDOSO, C. A. I.; SÚAREZ, Y. R.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F.; LIMA, S. M. Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy as a potential tool in assessing the role of diet in cuticular chemical composition of *Ectatomma brunneum*. *Genetics and Molecular Research*. 12 (4): 10035-10048. 2014.

BIRK, D. E.; BRUCKNER, P. Collagen suprastructure. **Top. Curr. Chem.** 247: 185-205. 2005.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. A. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.

Braden, M. *Arch. Oral Biol.* 9. 479 (1964).

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. First national report for the convention on biological diversity – Brazil clearing-house mechanism for CDB. Brasília, 1998.

CASTRO, L. V. **Estudo de lesão de cárie experimental via espectroscopia fotoacústica e raman**. 2015. 80 p. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015.

CASTRO, R. M. C. CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; MELO, A. L. A.; MARTINS, L. S. F.; FERREIRA, K. M.; GIBRAN, F. Z.; BENINE, R. C.; CARVALHO, M.; RIBEIRO, A. C.; ABREU, T. X.; BOCKMANN F. A.; PELIÇÃO, G. Z.; STOPIGLIA, R.; LANGEANI, F. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do Rio Grande no estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v 4, n. 1. 2004.

CESAR, C. L. **Efeito fotoacústico em sólidos**. 1979. 66 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Campinas, 1979.

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2017**. São Paulo: CETESB, 2018.

CHEN, R. F. Fluorescence quantum yields of tryptophan and tyrosine. **Analytical Letters**, 1:1, 35-42, 1967.

COELHO, T.M.; NOGUEIRA, E.S.; WEINAND, W.R.; LIMA, W.M.; STEIMACHER, A.; MEDINA, A.N. Thermal properties of natural nanostructured hydroxyapatite extracted from fish bone waste, **J. Appl. Phys.** 101, 2007.

COSTA, M. P; GOMES, C; NOGUEIRA, D. H; GONÇALES, J. V; PEGORARO, M. S; Avaliação socioambiental do riacho Laranja Doce, Dourados – MS. In: 8º Encontro De Ensino Pesquisa E Extensão Da Universidade Federal Da Grande Dourados E 5º Encontro De Ensino Pesquisa E Extensão Da Universidade Estadual De Mato Grosso Do Sul – ENEPEX, Dourados. **Anais...** Dourados: Universidade Federal da Grande Dourados, 2014.

CUNHA, S. B.; GUERRA, A. J. T. A questão ambiental: diferentes abordagens. 4 ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2008.

CUNHA, S. B.; GUERRA, A. J. T. Avaliação e perícia ambiental. 14 ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2013.

DEER, W. A.; HOWIE, R. A.; ZUSSMAN, J.; Minerais constituintes das rochas: uma introdução, 2ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2000.

DIAS, M.A.; **Biol. Pesq.** 2007, 3, 1.

DIXON, J. M., TANIGUCHI, M., and LINDSEY, J. S. (2005) PhotochemCAD 2: A refined program with accompanying spectral databases for photochemical calculations. **Photochem. Photobiol.** 81, 212–213.

DORETO, P. S. **Diferenciação de espécies de plantas aquáticas através da espectroscopia fotoacústica por transformada de Fourier (FTIR-PAS)**. 2012, 24p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais). Universidade Estadual da Mato Grosso do Sul, Dourados, 2012.

DRAKE, M. T. & PEREIRA, D. L. Development of a fishbased index of biotic integrity for small inland lakes in central Minnesota. **North American Journal of Fisheries Management**, 22: 1105-1123. 2003.

EL-BROLOSSY, T. A.; ABDALLA, S.; HASSANEIN, O. E.; NEGM, S.; TALLAT, H. Photoacoustic and electron microscopic studies of remineralized artificially carious enamel and dentin, **J. Phys.** IV 125, 685 (2005).

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FENG, Z.; LI, Y.; HUANG, Y.; SEO, H. J. Luminescence properties of Eu²⁺ and Eu³⁺ doped calcium-deficient hydroxyapatite prepared in air. *Journal Alloy Compounds*. v.509, p.7087-7092, 2011.

FILHO, A. S. Análise ambiental para a preservação da microbacia do córrego Laranja Doce, sul de Mato Grosso do Sul. **In:** XIII Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada, 2009, Viçosa – MG. Anais do XIII Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada, Viçosa, 2009.

FINKLER, Raquel. **A bacia hidrográfica**. Brasília: ANA, 2013. Material de apoio elaborado para o Curso de Planejamento, manejo e gestão de bacias.

FISCHER, M., and GEORGES, J. (1996) Fluorescence quantum yield of rhodamine 6G in ethanol as a function of concentration using thermal lens spectrometry. **Chem. Phys. Lett.** 260, 115–118.

FREITAS, P. G. **Aplicações da espectroscopia óptica para diagnóstico e análise de compostos biológicos.** 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado em Física). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

FROEHLICH, O.; CAVALARO, M.; SABINO, J.; SÚAREZ, Y. R.; VILELA, M. J. A. Checklist da ictiofauna do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **IHERINGIA. SÉRIE ZOOLOGIA JCR**, v. 107, p. 1-14, 2017.

GEORGAKOUDI, I.; JACOBSON, B. C.; MÜLLER, M. G.; SHEETS, E. E.; BADIZADEGAN, K. CARR-LOCKE, D. L.; CRUM, C. P.; BOONE, C. W.; DASARI, R. R.; DAM, V. J.; FELD, M. S. NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. **Cancer Research** 62, 682-687, 1, 2002.

GHISAIDOOBE, A. B. T.; CHUNG, S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on forster resonance energy transfer techniques. **Internacional Journal of Molecular Sciences.** 2014, 15, 22518-22538.

GOISSIS, A. P. A. Análise estrutural do colágeno tipo I. correlação estrutura: atividade biológica. 2007. 112p Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

GHOSH, K. S.; MANDAL, K. High-performance bio-piezoelectric nanogenerator made with fish scale. **Applied Physics Letters**, 109, 103701 (2016).

GRIESBECK, O., BAIRD, G. S., CAMPBELL, R. E., ZACHARIAS, D. A., and TSIEN, R. Y. (2001) Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. **J. Biol. Chem.** 276, 29188–29194.

MORI, H.; TONE, Y.; SHIMIZU, K.; ZIKIHARA, K.; TOKUTOMI, S.; IDA, T.; HARA, M. Studies on fish scale collagen of Pacific saury (*Cololabis saira*). *Materials Science and Engineering: C*, 33(1), 174-181. 2013.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre-RS: Bookman, 1056p.,2009.

IBAMA. Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Caderno da Região Hidrográfica do Paraná. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Recursos Hídricos. Brasília: MMA, 2006.

IMASUL. Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul. Plano de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio Miranda. SEMAC. Campo Grande – MS, 2016.

IMASUL. Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul. Plano de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio Ivinhema. SEMAC. Campo Grande – MS, 2015.

IMASUL. Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul. Plano de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio Ivinhema: diagnóstico da bacia hidrográfica do Rio Ivinhema. SEMAC. Campo Grande – MS, 2014.

INSTITUTO SOS PANTANAL; WWF – BRASIL. Monitoramento das alterações da cobertura vegetal e uso do solo na Bacia do Alto Paraguai – Porção Brasileira – Período de Análise: 2012 a 2014. Instituto SOS Pantanal, WWF – Brasil. Brasília, 2015.

JARAMILLO-VILLA, U.; CARAMASCHI, E. P. Índices de integridade biótica usando peixes de água doce: uso nas regiões tropicais e subtropical. *Oecol. Bras.*, v. 12. n. 3. 442-462, 2008.

KIMURA, S.; MIYAUCHI, Y.; UCHIDA, N. Scale and bone type I collagen of Carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 99B, n. 2, pp. 473-476, 1991.

KUBONIWA, S.; KAWAI, H.; HOSHINA, T. Cathodoluminescence saturation and decay characteristics of ZnS: Cu, Al phosphor. *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 19, n. 9, 1980.

LAKOWICZ J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**, Springer, 2006.

LIMA, D. M. Vaz. **Técnicas espectroscópicas aplicadas em escamas de peixes da espécie *Astyanax altiparanae* para a diferenciação de populações**. 2015. 102 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Dourados, 2015.

LOPES, D. D. **Espectroscopia de fluorescência aplicada ao estudo das interações de formação de nanoestruturas de peptídeos contendo maguemita**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química. Goiás, 2014.

LUCENA, C. A. S.; SOARES, H. G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa*. 4072 (1): 101-125. 2016.

MARGALEF, R. **Limnologia**. Ed. Omega, Barcelona. 1983.

MATO GROSSO DO SUL. Relatório de Qualidade das Águas Superficiais da Bacia do Alto Paraguai, MS, 2003. Campo Grande, MS, 2005.

MATSUMOTO M. L., PEREIRA Z. V., GONÇALVES J. P., SANGALI A., FERNANDES S. S. L. **Avaliação ambiental do parque urbano Arnulpho Fioravante para adoção de estratégias de restauração.** Curitiba, v. 66-67, p. 51-60, set. 2012.

MARCU, L.; FRENCH, P. M. W.; ELSON, D. S. **Fluorescence lifetime and spectroscopy and imaging: principles and applications in biomedical diagnostics.** CRC Press. Boca Raton, London, New York. 2015.

MAVROPOULOS, E.; Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, 1999.

MEDINA JÚNIOR, P. B. **Avaliação dos impactos da visitação pública no rio Formoso, Bonito, MS, Brasil: subsídios à gestão ambiental do turismo em áreas naturais.** 2007, 156 p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2007.

MELO, W. L. B.; LÓIO, D. A.; VIANA, J. H. M. **Aplicação da espectroscopia fotoacústica na identificação de componentes do solo.** Comunicado Técnico 114. Embrapa. São Carlos-SP, 2010.

MENTER, J. M. **Photochem. Photobiol. Sci.** 2006, 5, 403.

MENTER, J. M.; CHU, E. G.; MARTIN, N. V. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.** 2009, 25, 128.

MILNER, T. E.; GOODMAN, D. M.; TANEMBAUM, B. S.; ANVARI, B.; NELSON, J. S. Noncontact determination of thermal diffusivity in biomaterials using infrared imaging radiometry. **Journal of Biomedical Optics** 1(1), 92-97, 1996.

MONTEIRO, S. N.; ASSIS, F. S.; MARGEM, F. M.; CORDEIRO, T. C.; FIGUEIREDO, A. B.; BRAGA, F. O. Photoacoustic thermal characterization of Banana fibers. **Materials Research**. 18. (supple 2): 240-245, 2015.

MORAIS, G. R. **Espectroscopia fotoacústica para o estudo da difusão de um extrato de *Caesalpinia peltophoroides Benth.* em feridas cutâneas e das mudanças estruturais de tecidos do pulmão infectados por *Paracoccidioides brasiliensis***. 2012. 75 p. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

MOREIRA, M. A. **Fundamento do sensoriamento remoto e metodologias de aplicação**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2003.

MORISHITA, G. M. **Projeto de construção de uma célula fotoacústica no Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica**. Monografia de Conclusão de Curso (Graduação) – Engenharia Física, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2014.

MUÑOZ, J. A. TOCHO, J. O. CUSSÓ, F. Photoacoustic determination of the luminescent quantum efficiency of Yb^{3+} ions in lithium niobate. **Applied Optics**. Vol. 37. No. 30/20, 1998.

NAGAI, T.; IZUMI, M.; ISHII, M. Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. **International Journal of Food Science and Technology**, 39, p.239–244, 2004.

NERI, J. W. **Aplicação do efeito fotoacústico a sistemas biológicos**. 1986. 56 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1986.

NUNES, F. C. **Estudo taxonômico das espécies de peixes de água doce da bacia do rio Pojuca, Bahia, Brasil**. 2012. 88 f. Monografia (Graduação) – Curso Superior de Ciências Biológicas. Universidade Federal Bahia, Salvador, 2012.

OLIVEIRA, M. D.; FERREIRA, C. J. **Estudos limnológicos para o monitoramento da bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal Sul**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003.

OLSON, O. P.; WATABE, N. Studies on formation and resorption of fish scales. **Cell Tissue Research** 211, 303-316. 1980.

PATEL, P.; HARDIK, M.; PATEL, P. A review on photoacoustic spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutical Erudition**. 3 (1), p. 41-49. 2013.

PATTERSON, G., DAY, R. N., and PISTON, D. (2001) Fluorescent protein spectra. **J. Cell Sci.** 114, 837–838.

PATTERSON, G. H., KNOBEL, S. M., SHARIF, W. D., KAIN, S. R., and PISTON, D. W. (1997) Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. **Biophys. J.** 73, 2782–2790.

PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. **Bioresource Technology**. 101. 3737-3742. 2010.

PEDROCHI, F. **Estudo de sistemas biológicos “in vitro” e “in vivo” utilizando a espectroscopia fotoacústica**. 2004. 96 p. Dissertação (Mestrado em Física). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

PEREIRA, N. A. **Subsídios às políticas de atuação em meio ambiente urbano: bacia do riacho Água Boa Dourados-MS**. 2007. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Aquidauana, Aquidauana, 2007.

PIRATOBA, A. R. A.; RIBEIRO, H. M. C.; MORALES, G. P.; GONÇALVES, W. G. Caracterização de parâmetros de qualidade da água na área portuária de Barcarena, PA, Brasil. **Interdisciplinary Journal of Applied Science**. v, 12. n, 3, 2017.

PON-ON, W.; SUNTORNSARATOON, P.; CHAROENPHANDHU, N.; ROSA, R. S; LIMA, F. C. T. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 2008.

PONZONI, F. J.; SHIMABUKURO, Y. E. Sensoriamento remoto no estudo da vegetação. São José dos Campos, SP: A. Silva Vieira ED., 2007.

PREECE, W. H. On the conversion of radiant energy into sonorous vibrations. Proc. R. Soc. Lond 1881 31, 506-520. **Journal of the Society of Telegraph Engineers**, vol. 9. 1881.

QU, T.; TOMAR, V. An analysis of the effects of temperature and structural arrangements on the thermal conductivity and thermal diffusivity of tropocollagen-hydroxyapatite interfaces. **Materials Science and Engineering C** 38, 28-28, 2014.

RAMACHANDRAN, G. N. Treatise on collagen. **Academic Press**. London. v.1, p.337-353. 1967.

ROBERTS, C. D. Comparative morphology of spined sacles and their phylogenetic significance in the teleostei. *Bulletin of Marine Science* – Miami. 52(1):60-113. 1993.

RODRÍGUEZ, G. P.; ARENAS, A. C.; HERNÁNDEZ, R. A. M.; STOLIK, S. A.; CRUZ-OREA.; SINENCIO, F. S.; **Anal. SCI.** 127, 357 (2001).

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. In: Angelo Barbosa Monteiro Machado, Gláucia Moreira Drummond, Adriano Pereira Paglia [editores]. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. 1. ed. Brasília, DF: MMA, Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 2008. v. 2. Cap. 8.

ROSENCWAIG, A.; GERSHO, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. **Journal of Applied Physics**, vol. 47. n.1, 1976.

ROSENCWAIG, A. **Photoacoustics and photoacoustic spectroscopy**. California, 1978.

ROSENCWAIG, A. Photoacoustic spectroscopy. **Advances in Electronics and Electron Physics**. vol. 46, p II-XII, 1-404. 1978.

ROSSINI, B. C.; OLIVEIRA, C. A. M.; MELO, F. A. G.; BERTACO, V. A.; ASTARLOA, J. M. D.; ROSSO, J. J.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Highlighting *Astyanax* Species Diversity through DNA Barcoding. **Plos One JCR**, v. 11, 2016.

ROSSINI, B. C. **Estudo da diversidade e das relações filogenéticas do gênero *Astyanax* (Characiformes, Characidae) baseado em sequências de DNA**. 2015, 132 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - UNESP, Botucatu, 2015.

RÖNTGEN, W. C. On tones produced by the intermitente irradiation of a gas. **Philosophical Magazine Series**, 5, 11:68, 308-311, 1881.

ROUSE, J. W.; HAAS, R. H.; SCHELL, J. A.; DEERING, D. W. Monitoring vegetation systems in the great plains with ERTS. In: Earth Resources Technology Satellite-1 Symposium, 3, 1973. Proceedings, Washington, 1973, v.1, Sec.A, p. 309-317.

RURACK, K., and SPIELES, M. (2011) Fluorescence quantum yields of a series of red and near-infrared dyes emitting at 600–1000 nm. **Anal. Chem.** 83, 1232–1242.

RYBCZYNSKI, P.; SIKORA, J.; AUGUSTYNSKA B. KUBICA, J. Fluorescence spectroscopy of collagen in several solvents. **Medical and Biological Sciences**, 2014, 28/3, 43-50.

SANTANA, C. A. **Estudo da integridade ambiental de riachos via técnicas espectroscópicas aplicadas em escamas de peixe**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Dourados, 2014.

SANTANA, C. A.; ANDRADE, L. H. C; SÚAREZ, Y. R.; YUKIMITU, K.; MORAES, J. C. S.; LIMA, S. M. Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy applied in fish scales to assess environmental integrity: a case study of *Astyanax altiparanae* species. **Infrared Physics & Technology**. v. 72. p. 84-89, 2015.

SANTANA, C. A. **Estudo da viabilidade do uso de escama de peixe como bioindicador ambiental e biomaterial**. 2018. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados.

SANTANA, C. A.; VAZ LIMA, D. M.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R.; LIMA, S. M. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, B: Biology 165 (2016) 80-86.

SANTOS, E. B.; VIEIRA, E. F. S; CESTARI, A. R.; BARRETO, L. S. Caracterização de escamas do peixe piau (*Leporinus elongatus*) e sua aplicação na remoção de Cu(II) de meio aquoso. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 32, n. 1, p. 134-138, 2009 .

SAWADA, L. **Determinação da difusividade térmica de cristais de $BaLiF_3$ puro e dopado**. 2000. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN – CNEN / SP. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SEMAC. Secretaria de Estado de Meio Ambiente, do Planejamento, da Ciência e Tecnologia e Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul. Plano Estadual de Recursos Hídricos de Mato Grosso do Sul: resumo executivo. Editora UEMS. Campo Grande – MS, 2010.

SHANER, N. C., Lin, M. Z., McKeown, M. R., Steinbach, P. A., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W., and Tsien, R. Y. (2008) Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. **Nat. Methods** 5, 545–551.

SILVA, I. R.; BARJA, P. R. Caracterização do regime térmico de uma amostra utilizando célula fotoacústica aberta (OPC). In: X ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E VI ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2006, São José dos Campos. **Revista Univap**, v. 13, n. 24, 2006.

SJOBACK, R., NYGREN, J., and KUBISTA, M. (1995) Absorption and fluorescence properties of fluorescein. **Spectrochim. Acta Part A** 51, L7–L21.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F.K.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5. Ed. Porto Alegre – RS: Brookman, 2002.

SIRE, J. Y.; AKIMENKO, M. A. Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (*shh*) expression in the zebrafish (*Danio rerio*). **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, p. 233-247, 2004.

SMITH, W. S.; BARRELA, W.; CETRA, M. Comunidade de peixes como indicadora de poluição ambiental. **Revista Brasileira de Ecologia**, (1): 67-71, 1997.

SNIRH. Sistema Nacional de Informação sobre Recursos Hídricos. Shapefile das 12 Regiões Hidrográficas definidas pelo Conselho Nacional de Recursos Hídricos – CNRH. Agência Nacional de Águas. Brasília – DF, 2016.

STOTOMAYOR, M. D. P. T.; DIAS, I. L. T.; LANZA, M. R. V.; MOREIRA, A.; KUBOTA, L. T. Aplicações e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, vol. 31, n. 7, 1755-1774, 2008.

STRYER, L.; Bioquímica, 3ª Ed., Guanabara Koogan Rio de Janeiro, 1992.

TERNANE, R.; COHEN-ADAD, M. T. H.; PANCZER, G. Structural and luminescent properties of new Ce³⁺ doped calcium borophosphate with apatite structure. *Solid State Science*. V.4, p. 53-59, 2002.

THOEN, J.; GLORIEUX, C. Photoacoustic and photopyroelectric approach to calorimetric studies. **Thermochimica Acta**, 304/305, 137-150, 1997.

TOMAZELA, D. P. **Monitoramento espacial e temporal de parâmetros físicos, químicos e biológicos da bacia hidrográfica do rio Capivari (Norte da Ilha de Santa Catarina)**. 2008. 42 p. Monografia (Graduação) – Curso Superior de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 2008.

TYNDALL, J. Action of na intermitente beam of radiante heat upon gaseous matter. **Philosophical Magazine**, 31, 307-317, 1881.

VARGAS, D.M.; AUDI, L.; CARRASCOSA, A.. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo , v. 43, n. 4, p. 367-370, 1997.

VERNEREY. F. J.; BARTHELAT, F. On the mechanics of fishscale structures. *International Journal of Solids and Structures*. 47. pp.2268-2275. 2010.

VIANA, F. L.; SÚAREZ, Y. R.; LIMA-JUNIOR, S. E. Influence of environmental integrity on the feeding biology of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 in the Ivinhema river basin. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringa, v. 35, n. 4, p. 541-548, 2013.

VIEGEROV, M. L. Eine Methode der gasanalyse, beruhend auf der optisch-akustischen tyndall-röntgenerscheinung. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. 1938;19:687–688.

VIEIRA, D. B; SHIBATTA, O. A. Peixes como indicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7. n. 1, 2007.

VIEIRA, E. F. S.; SANTOS, E. B.; CESTARI, A. R.; BARRETO, L. S. Caracterização de escamas do peixe piau (*Leporinus elongatus*) e sua aplicação na remoção de Cu (II) de meio aquoso. **Química Nova**, v. 32. n. 1, 134-138, 2009.

VON SPERLING, M. **Estudos de modelagem da qualidade da água de rios**. Belo Horizonte: UFMG, 2007. Vol. 7. 452 p.

WOOTON, R. J. 1990. Fish and fisheries series 1: ecology of teleost fishes. Chapman and Hall, New York.

ZHOU, X.; HAUDENSCHILD, A. K.; SHERLOCK, B.; HU, J, C.; LEACH, J. K.; ATHANASIOU, K. A.; MARCU. Detection of glycosaminoglycan loss in articular cartilage by fluorescence lifetime imaging. **Journal of Biomedical Optics**, 23(12), 126002, 2018.