

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

**TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS APLICADAS EM
ESCAMAS DE PEIXES DA ESPÉCIE *Astyanax altiparanae*
PARA A DIFERENCIAÇÃO DE POPULAÇÕES**

Dinorah Machado Vaz de Lima

Dourados – MS
Fevereiro / 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

**TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS APLICADAS EM
ESCAMAS DE PEIXES DA ESPÉCIE *Astyanax altiparanae*
PARA A DIFERENCIAÇÃO DE POPULAÇÕES**

Acadêmica: Dinorah Machado Vaz de Lima
Orientador: Prof. Dr. Sandro Marcio Lima
Co-orientador: Prof. Dr. Yzel Rondon Suárez

“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
Fevereiro / 2015

L697t Lima, Dinorah Machado Vaz de

Técnicas espectroscópicas aplicadas em escamas de peixes da espécie *Astyanax altiparanae* para a diferenciação de populações / Dinorah Machado Vaz de Lima. Dourados, MS: UEMS, 2015.

102 p. ; 30cm.


Dissertação (Mestrado) – Recursos Naturais – Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Unidade de Dourados, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Marcio Lima.

Co-orientador: Prof. Dr. Yzel Rondon Suárez.


1. Riachos. 2. Análise multivariada. 3. Dieta. I. Título.

CDD 23.ed. 597.09



*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein



Aos meus queridos pais, Adolpho e Terezinha,
pelo carinho, amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Terezinha e Adolpho, pelo amor, dedicação, apoio, compreensão e incentivo.

Ao meu namorado Rafael e ao meu irmão Adolpho pelo carinho, amor, compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sandro Marcio Lima e ao meu co-orientador Prof. Dr. Yzel Rondon Suárez, pela confiança referente ao presente trabalho, além da amizade e aprendizado.

Ao Prof. Dr. Luís Humberto da Cunha Andrade, pelo apoio, amizade e aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, na qual fui participante do Mestrado.

Agradeço a todos os amigos do Grupo e família “GEOF” pelo enorme aprendizado, apoio e carinho. No grupo percebi que o aprendizado é uma construção diária cujo ingrediente principal é o afeto. A este Grupo de Pesquisa que me apoiou e me acolheu, os meus mais sinceros agradecimentos.

Às minhas amigas de graduação: Lucimara, Paula, Pamela, Ingrid, Cristiane e Rafaella pelo apoio e anos de amizade.

A todos meus colegas de Mestrado, os quais estiveram presentes nesses dois anos de mestrado. Em especial a Ana Paula, a qual também pertence à família GEOF.

Ao CNPq pelo suporte financeiro e à Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa, de forma direta ou indireta.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1 – APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	4
1.Sistema do Alto Rio Paraná e a bacia do Rio Ivinhema: o grande laboratório	4
2.Indicadores ecológicos: abióticos e bióticos	6
3. Espectroscopia como método de análise ambiental	8
3.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier - Fotoacústica (FTIR-PAS).	9
3.2 Espectroscopia de Fluorescência	9
3.3 Análise Estatística Multivariada	10
3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS)	11
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 3 – ANÁLISES PRELIMINARES	19
1.Influência da região do corpo do peixe a qual as escamas foram retiradas	19
2. Influência das faces externa e interna das escamas	24
3.Influência do tamanho dos indivíduos	27
REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 4 – DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL DE PEIXE DA ESPÉCIE <i>Astyanax altiparanae</i> (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (CHARACIDAE) EM RIACHOS DA BACIA DO RIO IVINHEMA, ALTO RIO PARANÁ, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE FTIR-PAS.	31
RESUMO	31
ABSTRACT	33
1.INTRODUÇÃO	34
2.MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.1 Amostragem de dados	36

2.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier - Fotoacústica (FTIR-PAS).....	38
2.3 A análise dos dados	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4. CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 5 – APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA EM ESCAMAS DE PEIXES DA ESPÉCIE <i>Astyanax altiparanae</i> (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (CHARACIDAE) PARA A DIFERENCIAÇÃO DE POPULAÇÕES.....	50
RESUMO.....	50
ABSTRACT	52
1.INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAIS E MÉTODOS	55
2.1 Amostragem de dados.....	55
2.2 Espectroscopia de Fluorescência	56
2.3 A análise do dados.....	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4. CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	67
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	69
APÊNDICE	70

RESUMO

Nos estudos de ambientes aquáticos que utilizam peixes como bioindicadores, os aspectos mais avaliados são: a ocorrência (ou não) de algumas espécies; a frequência de más formações; fauna parasitária e danos hematológicos em resposta à qualidade ambiental. No entanto, certas estruturas, como as escamas, não são usadas nesta abordagem, sendo seu uso praticamente restrito à análise de crescimento dos peixes. A escama de peixe é um elemento ósseo e achatado utilizado na proteção do corpo do peixe e para auxiliar em sua hidrodinâmica. São compostas de diferentes materiais orgânicos, água e minerais que estão localizados em duas faces distintas: externa e interna, e que estão diretamente relacionadas ao hábito alimentar dos peixes. Assim, o objetivo do presente estudo é analisar se as escamas da espécie *Astyanax altiparanae* exibem respostas para as análises de absorção óptica na região do infravermelho médio e para as análises de fluorescência, a fim de diferenciar populações de peixes. As amostras foram coletadas em dez córregos distribuídos na Bacia do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul, Brasil, o qual é reconhecidamente importante para a biodiversidade do Estado. Os dados obtidos através dos espectros de absorção e de fluorescência foram utilizados para análise estatística. Os resultados mostraram que a absorção no infravermelho é uma ferramenta potencial para detectar as diferenças intraespecíficas, podendo detectar influências da dieta sobre a composição química das escamas de peixes. Os resultados de fluorescência indicam que, apesar de cada face da escama apresentar uma composição química ligeiramente diferentes, não foram observadas diferenças nas formas de curvas dos espectros. Porém, tanto o comprimento de onda de excitação em 360nm quanto em 405nm, a interpretação estatística é capaz de analisar a escamas de *A. altiparanae*, proporcionando resultados significativos e esclarecedores para a diferenciação de populações.

Palavras-chave: riachos, análise multivariada, dieta

ABSTRACT

In studies of aquatic environments using fish as bioindicators, the most valued aspects are: the occurrence (or not) of some species; the frequency of malformations; parasitic fauna and hematological damage in response to environmental quality. However, certain structures, like the scales are not used in this approach, and its practically restricted to use fish growth analysis. The fish scale is a bony, flat element used in fish body protection and to assist in their hydrodynamics. Are composed of different organic materials, water and minerals that are located in two distinct faces: external and internal, which are directly related to fish feeding habit. The objective of this study is to analyze whether the scales of *Astyanax altiparanae* species exhibit answers to the optical absorption analyzes in the mid-infrared region and the fluorescence analysis in order to differentiate fish stocks. The samples were collected in ten streams distributed in River Ivinhema Basin, Mato Grosso do Sul, Brazil, which is recognized as important to the state's biodiversity. The data obtained from the absorption and fluorescence spectra were used for statistical analysis. The results showed that the infrared absorption is a potential tool for detecting intraspecific differences may detect dietary influences on the chemical composition of fish scales. The fluorescence results indicate that, although each face of the scale present a slightly different chemical composition, no differences were seen in the forms of the spectra curves. However, neither the wavelength of excitation at 360nm and 405nm, the statistical interpretation is able to analyze the scales *A. altiparanae*, providing significant results for enlightening and differentiation of populations.

Keywords: streams, multivariate analysis, diet

CAPÍTULO 1 – APRESENTAÇÃO

Os riachos são ambientes relevantes para estudos, principalmente no âmbito ictiofaunístico, por serem ecossistemas aquáticos em pequena escala com características físico-químicas bem definidas, propícias à existência de peixes.

Recentemente, os estudos ictiofaunísticos deram uma importância maior aos riachos, por serem compostos principalmente por indivíduos de médio e pequeno porte, os quais apresentam uma resposta rápida às alterações ambientais e podem sofrer modificações em suas estruturas populacionais. Além disso, os riachos são importantes componentes das paisagens continentais. Por essas razões os riachos foram escolhidos para realização da pesquisa apresentada nessa dissertação.

Os ecossistemas aquáticos têm sofrido diversas alterações causadas pelas ações antrópicas. Na necessidade de se verificar as reais consequências dessas alterações ambientais dos corpos d'água para a biota aquática, associam-se métodos físico-químicos com métodos biológicos de avaliação, permitindo uma caracterização mais completa dos ambientes aquáticos.

A fim de complementar as metodologias convencionais para os estudos das alterações ambientais, surgiu a proposta de pesquisas que busquem desenvolver projetos multidisciplinares envolvendo as áreas de Exatas e da Biologia com o objetivo de encontrar novas metodologias e biomarcadores nos riachos da bacia do rio Ivinhema - MS, sendo este estudo uma linha de pesquisas do Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (GEOF) do Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (PGRN - UEMS). Esse estudo representa uma continuidade natural de trabalhos recentemente realizados no GEOF, que têm explorado principalmente os sistemas naturais do Estado de Mato Grosso do Sul.

As metodologias utilizadas nesta pesquisa são de base espectroscópica, as quais avaliam a interação da radiação eletromagnética com o material amostrado, como: a espectroscopia de absorção no infravermelho médio via fotoacústica e a espectroscopia de fluorescência no visível com excitação no ultravioleta. Como material de análise utilizou-se escamas de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000), por

Capítulo 1 – Apresentação

ser uma espécie bioindicadora e por apresentar ampla distribuição espacial. As análises foram realizadas com interpretação estatística multivariada dos dados.

Especificamente, o objetivo deste estudo foi analisar se as escamas de peixe da espécie *Astyanax altiparanae*, reconhecidas como bioindicadoras, exibem respostas para as metodologias espectroscópicas utilizadas para a diferenciação das populações.

Antes de apresentar os principais resultados e discussão do estudo, a dissertação foi dividida em capítulos na seguinte forma:

- Capítulo 2 – Considerações Gerais

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão da literatura sobre a bacia do Alto Rio Paraná e a bacia do Rio Ivinhema, destacando sua distribuição e suas principais características como a biologia ictiofaunística. Também será abordada a utilização de indicadores ecológicos, o uso de peixes e de suas escamas como bioindicadores. Por fim serão abordadas as metodologias utilizadas nessa dissertação.

- Capítulo 3 – Análises Preliminares

Neste capítulo é apresentada as análises preliminares desenvolvidas para subsidiar as etapas deste estudo. Os resultados obtidos nesta etapa experimental e avaliados com análise estatística mostraram que é possível a utilização das metodologias propostas para diferenciação de populações, bem como constatou a possibilidade do uso de escamas de peixe como bioindicadoras.

- Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

Neste capítulo, o objetivo do estudo, como o próprio título indica, foi investigar o uso da técnica de absorção no infravermelho médio por absorção de radiação coletada via fotoacústica em escamas de peixe da espécie *Astyanax altiparanae*, para a diferenciação de populações em riachos pertencentes a bacia do rio Ivinhema – MS. Na seção APÊNDICE, o artigo referente a este capítulo está estruturado de acordo com as normas para submissão à Revista *Journal of Fish Biology*.

- Capítulo 5 – Aplicação da espectroscopia de fluorescência em escamas de peixes da espécie *Astyanax altiparanae* (Characidae) para a diferenciação de populações.

Capítulo 1 – Apresentação

Neste capítulo, o objetivo do estudo foi investigar o uso da técnica de espectroscopia de fluorescência em dois comprimentos de onda de excitação (360 e 405nm) nas escamas de peixe da espécie *Astyanax altiparanae*, para a diferenciação de populações em riachos pertencentes a bacia do rio Ivinhema – MS.

- Capítulo 6 – Conclusões e Perspectivas.

Neste capítulo estão as considerações finais desta pesquisa e também são apresentadas as perspectivas dos trabalhos que poderão ser realizados a partir dos resultados encontrados nesta dissertação.

CAPÍTULO 2 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Sistema do Alto Rio Paraná e a bacia do Rio Ivinhema: o grande laboratório

O sistema do Alto Rio Paraná inclui os rios da Prata, Uruguai, Paraná e Paraguai. Com uma drenagem de aproximadamente 900.000 km², englobando a drenagem do Rio Paraná à montante do antigo Salto de Sete Quedas (inundado pelo Reservatório da Hidrelétrica de Itaipu) (BRITSKI & LANGEANI 1988; LANGEANI *et al.*, 2007). A bacia do Alto Rio Paraná abrange outras bacias importantes de acordo com o Estado que está inserida, como ilustrado na Figura 1.

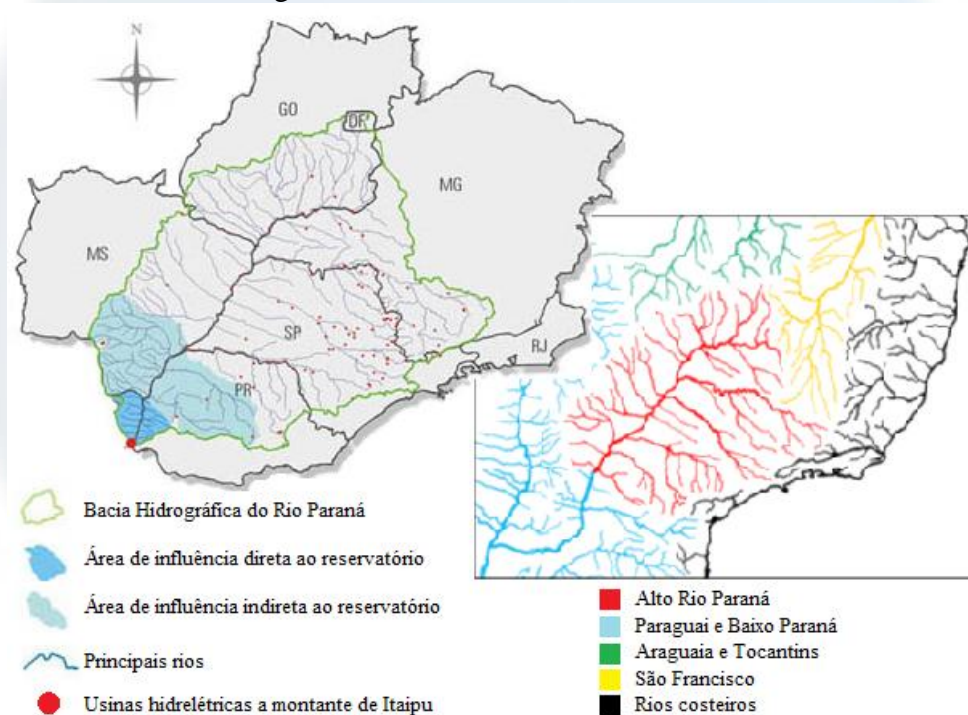


Figura 1. Mapa da localização geográfica do Sistema do Alto do Rio Paraná e suas bacias vizinhas. Fonte: Adaptado de Langeani *et al.*, 2007 e “Ache tudo e região”, 2015.

Uma dessas bacias e de grande importância para o Estado do Mato Grosso do Sul é a bacia do Rio Ivinhema, que é a segunda maior bacia hidrográfica do Estado, localizando-se na porção Centro-Sul, entre as latitudes de 21° e 23° S e as longitudes de 53°30' e 56°W (MATO GROSSO DO SUL, 2006). O rio Ivinhema percorre no sentido noroeste-sudeste, ao longo da região sudeste do Estado do Mato Grosso do Sul, e tem como principais

formadores os rios Vacarias, Santa Maria, Brilhante e Dourados, que nascem na vertente oriental da Serra de Maracajú. Na confluência com o Rio São Bento, em sua margem esquerda, inclina para sudeste e após a embocadura do Rio Curupaí bifurca-se em dois canais, que vão desaguar na margem direita do Rio Paraná (FORTES, 2003). Possui aproximadamente 600 km de extensão com 44.966,66 km² de área, compreendendo cerca de 5% da área total da bacia do Alto Rio Paraná (MATO GROSSO DO SUL, 2006; SÚAREZ *et al.*, 2011), sendo de grande importância ambiental e econômica para o estado de Mato Grosso do Sul.

O rio Ivinhema é um dos poucos rios com características lólicas remanescentes na bacia, resultante da conversão de uma parte do rio em uma sequência de riachos, (CALLISTO *et al.*, 2002). Os riachos são ambientes relevantes para estudos, principalmente no âmbito ictiofaunístico, por serem ecossistemas aquáticos em pequena escala com características lólicas bem definidas, propícias à existência de peixes (ESTEVEES & ARANHA, 1999).

Nessas últimas duas décadas, os estudos ictiofaunísticos, como: a avaliação da influência dos fatores ambientais sobre as comunidades; estudos da sistemática; composição; evolução e biologia geral, deram uma importância maior aos ambientes de menor volume de água, como os riachos (PAVANELLI & CARAMASCHI, 2003; CASTRO *et al.*, 2005; CASATTI *et al.*, 2006; LANGEANI *et al.*, 2007; SÚAREZ *et al.*, 2007; SÚAREZ & LIMA-JUNIOR, 2009). Essa importância é dada devido aos riachos serem compostos por, pelo menos, 50% de indivíduos de médio e pequeno porte (indivíduos com até 150 mm de comprimento padrão) (CASTRO, 1999). Considerando que essas espécies de pequeno porte apresentam alto grau de endemismo (BUCKUP, 1999; CASTRO, 1999) e dependem de material alóctone (LOWE-McCONNELL, 1999), apresentam uma resposta rápida às alterações ambientais e podem sofrer modificações em suas estruturas populacionais, inclusive com o desaparecimento das espécies mais sensíveis. Por essas razões os riachos foram escolhidos para realização da pesquisa apresentada nessa dissertação.

2. Indicadores ecológicos: abióticos e bióticos

Os ecossistemas aquáticos têm sofrido forte pressão das ações antrópicas (MORENO & CALLISTO, 2005). Desta forma, diversas metodologias, como o uso de indicadores ecológicos, têm sido utilizadas na avaliação e no monitoramento das alterações ambientais, as quais alteram a qualidade hídrica (KÖNIG *et al.*, 2008).

Os indicadores ecológicos são descritores ambientais eficientes, usados para avaliar o estado do ambiente e monitorar tendências dessa condição ao longo do tempo. Os indicadores ecológicos devem ser capazes de acusar qualquer sinal de mudança no ambiente e, se possível, serem utilizados para detectar a causa do problema (DALE & BEYELER, 2001).

Para ser um indicador ecológico o descritor deve caracterizar efetivamente o estado de um determinado sistema ecológico e ser simples o suficiente para ser facilmente medido, podendo ser um indicador abiótico ou biótico. (DALE & BEYELER, 2001).

O uso de variáveis físicas e químicas, principalmente através de índices de qualidade de água, são métodos bastante utilizados para avaliar a influência abiótica no ambiente. (DA-SILVA & JARDIM, 2006). A utilização de determinados índices baseia-se no fato de que, ao ocorrer alterações ambientais, as variáveis hídricas serão alteradas e, pela análise destas, pode-se inferir a integridade ambiental (KÖNIG *et al.*, 2008).

As variáveis físicas e químicas dos riachos podem ser avaliadas de acordo com testes do oxigênio, pH, temperatura, condutividade elétrica, qualidade da água e estrutura física do habitat. Essas variáveis permitem avaliar a influência dos fatores ambientais sobre a ictiofauna, podendo verificar alterações nas comunidades, nas populações, na sistemática, na composição, na evolução e na biologia geral dos peixes (PAVANELLI & CARAMASCHI, 2003; CASTRO *et al.*, 2005; CASATTI *et al.*, 2006; LANGEANI *et al.*, 2007; SÚAREZ *et al.*, 2007; SÚAREZ & LIMA-JUNIOR, 2009).

Na necessidade de se verificar as reais consequências das alterações ambientais dos corpos d'água para a biota aquática, recomenda-se associar os métodos físico-químicos de avaliação com métodos biológicos, permitindo uma caracterização mais completa dos ambientes aquáticos (CALLISTO *et al.*, 2004). As respostas biológicas fornecem

subsídios para avaliar a qualidade estética, ecológica e de saúde dos ambientes aquáticos (JUNQUEIRA & CAMPOS, 1998).

Nesse sentido, o uso de peixes como indicador biótico (bioindicadores) se justifica por fornecerem uma visão integrada do ambiente aquático. Os peixes apresentam muitas informações devido a ampla variedade de alimentação, diversos tipos de habitats e são representativos em cadeias tróficas aquáticas (CETRA & PETRERE, 2006).

Os peixes são bioindicadores valiosos para estudos com organismos, populações e comunidades. A utilização de peixes como bioindicadores é capaz de fornecer importantes informações com capacidade de descrever alterações nos ecossistemas aquáticos (SCHULZ & MARTINS-JUNIOR, 2001).

Além disso, os peixes representam aproximadamente 50% dos vertebrados, englobando cerca de 28.000 espécies e ocupando os mais diversos ambientes aquáticos. O Brasil destaca-se pela diversidade de sua fauna, principalmente de peixes de água doce, com aproximadamente 2.500 espécies conhecidas (BUCKUP *et. al.*, 2007), representando aproximadamente 37% dos vertebrados conhecidos no país (LEWINSOHN & PRADO, 2005).

Entre as várias famílias de peixes encontradas na fauna brasileira, a família Characidae é bastante representativa e diversa, sendo uma das famílias considerada complexa pelo fato de representar a maioria dos peixes de escamas. Dentro da família Characidae está a subfamília Tetragonopterinae, a qual é amplamente distribuída. A espécie *Astyanax altiparanae* (“lambari do rabo amarelo” e/ou “tambiú”), utilizada neste estudo, pertence a esta subfamília e é comumente encontrado nas bacias do sistema do Alto Rio Paraná, ocupando diferentes tipos e tamanhos de ambientes (riachos, rios e lagos) (GARUTTI & BRITSKI, 2000). São peixes de tamanho pequeno e sua dieta revela ser uma espécie generalista e oportunista, sendo altamente adaptável às mudanças ambientais e com plasticidade elevada em resposta à disponibilidade de recursos (GOMIERO & BRAGA, 2003). Desta forma, esta espécie está sendo utilizada no estudo por ser uma espécie bioindicadora resistente às alterações ambientais, possibilitando verificar se há diferenciação de populações.

Nos estudos de ambientes aquáticos, que utilizam peixes como bioindicadores, os aspectos mais avaliados são: a ocorrência (ou não) de algumas espécies; a frequência de más formações; fauna parasitária e danos hematológicos em resposta à qualidade ambiental (HARMEL, 2004; ABNT, 2004). No entanto, certas estruturas, como as escamas, não são usadas nesta abordagem, sendo seu uso praticamente restrito à análises de crescimento dos peixes e, em determinadas regiões, as escamas casualmente são utilizadas para fabricação de farinha e o óleo de peixe usado na fabricação de rações para peixes (NUNES, 2001; ISLAM *et al.*, 2004; FAO, 2007).

A. altiparanae possui escamas pequenas, arredondadas, com bordas ligeiramente grossas e lisas. A escama é um elemento ósseo e achatado que desempenha tanto a função de proteção do corpo do peixe quanto auxilia na sua hidrodinâmica (SIRE & AKIMENKO, 2004). É composta por diferentes matérias orgânicas, água e minerais (PATI, ADHIKARI & DHARA, 2010) que estão distribuídas em duas faces distintas: a externa, em contato com a água, com textura áspera, fina, composta de uma fase inorgânica de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{O}_4)_6(\text{OH})_2$] deficiente em cálcio; e a face interna, de textura lisa, espessa, composta de uma fase orgânica protéica de colágeno tipo I (IKOMA *et al.*, 2003; HUANG, HSIAO & CHAI, 2011; MORI *et al.*, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que as escamas são capazes de incorporar poluentes em suas matrizes e podem agir como uma impressão digital química dos eventos que estão ocorrendo no ambiente em que os peixes habitam (KAUR & DUA, 2012; GUAMBE *et al.*, 2012). A maioria desses estudos utilizam análises morfométricas e técnicas muito sofisticadas como a microscopia eletrônica de varredura. Assim, o presente estudo propõe o emprego de técnicas espectroscópicas em escamas de peixe da espécie *A. altiparanae* para identificar a impressão digital química de seus habitats.

3. Espectroscopia como método de análise ambiental

Importante destacar que as metodologias espectroscópicas empregadas nessa pesquisa são inéditas e complementam os estudos anteriores desenvolvidos no GEOF-UEMS em sistemas biológicos. Os detalhes da configuração usados nos estudos serão apresentados nos capítulos posteriores.

3.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier - Fotoacústica (FTIR-PAS).

A Espectroscopia de Absorção Fotoacústica no Infravermelho Médio por Transformada de Fourier (FTIR-PAS, *Fourier Transform Infrared - Photoacoustic Spectroscopy*) é uma técnica que permite identificar os grupos químicos presentes em cada amostra, permitindo a distinção de espécies químicas através das frequências específicas e modos de vibrações intrínsecas de cada ligação química. O sistema fotoacústico de detecção consiste em determinar a absorção do material através de um sinal acústico com energia correspondente à da energia da radiação absorvida pela molécula. Essa metodologia se destaca à transmissão convencional por não requerer qualquer preparação da amostra, podendo com isso ser aplicada em diferentes sistemas biológicos (MICHAELIAN, 2010).

A técnica de FTIR-PAS vem sendo aplicada em diversos estudos (BJARNESTAD & DAHLMAN, 2002), por exemplo, para detectar a contaminação de fungos sobre a superfície do milho (GORDON *et al.*, 1997); para avaliar a qualidade das sementes de ervilha (LETZELTER *et al.*, 1995); para identificar a presença de fungos e bactérias (THOMPSON *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2006; NIE *et al.*, 2007); e mais recentemente foi empregada pelo Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (GEOF) da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) na identificação de doença (“ferrugem”) em plantas (ANDRADE *et al.*, 2008); para diferenciar castas e espécies de formigas (ANTONIALI JUNIOR *et al.*, 2007, 2008); em feromônios de vespas (NEVES *et al.*, 2012); e para a diferenciação de espécies de peixes a partir da análise de escamas (ALMEIDA *et al.*, 2012). Mais recentemente foi empregada para avaliar a integridade ambiental de riachos através da análise da escama de peixe da espécie *A. altiparanae* (SANTANA, 2014).

3.2 Espectroscopia de Fluorescência

A análise da fluorescência de um composto tem sido amplamente reconhecida como uma técnica muito sensível devido à capacidade de se detectar o sinal proveniente de moléculas quando excitadas por um comprimento de onda específico. É também bastante seletiva, uma vez que os comprimentos de onda de excitação e emissão dependem do

mesmo composto de interesse, fazendo com que o sinal de fluorescência coletado seja característico de cada molécula em estudo, pois somente aqueles grupos funcionais que fluorescem podem ser observados. Pode ser aplicada em sistemas químicos nos estados líquido, gasoso e sólido, complexos ou não. Permite a determinação e a caracterização de materiais e componentes orgânicos e inorgânicos presentes em uma amostra com fases múltiplas, ou em baixas concentrações das fases minerais. É tão importante quanto outras técnicas de espectroscopia, por exemplo, a absorção no infravermelho (FTIR) (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009; SCHERER *et al.*, 2011).

A técnica de fluorescência está sendo utilizada em diversos estudos, por exemplo, no estudo de qualidade de óleos vegetais comestíveis como azeite de oliva (CHEIKBOUSMAN *et al.*, 2005), na caracterização de óleos vegetais (KONGBONGA *et al.*, 2011) e na determinação do teor de biodiesel em misturas de diesel/biodiesel (SCHERER *et al.*, 2011), e em estruturas de apatita e hidroxiapatita sintéticas dopadas com Eu^{3+} , Eu^{2+} e o Ce^{3+} (TERNANE, COHEN-ADAD & PANCZER, 2002; FENG *et al.*, 2011).

3.3 Análise Estatística Multivariada

Para ambas as técnicas espectroscópicas, para a avaliação estatística dos dados, utilizou-se a análise multivariada de função discriminante.

A análise multivariada é um método estatístico aplicado quando o experimento fornece observações de duas ou mais variáveis respostas, havendo uma correlação entre elas. Ou seja, a análise multivariada é um conjunto de métodos estatísticos aplicados quando é preciso medir várias variáveis simultaneamente para cada elemento amostral (MINGOTI, 2007; MANLY, 2008; FERREIRA, 2011).

A análise de função discriminante é uma técnica de análise multivariada utilizada para diferenciar ou discriminar populações e classificar indivíduos em populações pré-definidas. Para a diferenciação, estabelecem funções das variáveis observadas que expliquem a diferença das populações. Para a classificação, estabelecem funções que além de diferenciar as populações, classifique novos indivíduos em uma das populações. Assim, a análise de função discriminante possui o objetivo de apontar a qual grupo um elemento tem mais probabilidade de pertencer, ou seja, trata de avaliar a possibilidade de separação

de dois ou mais grupos de indivíduos (MINGOTI, 2007; MANLY, 2008; FERREIRA, 2011).

A análise multivariada de função discriminante é um método eficiente de análise, pois permite encontrar uma combinação linear entre as variáveis que melhor explique a diferença entre os grupos (QUINN & KEOUGH 2005). Utilizou-se esta análise pelo fato dos grupos, aos quais as amostras pertenciam, serem conhecidos. Sendo este um pressuposto para a realização desta análise estatística. Além disso, este é um método altamente eficiente e é utilizado para encontrar uma combinação linear das variáveis que explicam melhor a diferenciação entre as populações analisadas. Como resultado desta análise estatística é gerado um gráfico de dispersão das amostras e três fatores são verificados: Wilk's Lambda, que varia de 0 a 1, sendo que, a distância entre os grupos é maior quando mais próximo de 0 e menor quando mais próximo de 1; o fator "F", que quanto maior for seu valor, maior é a separação entre os grupos (este fator está associado ao tamanho do conjunto de dados); e o fator "p" que indica se a diferença entre os grupos é ou não significativa de tal modo que, para ser significativo, seu valor deve ser $p < 0,05$.

A distância euclidiana é uma das medidas de dissimilaridade mais utilizadas na prática (GAUCH, 1982). De acordo com Brower e Zar (1977), quanto menor o valor da distância euclidiana entre dois grupos/pontos, mais próximos eles se apresentam em termos de parâmetros quantitativos por classe. Logo, quanto menor a distância euclidiana, maior a eficiência do procedimento.

O teste de Mantel é um procedimento estatístico que investiga a significância estatística da correlação entre duas matrizes (MANTEL, 1967), frequentemente usado para correlacionar à variável "distância" com outra variável qualquer (MANLY, 1986).

3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS)

Esse método foi empregado nas escamas com o intuito de visualizar as diferenças entre as faces das escamas, estabelecendo sua composição química mais comum. Trata-se de estudos iniciais que deverão ser mais explorados em estudos futuros realizados em sistemas biológicos pelo GEOF-UEMS.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica muito versátil e usada rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos. Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de fácil interpretação. Uma das grandes vantagens do MEV é sua alta resolução, na ordem de 2 a 5 nm (20 - 50 Å) - existindo instrumentos com até 1 nm (10 Å). Além disso, o MEV pode ser acoplado com Sistema de Energia Dispersiva (*Energy Dispersive System - EDS*), o qual possibilita a determinação da composição qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos. O limite de detecção é da ordem de 1%, mas pode variar de acordo com as especificações utilizadas durante a análise, como o tempo de contagem, por exemplo. Dentre as vantagens do sistema EDS, destaca-se os perfis e mapas químicos (NAGATANI *et al.*, 1987; GOLDSTEIN & NEWBURY, 1992; MALISKA, 2004).

Portanto, a elevada profundidade de foco (imagem com aparência tridimensional) e a possibilidade de combinar a análise microestrutural com a microanálise química são fatores que em muito contribuem para o amplo uso desta técnica.

REFERÊNCIAS

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**; Norma Técnica NBR15088, Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes, Rio de Janeiro, 2004.

ACHE TUDO E REGIAO. **Mapas geográficos**. Disponível em:
http://www.achetudoeregiao.com.br//pr/rio_parana.htm. Acesso em: 02 de Janeiro de 2015.

ALMEIDA, F. S.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. Differentiation of Neotropical Fish Species with Statistical Analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy Data. **Applied Spectroscopy**. v.66, p.782-785, 2012.

ANDRADE, L. H. C.; FREITAS, P. G.; MANTOVANI, B. G.; FIGUEIREDO, M. S.; LIMA, R. A.; LIMA, S. M.; RANGEL, M. A. S.; MUSSURY, R. M. Detection of soybean rust contamination in soy leaves by FTIR photoacoustic spectroscopy. **The European Physical Journal Special Topics**. v.153, p.539-541, 2008.

ANTONIALI JUNIOR, W. F.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizzottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v.6, p. 492-499, 2007.

ANTONIALI JUNIOR, W. F.; SÚAREZ, Y. R.; IZIDA, T.; ANDRADE, L. H. C.; LIMA, S. M. Intra and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 559-566, 2008.

BJARNESTAD, S.; DAHLMAN, O. Chemical compositions of hardwood and softwood pulps employing photoacoustic Fourier transform infrared spectroscopy in combination with partial least-squares. **Analytical Chemistry**, v. 74, p 5851-5858, 2002.

BRITSKI, H.A. & LANGEANI, F. *Pimelodus paranaensis*, sp.n., um novo Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) do Alto Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**.5(3):409-417. 1988.

BROWER, J. E.; ZAR, J. H. **Field & laboratory methods for general ecology**. 2.ed. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers, 226 p., 1977.

BUCKUP, P. A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In CARAMASCHI, E. P. R.; MAZZONI, R., PERES-NETO, P. R. (Ed.). **Ecologia de peixes de riachos**. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, p. 91-138, 1999.

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

Capítulo 2 – Considerações Gerais

CALLISTO, M.; FERREIRA, W. R.; MORENO, P.; GOULART, M.; PETRUCIO, M. Aplicação de um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats em atividades de ensino de pesquisa (MG-RJ). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v, 14, n. 1, p. 91-98, 2002.

CALLISTO, M.; GONÇALVES, Jr, J. F.; MORENO, P. Invertebrados aquáticos como bioindicadores. In: **Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais**. Belo Horizonte: UFMG, v.1, p.1-12. 2004.

CASATTI, L.; LANGEANI, F.; SILVA, A. M.; CASTRO, R. M. C. Stream fish, water and habitat quality in a pasture dominated basin, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 66, n. 2B, p. 681-696, 2006.

CASTRO, R. M. C. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos. In: CARAMASCHI, E. P. R.; MAZZONI, R.; PERESNETO, P. R. (Ed.). **Ecologia de peixes de riachos**. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, p.139-155, 1999.

CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; VARI, R. P.; MELO, A. L. A.; MARTINS, L. S. F.; ABREU, T. X.; BENINE R. C.; GIBRAN, F. Z.; RIBEIRO, A. C.; BOCKMANN, F. A.; CARVALHO, M.; PELIÇÃO, G. Z.; FERRERIRA, K. M.; STOPIGLIA, R.; AKAMA, A. Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of the upper rio Paraná basin, Brazil Ichthyological Exploration of Freshwaters, **Munchen**, v. 16, n. 3, p. 193-288, 2005.

CETRA, M.; PETRERE JUNIOR, M. 2006, Fish-Assemblage Structure of the Corumbatai River basin, São Paulo State, Brazil: characterization and anthropogenic disturbances. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 66, no. 2A, p. 431-439.

CHEIKBOUSMAN, R.; ZUDE, M.; BOUVERESSE, DJ-R.; LÉGER, C. L.; RUTLEDGE, D. N.; BIRLOUEZ-ARAGON, I. Fluorescence spectroscopy for monitoring deterioration of extra virgin olive oil during heating. **Anais Bioanal Chemical**. v.382: 1438-1443, 2005.

DALE, V. H.; BEYELER, S. C. Challenges in the development and use of ecological indicators. **Ecological Indicators**, 1: 3-10. 2001.

DA-SILVA, G. S.; JARDIM, W. F. Um novo índice das águas para proteção de vida aquática aplicado ao rio Atibaia, região de Campinas/Paulínia – SP. **Química Nova**. V.29; n.4; p. 689-694. 2006.

ESTEVES, K. E.; ARANHA, J. M. R. Ecologia trófica de peixes de riachos. In CARAMASCHI, E. P. R.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (Ed.). **Ecologia de peixes de riachos**. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, p. 157-182, 1999.

FAO – **Food and Agricultural Organization of the United Nations**. The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA). Rome: FAO, 180p, 2007.

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.

FERREIRA, D. F. **Estatística multivariada**. 2 ed. Lavras: UFLA, 675 p., 2011.

FORTES, E. **Geomorfologia do baixo curso do rio Ivinhema, MS: uma abordagem morfogenética e morfoestrutural**. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 209p., 2003.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax*(Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia: Série Zoologia**, v. 13, p. 65-88, 2000.

GAUCH, H. G. **Multivariate analysis in community ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 298p., 1982.

GOLDSTEIN, J.; NEWBURY, D. E. **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis - A text for biologist, Materials Scientist and Geologists**. Plenum Press, New York, 2 ed., 1992.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. O lambari *Astyanax altiparanae* (Characidae) pode ser um dispersor de sementes? **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 25 n. 2, p. 353-360, 2003.

GORDON, S. H.; SCHUDY, R. B.; WHEELER, B. C.; WICKLOW, D. T.; GREENE, R. V. Identification of Fourier transform infrared photoacoustic spectral features for detection of *Aspergillus flavus* infection in corn. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 179-186, 1997.

GUAMBE, J. F.; MARS, J. A.; DAY, J. Application of PIXE in pollution control of the Matola River in Mozambique-analysis of fish scales. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 273, p. 171-172, 2012.

HARMEL, V. C.; **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise de qualidade de águas superficiais**. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional de Blumenau, Brasil, 2004.

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

HUANG, Y-C.; HSIAO, P-C.; CHAI, H-J. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. **Ceramics International**. v.37: 1825-1831, 2011.

IKOMA, T.; KOBAYASHI, H.; TANAKA, J.; WALSH, D.; MANN, S. Microstructure, mechanical, and, biomimetic properties of fish scales from *Pagrus major*. **Journal of Structure Biology**, v.142, p.327-333, 2003.

ISLAM, M. S.; KHAN, S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**. v.49, p.103-110, 2004.

JUNQUEIRA, V. M.; CAMPOS, S. C. M. Adaptation of the “BMWP” method for water quality evaluation to Rio das Velhas watershed (Minas Gerais, Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 10. p.125-135. 1998.

KAUR, R.; DUA, A. Fish scales as indicators of wastewater toxicity from an international water Tung Dhabdrain. **Environmental Monitoring and Assessment**. v.184, p.2729-2740, 2012.

KONGBONGA, Y. G. M.; GHALILA, H.; ONANA, M. B.; MAJDI, Y.; LAKHDAR, Z. B.; MEZLINI, H.; SEVESTRE-GHALILA, S. Characterization of Vegetable Oils by Fluorescence Spectroscopy. **Food Nutrition Sciences**. 2: 692-699, 2011.

KÖNIG, R.; SUZIN, C. R. H.; RESTELLO, R. M.; HEPP, L. U. Qualidade das águas de riachos da região norte do rio Grande do Sul (Brasil) através de variáveis físicas, químicas e biológicas. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**. v. 3. n.1.; p. 84-93. 2008.

LANGEANI, F.; CASTRO, R. M. C.; OYAKAWA, O. T.; SHIBATTA, O. A.; PAVANELLI, C. S.; CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 75-78, 2007.

LETZELTER, N. S.; WILSON, R. H.; JONES, A. D.; SINNAEVE, G. Quantitative determination of the composition of individual pea seeds by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 67, 239-245, 1995.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Quantas espécie shá no Brasil? **Megadiversidade**, v.1, p.36-42, 2005.

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Tradução VAZZOLER, A. E. A. de M.; AGOSTINHO, A. A.; CUNNINGHAM, P. T. M. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo (coleção base). 535p. 1999.

MALISKA, A. M. **Microscopia eletrônica de varredura**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. 98 p., 2004. Disponível em: http://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf. Acesso em: 18 de Janeiro de 2015.

MANLY, B. J. F. **Métodos estatísticos multivariados**: uma introdução. 3 ed. Porto Alegre: Bookman, 229p., 2008.

MANLY, B. J. F. Randomization and regression methods for testing for associations with geographical, environmental and biological distances between populations. **Researches on Population Ecology**. v.28, p. 201-218, 1986.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**. v.27, p. 209-220, 1967

MATO GROSSO DO SUL. **Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos/Instituto de Meio Ambiente Pantanal**. Gerência de Recursos Hídricos. Bacia do Rio Ivinhema – Diagnóstico Hidroambiental e Socioeconômico 2004-2005. Campo Grande – MS, 2006.

MICHAELIAN, K. H. **Photoacoustic Infrared Spectroscopy**. New York-US: John Wiley & Sons, 402 p., 2010.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem**. Belo Horizonte: UFMG, 297 p., 2007.

MORENO, P.; CALLISTO, M. Indicadores ecológicos e a vida na lama. **Ciência Hoje**. v. 213; p. 68-71. 2005.

MORI, H.; TONE, Y.; SHIMIZU, K.; ZIKIHARA, K.; TOKUTOMI, S.; IDA, T.; IHARA, H.; HARA, M. Studies on fish scale collagen of Pacific saury (*Cololabissaira*). **Materials of Science and Engineering C**, v.33, p.174–181. 2013.

NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra-high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**. v.11, p. 901-909, 1987.

NEVES, E. F.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R.; LIMA, S. M.; ANTONIALLI JUNIOR, W. F. Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 1891-1898, 2012.

NIE, M.; ZHANG, W. Q.; XIAO, M.; LUO, J. L.; BAO, K.; CHEN, J. K.; LI, B. FTIR FTIR Spectroscopy and Artificial Neural Network Identification of *Fusarium* Species. **Journal of Phytopatology**, v. 155, p. 364-367, 2007.

NUNES, S. B. **Estabelecimento de um plano de análise de perigo e pontos críticos de controle (APPCC) para Peixe-Sapo (*Lophiuspis catorius*) eviscerado e congelado**. Dissertação Mestrado, Florianópolis: UFSC, 121p., 2001.

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

PAVANELLI, C. S.; CARAMASCHI, É. P. Temporal and spatial distribution of the ichthyofauna in two streams of the upper rio Paraná basin. **Brazilian Archives Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 2, p. 271-280, 2003.

QUINN, G. P.; KEOUGH, M. J. (2005). **Experimental design and data analysis for biologists**. Edinburgh-UK: Cambridge, University Press, 2005. 537 p.

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

SCHERER, M. D.; OLIVEIRA, S. L.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; CAIRES, A. R. L. Determination of the biodiesel content in diesel/biodiesel blends: a method based on fluorescence spectroscopy. **Journal of Fluorescence**. v.21: 1027-1031, 2011.

SCHULZ, U. H.; MARTINS-JUNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as bioindicators of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 4, p. 615-622, 2001.

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**. 48: 233-247, 2004.

SÚAREZ, Y. R.; LIMA-JÚNIOR, S. E. Variação espacial e temporal nas assembléias de peixes de riachos na bacia do rio Guiraí, Alto Rio Paraná. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 1, p. 101-111, 2009.

SÚAREZ, Y. R.; SOUZA, M. M.; FERREIRA, F. S.; PEREIRA, M. J.; SILVA, E. A.; XIMENES, L. Q. L.; AZEVEDO, L. G.; MARTINS, O. C.; LIMA-JÚNIOR, S.E. Patterns of species richness and composition of fish assemblages in stream of the Ivinhema River basin, Upper Paraná River, **Acta Limnologica Brasiliensia**. vol. 23, no. 2, p. 177-188, 2011

SÚAREZ, Y. R.; VALÉRIO, S. B.; TONDATO, K. K.; XIMENES, L. Q. L.; FELIPE, T. R. A. Determinantes ambientais da ocorrência de espécies de peixes em riachos de cabeceira da bacia do rio Ivinhema, alto rio Paraná. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, vol. 29, no. 2, p. 145-150, 2007.

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.

THOMPSON, S. E.; FOSTER, N. S.; JOHNSON, T. J.; VALENTINE, N. B.; AMONETTE, J. E. Identification of Bacterial Spores Using Statistical Analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy Data. **Applied Spectroscopy**. v.57, p.893-899, 2003.

ZHAO, H.; PARRY, R. L.; ELLIS, D. I.; GRIFFITH, G. W.; GOODACRE, R. The rapid differentiation of *Streptomyces* isolates using Fourier transform infrared spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**. v.40, p.213-218, 2006.

CAPÍTULO 3 – ANÁLISES PRELIMINARES

Neste capítulo serão apresentadas as análises preliminares desenvolvidas para subsidiar as etapas subsequentes do trabalho.

1. Influência da região do corpo do peixe a qual as escamas foram retiradas

Nesta etapa buscou verificar se a região do corpo do peixe a qual foram retiradas as escamas fornecem informações diferentes quanto às respostas aos métodos espectroscópicos. Desta forma, foram coletados trinta indivíduos da espécie *Astyanax altiparanae*. Todos os indivíduos foram coletados no mesmo riacho, Água Boa, com o objetivo de padronizar a influência ambiental, e não foi padronizado o tamanho dos peixes, e conseqüentemente de suas escamas. O riacho Água Boa é localizado dentro do município de Dourados – MS.

Dos indivíduos coletados, retirou-se quinze escamas de cada, sendo cinco da região denominada umeral; cinco da região denominada pélvica; e cinco da região caudal, conforme ilustrado na Figura 1.1. Com essas escamas foram realizadas análises de FTIR-PAS e de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação em 360 e 405 nm. Todas as análises foram realizadas tanto para a face externa quanto para a face interna da escama. Os dados obtidos foram explorados com a análise estatística de função discriminante a fim de aferir se para cada região do corpo do peixe seria possível perceber diferença entre os espectros obtidos nas escamas de diferentes tamanhos, tanto analisando a face externa quanto a interna.

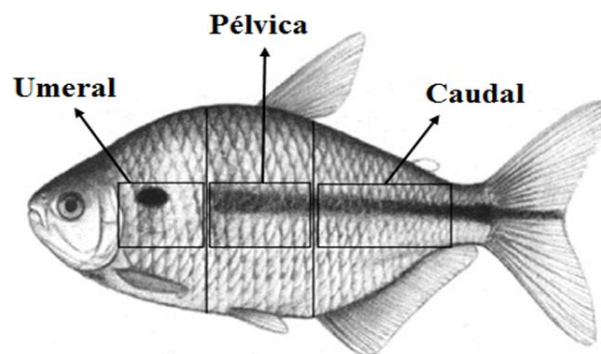


Figura 1.1 Exemplar de *Astyanax altiparanae* ilustrando as regiões em que as escamas foram retiradas.

A Figura 1.2 mostra os espectros médios das regiões umeral, pélvica e caudal obtidos das análises de FTIR-PAS para a face externa (a) e interna (b) das escamas, independentemente do tamanho dos peixes. Pelos espectros é possível perceber que a região em torno de 1000 cm^{-1} é bem mais intensa para a face externa das escamas, o que é de se esperar por ser a face com maior concentração dos modos vibracionais referentes à hidroxiapatita.

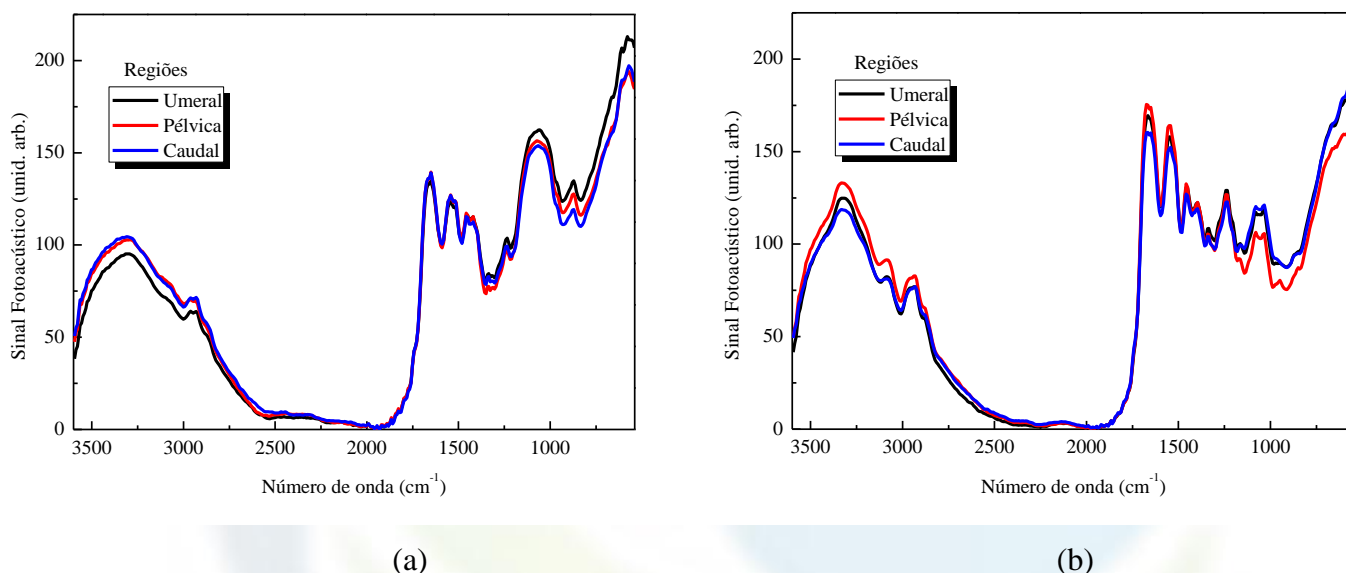


Figura 1.2 Espectros médios de absorção fotoacústica das faces externa (a) e interna (b) das regiões umeral, pélvica e caudal das escamas do *A. altiparanae*.

Embora os espectros obtidos com as análises de FTIR-PAS apresentaram pequena diferença entre as intensidades, buscou-se à análise estatística para verificar se havia diferenças significativas entre as regiões do corpo do peixe para cada grupo de tamanho analisado. Conforme será apresentado nos próximos capítulos, os principais picos de absorção referentes à amida e amina foram selecionados para a análise estatística, de maneira que o número de onda no espectro foi usado como variável. Com os resultados obtidos da análise estatística para a face externa das escamas, as quais apresentam hidroxiapatita (IKOMA *et al.*, 2003; MORI *et al.*, 2013), constatou-se que a única região com diferenças não significativas é a região caudal, ou seja, escamas retiradas dessa porção não são capazes de perceber diferença entre os tamanhos dos peixes (e conseqüentemente

das escamas). A região pélvica e a região umeral mostraram ser diferentes, as quais podem separar os grupos pelos seus respectivos tamanhos. A síntese dos dados estatísticos obtidos está listada na Tabela 1.1. Vale notar que a porcentagem de separação entre os tamanhos dos peixes para as escamas da região umeral e pélvica são bastante significativos (76 e 71%, respectivamente). Para a face interna, composta principalmente por colágeno do tipo I (IKOMA *et al.*, 2003; MORI *et al.*, 2013), realizou-se o mesmo procedimento e a única região que não mostrou diferença significativa entre os três grupos de tamanho foi a região umeral do corpo do peixe. A região caudal e pélvica teve a primeira raiz canônica explicando 85 e 77% dos dados, respectivamente.

A Figura 1.4 mostra os espectros médios obtidos nas análises de espectroscopia de fluorescência, para o comprimento de onda de excitação de 360nm, para os três grupos de tamanho dos peixes, tanto para excitação feita na face externa (a) quanto na face interna (b) das escamas.

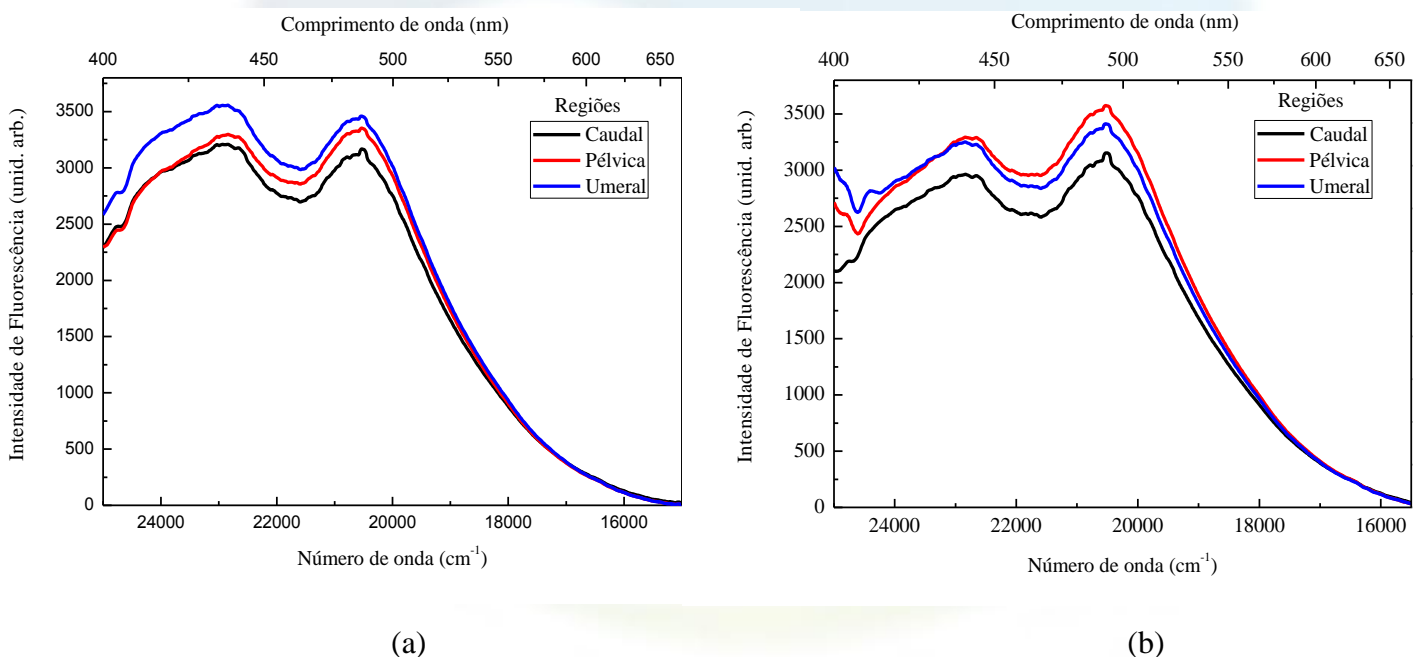


Figura 1.4 Espectros médios de fluorescência no comprimento de onda de excitação em 360 nm, das três regiões de retirada das escamas, para as faces externa (a) e interna (b).

A Figura 1.5 mostra os espectros médios de fluorescência para o comprimento de onda de excitação de 405nm, excitando as três regiões de retirada da escama dos peixes, tanto nas faces externa (a) quanto na interna (b).

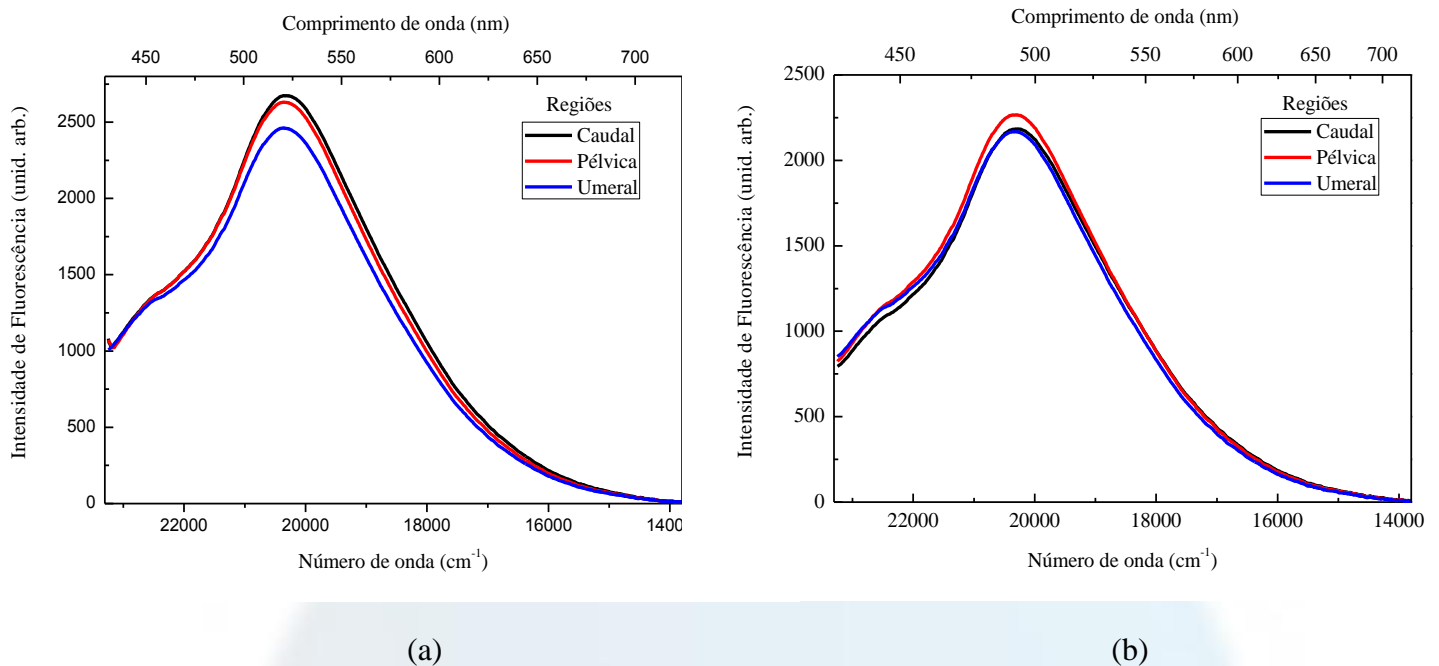


Figura 1.5 Espectros médios de fluorescência no comprimento de onda de excitação em 405nm, das três regiões de retirada das escamas, excitando as faces externa (a) e interna (b).

Assim como nas análises de FTIR-PAS, os espectros de fluorescência obtidos apresentaram uma diferença pequena entre as intensidades, em ambos comprimento de onda de excitação utilizados (360 e 405nm), sendo necessário a análise estatística para uma melhor interpretação. Como será apresentado no Capítulo 5, os espectros de fluorescência foram deconvoluídos em Gaussianas, de maneira que as intensidades de fluorescência para cada uma das Gaussianas foram consideradas como parâmetro para a análise estatística, e a posição em número de onda de cada Gaussiana foi usada como variável. Estas Gaussianas correspondem a emissões tanto da hidroxiapatita quanto do colágeno tipo I, de acordo com a referência Ikoma *et al.*(2003) e Mori *et al.*(2013).

Os resultados obtidos com a análise estatística foram coincidentes com os resultados de FTIR-PAS, conforme se vê na Tabela 1.1. Para excitação da face externa, a região caudal é a mais interessante por que não consegue distinguir os tamanhos dos peixes. Por outro lado, com excitação na face interna, a região umeral mostra-se mais representativa. Embora se tenha outras regiões com resultados estatísticos não significativos para o estudo com a espectroscopia de fluorescência, decidiu-se usar o mesmo conjunto de amostra em ambos os métodos espectroscópicos, a saber, absorção no

infravermelho médio e fluorescência, usando escamas da porção caudal se a excitação for externa e porção umeral se a excitação for interna.

Tabela 1.1 Resultados da análise estatística para as medidas de fluorescência em 360 e 405 nm e de FTIR-PAS para as faces externa e interna das escamas de acordo com as regiões do corpo do peixe das quais as escamas foram retiradas.

FACE	REGIÕES	360 nm	405 nm	FTIR-PAS
EXTERNA	UMERAL	81%; p = 0.036	98%; P = 0.821 NS	76%; P = 0.001
	PÉLVICA	66%; p = 0.107 NS	99%; P = 0.005	71%; P = 0.000
	CAUDAL	88%; p = 0.089 NS	96%; P = 0.275 NS	71%; P = 0.113 NS
INTERNA	UMERAL	87%; p = 0.230 NS	Não gerado gráfico – NS	91%; P = 0.766 NS
	PÉLVICA	73%; p = 0.011	84%; P = 0.084 NS	77%; P = 0.077 NS
	CAUDAL	73%; p = 0.059 NS	92%; P = 0.437 NS	85%; P = 0.009

Não significativo = NS; **Negrito** = Regiões que apresentam menor influência.

A partir desses resultados, para ambas as técnicas utilizadas, concluímos que para analisar a face externa das escamas, a melhor região do corpo do peixe na retirada da escama, é a região caudal, pois não se pode perceber através dessas escamas qualquer influência no tamanho dos peixes. Para a face interna das escamas, a melhor região do corpo do peixe na retirada da escama, é a região umeral, que pelo mesmo motivo da face externa, não distingue os peixes em tamanho.

Alguns estudos, que analisam a idade de peixes através de técnicas morfométricas utilizando as escamas como amostras, sugerem que a melhor região de retirada da escama é a mais próxima da região umeral ou abaixo da nadadeira peitoral (GIAMAS *et al.*, 1992). Estas regiões são as que menos sofrem interferência de perda de informações devido a predação e até mesmo pelo modo de natação. De acordo com Ibañez *et al.* (2009) as escamas da região próxima a nadadeira pélvica são boas para diferenciação de gênero e espécies de peixe.

Pelos resultados descritos na Tabela 1.1 e de acordo com a literatura, tem-se que escamas retiradas da região umeral são as mais apropriadas para comparação dos espectros tanto de fluorescência quanto de absorção no infravermelho quando a análise for feita na face interna. Isto porque a interpretação estatística indica não haver diferença significativa

entre os espectros de fluorescência e de absorção destas escamas, sendo apropriada para comparação de populações. Assim, o foco do trabalho foi analisar as escamas retiradas da região umeral do corpo dos peixes.

2. Influência das faces externa e interna das escamas

Nesta etapa buscou verificar se as faces externas e internas das escamas influenciam nas respostas aos métodos utilizados. As amostras utilizadas foram dos trinta indivíduos coletados descritos anteriormente. As análises das escamas foram realizadas com a técnica de FTIR-PAS e com a técnica de fluorescência nos comprimento de onda de excitação em 360 e 405 nm, a as espessuras das escamas foram medidas com um paquímetro.

Os espectros resultantes das análises de FTIR-PAS e fluorescência se diferenciaram de acordo com a face analisada (externa e interna) (Figura 2.1; Figura 2.2 e Figura 2.3).

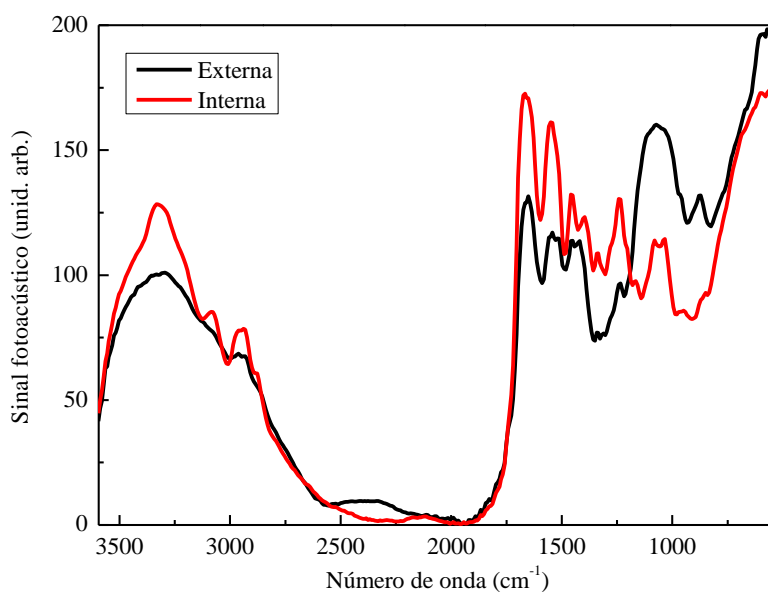


Figura 2.1 Espectros médios das faces externa e interna das análises de FTIR-PAS.

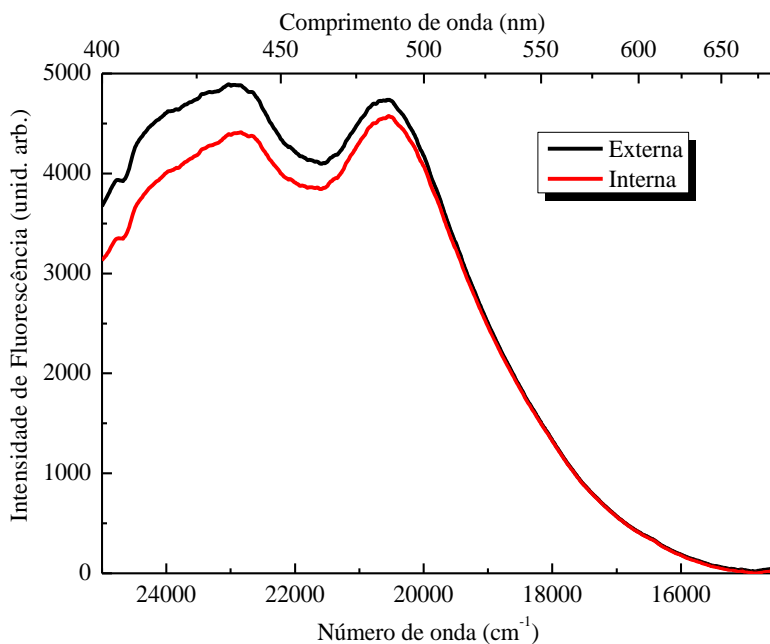


Figura 2.2 Espectros médios das faces externa e interna das análises de Fluorescência com excitação em 360nm.

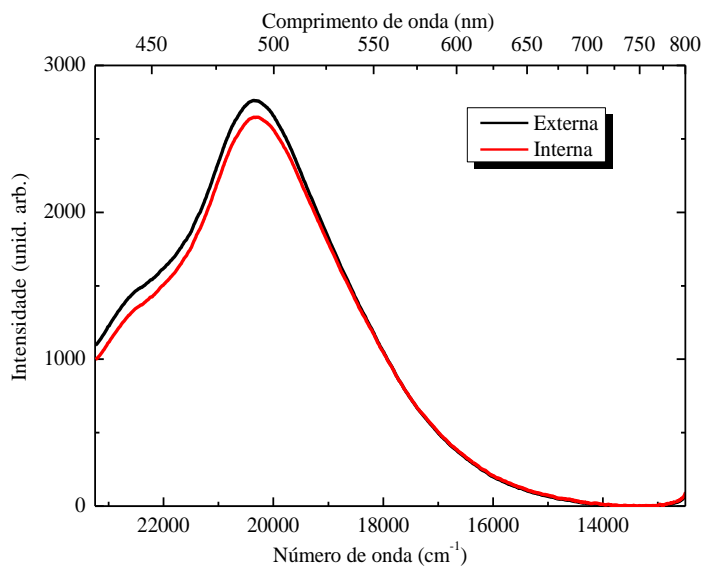


Figura 2.3 Espectros médios das faces externa e interna das análises de Fluorescência com excitação em 405nm.

Os valores das espessuras encontrados nas escamas foram entre 48 e 98 μm , porém, a análise estatística não constatou diferença significativa para dizer se as espessuras das escamas influenciavam nas análises das técnicas espectroscópicas.

A Figura 2.4 mostra as imagens realizadas com a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e as análises de EDS (*Energy Dispersive System*) para escamas de peixes coletados no riacho Cabeceira do Rio Dourado. Na parte (a) tem-se a imagem da face externa, em (b) da face interna e em (c) e (d) os respectivos espectros de EDS. Embora sejam mostradas apenas as imagens das escamas do Cabeceira do Rio Dourados, escamas de peixes de todos os dez riachos foram também estudados e as imagens obtidas são semelhantes às mostradas na figura 2.4.

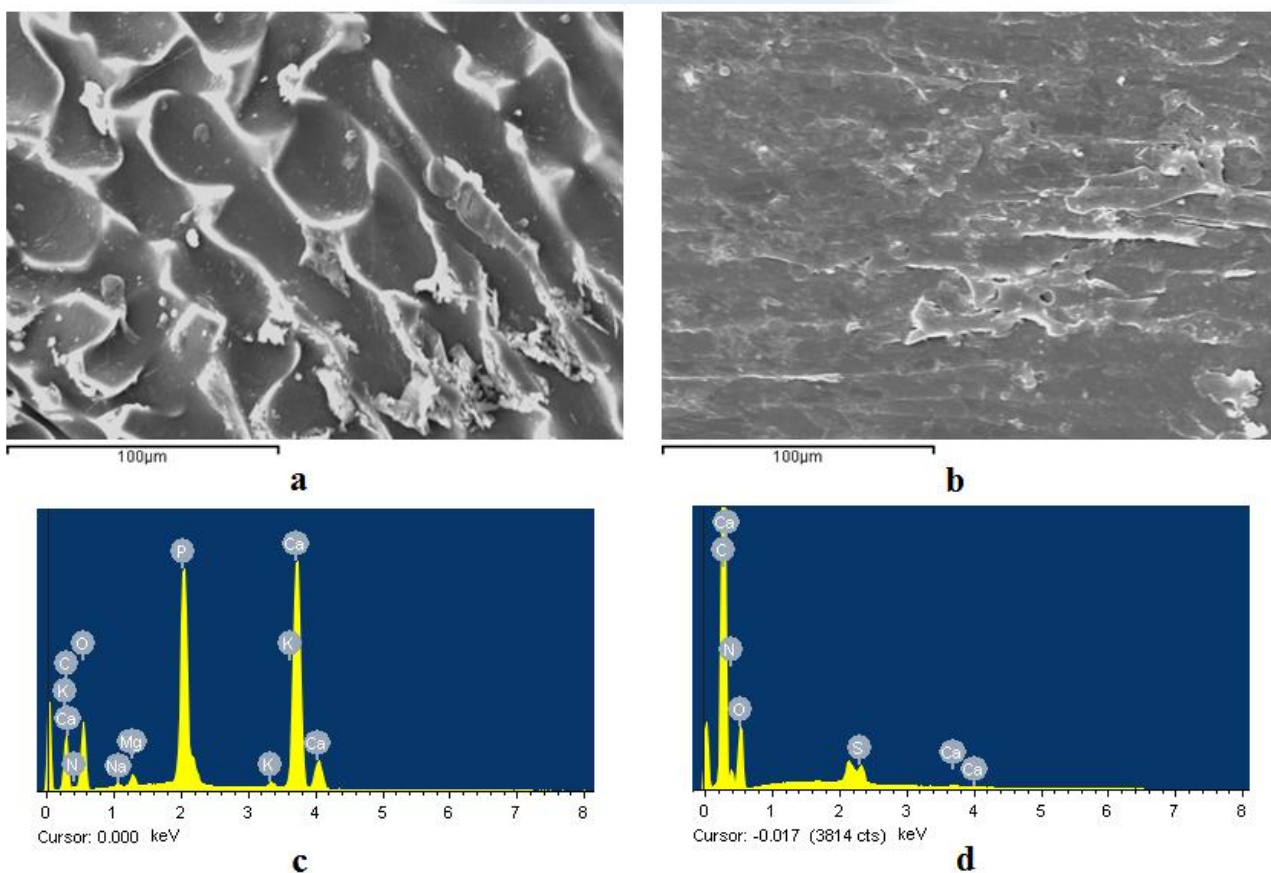


Figura 2.4 (a) Imagem de MEV da face externa da escama; (b) Imagem de MEV da face interna da escama; (c) Espectro da análise de EDS da face externa; (d) Espectro da análise de EDS da face interna.

A Tabela 2.1 descreve os principais elementos encontrados nas escamas obtidos nas análises de EDS.

Tabela 2.1 Resultados das análises de EDS da face externa e interna das escamas do riacho Cabeceira Dourado.

Elemento Químico	Riacho Cabeceira Dourado			
	Face Externa		Face Interna	
	% Peso	% Atômico	% Peso	% Atômico
C	30.67	42.39	60.52	66.38
N	4.35	5.16	11.96	11.25
O	38.77	40.23	26.84	22.1
Na	0.19	0.14	-	-
Mg	0.55	0.38	-	-
P	9.44	5.06	-	-
K	0.34	0.15	-	-
Ca	15.69	6.5	0.1	0.03
S	-	-	0.58	0.24

Nestas imagens (Figura 2.4, a e b) percebe-se nitidamente a diferença entre as faces da escama: a face externa se mostra com textura áspera, apresentando os anéis de crescimento; e a face interna se mostra com textura lisa. A face externa da escama é rica em material inorgânico, contendo alta proporção de cálcio e fósforo, apresentando relação média Ca/P=1,66 (Tabela 2.1), o que é conhecido para a maioria das escamas de peixes estudadas na literatura, o que caracteriza uma hidroxiapatita deficiente de cálcio (IKOMA *et al.*, 2003; MORI *et al.*, 2013). Com base nestes resultados, escolheu-se explorar apenas as medidas da face interna das escamas, a qual é constituída basicamente de colágeno tipo I, parte proteica, orgânica, sendo mais representativa quimicamente neste tipo de análise do que a face externa, que possui hidroxiapatita e maior composição inorgânica (BIGI *et al.*, 2001; IKOMA *et al.*, 2003; MORI *et al.*, 2013).

3. Influência do tamanho dos indivíduos

Os trinta indivíduos coletados da espécie *Astyanax altiparanae* tinham diferentes tamanhos e, conseqüentemente, diferentes espessuras das escamas, o que pode influenciar uma análise espectroscópica.

Para verificar a influência do tamanho dos indivíduos realizou-se a análise através da técnica de FTIR-PAS. Para esta análise, as escamas foram separadas em três grupos de tamanhos diferentes, conforme mostra a Figura 3.1.

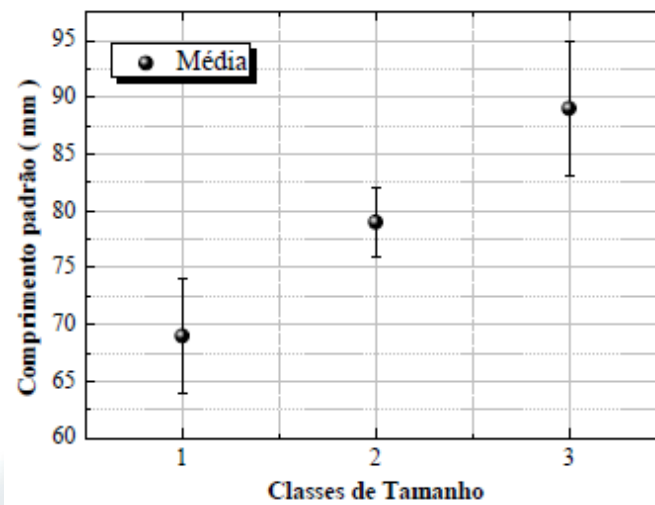


Figura 3.1 Gráfico da média e desvio padrão dos três grupos de tamanho dos peixes.

A partir dos resultados anteriores, decidiu-se analisar apenas a face interna das escamas e utilizar as escamas retiradas da região umeral. Assim, foram retiradas cinco escamas da região umeral de cada peixe para realização das medidas, da face interna. As análises foram realizadas pela técnica de FTIR-PAS seguida pela análise estatística dos principais picos de absorção, referentes à ligação de C-H, C=O e N-H representados no espectro de absorção médio mostrado na Figura 3.2.

Os resultados obtidos pela estatística foram Wilk's Lambda = 0.424, F = 0.828 e p = 0.674, mostraram não haver diferença significativa entre os tamanhos das escamas a ponto de interferirem nos resultados. Portanto, a influência do tamanho dos indivíduos é descartada quando utilizadas a face interna das escamas de *Astyanax altiparanae* retiradas na região umeral. Assim, como apontado anteriormente, nesse trabalho decidiu-se analisar a concentração do colágeno tipo I das faces internas das escamas da porção umeral dos peixes *A. altiparanae* coletados em dez riachos da bacia do Rio Ivinhema, a fim de testar os métodos para distinção das populações.

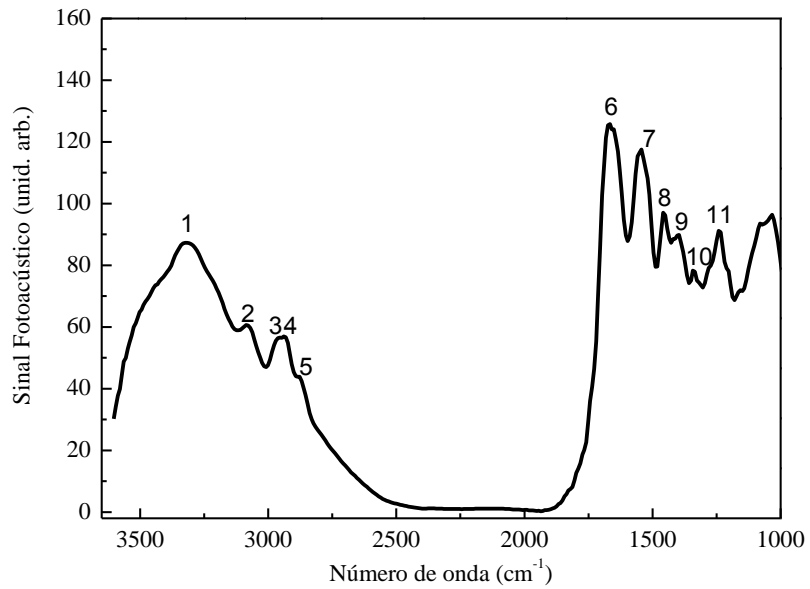


Figura 3.2 Espectro médio de absorção da face interna na análise de FTIR-PAS e os picos utilizados para análise estatística.

REFERÊNCIAS

BIGI, A.; BURGHAMMER, M.; FALCONI, R. KOCH, M. H. J.; PANZAVOLTA, S.; RIEKEL, C. Twisted plywood pattern of collagen fibrils in teleost scales: an X-ray diffraction investigation. **Journal of Structural Biology**, v.136, p. 137-143, 2001.

GIAMAS, M. T. D.; SANTOS, R. A.; JUNIOR, H. V.; CAMPOS, E. C.; CAMARA, J. J. C. Determinação da curva de crescimento através da Lepidologia em diferentes áreas do corpo de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces, Characidae), na represa de Ibitinga, Sp. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29 n. 2, 185-192, 1992.

IBAÑEZ, A. L.; COWX, I. G.; O'HIGGINS, P. Variation in elasmoid fish scale patterns is informative with regard to taxon and swimming mode. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 155, p. 834-844, 2009.

IKOMA, T.; KOBAYASHI, H.; TANAKA, J.; WALSH, D.; MANN, S. Microstructure, mechanical, and, biomimetic properties of fish scales from *Pagrus major*. **Journal of Structure Biology**, v.142, p.327-333, 2003.

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

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

CAPÍTULO 4 – DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL DE PEIXE DA ESPÉCIE *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (CHARACIDAE) EM RIACHOS DA BACIA DO RIO IVINHEMA, ALTO RIO PARANÁ, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE FTIR-PAS.

LIMA, D.M.V.; ALMEIDA, F. S.; SANTANA, C. A.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. e LIMA, S. M.

Programa de Pós - graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Rodovia Dourados - Itahum, km 12, 79804-970, Dourados, MS.

RESUMO

Astyanax altiparanae é o peixe mais comum encontrado na Bacia do Rio Ivinhema, ocupando diferentes tipos e tamanhos de ambientes. Esta característica torna a espécie apropriada como bioindicadora ou biomarcadora. Recentemente, as escamas desta espécie de peixe foram propostas como bioindicadoras, principalmente porque a sua composição química apresenta uma boa relação com o meio ambiente. Assim, nesta pesquisa, as escamas da espécie *A. altiparanae* foram extraídas de peixes amostrados em dez diferentes riachos da Bacia do Rio Ivinhema para a diferenciação das populações. O objetivo foi propor uma análise espectroscópica para analisar e diferenciar as populações, analisando a relação entre a composição química das escamas e os descritores ambientais. Foram identificadas as principais intensidades de absorção na região do infravermelho e os dados experimentais foram utilizados como variável numa análise multivariada de função discriminante. A interpretação estatística demonstrou uma diferenciação significativa entre as populações analisadas, com as duas primeiras raízes canônicas explicando em conjunto 100% da variação dos dados. Foi observada uma boa concordância entre a metodologia de análise de composição e dieta utilizada, indicando que a combinação de espectroscopia de

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

absorção no infravermelho com análise discriminante é uma metodologia eficiente para ser utilizado no estudo de populações de peixes.

Palavras-chave: escamas de peixes, populações de peixes, modos químico-vibracionais, colágeno de peixes, espectroscopia de absorção no infravermelho médio, análise estatística multivariada.

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

ABSTRACT

Astyanax altiparanae is the most common fish species found in Ivinhema River Basin, occupying different types and sizes of environments. This characteristic turns the specie very appropriate as bioindicator or biomarked. Recently, scales from this fish species were proposed as bioindicator, mainly because their chemical composition exhibits good connection with the environmental. So, in this research, scales from *A. altiparanae* species were extracted from fishes sampled in ten different streams in Ivinhema River Basin for population discrimination. The aim was to propose a spectroscopic analyze to differentiate the populations, analyzing the connection among chemical composition of scales and environmental descriptors. The main absorption intensities in the infrared region were identified, and the experimental data were used as variable in a multivariate discriminant analysis. The statistical interpretation demonstrated a significant differentiation among analyzed populations, with the first two canonical roots explain together 100% of data variation. There was observed a good agreement between the used methodology and diet composition analysis, indicating that the combination of infrared absorption spectroscopy with discriminant analysis is a very well methodology to be used in the fish population study.

Keywords: Fish scales, fish population, chemical vibrational modes, fish collagen, mid-infrared absorption spectroscopy, multivariate statistical analysis.

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

1. INTRODUÇÃO

A bacia do Alto Rio Paraná é o segundo maior sistema de drenagem da América do Sul, sendo o mais importante sistema do Brasil em termos de área e diversidade de peixes (LOWE-McCONNELL, 1999). Esta bacia abrange outras bacias importantes de acordo com o Estado que está inserido. Uma dessas bacias de grande importância para o Estado do Mato Grosso do Sul é a bacia do Rio Ivinhema. A bacia do Rio Ivinhema está localizada na porção direita do rio Paraná, no Mato Grosso do Sul. O rio Ivinhema é um dos poucos rios com características lóticis, resultante da conversão de uma parte do rio em uma sequência de riachos (CALLISTO *et al.*, 2002). Riachos são ecossistemas aquáticos em pequena escala e apresentam características lóticis bem definidas que são propícias para a existência de peixes (ESTEVES & ARANHA, 1999).

As variáveis físico-químicas que caracterizam os riachos podem ser avaliadas de acordo com testes do oxigênio, pH, temperatura, condutividade elétrica, qualidade da água e estrutura física do habitat. O uso destas variáveis para analisar o ambiente é importante, pois de acordo com Suárez *et al.* (2011) algumas espécies de peixes são adaptados para diferentes tipos de ambientes podendo ocorrer em habitats com características/ variáveis diferentes.

Entre as várias famílias de peixes encontradas no sistema Alto Rio Paraná, a família Characidae é a mais diversa, em que a subfamília Tetragonopterinae é amplamente distribuída. A espécie *Astyanax altiparanae* pertence a esta subfamília e é comumente encontrada nas bacias do sistema do Alto Rio Paraná, ocupando diferentes tipos e tamanhos de ambientes (riachos, rios e lagos) (GARUTTI & BRITSKI, 2000). Estes peixes têm um tamanho pequeno e sua dieta revela ser uma espécie generalista e oportunista, sendo altamente adaptável às mudanças do ambiente físico e com plasticidade elevada em resposta à disponibilidade de recursos (GOMIERO & BRAGA, 2003).

Nos estudos de ambientes aquáticos, que utilizam peixes como bioindicadores, os aspectos mais avaliados são: a ocorrência (ou não) de algumas espécies; a frequência de más formações; fauna parasitária e danos hematológicos em resposta à qualidade ambiental (HARMEL, 2004; ABNT, 2004). No entanto, certas estruturas (como as escamas), não são

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

usadas nesta abordagem, sendo seu uso praticamente restrito à análises de crescimento dos peixes e, em determinadas regiões, as escamas casualmente são utilizadas para fabricação de farinha e o óleo de peixe usado na fabricação de rações para peixes (NUNES, 2001; ISLAM *et al.*, 2004; FAO, 2007).

A. altiparanae possui escamas pequenas, arredondadas, com bordas ligeiramente grossas e lisas. A escama é um elemento ósseo e achatado que desempenha tanto a função de proteção do corpo do peixe quanto auxilia na sua hidrodinâmica (SIRE e AKIMENKO, 2004). É composta por diferentes matérias orgânicas, água e minerais (PATI, ADHIKARI e DHARA, 2010) que estão distribuídas em duas faces distintas: a externa, em contato com a água, com textura áspera, fina, composta de uma fase inorgânica de hidroxiapatita $[Ca_{10}(O_4)_6(OH)_2]$ deficiente em cálcio; e a face interna, de textura lisa, espessa, composta de uma fase orgânica protéica de colágeno tipo I (IKOMA *et al.*, 2003; HUANG, HSIAO & CHAI, 2011; MORI *et al.*, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que as escamas são capazes de incorporar poluentes em suas matrizes e podem agir como uma impressão digital química dos eventos que estão ocorrendo no ambiente em que os peixes habitam. No entanto, esses estudos fazem uso de técnicas morfométricas e de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As técnicas morfométricas/ morfoanatômicas referem-se a um estudo da forma e do tamanho com a análise estatística relacionada com outras variáveis e com suas co-variações, de modo que exige muito tempo para obter os dados da forma e do tamanho. O MEV é uma técnica capaz de identificar as estruturas dos materiais, não analisando a estrutura química (REIMER, 1985; SANTOS, 2003; SANTOS, 2008, MOURA, 2011).

O uso de técnicas espectroscópicas para analisar sistemas biológicos está crescendo. A técnica de Espectroscopia de Absorção Fotoacústica no Infravermelho Médio por Transformada de Fourier (FTIR-PAS, *Fourier Transform Infrared – Photoacoustic Spectroscopy*) vem sendo aplicada em diversos estudos (BJARNESTAD & DAHLMAN, 2002), pois é uma técnica útil que permite a distinção de espécies químicas através das frequências específicas e através dos modos vibracionais de cada ligação química. Esta técnica permite a identificação, ou impressões digitais, de cada ligação química numa amostra. A detecção fotoacústica podem ser aplicadas a diferentes sistemas, o que permite

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

a análise de absorção óptica de materiais opacos na região do infravermelho (MICHAELIAN, 2010). Alguns estudos utilizam a técnica de FTIR-PAS para detectar a contaminação de fungos sobre a superfície do milho (GORDON *et al.*, 1997); para avaliar a qualidade das sementes de ervilha (LETZELTER *et al.*, 1995); para identificar a presença de fungos e bactérias (THOMPSON *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2006; NIE *et al.*, 2007); e mais recentemente foi empregada pelo Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (GEOF) da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) na identificação de doença (“ferrugem”) em plantas (ANDRADE *et al.*, 2008); para diferenciar castas e espécies de formigas (ANTONIALLI JUNIOR *et al.*, 2007; 2008); em feromônios de vespas (NEVES *et al.*, 2012); e para a diferenciação de espécies de peixes a partir da análise de escamas (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Assim, a proposta deste trabalho se concentra em testar a eficiência deste método para diferenciar populações de mesma espécie de peixe (*A. altiparanae*) de diferentes porções da bacia hidrográfica do Rio Ivinhema, bem como tentar explicar a diferenciação das populações usando a correlação com as variáveis físico-químicas ambientais do habitat de cada riacho em que os peixes foram amostrados como também a correlação com a dieta das populações.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem de dados

Os peixes da espécie *Astyanax altiparanae* foram coletados em dez córregos da Bacia do Rio Ivinhema (Figura 2.1.1), do Alto Rio Paraná, com tela de isca (1,2 x 0,8 m), que é uma peneira de armação retangular; tela de mosquiteiro (2 mm de abertura de malha) e com rede de arrasto para os pontos mais largos. Coletaram-se de cinco a dez indivíduos por riacho amostrado. Todos os indivíduos da espécie amostrados foram, primeiramente, fixados em formol a 10% e, posteriormente, levados ao laboratório e transferidos para álcool 70% para preservação.

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

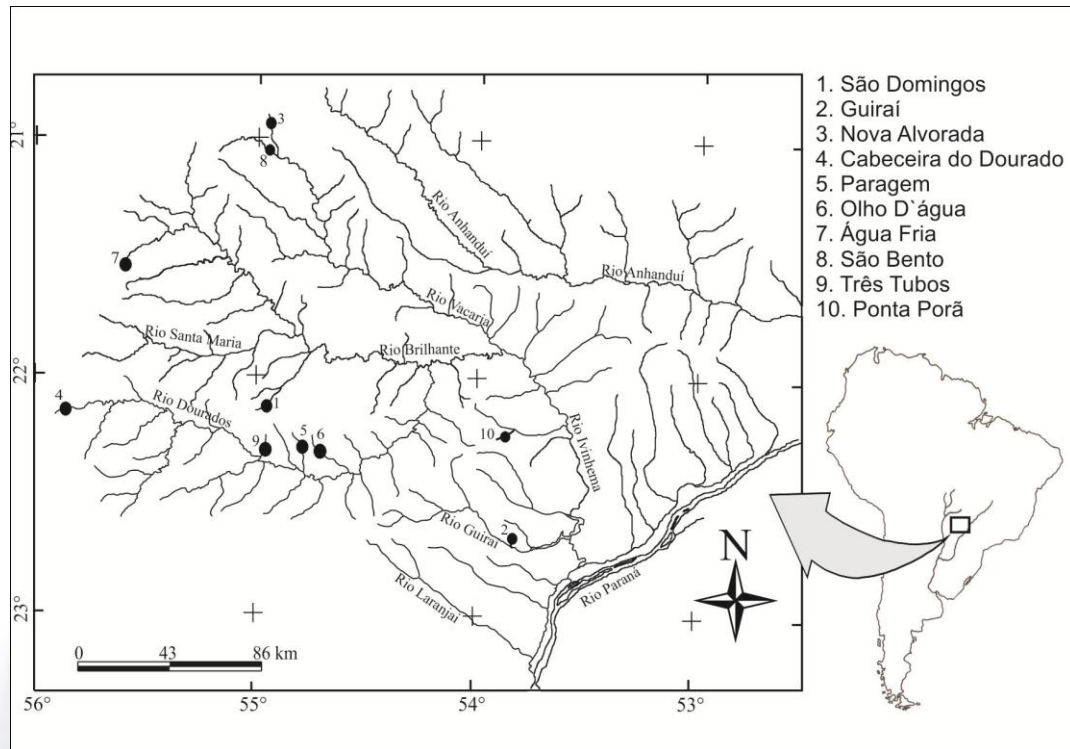


Figura 2.1.1 Mapa da bacia do rio Ivinhema com a localização dos riachos amostrados.

Antes da retirada das escamas, os peixes foram lavados em água corrente para retirada de sujeiras. Com o auxílio de uma pinça foram retiradas as escamas da região umeral de cada peixe, representada na Figura 2.1.2. Baseado nas análises preliminares, a região umeral foi escolhida por ser mais representativa em termos da composição química da escama.

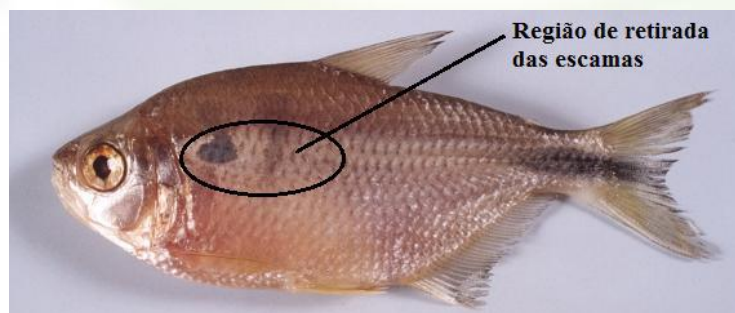


Figura 2.1.2. Foto ilustrando a região umeral da qual foram retiradas as amostras de escamas.

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

Após a retirada, essas escamas foram lavadas em água destilada, brevemente secadas em papel toalha e, posteriormente, inseridas entre lâminas de vidro para preservação. Para a análise as lâminas foram inseridas em estufa a vácuo por 12 horas, para remover toda a umidade.

Obteve-se de cada riacho amostrado um conjunto de variáveis físico-químicas como: o pH da água, a condutividade elétrica da água ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), a temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$), a turbidez da água (NTU), a velocidade da água (ms^{-1}) e a estrutura física do habitat (largura (m), profundidade (m) e altitude (m) do riacho). Para a análise de dieta foram utilizados dados obtidos por Viana *et al.* (2013), que realizou uma análise dos componentes alimentares presentes no estômago de *A. altiparanae* amostrados nos riachos Nova Alvorada, Guiraí, São Domingos e Paragem.

2.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier - Fotoacústica (FTIR-PAS).

As análises de FTIR-PAS foram realizadas no espectrofotômetro Nexus 670 Thermo Nicolet com detecção fotoacústica na gama espectral de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, que abrange a região conhecida como a região de impressão digital ($1700\text{ e }400\text{ cm}^{-1}$).

Durante todas as análises, o espectrômetro foi purgado com ar seco, para remover qualquer vapor de água. A célula fotoacústica foi purgada com gás hélio. A referência de carbono preto foi usada para coletar o espectro da fonte de infravermelho, para a normalização. Novos espectros de referência foram obtidos em cada mudança no grupo de amostras. Os espectros foram obtidos com 16 cm^{-1} de resolução e 128 varreduras para cada amostra. Com base no espectro, definimos os picos mais importantes ($4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$).

A partir dos espectros obtidos, 11 picos de absorção foram escolhidos e as intensidades de absorção destes picos foram separadas em uma matriz para a análise estatística, em que a frequência de cada pico foi utilizada como variável.

2.3 A análise dos dados

A existência de alguma diferença entre as populações foi verificada utilizando a análise multivariada de função discriminante, em que as intensidades dos picos espectrais

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

selecionados foram utilizadas como variáveis. Este é um método altamente eficiente e é utilizado para encontrar uma combinação linear das variáveis que explicam melhor a diferenciação entre as populações analisadas.

Obteve-se a distância geográfica através da base cartográfica (1:1000000) e a distância entre os locais foi medida utilizando o fluxo do riacho.

As variáveis físico-químicas ambientais foram normalizadas (média = 0 e desvio padrão = 1). Após a padronização/ normalização, foram utilizadas para produzir uma matriz de distância ambiental entre os ambientes utilizando o método de distância Euclidiana. O teste de Mantel parcial foi utilizado para quantificar a influência da limnologia e da distância geográfica sobre a diferenciação das populações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 3.1, apresenta um espectro médio de absorção obtido na análise de FTIR-PAS, aplicada em escamas de peixe da espécie *A. altiparanae*, normalizado pela área. Todos os espectros mostraram-se semelhantes em bandas de absorção. Os números indicam os picos de absorção que foram selecionados e os principais grupos funcionais observados representam a composição de colágeno (amida e amina). Os grupos funcionais dos picos selecionados foram identificados de acordo com dados da literatura (LIN-VIEN *et al.*, 1991; SMITH, 1999; MAYO *et al.*, 2004) e foram listados na Tabela 3.1.

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

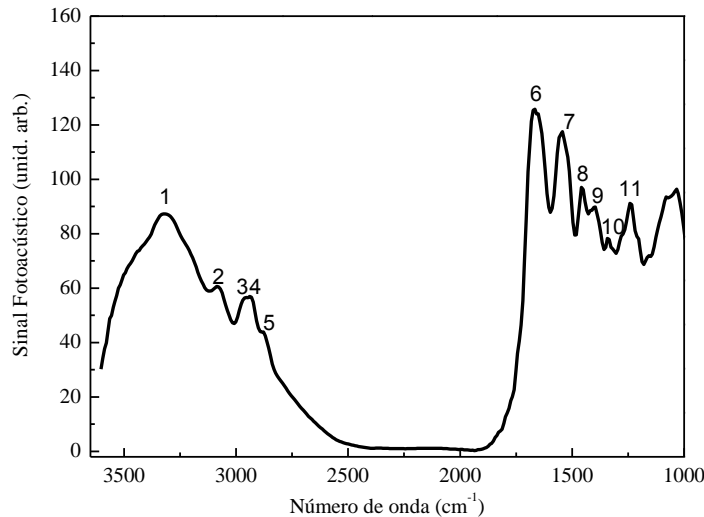


Figura 3.1 Espectro médio de absorção obtido na análise de FTIR-PAS e os picos utilizados na matriz para análise estatística.

Tabela 3.1 Picos selecionados, número de onda, grupo funcional, modo vibracional e resultados da análise discriminante das escamas de *Astyanax altiparanae*.

Picos	Número de Onda (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	Modo Vibracional	F-value
1	3309	N-H (Amida A)	Estiramento simétrico	3,538*** (2)
2	3077	NH₂ (Amida B)	Estiramento assimétrico	2,384** (5)
3	2969	CH₃	Estiramento assimétrico	2,592*** (3)
4	2931	CH₂ (Amida B)	Estiramento assimétrico	3,607*** (1)
5	2877	CH ₃	Estiramento simétrico	1,356 ns
6	1666	C=O (Amida I)	Estiramento	2,076 ns
7	1542	NH e/ou CN (Amida II)	No plano de flexão e/ou estiramento assimétrico	1,703 ns
8	1457	O-CH ₂	Estiramento dobra -cis	1,639 ns
9	1396	O-CH₂	Torção para fora do plano	2,488*** (4)
10	1334	NH (Amida III)	Estiramento assimétrico	1,918 ns
11	1234	CH₃-CO	Estiramento simétrico	2,196** (6)

Negrito = Picos que tiveram maior relevância para a análise estatística, **(1 a 6)** = posições de relevância.*** picos com maior relevância, ** picos com relevância menor que os picos com ***.

A Amida A está associado com os grupos NH e aparecem na gama de 3309 cm⁻¹. A Amida B aparece em 3077 cm⁻¹ e 2931 cm⁻¹. Em 1666 cm⁻¹ é a vibração de grupos carbonilo (C = O) pertencentes a Amida I. A Amida II aparece em 1542 cm⁻¹. A 1334 cm⁻¹ e 1234 cm⁻¹ é, geralmente, responsável pela combinação de NH no plano de flexão e no estiramento de CN.

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

Os espectros de absorção são bastante semelhantes, não sendo possível a diferenciação visual das populações analisadas. Assim, aplicou-se análise estatística multivariada, utilizando como variável a intensidade de absorção dos 11 picos identificados no espectro. A análise multivariada de função discriminante demonstrou uma diferenciação significativa entre as populações analisadas, tendo como resultado o valor de Wilk's Lambda = 0,063; F = 19,193 e p <0,001. A primeira raiz canônica explicou 61,9% da variação dos dados e a segunda raiz canônica explicou aproximadamente 38,1% da variação dos dados. A Figura 3.2 mostra a distribuição das populações resultantes da análise estatística. Considerando-se os picos selecionados, seis apresentaram uma importância significativa maior para diferenciar as populações, pelos valores de F. Esses seis picos (Tabela 3.1) são referentes aos grupos funcionais de NH, NH₂, CH₃, CH₂, O-CH₂, CH₃-CO e grupos de Amida.

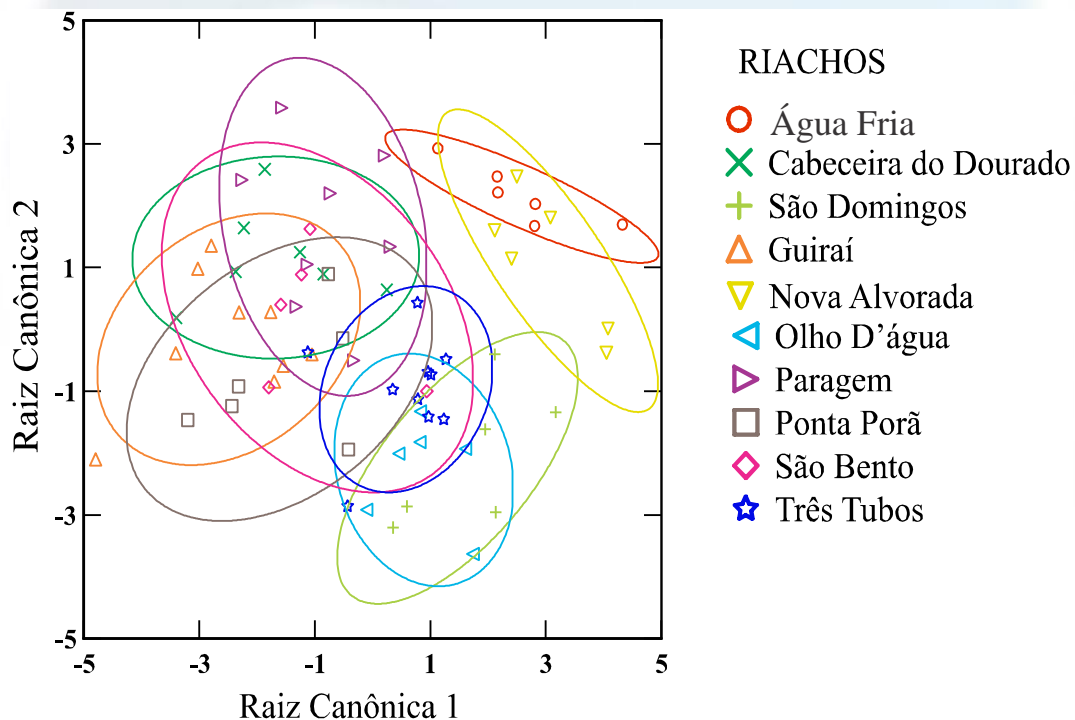


Figura 3.2 Gráfico de dispersão das populações de *Astyanax altiparanae*.

Uma das influências verificadas para a diferenciação das populações através da técnica de FTIR-PAS foi os dados limnológicos. A tabela 3.2 apresenta as variáveis físico-

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

químicas obtidas de cada riacho para a construção da matriz ambiental dos dados limnológicos.

Tabelas 3.2 Variáveis físico-químicas obtidas de cada riacho amostrado representantes dos dados limnológicos.

Riachos	pH	Cond. ($\mu\text{s.cm}^{-1}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Turb. (NTU)	Veloc. (ms^{-1})	Larg. (m)	Prof. (m)	Alt. (m)
Água Fria	7,2	12,3	22,3	10,5	0,33	1,0	0,40	554
Cabeceira Dourado	7,5	29,5	20,7	2,9	0,34	1,5	0,22	641
São Domingos	5,7	82,6	23,5	7,5	0,45	1,0	0,40	375
Guiraí	6,5	238,5	23,8	19,6	0,25	6,5	1,25	244
Nova Alvorada	7,2	98,7	22,8	6,2	0,38	2,3	0,55	432
Olho d'água	6,6	0,1	24,5	11,3	0,45	2	0,74	387
Paragem	7,0	0,1	23,1	11,8	0,36	0,9	0,66	389
Ponta Porã	6,6	18,1	22,3	9,5	0,08	1,2	0,35	307
São Bento	7,2	33,7	21,1	10,9	0,80	6,0	0,84	344
Três tubos	6,5	31,8	23,3	4,6	0,09	2,2	0,48	400

O resultado da distância de Mahalanobis, utilizando os dados limnológicos dos riachos e os dados das análises de FTIR-PAS, mostrou que os dados limnológicos não são significativos para a diferenciação das populações ($r = 0,06$; $p > 0,05$). Assim, pode-se afirmar que os dados limnológicos dos riachos apresentam características semelhantes entre eles.

Outra das influências verificadas para a diferenciação das populações através da técnica de FTIR-PAS foi os dados de distância geográfica, a qual permite verificar a possibilidade parentesco genético entre as populações, pois devido as correntes/fluxo das águas dos riachos os peixes podem migrar de um local para outro contribuindo para as semelhanças ou para as diferenças entre as populações. O resultado obtido da distância de Mahalanobis, utilizando os dados de distância geográfica e os dados das análises de FTIR-PAS, mostrou que os dados de distância geográfica também não foram significativos ($r = 0,23$; $p > 0,05$), indicando que a separação observada no gráfico de dispersão das populações (Figura 3.2) não está relacionada com a distribuição geográfica.

A fim de investigar a influência da dieta das populações, verificou-se os componentes alimentares dos estômagos das populações dos riachos Nova Alvorada, Guiraí, São Domingos e Paragem de acordo com os dados levantados pelo trabalho de

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

Viana *et al.* (2013). Os componentes alimentares dos estômagos foram identificados e a percentagem de massa relativa foi determinada (Tabela 3.3). O riacho Nova Alvorada apresenta uma alimentação exclusivamente terrestre (insetos e plantas). Nos estômagos dos peixes coletados nos riachos Guiraí e Paragem foram encontrados todos os tipos de alimentos listados na Tabela 3.3. Por fim, no riacho São Domingos, a dieta de peixes está baseada em alimentos terrestres (insetos e plantas), com uma pequena concentração de sedimentos. Na Tabela 3.3 pode-se notar que o principal alimento encontrado nos estômagos dos peixes analisados são as plantas terrestres.

Tabela 3.3 Dados de dieta obtidos através dos alimentos encontrados nos estômagos de peixes de acordo com o riacho amostrado.

Stream	IT (%)	IA (%)	PT (%)	PA (%)	AL (%)	DR (%)	AR (%)	NE (%)	S(%)	MI (%)
Nova Alvorada	17.0	-	83.0	-	-	-	-	-	-	-
São Domingos	44.5	-	53.0	-	-	-	-	-	2.5	-
Paragem	20.5	19.5	35.5	0.2	1.7	7.1	-	2.2	7.7	5.6
Guiraí	38.0	7.0	29.0	-	-	8.0	0.3	-	10.7	7.0

IT= Insetos Terrestres; IA= Insetos Aquáticos; PT= Plantas Terrestres; PA= Plantas Aquáticas; AL= Algas; DR= Detritos e/ ou restos de peixes; AR= Aracnídeos; NE=Nematóides; S= Sedimentos; MI= Material Indefinido.

Uma nova análise estatística multivariada foi realizada correlacionando os dados espectroscópicos com os dados dos quatro riachos em que foram analisados os estômagos. Os mesmos picos de absorção, acima descritos, foram usados nesta análise para comparar a dieta com os dados espectroscópicos. A interpretação resultou em Wilk's lambda = 0,0308; F = 37,62; e p <0,05 (Fig. 3.3).

A análise de função discriminante demonstrou diferenciação significativa entre os quatro riachos analisados, com a primeira raiz canônica explicando 77,8% e a segunda raiz canônica explicando 22,2% da variação dos dados. Os mesmos seis picos selecionados anteriormente tiveram importância significativa para a discriminação. A disposição destes riachos no gráfico de dispersão (Figura 3.3), observando pela primeira raiz canônica, apresentam uma boa correlação com a concentração de plantas terrestres encontrados nos estômagos dos peixes (Tabela 3.3).

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

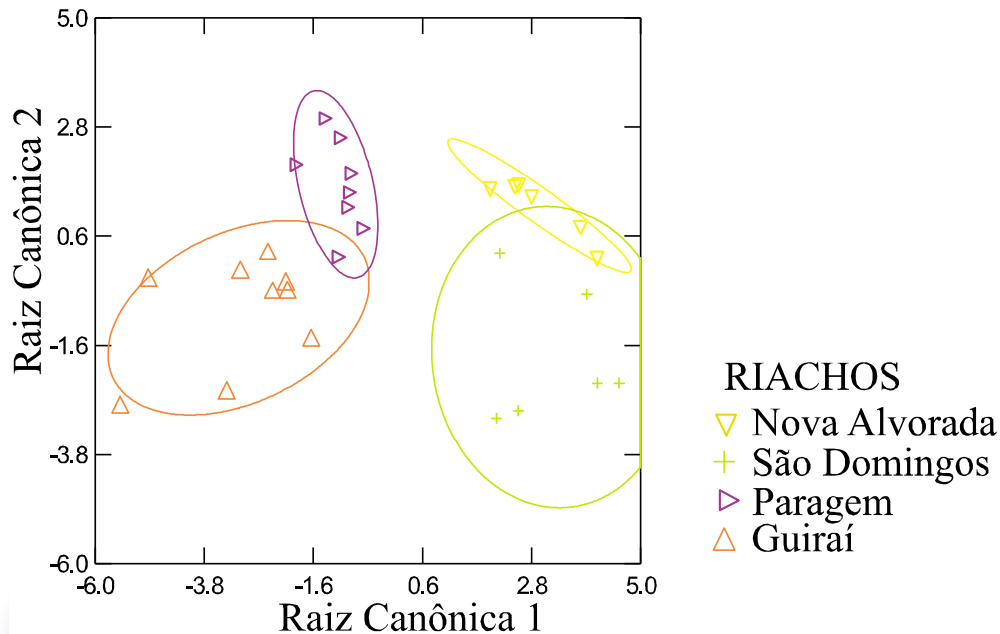


Figura 3.3 Gráfico de dispersão utilizando a técnica de FTIR-PAS de quatro populações de *Astyanax altiparanae*, as quais foram realizadas a análise de dieta.

A diferença observada entre as populações não foi observado pelos dados limnológicos ou geográficos. No entanto, os dados de dieta disponíveis organizam as populações principalmente de acordo com a concentração de alimentos como a concentração de plantas terrestres (Fig. 3.3) no riacho de Nova Alvorada, no qual os indivíduos da população apresentam uma alimentação exclusivamente terrestre, sugerindo que por esta razão, este riacho tem a elipse localizada no lado direito do gráfico de dispersão. A dieta dos peixes do riacho São Domingos é semelhante ao do riacho de Nova Alvorada, diferindo na presença de sedimentos e na porcentagem de insetos terrestres e plantas; os riachos Paragem e Guiraí são mais generalistas, com uma grande diversidade de componentes alimentares, de modo a que eles estão agrupados no lado esquerdo do gráfico de dispersão (Fig. 3.3).

A dieta de *A. altiparanae* foi estudada por vários autores e revela ser uma espécie oportunista e generalista, elevando a plasticidade da espécie em resposta à disponibilidade de recursos (GOMIERO & BRAGA, 2003).

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

O recente estudo de Almeida *et al.*(2012) afirma que as diferenças na distribuição espacial e na dieta influenciam na assinatura espectral das espécies de peixes analisadas. Sugerindo assim, que os riachos localizados em posição diferente em relação a rede hidrográfica (gradiente longitudinal), principalmente em porções inferiores da bacia, oferecem diferentes tipos de alimento, os quais influenciam na composição química das escamas.

No trabalho de Bonato *et al.*, (2012) analisou-se a alimentação dos peixes de dois riachos do Alto Rio Paraná, sugerindo que a espécie de peixe *A. altiparanae* utilize principalmente insetos, terrestres e aquáticos, em sua dieta. Neste estudo, insetos terrestres como abelhas e formigas eram comuns em toda a bacia hidrográfica, como resposta a dispersão na aérea, no entanto, insetos aquáticos podem variar de acordo com as características químicas e físicas e isso pode explicar as diferenças observadas na assinatura espectral das escamas de populações de diferentes áreas da bacia hidrográfica do Rio Ivinhema.

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostram que as análises da técnica de FTIR-PAS aliada com a estatística multivariada são capazes de avaliar as escamas de *A. altiparanae* para a diferenciação de populações, usando os picos de intensidades da absorção relativos ao colágeno como variáveis. Assim, este trabalho corrobora o estudo de Almeida *et al.*, (2012), sugerindo que a técnica de FTIR-PAS é uma ferramenta potencial para detectar não só as diferenças interespecíficas mas, também, diferenças intraespecífica, podendo detectar influências da dieta sobre a composição química das escamas de peixes.

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

REFERÊNCIAS

- ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**; Norma Técnica NBR15088, Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes, Rio de Janeiro, 2004.
- ALMEIDA, F. S.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. Differentiation of Neotropical Fish Species with Statistical Analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy Data. **Applied Spectroscopy**. v.66, p.782-785, 2012.
- ANDRADE, L. H. C.; FREITAS, P. G.; MANTOVANI, B. G.; FIGUEIREDO, M. S.; LIMA, R. A.; LIMA, S. M.; RANGEL, M. A. S.; MUSSURY, R. M. Detection of soybean rust contamination in soy leaves by FTIR photoacoustic spectroscopy. **The European Physical Journal Special Topics**. v.153, p.539-541, 2008.
- ANTONIALI JUNIOR, W. F.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v.6, p. 492-499, 2007.
- ANTONIALI JUNIOR, W. F.; SÚAREZ, Y. R.; IZIDA, T.; ANDRADE, L. H. C.; LIMA, S. M. Intra and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma species* (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 559-566, 2008.
- BJARNESTAD, S.; DAHLMAN, O. Chemical compositions of hardwood and softwood pulps employing photoacoustic Fourier transform infrared spectroscopy in combination with partial least-squares. **Analytical Chemistry**, v. 74, p 5851-5858, 2002.
- BONATO, K. O.; DE LA RIVA, R. L.; SILVA, J. C. Diet and trophic guilds of fish assemblages in two streams with different anthropic impacts in the northwest of Paraná, Brazil. **Zoologia**, 29, p. 27-38, 2012.
- CALLISTO, M.; FERREIRA, W. R.; MORENO, P.; GOULART, M.; PETRUCIO, M. Aplicação de um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats em atividades de ensino de pesquisa (MG-RJ). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v, 14, n. 1, p. 91-98, 2002.
- ESTEVES, K. E.; ARANHA, J. M. R. Ecologia trófica de peixes de riachos. In CARAMASCHI, E. P. R.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (Ed.). **Ecologia de peixes de riachos**. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, p. 157-182, 1999.
- FAO – **Food and Agricultural Organization of the United Nations**. The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA). Rome: FAO, 180p., 2007.

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia**. Série Zoologia, v. 13, p. 65-88, 2000.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. O lambari *Astyanax altiparanae* (Characidae) pode ser um dispersor de sementes? **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 25 n. 2, p. 353-360, 2003.

HARMEL, V. C.; **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise de qualidade de águas superficiais**. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional de Blumenau, Brasil, 2004.

HUANG, Y-C.; HSIAO, P-C.; CHAI, H-J. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. **Ceramics International**. v.37: 1825-1831, 2011.

IKOMA, T.; KOBAYASHI, H.; TANAKA, J.; WALSH, D.; MANN, S. Microstructure, mechanical, and, biomimetic properties of fish scales from *Pagrus major*. **Journal of Structure Biology**, v.142, p.327-333, 2003.

ISLAM, M. S.; KHAN, S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**. v.49, p.103-110, 2004.

LETZELTER, N. S.; WILSON, R. H.; JONES, A. D.; SINNAEVE, G. Quantitative determination of the composition of individual pea seeds by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 67, 239-245, 1995.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, v.1, p.36-42, 2005.

LIN-VIEN, D.; COLTHUP, N. B.; FATELEY, W. G.; GRASSELLI, J. G. **Infrared And Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules**. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 1991.

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Tradução VAZZOLER, A. E. A. de M.; AGOSTINHO, A. A.; CUNNINGHAM, P. T. M. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo (coleção base). 535p. 1999.

MAYO, D. W.; MILLER, F. A.; HANNAH, R. W. **Course Notes on the Interpretation of Infrared and Raman Spectra**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2004.

MICHAELIAN, K. H. **Photoacoustic Infrared Spectroscopy**. New York-US: John Wiley & Sons, 402 p., 2010.

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

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

MOURA, K. O. **Utilização de escamas do peixe corvina para adsorção de Cr (VI) em meio aquoso – cinética e termodinâmica por calorimetria isotérmica contínua.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química), Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, 2011.

NEVES, E. F.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R.; LIMA, S. M.; ANTONIALLI JUNIOR, W. F. Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 1891-1898, 2012.

NIE, M.; ZHANG, W. Q.; XIAO, M.; LUO, J. L.; BAO, K.; CHEN, J. K.; LI, B. FTIR FTIR Spectroscopy and Artificial Neural Network Identification of *Fusarium* Species. **Journal of Phytopatology**, v. 155, p. 364-367, 2007.

NUNES, S. B. **Estabelecimento de um plano de análise de perigo e pontos críticos de controle (APPCC) para Peixe-Sapo (*Lophiispis catorius*) eviscerado e congelado.** Dissertação Mestrado, Florianópolis: UFSC, 121p., 2001.

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

REIMER, L. **Scanning Electron Microscopy, Physics of Image Formation and Microanalysis**, Springer-Verlag, 1985.

SANTOS, E. B. **Caracterização de escamas de peixe de piau (*Leporinus elongatus*) e sua aplicação na remoção de íons Cu(II) em meio aquoso.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química), Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, 2008.

SANTOS, V. B.; FREITAS, R. T. F.; FREATO, T. A.; MILLIOTI, L. C.; ORFÃO, L. H. Morfometria do crescimento de alevinos de duas linhagens de tilápias (*Oreochomis niloticus*). In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA/ZOOTECNIA, v.12, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003.

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: 233-247, 2004.

SMITH, B. C. **Infrared Spectral Interpretation: a systematic approach.** New York: CRC, 1999.

SÚAREZ, Y. R.; SOUZA, M. M.; FERREIRA, F. S.; PEREIRA, M. J.; SILVA, E. A.; XIMENES, L. Q. L.; AZEVEDO, L. G.; MARTINS, O. C.; LIMA-JÚNIOR, S. E. Patterns of species richness and composition of fish assemblages in streams of the Ivinhema River

Capítulo 4 – Diferenciação populacional de peixe da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS.

basin, Upper Paraná River, **Acta Limnologica Brasiliensia**. vol. 23, no. 2, p. 177-188, 2011

THOMPSON, S. E.; FOSTER, N. S.; JOHNSON, T. J.; VALENTINE, N. B.; AMONETTE, J. E. Identification of Bacterial Spores Using Statistical Analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy Data. **Applied Spectroscopy**. v.57, p.893-899, 2003.

VIANA, L. F.; 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**, v. 35, p. 541-548, 2013.

ZHAO, H.; PARRY, R. L.; ELLIS, D. I.; GRIFFITH, G. W.; GOODACRE, R. The rapid differentiation of *Streptomyces* isolates using Fourier transform infrared spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**. v.40, p.213-218, 2006.

Capítulo 5 – Aplicação da espectroscopia de fluorescência em escamas de peixes da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) para a diferenciação de populações.

CAPÍTULO 5 – APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA EM ESCAMAS DE PEIXES DA ESPÉCIE *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (CHARACIDAE) PARA A DIFERENCIAÇÃO DE POPULAÇÕES.

LIMA, D. M. V.; ALMEIDA, F. S.; SANTANA, C. A.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. e LIMA, S. M.

Programa de Pós - graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Rodovia Dourados - Itahum, km 12, 79804-970, Dourados, MS.

RESUMO

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica muito sensível e seletiva. Ela permite a determinação e caracterização de materiais e componentes orgânicos e inorgânicos presentes em uma amostra com fases múltiplas, ou em baixas concentrações das fases minerais. A escama de peixe é um elemento ósseo achatado utilizado na proteção do corpo do peixe e para auxiliar em sua hidrodinâmica. São compostas de diferentes materiais orgânicos, água e minerais que estão localizados em duas faces distintas: a face externa, composto por uma fase inorgânica de hidroxiapatita deficiente em cálcio; e a face interna, que consiste em uma fase orgânica protéica de colágeno tipo I. O objetivo deste estudo é analisar se as escamas da espécie de peixe *Astyanax altiparanae* exibem respostas para as análises de fluorescência para diferenciar a composição química da escama de diferentes populações. Os peixes da espécie *A. altiparanae* foram coletadas em dez córregos distribuídos na Bacia do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul, Brasil. As análises de fluorescência foram realizadas em dois comprimentos de onda de excitação: 360 e 405 nm. Picos de intensidades de fluorescência, na região do visível, foram selecionados para análise estatística. Para o comprimento de onda de excitação a 360nm na face interna, o resultados da análise estatística resultou em Wilk's Lambda = 0,145; F = 10,66; p <0,001, mostrando uma pequena diferença entre as populações. A primeira raiz canônica explicou 71% dos resultados. Da face externa resultou em Wilk's Lambda = 0,143; F = 10,77; p

Capítulo 5 – Aplicação da espectroscopia de fluorescência em escamas de peixes da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) para a diferenciação de populações.

<0,001, exibindo um resultado semelhante para a dispersão interna. A primeira raiz canônica explicou 74,5% da variação dos dados. Para o comprimento de onda em 405 nm a face interna resultou em Wilk's Lambda = 0,106; F = 13,54; p <0,001, apresentando diferença significativa entre os riachos, com a primeira raiz canônica explicando 80,3% da variação dos dados. Para a face externa, resultou em Wilk's Lambda = 0,073; F = 15,35; p <0,001, com a primeira raiz canônica explicando 76,1% da variação dos dados. Os resultados indicam que, apesar de cada face da escama apresentar uma composição química diferente, não foi observado diferenças nas formas de curvas de fluorescência. Ambos os comprimentos de onda de excitação são capazes de analisar a escamas de *A. altiparanae*, proporcionando resultados significativos e esclarecedores para a diferenciação de populações.

Palavras-chave: riachos, análise multivariada, colágeno

ABSTRACT

The analysis of fluorescence spectroscopy is very sensitive and selective. It enables the determination and characterization of organic and inorganic materials and components present in a sample containing multiple phases or at low concentrations of the mineral phases. The fish scale is a bone element and flattened that it is used to protect the fish's body and helps it's in their hydrodynamic. They are composed of different organic materials, water and minerals that are located in two distinct faces: the external face, composed of an inorganic phase of hydroxyapatite deficient in calcium; and the internal face, consisting of an organic protein phase of collagen type I. The objective of this study is to analyze if *Astyanax altiparanae* scales exhibit fluorescence behavior to differentiate the chemical composition of the scale of different populations. The *A. altiparanae* fish species were collected at ten streams, all distributed in the Ivinhema Basin River, Mato Grosso do Sul, Brazil. Scales were removed from the humeral region of each fish. The fluorescence measurements were performed at two excitation wavelengths: 360 and 405 nm. Some fluorescence intensities in the visible region were selected for statistical analysis. For the excitation wavelength at 360nm in the internal face, the statistical analysis provided a Wilk's Lambda = 0.145; $F = 10.66$; $p < 0.001$, showing small difference between the populations. The first canonical root explains 71% of the results. The external face provided Wilk's Lambda = 0.143; $F = 10.77$; $p < 0.001$, exhibiting a result similar to the internal dispersion. The first canonical root explained 74.5% of the data variation. For the wavelength at 405 nm the internal face provided Wilk's Lambda = 0.106; $F = 13.54$; $p < 0.001$ showing significant difference between the streams, with the first canonical root explaining 80.3% of the data variation. To the external face, Wilk's Lambda = 0.073; $F = 15.35$; $p < 0.001$ were obtained, with the first canonical root explaining 76.1% of the data variation. The results indicate that although each face of the scale has a different chemical composition, it was not observed strong difference in the luminescence curve shapes, and both excitation wavelengths are capable to analyze the scales *A. altiparanae*, providing meaningful and enlightening results for the differentiation of populations.

Keyword: streams, mutivariate analysis, collagen

1. INTRODUÇÃO

A análise da fluorescência de um composto tem sido amplamente reconhecida como uma técnica muito sensível devido à capacidade de se detectar o sinal proveniente de moléculas quando excitadas por um comprimento de onda específico. É também bastante seletiva, uma vez que os comprimentos de onda de excitação e emissão dependem do mesmo composto de interesse, fazendo com que o sinal de fluorescência coletado seja característico de cada molécula em estudo, pois somente aqueles grupos funcionais que fluorescem podem ser observados. Pode ser aplicada em sistemas químicos nos estados líquido, gasoso e sólido, complexos ou não. Permite a determinação e a caracterização de materiais e componentes orgânicos e inorgânicos presentes em uma amostra com fases múltiplas, ou em baixas concentrações das fases minerais. É tão importante quanto outras técnicas de espectroscopia, por exemplo, a absorção no infravermelho -FTIR-PAS (*Fourier Transform Infrared – Photoacoustic Spectroscopy*) (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009; SCHERER *et al.*, 2011).

No processo de fluorescência, o estado fundamental de uma molécula caracteriza-se pela configuração de menor energia que seus elétrons podem ocupar, ou seja, é o estado mais estável em que a molécula pode permanecer. No estado fundamental os elétrons da molécula ocupam o nível de menor energia vibracional, mas ao serem excitados podem ser promovidos para qualquer estado de mais alta energia. Depois ocorre a relaxação vibracional, um processo de decaimento não radioativo, que leva o elétron ao nível de menor energia vibracional do estado eletrônico em que se encontra. A molécula pode continuar perdendo energia por processos não radioativos até que o elétron excitado retorne ao estado fundamental ou o elétron pode transferir diferença de energia na forma de radiação (fóton). Essa emissão é chamada de fluorescência e terá sempre uma energia menor que a energia de excitação da molécula devido à relaxação vibracional e a outros processos não radioativos que possam ocorrer. (SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 2002). Essa fluorescência, por sua vez, pode ser coletada em forma de espectros, que geralmente são apresentados como espectros de emissão (LAKOWICZ, 2006).

Em estudos de ambientes aquáticos, que utilizam peixes como bioindicadores, os aspectos mais avaliados são: a ocorrência (ou não) de algumas espécies; a frequência de

Capítulo 5 – Aplicação da espectroscopia de fluorescência em escamas de peixes da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) para a diferenciação de populações.

más formações; fauna parasitária e danos hematológicos em resposta à qualidade ambiental (HARMEL, 2004; ABNT, 2004). No entanto, certas estruturas (como as escamas), não são usadas nesta abordagem, sendo seu uso praticamente restrito às análises de crescimento dos peixes e, em determinadas regiões, as escamas casualmente são utilizadas para fabricação de farinha e o óleo de peixe usado na fabricação de rações para peixes (NUNES, 2001; ISLAM *et al.*, 2004; FAO, 2007). Porém, estudos recentes têm demonstrado que as escamas de peixes são capazes de incorporar poluentes em suas matrizes e podem agir como uma impressão digital química dos eventos que estão ocorrendo no ambiente em que os peixes habitam (SANTOS, 2008, MOURA, 2011).

As escamas são elementos ósseos achatados que desempenham tanto a função de proteção do corpo do peixe quanto o auxilia na sua hidrodinâmica (SIRE & AKIMENKO, 2004). São compostas por diferentes matérias orgânicas, água e minerais (PATI, ADHIKARI & DHARA, 2010) que estão distribuídas em duas faces distintas: a externa, em contato com a água, com textura áspera, fina, composta de uma fase inorgânica de hidroxiapatita $[Ca_{10}(O_4)_6(OH)_2]$ deficiente em cálcio; e a face interna, de textura lisa, espessa, composta de uma fase orgânica protéica de colágeno tipo I (IKOMA *et al.*, 2003; HUANG, HSIAO & CHAI, 2011; MORI *et al.*, 2013).

A espécie de peixe *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) possui escamas pequenas, arredondadas, com bordas ligeiramente grossas e lisas. É conhecido popularmente como “lambari do rabo amarelo” ou “tambiú” e está entre as espécies mais abundantes em toda a zona de Neotropical, ocorrendo em diversos microambientes, tais como os rios e riachos do Alto Rio Paraná (SUÁREZ *et al.*, 2007), sendo um dos peixes mais comuns nos riachos da bacia do rio Ivinhema (SUÁREZ *et al.*, 2011).

Devido à eficácia e à versatilidade da técnica e poucos estudos com a técnica de espectroscopia de fluorescência em sistemas e materiais biológicos, a proposta deste trabalho é analisar se a escama de *A. altiparanae* apresenta resposta à técnica para a diferenciação da composição química da escama extraídas de peixes de diferentes populações.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem de dados

Os peixes da espécie *Astyanax altiparanae* foram coletados em dez córregos da Bacia do Rio Ivinhema (Figura 2.1.1), do Alto Rio Paraná, com tela de isca (1,2 x 0,8 m), que é uma peneira de armação retangular; tela de mosquiteiro (2 mm de abertura de malha) e com rede de arrasto para os pontos mais largos. Coletaram-se de cinco a dez indivíduos por riacho amostrado. Todos os indivíduos da espécie amostrados foram, primeiramente, fixados em formol a 10% e, posteriormente, levados ao laboratório e transferidos para álcool 70% para preservação.

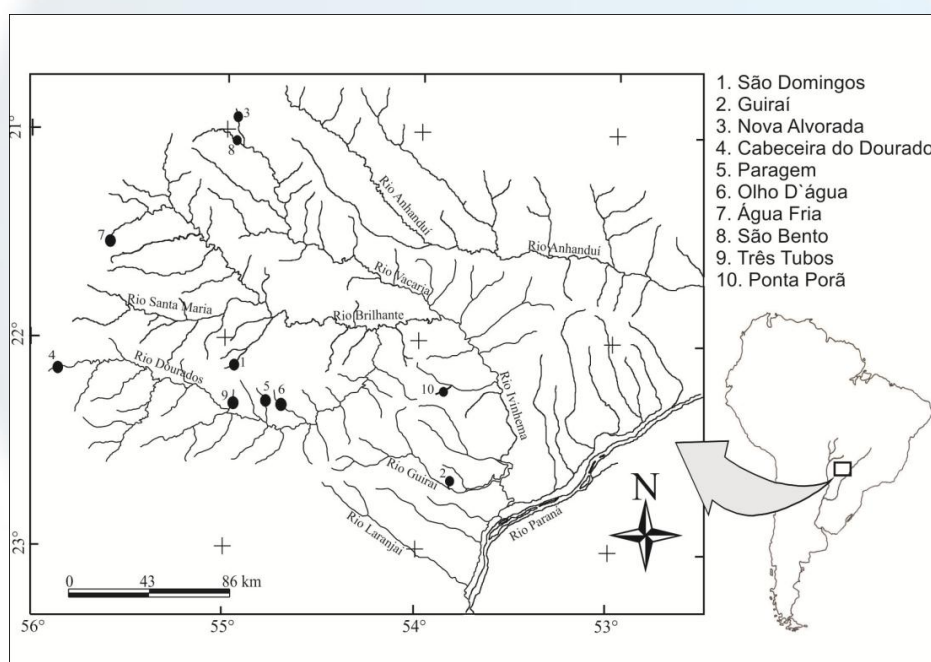


Figura 2.1.1 Mapa da bacia do rio Ivinhema com a localização dos riachos amostrados.

Antes da retirada das escamas, os peixes foram lavados em água corrente para retirada de sujeiras. Com o auxílio de uma pinça foram retiradas as escamas da região umeral de cada peixe, representada na Figura 2.1.2. Baseado nas análises preliminares, a região umeral foi escolhida por ser mais representativa em termos da composição química da escama.

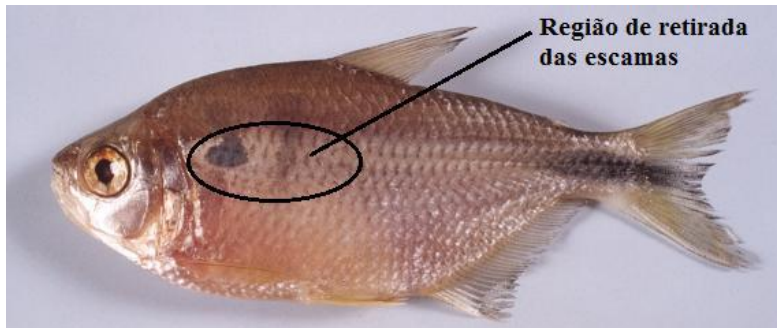


Figura 2.1.2. Foto ilustrando a região umeral da qual foram retiradas as amostras de escamas.

Após a retirada, essas escamas foram lavadas em água destilada, brevemente secadas em papel toalha e, posteriormente, inseridas entre lâminas de vidro para preservação. Para a análise as lâminas foram inseridas em estufa a vácuo por 12 horas, para remover toda a umidade.

Obteve-se de cada riacho amostrado um conjunto de variáveis físico-químicas como: o pH da água, a condutividade elétrica da água ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), a temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$), a turbidez da água (NTU), a velocidade da água (ms^{-1}) e a estrutura física do habitat (largura (m), profundidade (m) e altitude (m) do riacho).

2.2 Espectroscopia de Fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas em dois comprimentos de onda de excitação: 405 e 360 nm. Para o comprimento de onda de excitação em 405 nm utilizou-se o Laser de Diodo e para o comprimento de onda de excitação em 360 nm utilizou-se o Laser de Argônio Innova 308C da Coherent.

Uma fibra óptica bifurcada foi utilizada para conduzir a radiação de excitação e para captar o sinal de emissão da amostra e conduzi-lo ao espectrômetro portátil HR4000 da Ocean Optics, de onde o espectro de fluorescência era detectado e armazenado em um microcomputador. A Figura 2.2.1 mostra um esquema do aparato experimental utilizado nessas medidas.

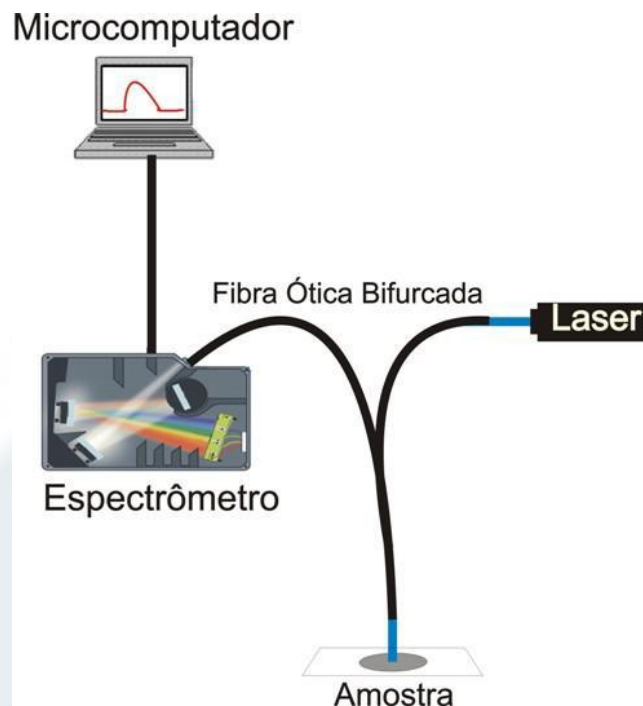


Figura 2.2.1. Ilustração do aparato experimental de fluorescência utilizado nas análises das escamas.

Coletou-se um espectro para cada escama, excitando diretamente tanto para a face externa quanto a face interna da escama. Antes da coleta dos espectros, registrou-se uma correção de intensidade de fundo e todas as medidas foram realizadas em uma sala escura para que a luminosidade do ambiente não interferisse nos dados. Após a obtenção dos espectros, foi realizado um ajuste (processo de deconvolução dos dados) para encontrar as melhores Gaussianas que se ajustavam ao espectro.

2.3 A análise dos dados

A existência de alguma diferença entre as populações foi verificada utilizando a análise multivariada de função discriminante, em que as intensidades das Gaussianas foram utilizadas como variáveis. Este é um método altamente eficiente e é utilizado para encontrar uma combinação linear das variáveis que explicam melhor a diferenciação entre as populações analisadas.

Obteve-se a distância geográfica através da base cartográfica (1:1000000) e a distância entre os locais foi medida utilizando o fluxo do riacho.

As variáveis físico-químicas ambientais foram padronizadas (média = 0 e desvio padrão = 1). Após a padronização foram utilizadas para produzir uma matriz de distância

ambiental entre os ambientes utilizando o método de distância Euclidiana. O teste de Mantel parcial foi utilizado para quantificar a influência da limnologia e da distância geográfica sobre a diferenciação das populações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises de fluorescência realizada com o comprimento de onda de excitação em 360 nm, os espectros foram ajustados por quatro Gaussianas localizadas na região do visível (Figura 3.1), centralizadas em 23584 cm^{-1} , 22727 cm^{-1} , 20408 cm^{-1} e 17361 cm^{-1} (424 nm, 440 nm, 490 nm e 576 nm, respectivamente). Nas análises para o comprimento de onda de excitação em 405 nm, os espectros foram ajustados por três Gaussianas (Figura 3.2) pois o espectro de fluorescência neste caso, com menor energia, é menos largo quando comparado com o espectro de fluorescência obtido com excitação em 360 nm. Os correspondentes valores dos números de onda são 22752 cm^{-1} , 20430 cm^{-1} e 17365 cm^{-1} (424 nm, 490 nm e 576 nm, respectivamente).

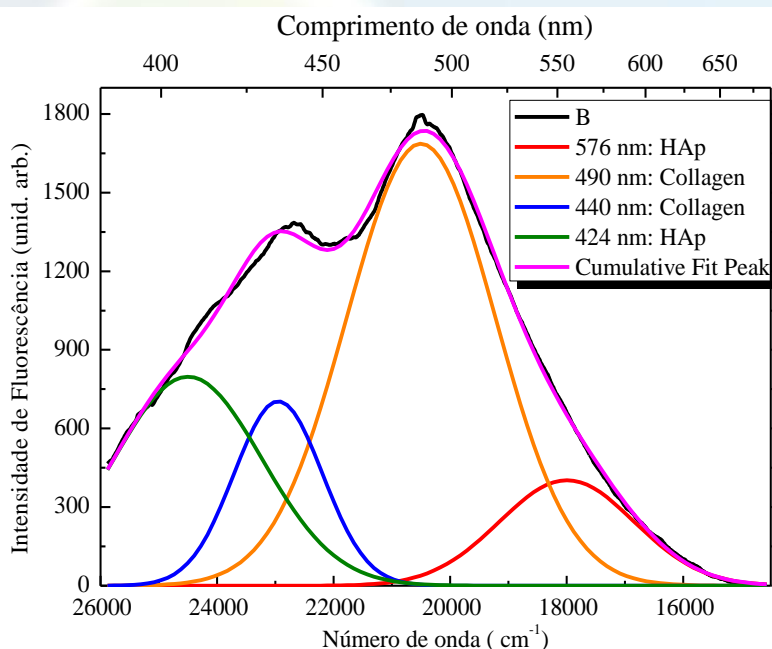


Figura 3.1 Curva média e as quatro Gaussianas da fluorescência das escamas excitadas no comprimento de onda de excitação em 360 nm.

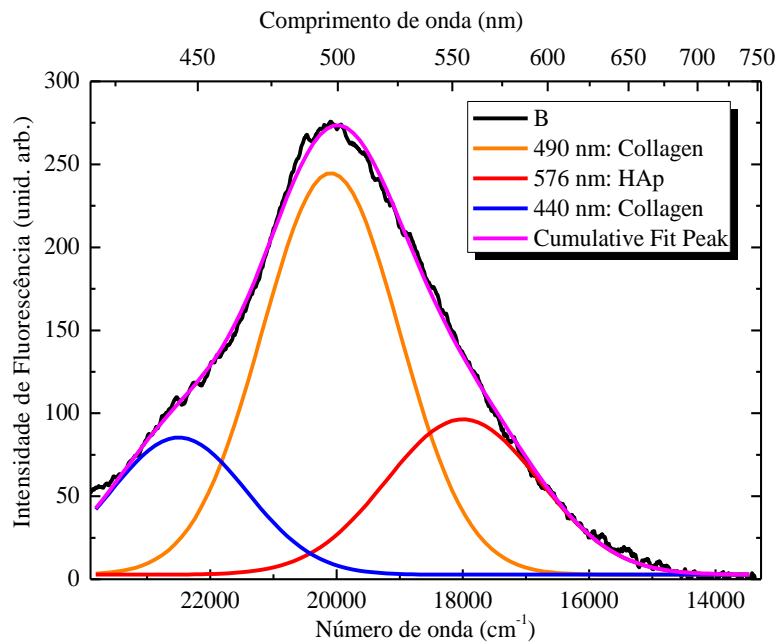


Figura 3.2. Curva média e as três Gaussianas da fluorescência das escamas excitadas no comprimento de onda de excitação em 405 nm.

Alguns trabalhos com peixes encontrados na literatura que usaram a técnica de espectroscopia de fluorescência, como o trabalho de Wu *et al.*(2012) encontraram nos espectros picos entre 440 e 460 nm referentes ao colágeno tipo I e V que são próximos aos observados por Andersen & Wold (2003) e dos encontrados nesta pesquisa. Os picos obtidos nesta pesquisa foram descritos com base no trabalho realizado por Roman-Lopez *et al.*(2014) em que ao estimularem a luminescência em ossos naturais, hidroxiapatita comercial e colágeno, conseguiram identificar os picos de intensidades referente aos principais componentes presentes nas escamas: hidroxiapatita e colágeno.

Para a fluorescência com o comprimento de onda de excitação em 360 nm, o espectro médio obtido da face interna e da face externa das escamas mostrou-se semelhantes, para os dez riachos (Figura 3.4). Apesar de cada face da escama possuir uma composição química diferente, não se observou uma diferenciação no formato das curvas dos espectros conforme a face analisada.

Capítulo 5 – Aplicação da espectroscopia de fluorescência em escamas de peixes da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) para a diferenciação de populações.

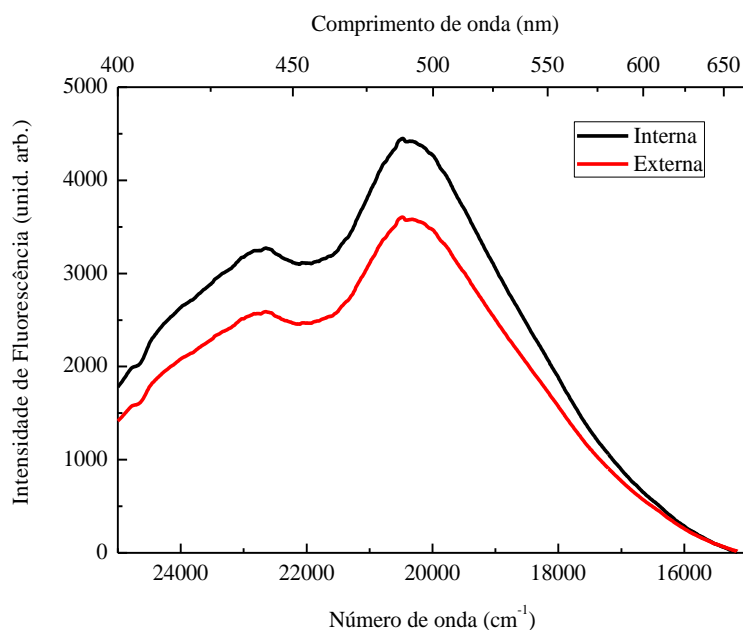


Figura 3.4 Espectro médio da fluorescência da face interna e externa das escamas de diferentes populações com o comprimento de onda de excitação em 360 nm.

Para a Fluorescência com o comprimento de onda de excitação em 405 nm, as medidas também foram realizadas tanto na face interna, quanto na face externa das escamas. Para ambas as faces, o comportamento das curvas dos espectros também foi similar (Figura 3.5).

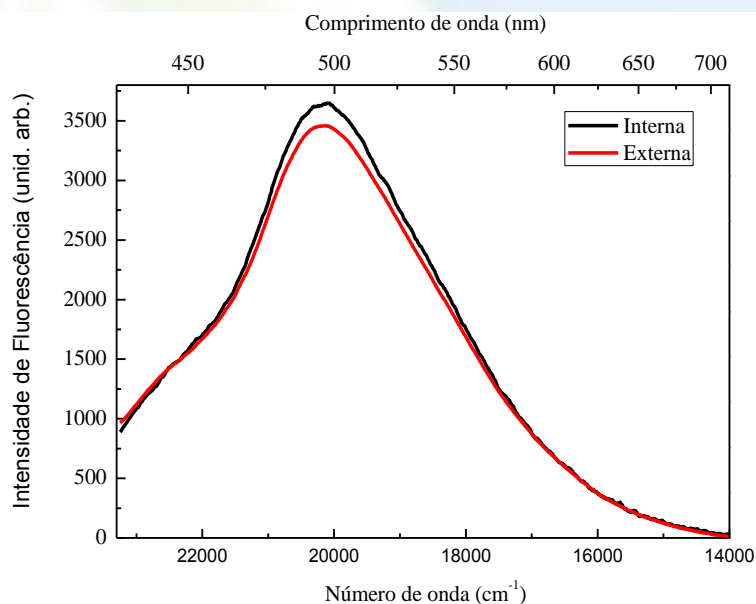


Figura 3.5 Espectro médio da fluorescência da face interna e externa das escamas de diferentes populações com o comprimento de onda de excitação em 405 nm.

Capítulo 5 – Aplicação da espectroscopia de fluorescência em escamas de peixes da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) para a diferenciação de populações.

Analisando as curvas de emissão para cada riacho, não é possível encontrar visível diferença entre os riachos. Portanto, a análise estatística foi aplicada gerando os diagramas de dispersão para as faces interna e externa em ambos os comprimentos de onda analisados. A Figura 3.6 representa os diagramas de dispersão com a primeira e a segunda raiz canônica da análise estatística de função discriminante das escamas para as faces interna e externa, respectivamente, para a fluorescência com comprimento de onda em 360 nm.

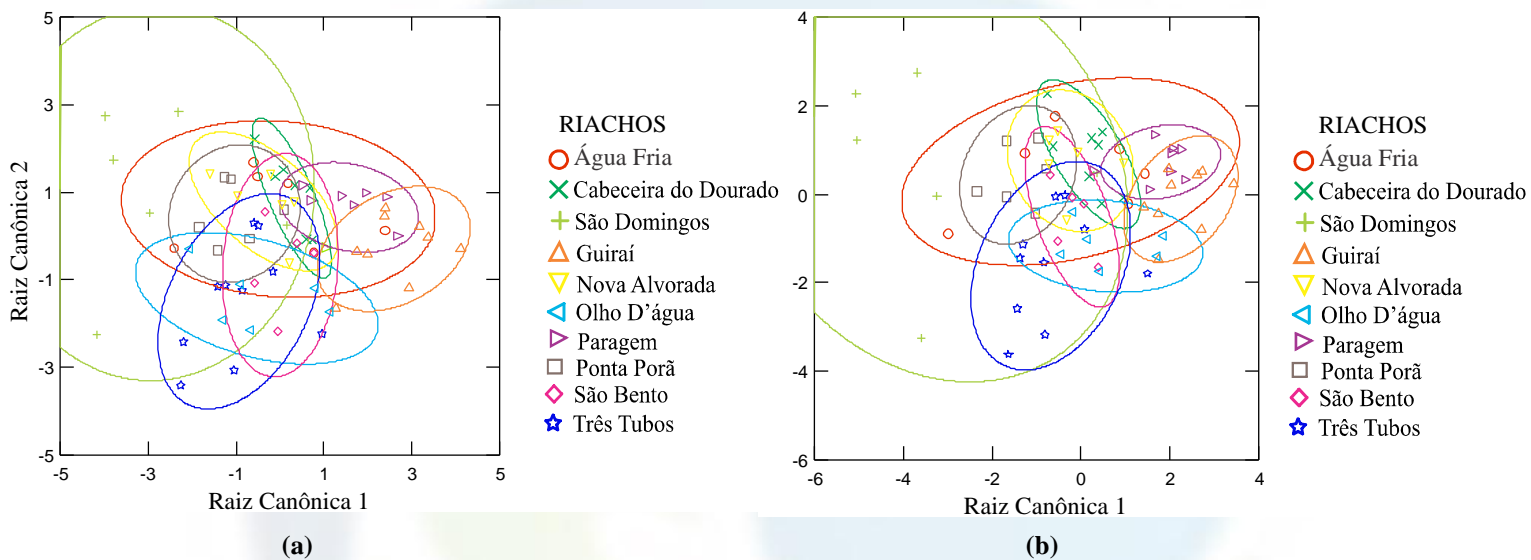


Figura 3.6 Diagramas de dispersão determinados pela análise estatística para as faces interna (a) e externa (b) das escamas, excitadas no comprimento de onda em 360 nm.

Para os dados selecionados para a face interna, a análise estatística forneceu um Wilk's Lambda = 0,145; F = 10,66; p < 0,05 mostrando pequena diferença entre as populações dos riachos. A primeira raiz canônica foi capaz de explicar 84,3% dos resultados para a variação dos dados. Os dados da face externa forneceram um Wilk's Lambda = 0,143; F = 10,77; p < 0,05, exibindo uma dispersão parecida com a face interna. A primeira raiz canônica contribuindo com 85,2% na explicação da variação dos dados. Verifica-se que as respostas de ambas as faces conseguem distinguir os dez ambientes.

A Figura 3.7 representa os diagramas de dispersão para a fluorescência com comprimento de onda de excitação em 405 nm.

Capítulo 5 – Aplicação da espectroscopia de fluorescência em escamas de peixes da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) para a diferenciação de populações.

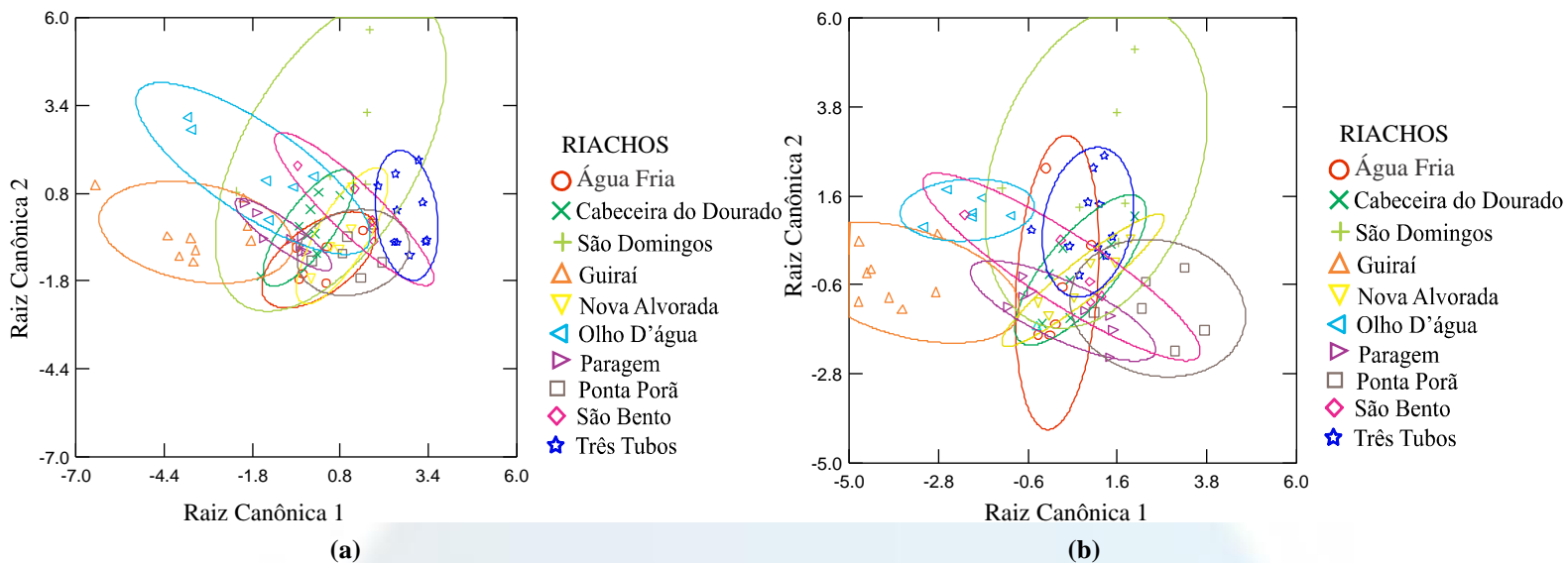


Figura 3.7 Diagramas de dispersão determinados pela análise estatística para as faces interna e externa das escamas, excitadas no comprimento de onda em 405 nm.

Para a face interna obteve-se Wilk's Lambda = 0,106; $F = 13,54$; $p < 0,05$ exibindo diferença significativa entre os riachos, com a primeira raiz canônica explicando 80,3% da variação dos dados. A estatística da face externa não se diferiu muito da face interna, o qual apresenta Wilk's Lambda = 0,99; $F = 14,29$; $p < 0,05$, com a primeira raiz canônica explicando 88% da variação dos dados, ou seja, apesar da similaridade das curvas de emissão para todos os riachos, os dados estatísticos mostram que eles são pouco diferentes.

Os dados limnológicos e os dados de distância geográfica são os mesmos obtidos no artigo* “Diferenciação populacional de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS”. O resultado da distância de Mahalanobis, utilizando os dados limnológicos dos riachos mostrou-se não significativo para a diferenciação das populações. Os resultados utilizando os dados de distância geográfica também se mostraram não significativos.

A fim de investigar a influência da dieta das populações, verificou-se os componentes alimentares dos estômagos das populações dos riachos Nova Alvorada, Guiraí, São Domingos e Paragem de acordo com os dados levantados pelo trabalho de

*O artigo “Diferenciação populacional de peixe da espécie *Astyanax altiparanae* (Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná, através da técnica de FTIR-PAS” será submetido para a revista Journal of Fish Biology.

Capítulo 5 – Aplicação da espectroscopia de fluorescência em escamas de peixes da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) para a diferenciação de populações.

Viana *et al.* (2013). Os componentes alimentares dos estômagos foram identificados e a percentagem de massa relativa foi determinada (Tabela 3.1). A população do riacho Nova Alvorada apresenta uma alimentação exclusivamente terrestre (insetos e plantas), dos riachos Guiraí e Paragem foram observou-se todos os tipos de alimentos listados na Tabela 3.1. Por fim, no riacho São Domingos, a dieta de peixes está baseada em alimentos terrestres (insetos e plantas), com uma pequena concentração de sedimentos. Na Tabela 3.1 pode-se notar que o principal alimento encontrado nos estômagos dos peixes analisados são as plantas terrestres.

Tabela 3.3 Dados de dieta obtidos através dos alimentos encontrados nos estômagos de peixes de acordo com o riacho amostrado.

Stream	IT (%)	IA (%)	PT (%)	PA (%)	AL (%)	DR (%)	AR (%)	NE (%)	S (%)	MI (%)
Nova Alvorada	17.0	-	83.0	-	-	-	-	-	-	-
São Domingos	44.5	-	53.0	-	-	-	-	-	2.5	-
Paragem	20.5	19.5	35.5	0.2	1.7	7.1	-	2.2	7.7	5.6
Guiraí	38.0	7.0	29.0	-	-	8.0	0.3	-	10.7	7.0

IT= Insetos Terrestres; IA= Insetos Aquáticos; PT= Plantas Terrestres; PA= Plantas Aquáticas; AL= Algas; DR= Detritos e/ ou restos de peixes; AR= Aracnídeos; NE=Nematóides; S= Sedimentos; MI= Material Indefinido.

Uma nova análise estatística multivariada foi realizada correlacionando os dados espectroscópicos com os dados dos quatro riachos em que foram analisados os estômagos. As mesmas gaussianas, acima descritas, foram usadas nesta análise para comparar a dieta com os dados espectroscópicos. A interpretação resultou para o comprimento de onda de excitação em 360 nm, para a face interna, Wilk's lambda = 0,135; F = 13,77; e p <0,05 (Fig. 3.8 (a)). Para a face externa resultou em Wilk's lambda = 0,106; F = 16,58; e p <0,05 (Fig. 3.8 (b)). A análise de função discriminante demonstrou diferenciação significativa entre os quatro riachos analisados, com a primeira raiz canônica explicando 94,4% e 90,8% da variação dos dados, para a face interna e externa, respectivamente.

Capítulo 5 – Aplicação da espectroscopia de fluorescência em escamas de peixes da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) para a diferenciação de populações.

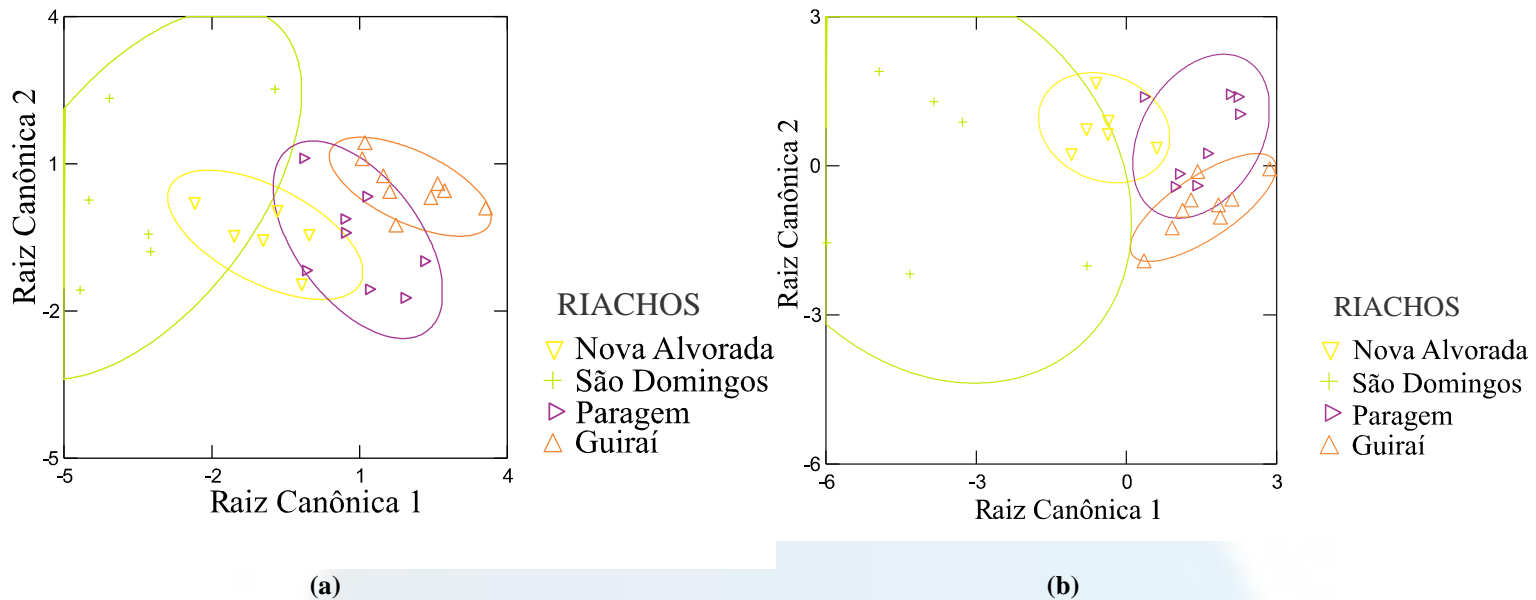


Figura 3.8 Diagramas de dispersão de quatro populações com dietas distintas. Faces interna (a) e externa (b) das escamas, excitadas no comprimento de onda em 360nm.

Para o comprimento de onda de excitação em 405, a interpretação resultou para a face interna, Wilk's lambda = 0,307; F = 6,43; e p <0,05 (Fig. 3.9 (a)). Para a face externa resultou em Wilk's lambda = 0,090; F = 18,76; e p <0,05 (Fig. 3.9 (b)). A primeira raiz canônica explica 55,96% para a face interna da escama e 71,6% para a face externa.

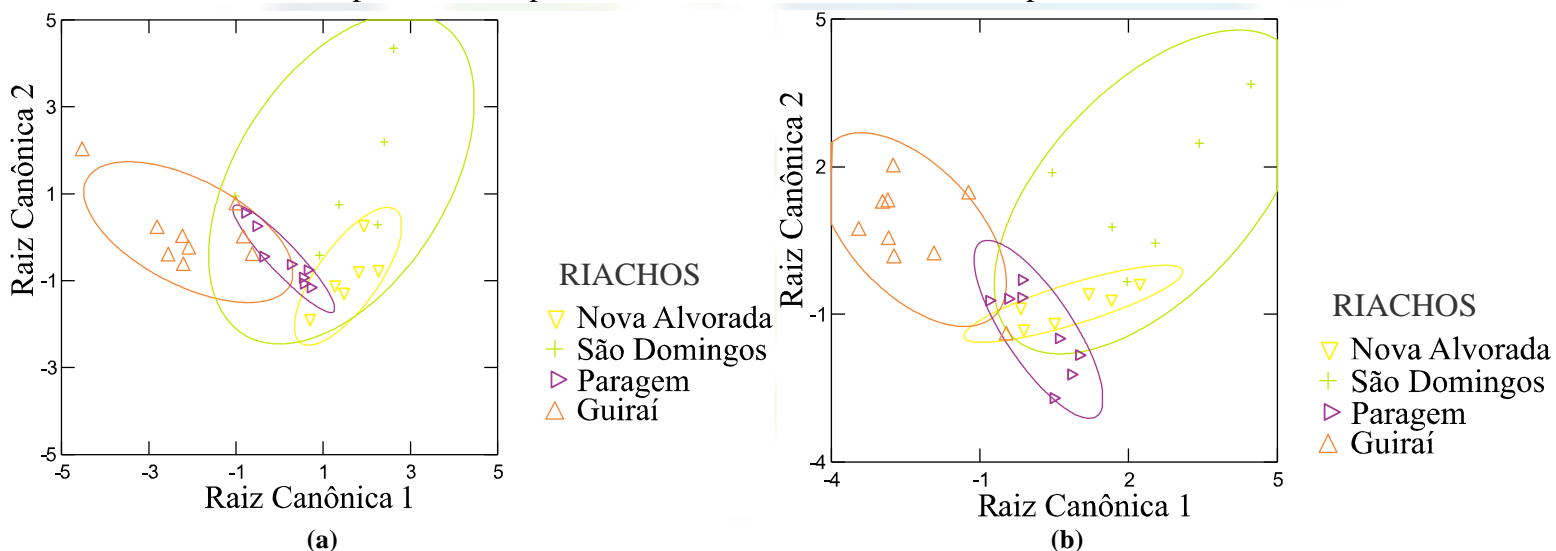


Figura 3.9 Diagramas de dispersão de quatro populações com dietas distintas. Face interna (a) e externa (b) das escamas, excitadas no comprimento de onda em 405nm.

Com estes resultados podemos afirmar que a técnica de espectroscopia de fluorescência encontrou diferença entre as populações através da estatística, sendo uma técnica aplicável mesmo não sendo possível uma visível separação e formação de grupos.

No trabalho realizado anteriormente, com FTIR-PAS, foram utilizados onze picos de intensidade e a estatística também mostrou diferença significativa, sendo Wilk's Lambda = 0,063; F = 19,19; p < 0,001, com a primeira raiz canônica explicando 61,9% da variação dos dados e a segunda raiz 38,1%. Assim, é possível visualizar no diagrama de dispersão, gerado a partir das análises de FTIR-PAS, a separação das populações dos riachos em grupos que se diferenciaram em relação à dieta (Figura 3.10). Esses grupos foram estabelecidos após interpretação da análise composicional do estômago dos indivíduos, mostrando estar diretamente ligado ao tipo de alimento disponibilizado no ambiente em que os peixes foram coletados.

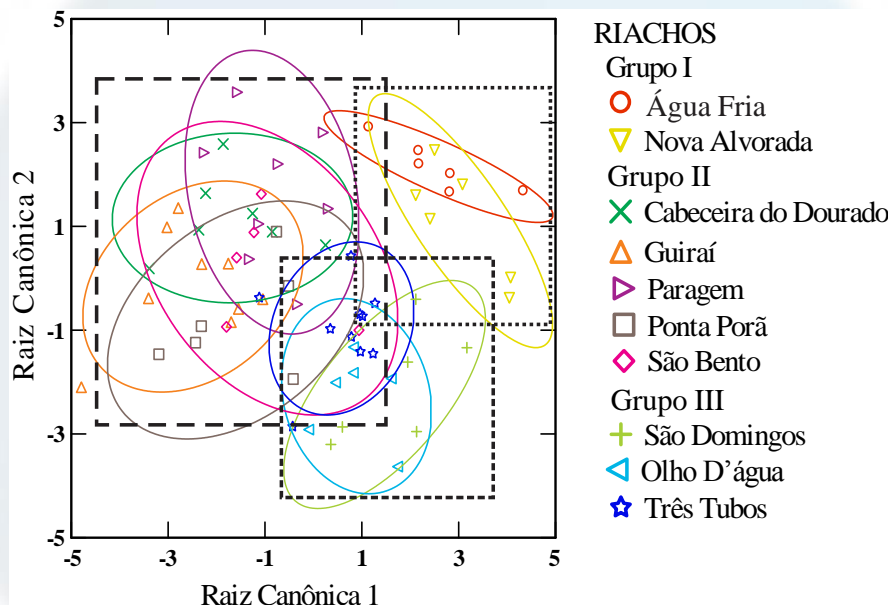


Figura 3.10 Diagrama de dispersão determinados pela análise estatística para FTIR-PAS.

4. CONCLUSÕES

A visível separação e formação de grupos não foram possíveis devido aos conjuntos de variáveis respostas (picos de intensidade) serem em menor quantidade em relação ao conjunto de variáveis respostas utilizados no trabalho com a técnica de FTIR-PAS. Os resultados obtidos mostram que a espectroscopia de fluorescência é capaz de analisar as escamas do peixe *Astyanax altiparanae*, baseando na interpretação do resultado com a análise estatística multivariada pode apresentar resultados significativos e esclarecedores para diferenciar populações. Os resultados mostram que tanto o comprimento de onda de

Capítulo 5 – Aplicação da espectroscopia de fluorescência em escamas de peixes da espécie Astyanax altiparanae (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) para a diferenciação de populações.

excitação em 360 quanto o de 405 nm são úteis para a realização desse tipo de pesquisa. O comprimento de onda com excitação em 360 nm é mais energético quando comparado com o comprimento de onda em 405 nm, apresentando maior espalhamento e originando mais gaussianas abaixo de 360 nm. O comprimento de onda em 405 nm é menos energético que o 360nm, porém é mais econômico para um protótipo. Assim, tem-se um resultado que indica a possibilidade de desenvolvimento de um protótipo experimental com o comprimento de onda de excitação em 405 nm, de baixo custo, portátil, para pesquisa *in loco*, uma vez que não há necessidade de qualquer preparo da amostra para esse estudo.

REFERÊNCIAS

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**; Norma Técnica NBR15088, Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes, Rio de Janeiro, 2004.

ANDERSEN, C. M. & WOLD, J. P. Fluorescence of muscle and connective tissue from cod and salmon. **Journal Agriculture Food Chemical**. v. 51, p. 470-476, 2003.

FAO – **Food and Agricultural Organization of the United Nations**. The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA). Rome: FAO, 180p., 2007.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia. **Série Zoologia**, v. 13, p. 65-88, 2000.

HARMEL, V. C.; **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise de qualidade de águas superficiais**. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional de Blumenau, Brasil, 2004.

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

HUANG, Y-C.; HSIAO, P-C.; CHAI, H-J. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. **Ceramics International**. v.37: 1825-1831, 2011.

IKOMA, T.; KOBAYASHI, H.; TANAKA, J.; WALSH, D.; MANN, S. Microstructure, mechanical, and, biomimetic properties of fish scales from *Pagrus major*. **Journal of Structure Biology**, v.142, p.327-333, 2003.

ISLAM, M. S.; KHAN, S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**. v.49, p.103-110, 2004.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3ed. New York-US: Springer, 954 p., 2006.

LETZELTER, N. S.; WILSON, R. H.; JONES, A. D.; SINNAEVE, G. Quantitative determination of the composition of individual pea seeds by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 67, 239-245, 1995.

MORI, H.; TONE, Y.; SHIMIZU, K.; ZIKIHARA, K.; TOKUTOMI, S.; IDA, T.; IHARA, H.; HARA, M. Studies on fish scale collagen of Pacific saury (*Cololabissaira*). **Materialsof Science and Engineering C**, v.33, p.174–181. 2013.

Capítulo 5 – Aplicação da espectroscopia de fluorescência em escamas de peixes da espécie *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (Characidae) para a diferenciação de populações.

MOURA, K. O. **Utilização de escamas do peixe corvina para adsorção de Cr (VI) em meio aquoso – cinética e termodinâmica por calorimetria isotérmica contínua.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química), Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, 2011.

NUNES, S. B. **Estabelecimento de um plano de análise de perigo e pontos críticos de controle (APPCC) para Peixe-Sapo (*Lophius piscatorius*) eviscerado e congelado.** Dissertação Mestrado, Florianópolis: UFSC, 121p., 2001.

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

ROMAN-LOPEZ, J.; CORRECHER, V.; GARCIA-GUINEA, J.; RIVERA, T.; LOZANO, I. B. Thermal and electron stimulated luminescence of natural bones, commercial hydroxyapatite and collagen. **Espectrochim Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 120, p. 610-615, 2014.

SANTOS, E. B. **Caracterização de escamas de peixe de piau (*Leporinus elongatus*) e sua aplicação na remoção de íons Cu(II) em meio aquoso.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química), Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, 2008.

SCHERER, M. D.; OLIVEIRA, S. L.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; CAIRES, A. R. L. Determination of the biodiesel content in diesel/biodiesel blends: a method based on fluorescence spectroscopy. **Journal Fluorescence**. v.21: 1027-1031, 2011.

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: 233-247, 2004.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SÚAREZ, Y. R.; SOUZA, M. M.; FERREIRA, F. S.; PEREIRA, M. J.; SILVA, E. A.; XIMENES, L. Q. L.; AZEVEDO, L. G.; MARTINS, O. C.; LIMA-JÚNIOR, S. E. Patterns of species richness and composition of fish assemblages in streams of the Ivinhema River basin, Upper Paraná River, **Acta Limnologica Brasiliensia**. vol. 23, no. 2, p. 177-188, 2011

SÚAREZ, Y. R.; VALÉRIO, S. B.; TONDATO, K. K.; XIMENES, L. Q. L.; FELIPE, T. R. A. Determinantes ambientais da ocorrência de espécies de peixes em riachos de cabeceira da bacia do rio Ivinhema, alto rio Paraná. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, vol. 29, no. 2, p. 145-150, 2007.

WU, C. W.; HSIAO, T. C.; CHU, S. C.; HU, H. H.; CHEN, J. C. Fibreoptic fluorescence spectroscopy for monitoring fish freshness. **Optical Biopsy**, 2012.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as técnicas espectroscópicas de absorção no infravermelho e de fluorescência sob excitação no UV são métodos eficientes e versáteis para análises de materiais biológicos. Este trabalho mostrou que as análises feitas pela técnica de FTIR – PAS, aliada com a estatística multivariada, é capaz de avaliar as escamas do peixe *A. altiparanae* para a diferenciação de populações, usando os picos de intensidades da absorção como variáveis. Portanto, este trabalho corrobora o estudo de Almeida *et al.*, (2012), sugerindo que a técnica de FTIR-PAS é uma ferramenta potencial para detectar não só as diferenças interespecíficas, mas também diferenças intraespecíficas, podendo detectar influências da dieta sobre a composição química das escamas de peixes. Os resultados da espectroscopia de fluorescência mostraram que a técnica também é capaz de avaliar as escamas de peixes para a diferenciação de populações. E que tanto o comprimento de onda de excitação em 360 nm quanto o comprimento de onda de excitação em 405 nm são úteis para a realização desse tipo de pesquisa. Portanto, tem-se um resultado que indica a possibilidade de desenvolvimento de um protótipo experimental de baixo custo, portátil, para pesquisa *in loco*, uma vez que não há necessidade de qualquer preparo da amostra para esse estudo.

Além deste trabalho, muitos outros podem ser realizados. Como exemplo, explorar as escamas como amostras, com técnicas ópticas e/ou analíticas, para caracterização dos compostos químicos da escama, a qual tem grande potencial de biomaterial. Também é interessante explorar melhor as técnicas utilizadas nas escamas, testando outros comprimentos de onda de excitação como também, utilizar outras espécies de peixes. Estes e outros estudos com escamas de peixes deverão ser desenvolvidos em trabalhos futuros no GEOF-UEMS.

APÊNDICE

Discrimination of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae) populations by applying Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy in the fish scales

F.S.de Almeida, C.A. Santana, D.M.V. Lima, L.H.C. Andrade, Y.R. Suárez, S.M. Lima*

Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, C.P. 351, Dourados, MS, Brazil.

Astyanax altiparanae fish species are considered very generalist and opportunist, occupying different types and sizes of environments. This characteristic turns it very appropriate as bioindicator or biomarked. So, in this work, *A. altiparanae* fish species were used to identify differences in populations by using the Fourier transform infrared spectroscopy directly in its scales. The discriminant analysis applied in the infrared spectra demonstrated a significant differentiation among the analyzed populations, with the first two canonical roots explain together 100% of the data variation. The obtained results were confronted with environmental descriptors and diet of fishes, and a better correlation was obtained when spectroscopic data were compared with the composition of food present in the fish stomachs. However, the study indicates that the combination of infrared absorption spectroscopy with discriminant analysis is a very appropriate methodology to be used in the fish population study.

Keywords: Fish scales, fish population, chemical vibrational modes, fish collagen, mid-infrared absorption spectroscopy, multivariate statistical analysis.

* *Corresponding author:* smlima@uems.br

Phone: +55 67 3902 2653

Fax: +55 67 3902 2652

Introduction

The Paraná River is one of the most important in South America in terms of area and fish diversity, encompassing important basins, as the Ivinhema River one. It is located on the right portion of the Paraná River in Mato Grosso do Sul State, and is one of the few rivers with lotic characteristics, while great portion of Upper Parana River was converted in a sequence of dams. Streams are, however, small aquatic ecosystems with well-defined characteristics of water qualities, such as dissolved oxygen concentration, pH, temperature and electrical conductivity. As well known, all these parameters are strongly dependent to the physical structure of each habitat, and they can influence directly in the fish diversity and biology, independently to the specie (Valério et al., 2007; Suárez et al., 2011; Souza & Lima-Junior, 2013). Because this, limnologic parameters have been used to differentiate fishes populations.

Among the fish families found in the upper Paraná River, the Characidae is the most abundant and exhibits large distribution (Langeani et al., 2007; Suárez et al., 2011). From this family, the *Astyanax altiparanae* specie is the easier to be found in this river, being present in different environmental types and sizes (streams, lakes and rivers) (Lima et al., 2003). These fishes are from small size, with total length reaches up to 15-20 cm, and their diet reveal a specie generalist and opportunist (Lizama & Ambrosio, 2004). They are highly adaptable to the environmental changes, with elevated plasticity in response to the resource availability (Dias et al., 2005; Viana et al., 2013).

In general, fish scales can be distinguished basically in two faces, depending on its chemical composition: the outer (inorganic phase) and inner (organic phase) (Ikoma et al., 2003). The outer face has direct contact with the environment, being composed in major concentration of hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{O}_4)_6(\text{OH})_2$) with calcium deficiency (Onozato & Watabe, 1979). The inner face exhibits highest concentration of type I collagen (Nagai et al., 2004). Fish scales have been used in several researches with different subjects, such as for population dynamics, identification of environmentally hazardous, genetic studies (DNA extraction) and others (Yue & Orban, 2001; Poulet et al., 2005; Kaur & Dua, 2012). Recently the chemical composition of scales from *A. altiparanae* was monitored by infrared spectroscopy in order to distinguish environments with different integrity levels (Santana et al., 2014). Most studies performed on fish scales also explore their qualities to evaluate the possible applications as biomaterial (Basu et al., 2006; Mori

et al., 2013). All studies with fish scales demonstrated that they exhibit important chemical signature with good correlation to the ecosystem.

In the last few years, the use of spectroscopic techniques for analyzing different biological systems has grown up (Santos et al., 2010). Among them, Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (FTIR-PAS) has been useful to the distinction of vibrational modes from different chemical bonds. The photoacoustic detection is more appropriate than the setup that relates the transmitted and incident radiations, mainly because it not requires any sample preparation to the analysis. With this, it has been applied directly in the sample, without any sample preparation, and a superficial study can be developed. Among the studied systems, microorganisms (Irudayaraj et al., 2002; Thompson et al., 2003), bones (Gu et al., 2013) and rapeseed varieties (Lu et al., 2014) can be mentioned. More recently, our group has also used FTIR-PAS in biological systems with different purpose: to discriminate castes and sex of ants in a same ant colony (Antonialli-Junior et al., 2007); to distinguish ant species (Antonialli-Junior et al., 2008); to diagnose the soybean rust (Asian rust contamination) on soy leaves caused by the fungi *Phakopsora pachyrhizi* (Andrade et al., 2008); to record facultative social parasitism in social insects (Neves et al., 2013); to study the dynamic formation of the chemical signature in wasp (Neves et al., 2012); to identify polydomy in ants (Tofolo et al., 2014); reproductive status of social wasp (Torres et al., 2014); and to monitor the diet influence on the cuticular chemical composition of ants (Bernardi et al., 2014). In fish scales, Almeida et al. (2012) used the FTIR-PAS to discriminate different fish species, hypothesize that differences in spatial distribution and diet can explain species differentiation.

In this work, fish populations from *A. altiparanae* were distinguished using the infrared absorption spectroscopy applied directly in the fish scales. This subject tests the hypothesis early pointed by our group that fish scales have strong relation with the habitat and diet. The obtained results exhibit very good correlation with stomach content and they do not have significance when compared with limnologic and geographic parameters, which are the parameters actually used to study differences in populations of fishes.

Material and methods

Data sampling

The fishes were collected in ten streams from the Ivinhema River Basin, Upper Paraná River, Brazil (Fig. 1). Immediately after the collection, the fish were fixed in 10% formalin to be transfer to the laboratory, where they were transferred to bottles of 70% alcohol. From each stream, five to ten individuals were selected, and from each fish, three scales were removed from the humeral region. Based on infrared spectroscopic preliminary analyzes, the humeral region was chosen to exhibit more intense absorption peaks of its chemical composition (Santana et al., 2014). After removal, the scales were desiccated in vacuum for at least 12 hours to remove the humidity before analysis in the infrared spectrophotometer.

From each stream was determined limnologic data as environmental descriptors, such as pH, electric conductivity ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), turbidity (NTU), width (m), depth (m), water velocity ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) and altitude (m.a.s.l). The geographical distance was obtained through of cartographic base (1:1,000,000) and the distance between sites was measured using the river flow. For diet analysis we used data obtained by Viana et al. (2013) which conducted an analysis of food components present in the stomach of the *A. altiparanae* sampled in the Nova Alvorada, Guiraí, São Domingos and Paragem streams.

Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (FTIR-PAS)

FTIR-PAS was performed using a spectrophotometer Nexus 670 Thermo Nicolet with photoacoustic detection in the spectral range from 4000 to 400 cm^{-1} , covering the region known as the fingerprint region (1700 and 400 cm^{-1}). Throughout the experiment, the spectrophotometer was purged with dry air to remove any water vapor. The photoacoustic cell was purged with helium gas. A carbon black spectrum was collected for reference, and the all spectra were obtained with 16 cm^{-1} resolution and 128 scans. The spectra were collected for the inner face of the scales, which is more representative of collagen and however is directly connected with the organic composition of the scale (Santana et al., 2014).

Data analysis

The inter-population difference was verified using a discriminant function analysis. This is a highly efficient method and is used to find a linear combination of variables that best explain the differentiation between analyzed populations (Quinn & Keough, 2005). From the obtained spectra, 11 absorption peaks were chosen, and the absorption intensities of the peaks were separated in a matrix, in which the frequency of each peak was used as variable.

The environmental descriptors, after standardizations (mean=0 and standard deviation=1) were used to produce a matrix of environmental distance among habitats using a Euclidean distance method. The partial Mantel test was used to quantify the influence of limnology and geographical distance on population differentiation.

Results

The photoacoustic absorption spectra obtained for scales of the *A. altiparanae* species are very similar, turning impossible to distinguish the populations by an eye inspection of each spectrum. So, eleven absorption peaks (vibrational modes) in the spectra of fish scales of *A. altiparanae* were selected for statistical analysis (Fig. 2). They represent the vibrational modes for chemical bonds of collagen (amide and amine), and the functional groups of these peaks were identified with reference data (Table 1) (Smith, 1999; Lin-Vien et al., 1991; Mayo et al., 2004).

Multivariate statistical analysis was applied by using the absorption intensity of the 11 peaks, which their wave number were used as variables. The interpretation resulted in Wilk's lambda = 0.063; F= 19.193; and $p < 0.001$ (Fig. 3). The discriminant analysis demonstrated significant differentiation among analyzed populations, with the first and second canonical roots explaining 61.9% and 38.1%, respectively. Considering the selected peaks, six of them had significant importance to the discrimination: NH, NH₂, CH₃CH₂, O-CH₂ and CH₃-CO from amide groups (Table 1).

From the environmental characteristics (pH, electric conductivity, temperature, turbidity, water speed, width, depth and altitude listed in Table 2), it was not found correlation with the infrared absorption spectra (Mantel $r= 0.06$; $p=ns$). By comparing geographic data (distance between the collected points) to investigate a possible genetic influence, so the streams are communicated and in some cases they are closest (Fig. 1), the Mahalanobis distance was not also significant (Mantel $r=0.23$; $p=ns$), indicating that the observed separation in population by spectroscopy is not related to the geographic distribution.

In order to investigate the influence of diet in the populations, the food components in the stomach of fishes collected in the Nova Alvorada, Guiraí, São Domingos and Paragem streams were identified and the relative mass percentage was determined (Table 3). Nova Alvorada stream presents a feeding exclusively terrestrial (insects and plants). In the stomachs of fishes collected in Guiraí and Paragem streams were found all kind of food listed in Table 3. Finally, in São Domingos stream, the fishes exhibit diet based on food terrestrial (insects and plants) with few concentration of sediments. By Table 3 it can be noted that the main food found in the stomachs of the analyzed fishes was terrestrial plants.

A new multivariate statistical analyze was performed with the spectroscopic data with the same four streams in which the stomachs were analyzed. The same absorption peaks described above were used in this analyze to compare the diet with the spectroscopic data. The interpretation resulted in Wilk's lambda = 0.0308; $F= 37.62$; and $p < 0.0001$ (Fig. 4). The discriminant analysis demonstrated significant differentiation among the four analyzed streams, with the first and second canonical roots explaining 77.8% and 22.2%, respectively. The same six selected peaks described before had significant importance to the discrimination. The disposition of these streams along to the first canonical root exhibits a good correlation with the terrestrial plants concentration found in the stomachs of the fishes (see Table 3).

Discussion

The results of this study show that FTIR-PAS with multivariate statistical is able to differ fish population using chemical composition of scales, where the absorption peaks in the mid-infrared region are the variables. The main observed functional groups of collagen identified by the infrared absorption spectrum is due amide in different forms: amide A, which is associated with NH groups appearing in 3309 cm^{-1} region;

and the amide B, appearing at 3077 and 2931 cm^{-1} , due NH_2 and CH_2 , respectively. The 1666 cm^{-1} is the vibration of carbonyl groups ($\text{C}=\text{O}$) belonging to amide I. Amide II appears in 1542 cm^{-1} and it is generally responsible to the combination of the NH in plane bending and/or the C-N stretch. At 1334 and 1234 cm^{-1} appears amide III, associate to NH and NH coupled with CN, respectively.

The observed difference between the population swas not noted by either limnologic or geographic data. However, available diet data organize the populations mainly according to the terrestrial plants concentration: NovaAlvorada stream presents a feeding exclusively terrestrial suggesting that by this reason this stream has ellipse located on the right side of the scatterplot (Fig. 4);the diet of fishes from São Domingos stream is similar to those from Nova Alvorada stream, differing in the presence of sediments and in the percentage of terrestrial insects and plants; the Paragem and Guiraí streams are most generalist with a large diversity of food, so that they are grouped in the left side of the scatterplot (Fig. 4).

Recently we compared the infrared spectra of scales from nineteen fish species from the Upper Paraná basin, in a similar methodology described in this research, and concluded that the answers determined by FTIR-PAS were directly connected to the food that constitute the died of each species interacting with spatial distribution (Almeida et al., 2012). It was possible to organize the species in four groups relating them with the diet composition. However, only now our assumption is being confirmed, so the results obtained with FTIR-PAS are in very good agreement to the stomach analysis performed in the same fishes used to infrared analyze. Besides, as we are comparing fish scales from a same species, the interspecific influence can be eliminated.

Bonato et al. (2012) analyzing fish feeding from two streams of Upper Paraná River, suggested that *A. altiparanae* use mainly terrestrial and aquatic insects in their diet (eg. Coleoptera -Bees and Hymenoptera-Ants). Terrestrial insects as bees and ants were common in the whole hydrographic basin, as response to aerial dispersion. However, aquatic insects can vary according to chemical and physical characteristics of the stream. Viana et al. (2013) explored the influence of environment in the diet of *A. altiparanae* in the streams of Ivinhema river basin. This work evidenced that different sites (impacted or least impacted) influence the fish feeding. This explains the observed differences in infrared signature of scales from fishes collected in different hydrographic portion of Ivinhema Basin (Table 3).

The results indicate that fish scales from *A. altiparanae* can be used in spectroscopic analysis to give information on habitat/diet characteristics. There was observed a good agreement between the used methodology and diet composition analysis. Besides, the used methodology succeeds to distinguish fish populations extracted from places classified as similar by limnology and geographic parameters. This indicates that it is potential for studies evolving fish scales as population bioindicator.



Acknowledgments

The authors would like to thank Agência Brasileira de Inovação (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for their financial support.



References

Almeida, F. S., S. M. Lima, L. H. C. Andrade & Y. R. Suárez, 2012. Differentiation of neotropical fish species with statistical analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy data. *Applied Spectroscopy* 66: 782-785.

Andrade, L. H. C., P. G. Freitas, B. G. Mantovani, M. S. Figueiredo, R. A. Lima, S. M. Lima, M. A. S. Rangel & R. M. Mussury, 2008. Detection of soybean rust contamination in soy leaves by FTIR photoacoustic spectroscopy. *European Physical Journal Special Topics* 153: 539-541.

Antonialli-Junior, W. F., S. M. Lima, L. H. C. Andrade & Y. R. Suárez, 2007. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics and Molecular Research* 6: 492-499.

Antonialli-Junior, W. F., Y. R. Suárez, T. Izida, L. H. C. Andrade & S. M. Lima, 2008. Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics and Molecular Research* 7: 559-566.

Basu, A., S. Mustafiz, M. R. Islam, N. Bjorndalen, M. S. Rahaman & O. Chaalal, 2006. A comprehensive approach for modeling sorption of lead and cobalt ions through fish scales as an adsorbent. *Chemical Engineering Communications* 193: 580-605.

Bernardi, R. C., E. L. B. Firmino, M. C. Pereira, L. H. C. Andrade, C. A. L. Cardoso, Y. R. Suárez, W. F. Antonialli-Jr & S. M. Lima, 2014. The Role of Diet in the Cuticular Chemical Composition of *Ectatomma brunneum*: FTIR-PAS as a Potential Tool, *Genetics and Molecular Research* 13: 10035-10048.

Bonato, K. O., R. L. Delariva, & J. C. Silva, 2012. Diet and trophic guilds of fish assemblages in two streams with different anthropic impacts in the northwest of Paraná, Brazil. *Zoologia* 29: 27-38.

Coelho, T. M., E. S. Nogueira, W. R. Weinand, W. M. Lima, A. Steimacher, A. N. Medina et al., 2007. Thermal properties of natural nanostructured hydroxyapatite extracted from fish bone waste. *Journal of Applied Physics* 101: 084701.

Dias, R. M., D. Bailly, R. R. Antonio, H. I. Suzuki & A. A. Agostinho, 2005. Colonization of the Corumbá Reservoir (Corumbá River, Paraná River Basin, Goiás State, Brazil) by the "Iambari" *Astyanax altiparanae* (Tetragonopterinae, Characidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 467-476.jh

Gu, C., D. R. Katti & K. S. Katti, 2013. Photoacoustic FTIR spectroscopic study of undisturbed human cortical bone. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 103: 25-37.

Ikoma, T., H. Kobayashi, J. Tanaka, D. Walsh & S. Mann, 2003. Microstructure, mechanical, and biomimetic properties of fish scales from *Pagrus major*. *Journal of Structure Biology* 142: 327-333.

Irudayaraj, J., H. Yang & S. Sakhamuri, 2002. Differentiation and detection of microorganisms using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* 606: 181-188.

Kaur, R. & A. Dua, 2012. Fish scales as indicators of wastewater toxicity from an international water Tung Dhab drain. *Environmental Monitoring and Assessment* 184: 2729-2740.

Langeani, F., R. M. C. Castro, O. T. Oyakawa, O. A. Shibatta, C. S. Pavanelli & L. Casatti, 2007. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica* 7: 181-197.

Lima, F. C. T., L. R. Malabarba, P. A. Buckup, J. F. Pezzi da Silva, R. P. Vari, A. Harold, R. Benine, O. T. Oyakawa, C. S. Pavanelli, N. A. Menezes, C. A. S. Lucena, M. C. S. L. Malabarba, Z. M. S. Lucena, R. E. Reis, F. Langeani, C. Moreira et al., 2003. Genera Incertae Sedis in Characidae. In Reis R. E., S. O. Kullander & C. J. Jr. Ferraris (eds), Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, RS: 106-168.

Lima-Junior, S. E. & R. Goitein, 2001. A new method for the analysis of fish stomach contents. *Acta Scientiarum*. Biological Sciences 23: 421-424.

Lin-Vien, D., N. B. Colthup, W. G. Fateley & J. G. Grasselli, 1991. Infrared And Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.

Lippitsch, E. 1990. Scale morphology and squamation patterns in cichlids (Teleostei, Perciformes): A comparative study. *Journal of Fish Biology* 37: 265-291.

Lizama, M. de los A. P. & A. M. Ambrosio, 2004. Growth, recruitment, and mortality parameters for *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 and *A. schubarti*, Britski, 1964 (Pisces, Characidae) in the Upper Paraná River floodplain, Brazil. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 26: 437-442.

Lu, Y., C. Du, C. Yu & J. Zhou, 2014. Classifying rapeseed varieties using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (FTIR-PAS). *Computers and Electronics in Agriculture* 107: 58-63.

Mayo, D. W., F. A. Miller & R. W. Hannah, 2004. Course Notes on the Interpretation of Infrared and Raman Spectra. New Jersey: John Wiley and Sons.

Michaelian, K. H. 2010. Photoacoustic Infrared Spectroscopy. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Mori, H., Y. Tone, K. Shimizu, K. Zikihara, S. Tokutomi, T. Ida, H. Ihara & M. Hara, 2013. Studies on fish scale collagen of Pacific saury (*Cololabis saira*). *Materials of Science and Engineering* 33: 174-181.

Nagai, T., M. Izumi & M. Ishii, 2004. Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. *International Journal of Food Science and Technology* 39: 239-244.

Neves, E. F., L. H. C. Andrade, Y. R. Suárez, S. M. Lima & W. F. Antonialli-Junior, 2012. Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genetics and Molecular Research* 11: 1891-1898.

Neves, E. F., T. S. Montagna, L. H. C. Andrade, Suárez, Y. R., Lima, S. M. & Antonialli Jr., W. F. (2013). Social Parasitism and Dynamics of Cuticular Hydrocarbons in Paper Wasps of the Genus *Mischocyttarus*. *Journal of the Kansas Entomological Society* 86: 69-77.

Onozato, H. & N. Watabe, 1979. Studies on fish scale formation and resorption. *Cell Tissue Research* 201: 409-422.

Poulet, N., Y. Reyol, H. Collier & S. Lek, 2005. Does fish scale morphology allow the identification of populations at a local scale? A case study for rostrum dace *Leuciscus burdigalensis* in River Viaur (SW France). *Aquatic Sciences* 67: 122-127.

Quinn, G. P. & M. J. Keough, 2005. *Experimental design and data analysis for biologists*. Edinburgh-UK: Cambridge, University Press.

Santana, C. A., L. H. C. Andrade, Y. R. Suárez, K. Yukimitu, J.C.S. Moraes & S. M. Lima, 2015. Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy applied in fish scales to access environmental integrity: a case study of *Astyanax altiparanae* species, submitted to *Infrared Physics & Technology*.

Santos, C., M. E. Fraga, Z. Kozakiewicz & N. Lima, 2010. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology* 161: 168-175.

Smith, B.C. 1999. *Infrared Spectral Interpretation: a systematic approach*. New York: CRC.

Souza, R. G. & S. E. Lima-Junior, 2013. Influence of environmental quality on the diet of *Astyanax* in a microbasin of central western Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 35: 177-184.

Suárez, Y. R., M. M. Souza, F. S. Ferreira, M. J. Pereira, E. A. Silva, L. Q. L. Ximenes, L. G. Azevedo, O. C. Martins & S. E. Lima-Junior, 2011. Patterns of species richness and composition of fish assemblages in streams of the Ivinhema River basin, Upper Paraná River. *Acta Limnologia Brasiliensia* 23: 177-188.

Thompson, S. E., N. S. Foster, T. J. Johnson, N. B., Valentine, J. E. Amonette, 2003. Identification of Bacterial Spores Using Statistical Analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy Data. *Applied Spectroscopy* 57: 893-899.

Tofolo, V.C., E. Giannotti, E. F. Neves, L. H. C. Andrade, S. M. Lima, Y. R. Suárez, & W. F. Antonialli-Junior, 2014. Polydomy in the ant *Ectatomma opaciventre*. *Journal of Insect Science: Journal of Insect Science* 14: 21.

Torres, V. O., D. Sguarizi-Antonio, S. M. Lima, L. H. C. Andrade & W. F. Antonialli-Junior, 2014. Reproductive Status of the social wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera, Vespidae). *Sociobiology* 61: 218-224.

Valério, S. B., Y. R. Suárez, T. R. A. Felipe, K. K. Tondato & L. Q. L. Ximenes, 2007. Organization patterns of headwater-stream fish communities in the Upper Paraguay-Paraná basins. *Hydrobiologia* 583: 241-250.

Viana, L. F., Y. R. Suárez & S. E. Lima-Junior, 2013. Influence of environmental integrity on the feeding biology of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 in the Ivinhema river basin. Acta Scientiarum. Biological Sciences 35: 541-548.

Yue, G. H. & L. Orban, 2001. Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction. Marine Biotechnology 3: 199-204.



FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. Map of Ivinhema basin with the black dots pointing where *A. altiparanae* were sampled.

Fig. 2. Average spectrum for *A. altiparanae* scales collected in Ivinhema River Basin, Upper Paraná Basin.

The numbers are indicating the selected peaks for statistical analysis.

Fig. 3. Scatterplot for the infrared spectra of scales from *A. altiparanae* collected in different position of Ivinhema River Basin, Upper Paraná Basin, Brazil.

TABLE CAPTIONS

Table 1: Selected peaks, functional groups, vibration modes and F-values from statistical analysis obtained by interpreting the infrared absorption spectra of scales of *A. altiparanae* specie collected in Ivinhema River Basin, Upper Paraná Basin, Brazil.

Table 2: Average values for environmental characteristics, such as pH, electric conductivity, temperature, turbidity, water speed, width, depth and height with respect to the sea level.

Table 3: Percentage of food concentration found in the stomachs of the studied fishes. TI are terrestrial insects, AI are aquatic insects, TP are terrestrial plants, AP are aquatic plants, AL are algae, PF are Debris and/or parts of fishes, AR are arachnids, NE are nematodes, S are sediments and UM are unidentified material.

Figures

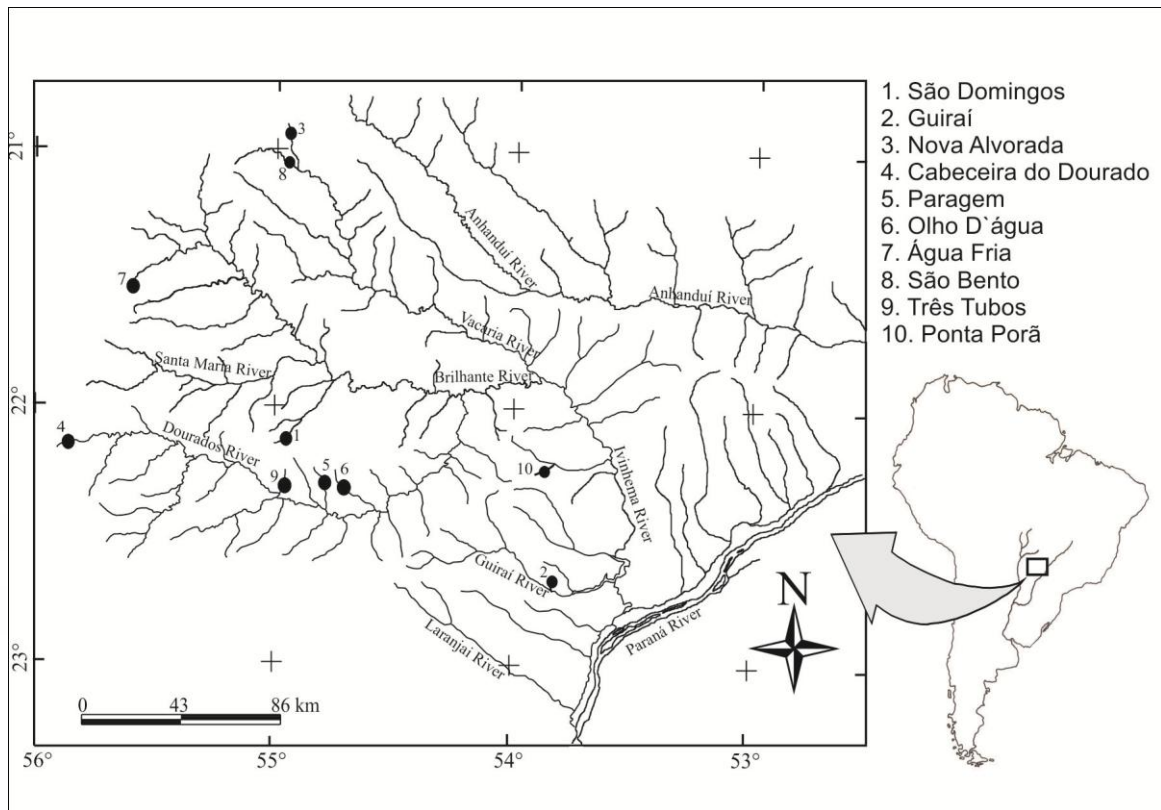


Fig. 1. Almeida *et al.*

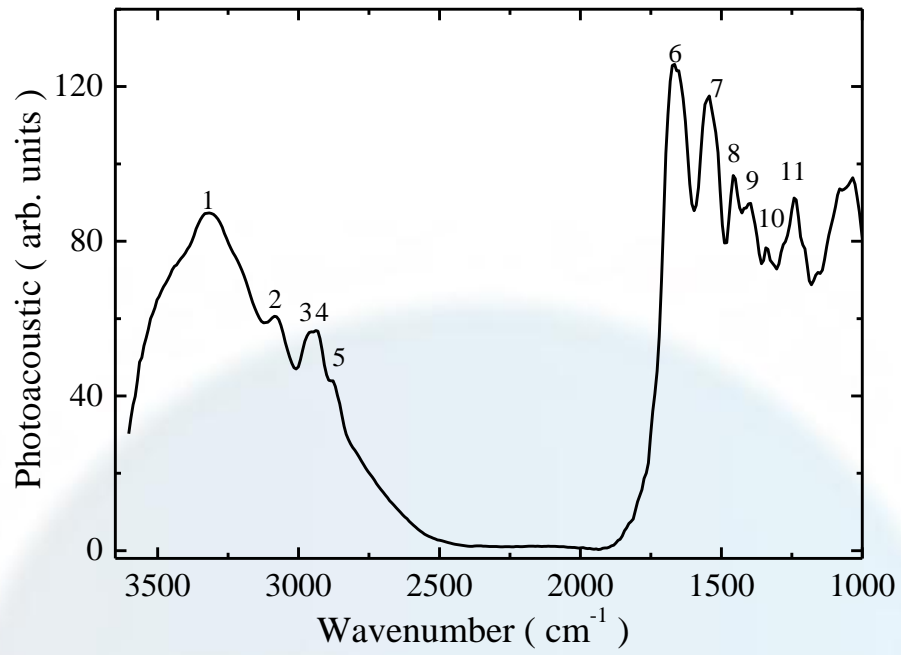


Fig. 2.Almeida *et al.*

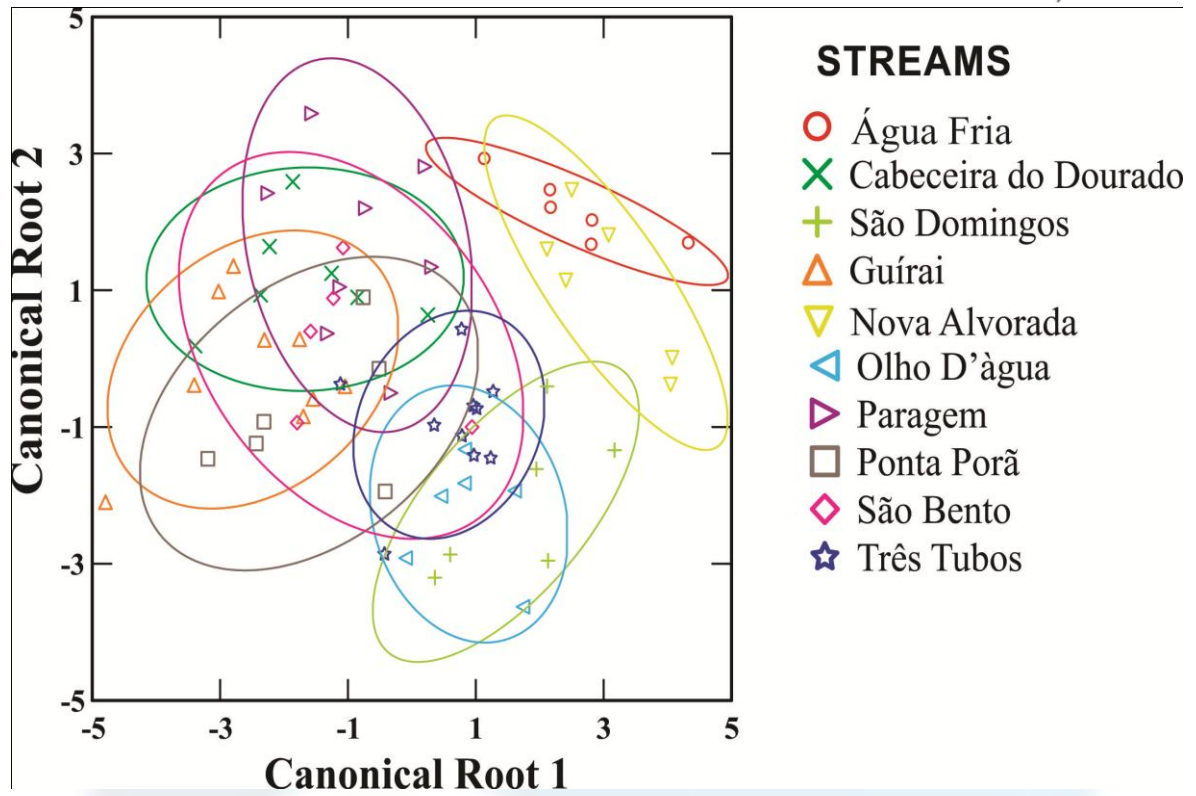


Fig. 3. Almeida *et al.*

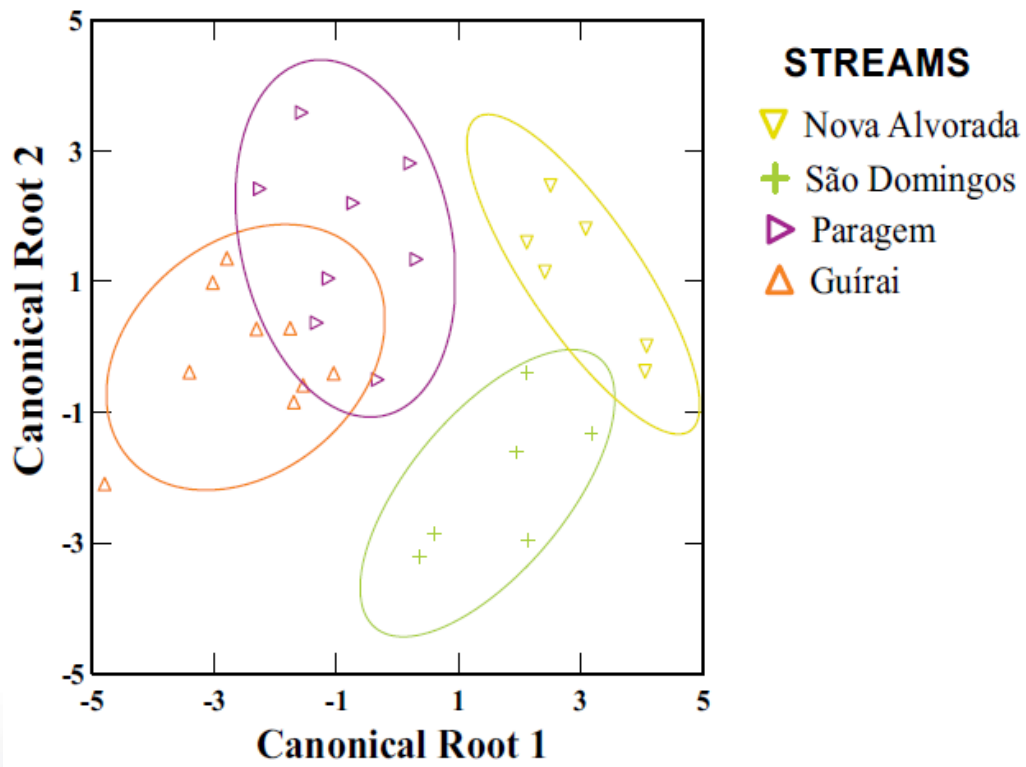


Fig. 4. Almeida *et al.*

Table 1: Selected peaks, functional groups, vibration modes and F-values from statistical analysis obtained by interpreting the infrared absorption spectra of scales of *A. altiparanae* specie collected in Ivinhema River Basin, Upper Paraná Basin, Brazil.

Peak	Wavenumber (cm ⁻¹)	Functional group	F-value
1	3309	v _s NH(Amide A)	3.538***
2	3077	v _{as} NH ₂ (Amide B)	2.384**
3	2969	v _{as} CH ₃	2.592***
4	2931	v _{as} CH ₂ (Amide B)	3.607***
5	2877	v _s CH ₃	1.356 ns
6	1666	v C=O(Amide I)	2.076 ns
7	1542	δ NH and/or v _{as} CN (Amide II)	1.703 ns
8	1457	δ O-CH ₂	1.639 ns
9	1396	δ O-CH ₂	2.488***
10	1334	v _{as} NH(Amide III)	1.918 ns
11	1234	v _s NH coupled with CN (Amide III)	2.196**

Table 2: Average values for environmental characteristics, such as pH, electric conductivity, temperature, turbidity, water speed, width, depth and height with respect to the sea level.

Stream name	pH	Electric Conductivity ($\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Turbidity (NTU)	WaterSpeed (ms^{-1})	StreamWidht (m)	StreamDepth (m)	Height (m)
Agua Fria	7.2	12.3	22.3	10.5	0.33	1.0	0.40	554
Cabeceira Dourado	7.5	29.5	20.7	2.9	0.34	1.5	0.22	641
São Domingos	5.7	82.6	23.5	7.5	0.45	1.0	0.40	375
Guiraí	6.5	238.5	23.8	19.6	0.25	6.5	1.25	244
Nova Alvorada	7.2	98.7	22.8	6.2	0.38	2.3	0.55	432
Olho d'agua	6.6	0.1	24.5	11.3	0.45	2.0	0.74	387
Paragem	7.0	0.1	23.1	11.8	0.36	0.9	0.66	389
Ponta Porã	6.6	18.1	22.3	9.5	0.08	1.2	0.35	307
São Bento	7.2	33.7	21.1	10.9	0.80	6.0	0.84	344
Três tubos	6.5	31.8	23.3	4.6	0.09	2.2	0.48	400

Table 3: Percentage of food concentration found in the stomachs of the studied fishes. TI are terrestrial insects, AI are aquatic insects, TP are terrestrial plants, AP are aquatic plants, AL are algae, PF are debris and/or parts of fishes, AR are arachnids, NE are nematodes, S are sediments and UM are unidentified material.

Stream	TI (%)	AI (%)	TP (%)	AP (%)	AL (%)	PF (%)	AR (%)	NE (%)	S (%)	UM (%)
Nova Alvorada	17.0	-	83.0	-	-	-	-	-	-	-
São Domingos	44.5	-	53.0	-	-	-	-	-	2.5	-
Paragem	20.5	19.5	35.5	0.2	1.7	7.1	-	2.2	7.7	5.6
Guirai	38.0	7.0	29.0	-	-	8.0	0.3	-	10.7	7.0