

ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PARA ESTUDOS AMBIENTAIS

Evandro Faria Lins¹, William Chagas Praxedes², Deise Cristiane Trevisan³, Patrícia Marcondes dos Santos⁴, Kumiko Koibuchi Sakane⁵, Maria Regina de Aquino-Silva⁶

^{1,2,3,4,5,6} Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, São José dos Campos, SP

Resumo - A análise do espectro infravermelho é uma ferramenta utilizada para identificar um composto ou investigar a composição química de uma amostra. O objetivo deste trabalho foi demonstrar como a utilização da técnica espectroscópica pode ser útil aos estudos ambientais, tendo sido possível através dela fazer a determinação de compostos presentes em essências florestais, permitindo assim, separar taxonomicamente as espécies *Psidium myrtoides* (Araçá-roxo) e *Psidium cattleianum* (Araçá-vermelho), bem como identificar a resposta metabólica de *Myrsine spec.* (Capororoca) submetida a duas condições ambientais diferenciadas (sol e sombra), em áreas degradadas e em processo de recuperação.

Palavras-chave: Espectroscopia no Infravermelho; Taxonomia; Condições Ambientais; Áreas de Recuperação.

Área do Conhecimento: Engenharia Ambiental.

Introdução

A Fazenda Santana do Poço, no município de Jacareí/SP, na década de 1990 sediou vários empreendimentos relacionados ao processo de extração de areia, apresentando assim alterações significativas da paisagem no que se refere à qualidade do solo e, conseqüentemente, à vegetação, além da presença de inúmeras lagoas resultantes do processo de mineração. Atualmente, esta área é de propriedade da Fundação Valeparaibana de Ensino (mantenedora da Universidade do Vale do Paraíba) que, assumindo as obrigações legais herdadas dos empreendimentos anteriormente estabelecidos na referida fazenda, propõem um projeto de recuperação e preservação ambiental - *Conhecer para Conservar* - a fim de restabelecer as características fisiográficas da região.

Dentre as essências florestais nativas introduzidas no processo de reflorestamento da área degradada, tem-se a Capororoca (*Myrsine spec.*) e o Araçá (*Psidium spec.*). Essas espécies possuem elevada capacidade de se adaptar, de se desenvolver e de se multiplicar em ambientes degradados (LORENZI, 2002); tais características justificam seu emprego na recuperação dessas áreas.

Fatores ambientais como duração, intensidade e distribuição espectral da radiação, temperatura, gravidade, forças impostas pelo vento, correntes de água, gradientes químicos, entre outros, afetam o crescimento e o desenvolvimento das plantas de diferentes formas, tais como a iniciação ou cessação do processo de desenvolvimento, a velocidade e a extensão do crescimento, a morfogênese e o tropismo (LARCHER, 2000).

Tradicionalmente, as respostas ecológicas frente às perturbações ambientais têm sido avaliadas com base em conceitos bioquímicos. Todavia, segundo Shepherd (2007), tal abordagem pode ser de certa maneira tendenciosa e subjetiva, ficando na maioria das vezes dependente da experiência do pesquisador. Neste sentido, a impressão metabólica por espectroscopia no infravermelho pode ser uma ferramenta que permite identificar as alterações funcionais de diferentes organismos em resposta a um fator ambiental específico.

A espectroscopia infravermelha tem sido utilizada como uma técnica importante para estudos ambientais (STUART, 1997).

A espectroscopia vibracional surge das vibrações dos átomos em moléculas. A radiação infravermelha na faixa de 10 000 a 100 cm^{-1} do espectro eletromagnético converte-se, quando absorvida, em energia de vibração molecular. Somente as vibrações que levam à alteração do momento dipolar da molécula são observadas nos espectros infravermelhos. O espectro vibracional aparece como uma série de bandas que representam os diferentes níveis de energia vibracional (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2006).

É muito pouco provável que duas substâncias dêem o mesmo espectro infravermelho, o que permite a comparação entre a substância desconhecida ao composto padrão. No entanto, é importante mencionar que certos grupos de átomos absorvem a radiação infravermelha mais ou menos na mesma região. Estas bandas são chamadas de características de grupos e permitem informações estruturais úteis após consulta às tabelas de correlações (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2006).

No presente trabalho buscou-se verificar a viabilidade da utilização de técnicas espectroscópicas como ferramenta na sistemática vegetal através da análise das diferentes espécies de Araçá e na avaliação de respostas fisiológicas da espécie Capororoca frente a diferentes condições de iluminação/incidência solar.

A escolha da área da antiga Fazenda do Poço, em processo de recuperação, como local de estudo se fez em função da mesma apresentar um ambiente diversificado e adverso em condições como aspecto nutricional do solo e variação na disponibilidade de radiação solar, os quais podem interferir no desenvolvimento da flora.

Metodologia

A fim de estabelecer parâmetros comparáveis na espectroscopia infravermelha, foram definidos os seguintes critérios: estudos de classificação sistemática (espécies) e de resposta à variação da condição ambiental em relação à incidência solar.

Para a análise da classificação sistemática foram escolhidas duas espécies da família Myrtaceae: *Psidium myrtilloides* (Araçá-roxo) e *Psidium cattleianum* (Araçá-vermelho). No caso do estudo da resposta à diferente condição ambiental foram escolhidos dois exemplares da espécie *Myrsine spec.* (Capororoca), um exposto a radiação solar direta e o outro exposto a radiação difusa (sombra).

Para todos os indivíduos arbóreos analisados foram coletados ramos contendo de quatro a cinco folhas aproximadamente à altura do peito (~1,50 metros).

Após a coleta, cada ramo foi lavado em água corrente e enxaguado em água destilada, seco manualmente com papel toalha e posteriormente inserido em um saco de papel pardo, devidamente identificados, a fim de serem levados para secagem em estufa a 70°C durante aproximadamente 15 dias para total secagem da umidade presente nas folhas.

Após a secagem, as folhas foram trituradas em um almofariz de porcelana e posteriormente peneiradas em uma peneira de 0,01mm, resultando em um pó bem fino o qual foi embalado em papel alumínio, identificado e encaminhado ao Laboratório de Espectroscopia no Infravermelho.

Foram confeccionadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) de cada uma das amostras das folhas secas. Utilizou-se o espectrofotômetro

infravermelho *Spectrum GX* (PerkinElmer) para obtenção dos espectros em modo de transmissão, no intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

Os espectros foram pré-processados para as análises matemáticas com correções de linha de base, suavização espectral através do algoritmo *Savitzky Golay* (9 pontos), normalização e colocação em absorbância.

Dentro da análise estatística multivariada foram feitas análise por componentes principais (PCA), cujo objetivo é a obtenção de um pequeno número de combinações lineares (componentes principais – PC's) de um conjunto de variáveis, que retenham o máximo possível da informação contida nas variáveis originais (SANTOS, 2011); e a análise por agrupamento hierárquico, onde se busca estabelecer a melhor forma de agrupar um conjunto de objetos compostos por variáveis conforme o grau de semelhança (JOHNSON & WICHERN, 1992).

Na análise por componentes principais foram obtidos os quatro primeiros componentes principais, calculados a partir da matriz de covariância formada pelos dados espectrais. Esses PC's serviram de entrada para a análise de *cluster* utilizando-se o algoritmo *Ward*, conhecido também como "variância mínima", onde são formados grupos unidos de forma a produzir o mínimo de aumento da variância (heterogeneidade), logo, esse pode ser considerado como o mais eficiente método de agrupamento para este conjunto de dados (EVERITT, 1994; WARD, 1963).

No programa *Minitab 15.1* foram realizadas as análises estatísticas multivariadas utilizando o intervalo espectral de 4000 a 930 cm^{-1} com exclusão da região de 2450 a 2200 cm^{-1} (CO_2 – dióxido de carbono), e os resultados expressos na forma de dendrograma que é uma representação gráfica dos resultados obtidos com a análise hierárquica de agrupamento (ROMESBURG, 1990).

Resultados

Foram obtidos espectros infravermelhos das amostras de Araçá-roxo e Araçá-vermelho (figura 1); e de Capororoca sob maior incidência de radiação solar (Capororoca sol) e Capororoca sob menor incidência de radiação solar (Capororoca sombra) (figura 2).

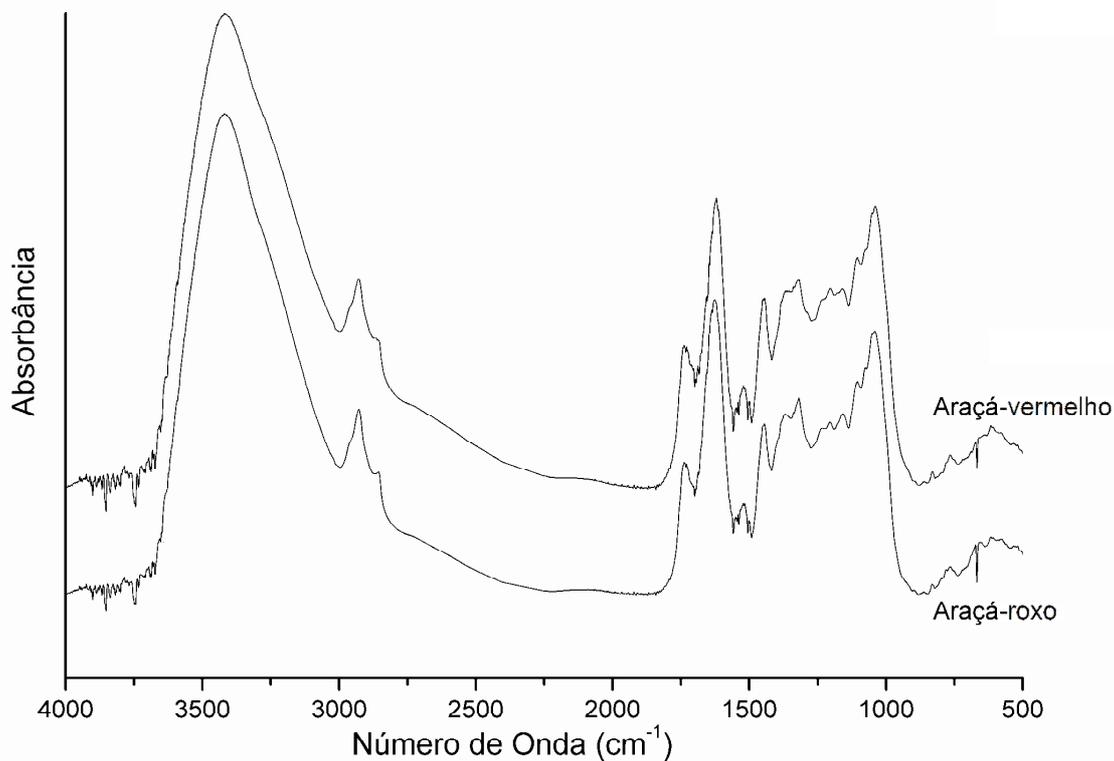


Figura 1 - Espectros médios de Araçá-roxo e Araçá-vermelho.

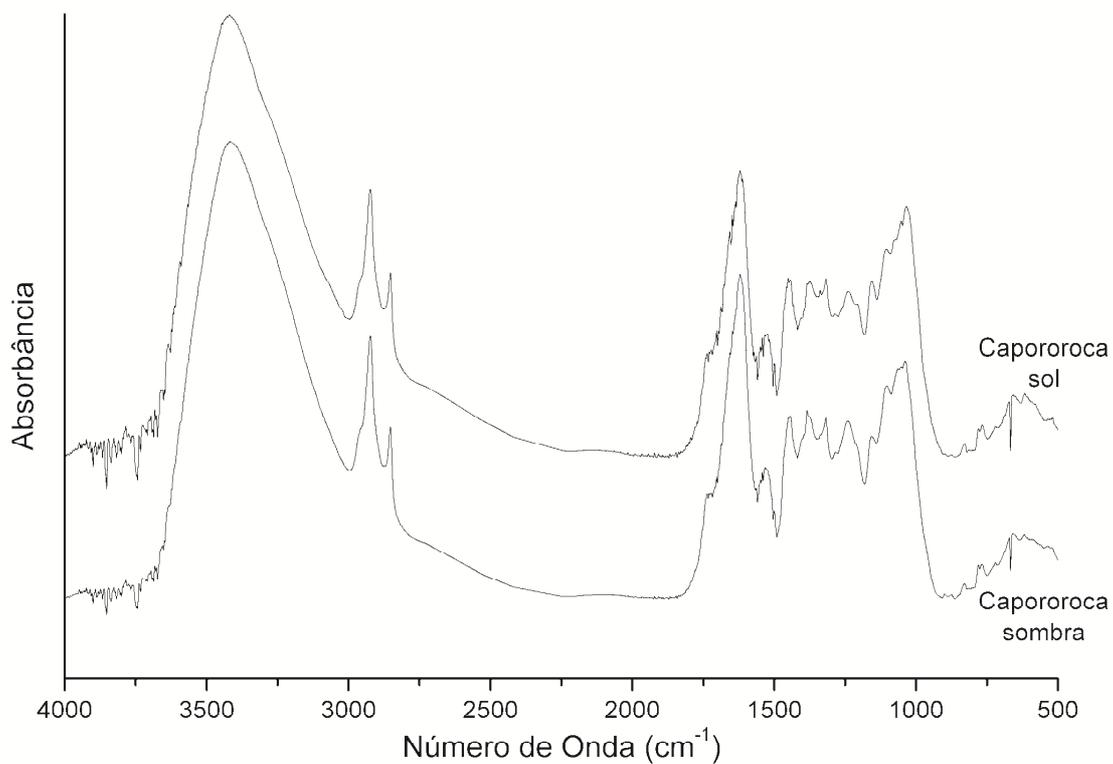


Figura 2 - Espectros médios de Capororoca sol e Capororoca sombra.

Na região de impressão digital do espectro (região abaixo de 1800 cm^{-1}), pode-se observar, através de inspeção visual, diferenças significativas nos contornos de bandas e nas intensidades relativas dos picos entre os espectros de Araçá-roxo e Araçá-vermelho. Essas diferenças são pouco observadas entre os espectros de Capororoca sol e Capororoca sombra.

Para a análise de agrupamento foram utilizados os seguintes parâmetros: de medida de similaridade, a distância euclidiana, a mais utilizada em análise de agrupamento segundo Cormack (1971); como algoritmo para o agrupamento hierárquico, o Ward; e para determinação do número de *clusters* a serem formados, foi utilizado o nível de similaridade igual a 90%.

O dendrograma da figura 3 mostra a clara discriminação das espécies de Araçás obtidas a partir da análise de *cluster* realizada em cinco espectros de cada amostra.

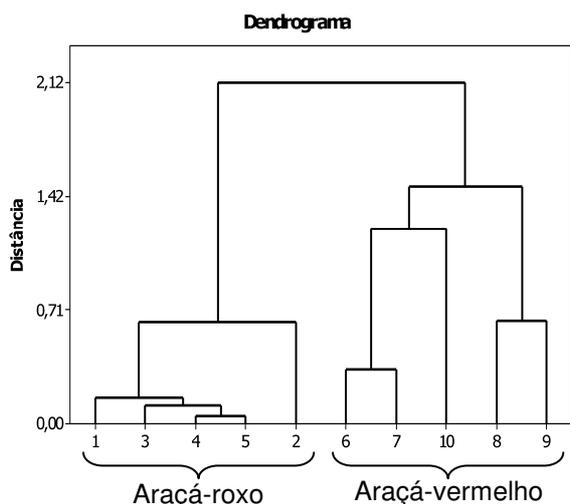


Figura 3 - Dendrograma comparativo do Araçá-roxo com o Araçá-vermelho. Os pontos 1 a 5 referem-se aos espectros do Araçá-roxo e os de 6 a 10 aos do Araçá-vermelho.

Já a clara discriminação entre as amostras de Capororoca sol e sombra somente foi possível após o cálculo da segunda derivada dos cinco espectros de cada amostra, conforme mostrado no dendrograma da figura 4. A partir da segunda derivada foram calculados os PC's que serviram de entrada para a análise estatística multivariada, a qual seguiu os mesmos parâmetros utilizados na análise dos Araçás.

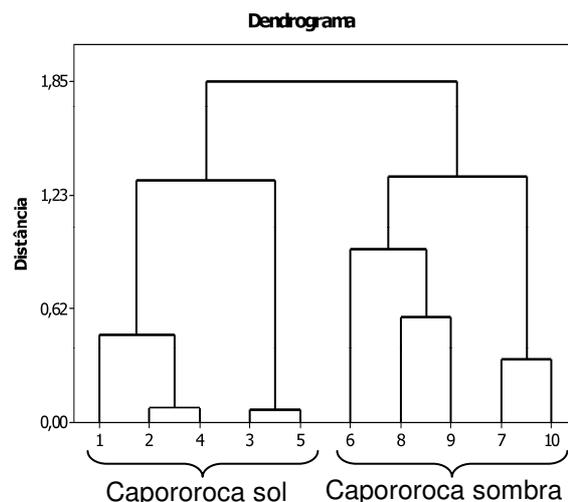


Figura 4 - Dendrograma comparativo Capororoca sol com a Capororoca sombra. Os pontos 1 a 5 referem-se aos espectros da Capororoca sol e os de 6 a 10 aos da Capororoca sombra.

Discussão

Os tratamentos matemáticos que foram feitos nas amostras de Araçá foram diferentes dos das Caporococas, como foi mostrado nos "Resultados". Isso ocorre porque no caso dos Araçás a discriminação encontra-se em nível de espécies (taxonomia) com diferenças espectrais significativas entre o Araçá-roxo e o Araçá-vermelho. Já no caso das Capororocas, as diferenças espectrais eram menos evidentes, pois se tratava da mesma espécie, variando apenas a condição de ambiente (disponibilidade de luz); justificando assim a necessidade da utilização da segunda derivada para acentuar as pequenas diferenças entre os espectros das amostras (STUART, 1997).

Conclusão

A espectroscopia infravermelha aliada à análise estatística multivariada (*Minitab 15.1*) é potencialmente útil na diferenciação de espécies de plantas (taxonomia) e de amostras de uma mesma espécie de árvore que estão sujeitas a condições de ambiente distintas, no caso de incidência de radiação solar.

Nesse âmbito, sugere-se que a espectroscopia no infravermelho possa ser aplicada em estudos ambientais no geral, tais como a caracterização e recuperação de áreas degradadas, identificação da fauna e da flora, assimilação de propriedades bioquímicas do solo e de recursos hídricos, identificação da presença de substâncias químicas em uma amostra, etc., bastando apenas aplicar as

técnicas e os processos matemáticos apropriados para cada tipo de pesquisa.

Referências

- APREMAVI. **Araçá-vermelho. O fruto que tem olhos.** Disponível em: <<http://www.apremavi.org.br/noticias/apremavi/488/aracavermelho-o-fruto-que-tem-olhos>>. Acesso em: 19 ago. 2011.
- CENTRO DE PREVISÃO DO TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS (CPTEC). **O Espectro Eletromagnético.** Disponível em: <http://videoseducacionais.cptec.inpe.br/swf/natureza_radiacao/1_2/>. Acesso em: 18 ago. 2011.
- CORMACK, R. A. Review of classification. **Journal of the Royal Statistical Society (Series A)**, v.134, p.321-367, 1971.
- DURIGAN, Giselda; BAITELLO, João Batista; FRANCO, Geraldo Antônio Daher Corrêa. **Plantas do Cerrado Paulista: Imagens de uma paisagem ameaçada.** São Paulo: Páginas & Letras Editora e Gráfica, 2004. 475 p.
- EVERITT, B. S., **Statistical Methods for Medical Investigations.** Second edition. London: Edward Arnold, 1994. 156p.
- JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis.** 3. Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 642p.
- LARCHER, Walter. **Ecofisiologia Vegetal.** São Carlos: Rima, 2000. 531 p.
- LORENZI, Harri. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil.** Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 03 v.
- RAMOS, Viviane Soares; DURIGAN, Giselda; FRANCO, Geraldo Antônio Daher Corrêa. **Árvores da Floresta Estacional Semidecidual: Guia de Identificação de Espécies.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2008. 320 p.
- ROMESBURG, H. C. **Cluster analysis for researchers.** Malabar, Fla.: Krieger publishing company, 1990. 334 p.
- SANTOS, P. M. Diferenciação de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis* através de Microespectroscopia (FT-IR) e análise estatística multivariada. 2011. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)
- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2011.
- SHEPHERD, K.D.; WALSH, M.G.. Infrared spectroscopy - enabling an evidence based diagnostic surveillance approach to agricultural and environmental management in developing countries: **Journal of Near Infrared Spectroscopy** 15, p. 1-19, 2007.
- SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J.. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7ª Edição Brasil: Ltc, 2006. 508 p.
- STUART, B. H. **Biological Applications of Infrared Spectroscopy.** John Wiley & Sons, 1997. 191p.
- UNIVAP. **Cavas de Areia - Problemas e soluções.** Disponível em: <<http://www.univap.br/cavas/>>. Acesso em: 19 ago. 2011.
- WARD, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**, v.58, p.236-244, 1963.