

Universidade Estadual de Campinas

**Instituto de Química
Departamento de Química Analítica**



Dissertação de Mestrado

**Espectrometria de Raios-X Aliada à Quimiometria no
Estudo de Vegetais**

Thais Levatti Alexandre

**Prof. Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno
(Orientadora)**

GERX - Grupo de Espectrometria de Raios-X
Caixa Postal 6154 CEP 13084-971, Campinas - SP

Fevereiro de 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

Al27e Alexandre, Thais Levatti.
Espectrometria de raios-X aliada à quimiometria no estudo de vegetais / Thais Levatti Alexandre. -- Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientadora: Maria Izabel Maretti Silveira Bueno

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Espalhamento Raman de raios-X. 2. Classificação vegetal . 3. Fluorescência de raios-X. I. Bueno, Maria Izabel Maretti Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: X-ray scattering spectrometry allied to chemometrics in vegetable studies

Palavras-chaves em inglês: Raman X-ray scattering, Vegetable classification, X-ray fluorescence

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Maria Izabel Maretti Silveira Bueno (orientadora), Adriana Vitorino Rossi, Noemí Nagatta

Data de defesa: 05/02/2007

DEDICO ESTE TRABALHO

*Aos meus pais, Gisela e Luiz,
que sempre confiaram em mim,
apoiaram meus sonhos e me deram toda a base e
força para enfrentar os desafios da vida
e sair sempre vitoriosa!*

*Às minhas irmãs, Elisa e Paula,
que me fizeram rir nos momentos tristes
e me “assustaram” nos momentos alegres!*

*Às minhas avós, Elza e Maria Adoinda,
que me criaram moldando a minha personalidade
e me fizeram geniosa, porém persistente!*

*Ao Fábio,
que encheu meus olhos de alegria
quando mais eu precisei!*

*“Tente mover o mundo – o primeiro passo será mover a si mesmo”
(Platão - filósofo grego)*

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Izabel Maretti Silveira Bueno por ter contribuído na elaboração desse projeto e ter sido muito mais que uma orientadora.

Ao Alexandre Antunes e ao André G. de Lima, pela valiosa amizade.

À Claudete H. Bernardes, à Fabíola M. Verbi Pereira, à Gisele G. Bortoleto, à Lidiane Oliveira e à Sandra G. de Moraes pelo apoio, entusiasmo e carinho.

À Karen Goraieb, pela enorme parceria na “Arte e Criação”.

Aos amigos Bob, Camila, Carlos, Chico, Jordan, Jean, Marcos, Mariza pelo apoio e cooperação.

Ao Fábio Fabri, pelo carinho, dedicação e incentivo.

À minha família, por todo o carinho e compreensão.

À CENP, pelo muito necessário suporte financeiro.

Para achar a água é preciso descer terra adentro, encharcar-se no lodo. Mas há os que preferem olhar os céus e esperar pelas chuvas”

Oduvaldo Vianna Filho

Curriculum vitae
Thais Levatti Alexandre

1. Formação Acadêmica

- 1.1. Mestrado em Química - *Universidade Estadual de Campinas*.
Ingresso: agosto / 2004
- 1.2. Licenciatura em Química - *Universidade Estadual de Campinas*.
Ingresso: março / 1999 Egresso: dezembro / 2003
- 1.3. Bacharelado em Química - *Universidade Estadual de Campinas*.
Ingresso: março / 1999 Egresso: dezembro / 2003

2. Produção Científica

2.1. Iniciação científica

“Determinação e lixiviação de metais pesados em peneiras plásticas”
Orientadora: Prof. Dra. Maria Izabel Marette Silveira Bueno.
Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp
Período: 2^o semestre de 2003

2.2. Resumo de trabalhos científicos apresentados em congressos

- 2.2.1.** Alexandre, T.L.; Goraieb, K.; Bueno, M.I.M.S.. *Determination of sweetness degrees of sugars by X-ray spectrometry allied to chemometrics*. In: 10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, Águas de Lindóia/SP – Brazil. 2006. Abstract book: v1, P030. Apresentação na forma de pôster.
- 2.2.2.** Alexandre, T.L.; Goraieb, K.; Bueno M.I.M.S.. *Calibration and classification of sugars using chemometrics tools and X-ray spectrometry*. In: EXRS 2006 – European Conference on X-ray Spectrometry, Paris, 2006. Abstract book v1, p 229. Apresentação na forma de pôster.
- 2.2.3.** Alexandre, T.L.; Bortoleto, G.G.; Borges, S.S.O.; Bueno, MIMS.; Lima, A.G.; Hemerly, F.P.; Goraieb, K.; Morais, S.G.. *Uso do espalhamento da luz síncrotron da linha XRF e quimiometria para a classificação de amostras orgânicas*. In: 16^a Reunião Anual de Usuários LNLS, Campinas, 2006. Livro de resumo v1, p 151. Apresentação na forma de pôster

2.2.4. Alexandre, T.L.; Bueno, M.I.M.S. *Espalhamento de raios-X na classificação taxonômica de plantas*. In: 13º Encontro Nacional de Química Analítica, Niterói/RJ, 2005. Livro de resumos.

Apresentação nas formas oral e pôster

2.2.5. Alexandre, T.L.; Bueno, M.I.M.S.. *Plant Taxonomy by X-ray Scattering*. In: International Conference on Nuclear Analytical Methods in The Life Science. Rio de Janeiro, 2005. Book of Abstracts: p 205.

Apresentação na forma de pôster.

2.3. Publicações

Alexandre, T.L.; Bueno, M.I.M.S.; *Classification of some species, genera and families of plants by X-ray spectrometry*. X-ray Spectrometry, 35: 257-260, 2006.

2.4. Pedido de Depósito de Patente

PI 0601864-5: Método de classificação de vegetais por espectrometria de raios-X.

Inventores: Thais Levatti Alexandre e Maria Izabel Maretti Silveira Bueno.
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Depositado em: 27/01/2006.

3. Experiência Profissional

3.1. Professora de Ensino Médio da disciplina de Química
Local: Escola Estadual “Prof. Israel Schoba”, Vinhedo/SP
Período: desde Janeiro de 2006.

3.2. Professora de Ensino Médio da disciplina de Química
Local: Escola Estadual “Prof. Maria Augusta de Moraes Neves”, São Paulo/SP
Período: fevereiro a dezembro de 2005.

3.3. Estágio Supervisionado no Ensino de Química.
Escola Estadual Culto à Ciência, Campinas/SP
Período: março a dezembro de 2002.

RESUMO

ESPECTROMETRIA DE RAIOS-X ALIADA À QUIMIOMETRIA NO ESTUDO DE VEGETAIS.

O uso da região de espalhamento na espectrometria de raios-X (XRS, do inglês, *X-Ray Spectrometry*) aliada à quimiometria é uma aplicação recente que tem mostrado bons resultados na discriminação de amostras orgânicas. Nesse trabalho, a proposta de se utilizar XRS para solucionar um problema de classificação taxonômica de *Lantana sp*, utilizando-se folhas desse vegetal não foi alcançada devido à reconhecida evolução contínua desta espécie. No entanto, o estudo de espécies do gênero *Musa* e das famílias Polemoniaceae, Asteraceae e Portulacaceae, utilizando-se pseudofrutos e sementes, respectivamente foi bem sucedido. A análise de componentes principais (PCA) realizada com os espectros obtidos da irradiação dos pseudofrutos e das sementes mostrou boa correlação entre a disposição das amostras e a classificação nos níveis gênero, espécie e variedades. Variáveis que poderiam justificar a discriminação obtida desses vegetais foram estudadas como exemplo o estudo envolvendo a utilização de carboidratos. Foram realizadas: a regressão de sacarose, frutose e glicose em solução aquosa e frutose e glicose em suco, com bons coeficientes de linearidade (0,998; 0,995; 0,998; 0,994 e 0,991, respectivamente); a discriminação de carboidratos; a regressão do índice de doçura e a rotação específica da luz polarizada de carboidratos; e a regressão da inversão da sacarose. Além da discriminação dos vegetais e do estudo de carboidratos, esse trabalho também apresenta a fundamentação teórica para explicar o surgimento desta técnica e um provável potencial que ela poderá apresentar para o futuro.

ABSTRACT

X-RAY SPECTROSMETRY ALLIED TO CHEMOMETRICS IN VEGETABLE STUDIES

The use of scattering on X-ray Spectrometry (XRS) allied to chemometrics is a new application that is showing good results in discrimination of organics. In the present work the proposal of applying XRS to solve the taxonomic classification of *Lantana sp* species, using leafs of these plants was not reached due to the evolution process this plant is still undergoing. Nevertheless, this motivated a discrimination study of species of *Musa* genus (banana) and species of Polemoniaceae, Portulacaceae and Asteraceae families, using fruits and seeds, respectively. Principal component analysis of spectra of fruits and seeds show good correlation between sample arrangement and taxonomic classification in genus, species and varieties. Looking for variables that could justify the discriminations obtained, studies were developed involving carbohydrates. It was realized: sucrose, fructose and glucose regression in aqueous solutions and fructose and glucose calibration in juice solutions with good linear coefficients (0.998; 0.995; 0.998; 0.994 e 0.991, respectively); carbohydrates discrimination; X-ray spectra correlation with sweetness degrees and specific rotation of polarized light of carbohydrates; and regression of kinetics of sucrose inversion. Besides the vegetable classifications and the carbohydrate studies, this work presents a theoretical basis to explain the XRS characteristics, the history before the arising of this method and its potentialities for the future.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE FIGURAS	XVIII
I) INTRODUÇÃO	1
I.I) HISTÓRIA DA TAXONOMIA	5
I.II) NÍVEIS DAS CATEGORIAS TAXONÔMICAS	9
I.III) CLASSIFICAÇÃO ATUAL DOS VEGETAIS	10
I.IV) PLANTAS ESTUDADAS	13
I.IV-A) FOLHAS.....	14
I.IV-B) SEMENTES.....	17
I.IV-C) PSEUDOFRUTOS.....	22
I.V) TÉCNICA DE ESPECTROMETRIA DE RAIOS X (XRS)	24
I.VI) CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS.....	31
I.VII) FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS.....	37
I.VII-A) ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	37
I.VII-B) REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRÁTICOS PARCIAIS.	39
I.VII-C) VALIDAÇÃO CRUZADA	41
I.VIII) TITULAÇÃO PELO MÉTODO EYNON LANE	41
I.IX) GRAU DE DOÇURA	44
I.X) POLARIMETRIA	47
II) OBJETIVOS	49
III) EXPERIMENTAL	53
III.I) ANÁLISE POR XRS	55
III.II) TRATAMENTO DE DADOS.....	56
III.III) OBTENÇÃO E PREPARO DAS FOLHAS.....	56
III.IV) OBTENÇÃO E PREPARO DAS SEMENTES.....	57

III.V) OBTENÇÃO E PREPARO DOS PSEUDOFRUTOS.....	57
III.VI) PREPARO DE SOLUÇÕES PARA A REGRESSÃO DE CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES POR XRS E EYNON-LANE	58
III.VI.I) PREPARO DE SOLUÇÕES AQUOSAS	58
III.VI.II) PREPARO DE SOLUÇÃO EM SUCO DE FRUTA.....	59
III.VII) PREPARO DE AMOSTRA PARA REGRESSÃO DE DOÇURA..	60
III.VIII) PREPARO DE AMOSTRAS PARA A ANÁLISE DE CINÉTICA DE INVERSÃO DA SACAROSE	60
IV) RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
IV.I) DISCRIMINAÇÃO DE VARIEDADES DE <i>Lantana sp.</i>	65
IV.II) DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DAS FAMÍLIAS ASTERACEAE, PORTULACACEAE E POLEMONIACEAE	70
IV.III) DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO MUSA	72
IV.IV) REGRESSÃO DE TEOR DE AÇÚCARES EM SOLUÇÃO AQUOSA E EM SUCO	79
IV.IV.I) REGRESSÃO DE SACAROSE, FRUTOSE E GLICOSE EM ÁGUA.....	80
IV.IV.II) REGRESSÃO DE FRUTOSE E GLICOSE EM SUCO	82
IV.V) CINÉTICA DE INVERSÃO DA SACAROSE.....	85
IV.VI) DISCRIMANÇÃO DE AÇÚCARES	86
IV.VII) REGRESSÃO DE DOÇURA E DE ÂNGULO DE ROTAÇÃO ESPECÍFICA DA LUZ POLARIZADA	88
V) CONCLUSÃO	91
VI) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variedades de <i>Musa sp</i> com seus respectivos genomas.....	24
Tabela 2 - Doçura relativa de alguns açúcares em relação a sacarose	46
Tabela 3 - Valores de RMSEV e número de variáveis latentes para as determinações das concentrações de glicose, frutose e sacarose em solução aquosa.	82
Tabela 4: Valores de RMSEV e número de variáveis latentes para as determinações das concentrações de glicose, frutose e sacarose em solução de suco de fruta.	84
Tabela 5 - Medidas da concentração de glicose e frutose pelos métodos Eynon-Lane e XRS aliado à quimiometria.	84
Tabela 6 - RMSEV e número de variáveis latentes para a cinética de inversão da sacarose.	86
Tabela 7 – Valores dos coeficientes de correlação (CC), RMSEV e número de variáveis latentes para as regressões de índice de doçura e ângulo de rotação da luz polarizada (α_D).....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore filogenética.	12
Figura 2 - Fotos de exemplares das espécies (a) <i>Lantana camara</i> , (b) <i>Lantana trifolia</i> e (c) <i>Lantana canescens</i>	15
Figura 3 - Fotos de exemplares das espécies: (a) <i>Zinnia lilliput</i> e (b) <i>Zinnia elegans</i>	18
Figura 4 - Fotos de exemplares das espécies (a) <i>Dahlia pinnata</i> e (b) <i>Tagete patula</i>	18
Figura 5 - Fotos de exemplares das espécies (a) <i>Portulaca grandiflora</i> e (b) <i>Phlox drumondii</i>	21
Figura 6 - Pseudofrutos da espécie <i>Musa sp.</i>	24
Figura 7 - Representação do efeito fotoelétrico.	25
Figura 8 - Esquema das possíveis interações de espalhamento da radiação primária de raios-X com o átomo.	27
Figura 9 - Espectro de fluorescência de raios-X de uma moeda.....	28
Figura 10 - Espectro de fluorescência de raios-X de banana nanica.....	29
Figura 11 - Representação do esquema da dispersão por comprimento de onda, utilizado por Suzuki, Suzuki, Kishimoto, Mizuno e Ohmura, mostrando a variação de ângulo entre o detector e a amostra na obtenção do deslocamento Raman (<i>Raman Shift</i>)	35
Figura 12 - Deslocamento do pico Compton para o berílio nos ângulos 30°, 60°, 80° e 120°.	36
Figura 13 - Estrutura dos carboidratos: (a) glicose, (b) frutose, (c) manitol, (d) sacarose e (e) lactose.	43
Figura 14 - Princípio de Shallenberger e estrutura X - do princípio de Kier.	45
Figura 15 - Reação de inversão da sacarose.....	47

Figura 16 - Celas apropriadas para irradiação em espectrômetro de fluorescência de raios X, a) amostra líquida, b) amostra sólida, c) amostra com espaço reduzido.....	55
Figura 17 – Gráfico de <i>loadings</i> para a região entre 0 e 40,92 keV de <i>Lantanas sp.</i>	66
Figura 18 – Gráfico de <i>scores</i> da região entre 0 e 40,92 keV dos espectros de <i>Lantana sp.</i>	67
Figura 19 – Gráfico de <i>scores</i> da região entre 0 e 16,42 keV dos espectros de <i>Lantanas sp.</i>	68
Figura 20 – Gráfico de <i>scores</i> da região de espalhamento entre 18,00 e 24,00 keV dos espectros de <i>Lantanas sp.</i>	68
Figura 21 – Gráfico de <i>loadings</i> para a região entre 0 e 40,92 keV de sementes.....	70
Figura 22 – Gráfico de <i>scores</i> dos espectros de sementes.....	71
Figura 23 - Gráfico de <i>loadings</i> para a região de 0 à 40,92keV de <i>Musa sp.</i> ..	73
Figura 24 – Espectros sobrepostos de folhas de <i>Lantana sp.</i>	74
Figura 25 – Espectros sobrepostos de pseudofrutos.....	75
Figura 26 - Espectros sobrepostos de sementes.	75
Figura 27 – Gráfico de <i>scores</i> representando a PC1xPC2 da região de espalhamento dos espectros de pseudofrutos do gênero <i>Musa.</i>	76
Figura 28 – Gráfico de <i>scores</i> representando a PC1xPC3 da região de espalhamento dos espectros de pseudofrutos do gênero <i>Musa.</i>	76
Figura 29 - Gráfico de <i>scores</i> tridimensional dos espectros da região de espalhamento de pseudofrutos do gênero <i>Musa.</i>	77
Figura 30 - PLS dos espectros de solução aquosa de sacarose.....	80
Figura 31 - PLS dos espectros de solução aquosa de frutose.	81
Figura 32 - PLS dos espectros de solução aquosa de glicose.	81

Figura 33 - PLS dos espectros de solução de frutose em suco de fruta.	83
Figura 34 - PLS dos espectros de solução de glicose em suco de fruta.	83
Figura 35 – Curva de cinética de inversão da sacarose pelo método polarimétrico.	85
Figura 36 – PLS de cinética de inversão da sacarose por XRS aliada à quimiometria.	86
Figura 37 - Espectros sobrepostos de sacarídeos	87
Figura 38 – Gráfico de <i>scores</i> da análise de componentes principais de espectros de carboidratos.	87
Figura 39 – Correlação entre o índice de doçura e os espectros de FRX de diferentes carboidratos.	88
Figura 40 - Correlação entre o ângulo de rotação específico da luz polarizada e os espectros de FRX de diferentes carboidratos.	89

I) INTRODUÇÃO

“... genetics has so profound a bearing on the problem of the mechanisms of evolution that any evolution theory which disregards the established genetic principles is faulty at its source.”

Theodosius Dobzhansky, 1937

Em conjunção com métodos multivariados de análise, a utilização da região de espalhamento dos espectros obtidos pela técnica de fluorescência de raios-X (XRF, do inglês *X-ray Fluorescence*) ou espectrometria de raios-X (XRS, do inglês, *X-ray Spectrometry*), é uma aplicação recente no uso da análise exploratória de espécies orgânicas (PI0400867-7). Neste trabalho, essa região é utilizada para o estudo de vegetais avaliando, através de uma diversidade de experimentos, o potencial que XRF (ou XRS) pode apresentar para o futuro no estudo de espécies inorgânicas e orgânicas.

Neste trabalho, não se tem o intuito de nomear e classificar vegetais em sistemas biológicos; pretende-se apenas mostrar que a técnica de XRS, usando um equipamento convencional de energia dispersiva (EDXRF, *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*), aliada à quimiometria pode apresentar potencial na diferenciação de plantas. O trabalho foi inicialmente proposto para auxiliar um grupo de taxonomistas, do Instituto de Biologia da UNICAMP, na classificação de um conjunto de plantas de comportamento ambíguo e de difícil classificação sistemática, pertencente ao gênero *Lantana*.

No entanto, a dificuldade encontrada na discriminação das plantas fornecidas pelo Instituto de Biologia da UNICAMP direcionou o projeto para o estudo de vegetais de nível taxonômico inferior e superior, avaliando-se, com as frutas, espécies e variedades de *Musa sp* (banana) e, com sementes de flores, as famílias Asteraceae, Polemoniaceae e Portulacaceae. A mudança no rumo do projeto trouxe descobertas interessantes para futuros estudos utilizando a região de espalhamento: foi notada uma relação entre a disposição das amostras na análise de componentes principais e a concentração de açúcares nos pseudofrutos, proporcionando o estudo de algumas propriedades de carboidratos.

O conhecimento da história da sistemática vegetal mostra não só a importância e a dificuldade que essa “ciência” apresenta, mas também como o método de classificação se desenvolveu, justificando o caminho tomado pelos taxônomos em desenvolvimento da sistemática vegetal (itens I.I, I.II e I.III).

As plantas estudadas durante o trabalho e suas características, sendo esta última relacionada a algumas das dificuldades no estudo, são apresentadas no item I.IV. A técnica de espectrometria de raios-X, sua história, descoberta e inovações são apresentadas no item I.V. Os fundamentos teóricos que explicam o espalhamento Raman de raios-X são apresentados no tópico I.VI e os fundamentos das análises quimiométricas para o estudo realizado, são apresentados no tópico I.VII.

Os métodos de Eynon-Lane e Polarimetria foram utilizados na obtenção de resultados comparativos para a calibração no estudo de carboidratos, e por isso, seus fundamentos podem ser encontrados nos itens I.VIII e I.X.

Verificando que é possível monitorar a conversão de sacarose em frutose e glicose através de XRS, foi feita a proposta de relacionar um parâmetro dependente diretamente das estruturas de alguns carboidratos. Assim, um estudo com o grau de doçura de açúcares foi realizado, correlacionando seus valores tabelados na literatura e obtidos através de testes sensoriais, com espectros de XRS. Constatou-se que estes valores estão diretamente correlacionados às estruturas dos açúcares e, portanto, como é baseado em análises sensoriais, às propriedades das papilas gustativas (item I.IX).

I.I) HISTÓRIA DA TAXONOMIA ^[1 - 3].

O alvo da nomenclatura biológica é indicar um único nome para cada espécie existente, permitindo assim uma comunicação fácil e efetiva sobre os organismos, ao identificá-los.

Nós humanos e nossos ancestrais sempre estivemos em contato com a identificação de plantas: herbívoros precisavam organizar plantas de acordo com a adequação alimentar, principalmente em comestíveis e venenosos. Plantas medicinais precisavam ser nomeadas e organizadas da mesma forma. Como as civilizações se desenvolveram na Ásia, no Oriente Médio, e nas Américas, cada uma dessas sociedades desenvolveu seu próprio sistema de nomenclatura, muitos dos quais foram bastante elaborados.

Embora as classificações recentes de plantas tenham sido preparadas na China antiga e no império Asteca no México e América Central, nosso moderno tratamento tem origem na Grécia antiga. Theophrastus, um discípulo de Platão e Aristóteles, escreveu extensivamente sobre plantas a cerca de 300 a.C., estabelecendo muitos conceitos importantes. Dentre estes estudos, Theophrastus sistematizou a distinção entre plantas com flores e plantas sem flores, reconheceu os órgãos sexuais das plantas e verificou que os frutos são desenvolvidos nos carpelos. Ele também descreveu mais de 500 espécies de plantas, criando os gêneros conhecidos como *Asparagus*, *Narcissus*, e *Daucus*.

Plinius, o ancião (Caius Plinius Secundus; d.C. 23-79), um advogado e historiador romano, escreveu sobre um grande número de assuntos. Seu maior trabalho, *História Natural*, foi uma tentativa de descrever “tudo” no mundo e apesar de ter incluído muitas criaturas baseadas em contos populares, ele serviu como única base de informação para estudos científicos relacionados, por mais de 1000 anos.

O livro mais importante sobre classificação de plantas do mundo antigo é *Materia Medica*, de Dioscorides. Escrito no primeiro século d.C., descreve 600 espécies de plantas e suas aplicações no tratamento de doenças.

Entre Dioscorides e a Renascença, quase nenhum trabalho de grande valor para a história natural foi escrito. No entanto, mudanças começaram a ocorrer no século XV e a Europa entrava na era das explorações. Navios eram enviados em expedições por toda a costa oeste da África e os exploradores retornavam com novas plantas e animais, além do conhecimento sobre as novas terras e seus povos. Simultaneamente, a exploração da física, da astronomia e geologia se iniciava.

Um importante resultado dessas explorações foi a descoberta que Plinius e outras autoridades antigas haviam errado em muitos aspectos. Até então, as pessoas aceitavam a idéia de que os antigos gregos e romanos representavam os “Anos Dourados” e eram basicamente infalíveis; qualquer observação que contradissesse Plinius era considerada “um erro da parte do observador”. A constatação de que os antigos eram de fato falíveis sinalizou que as respostas das questões sobre o mundo precisavam ser buscadas e que não se encontravam nos livros antigos, mas sim, num mundo desconhecido. A exploração - não somente geográfica, mas também, científica, filosófica e religiosa - tornou-se uma obsessão.

Na botânica, estes novos pensamentos independentes tornaram-se aparentes nas publicações de livros sobre plantas medicinais, chamadas de “livros de herbologia”, os quais eram publicados em grande quantidade. No meio do século XVI, estes documentos começaram a apresentar um conteúdo mais elaborado, com descrição precisa das plantas baseadas nas observações destas, e não no que fora descrito em *Materia Medica*. A maior parte dos

livros de herbologia continha cerca de 1000 plantas, uma quantidade razoável para um botânico se familiarizar.

A exploração teve continuidade, principalmente após a descoberta das Américas. O número de espécies de plantas tornou-se muito grande para os botânicos acompanharem. Mais que listar ou descrever todas as plantas do novo mundo, era necessário desenvolver um sistema de classificação para que as pessoas pudessem identificar uma espécie familiar e encontrá-la em livros de herbologia mais abrangentes.

Várias idéias se desenvolveram neste período; uma destas foi o conceito de gênero, como um grupo de espécies familiares, estabelecido por Gaspard Bauhin (1560-1624). Embora devesse parecer óbvio esse fundamento, foi extremamente inovador para a época. O conceito de espécie havia sido fácil: *acreditava-se que Deus havia criado todos os tipos de criaturas e que o fato de haver mais de milhões de espécies de grama com a mesma função, era apenas um fato que mostrava a forma de Deus pensar.*

O sistema de classificação com nomes científicos pode ser atribuído a Carolus Linnaeus, (Karl von Linné), um professor de história natural da Universidade de Uppsala (Suécia) durante meados do século XIX.

O número de espécies conhecidas na época de Linné era extremamente grande, até mesmo para uma única pessoa se familiarizar com metade delas. Um sistema eficiente de classificação e nomenclatura se tornou desesperadamente necessário e Linné tentou contornar esse problema. Ele criou um sistema padronizado, onde todas as espécies teriam um nome relativo ao gênero e um relativo à espécie, que seria a base de seu sistema binomial de nomenclatura.

O sistema de Linné era fácil de ser utilizado: ele decidiu que o número de estames e carpelos das flores seria a característica mais importante das

espécies; então, sua classificação era baseada nesta característica. No entanto, este sistema era completamente artificial, pois o fato das plantas compartilharem o mesmo número de estames não significa que elas se assemelham umas às outras.

A idéia de evolução das espécies foi desenvolvida lentamente ao longo de muitos anos e grande parte das teorias que foram criadas eram absurdas. Infelizmente, neste período, J. B. P. de Lamarck apresentou sua teoria da evolução pela herança das características adquiridas. A teoria de Lamarck era baseada na idéia incorreta de que as células do corpo produziam fluidos, que eram difundidos pelos órgãos sexuais, onde se concentravam e formavam o esperma e o óvulo. Portanto, segundo Lamarck, qualquer característica adquirida poderia passar para as futuras gerações. A teoria da herança adquirida nunca foi totalmente aceita.

Em 1859, Charles Darwin e Alfred Wallace propuseram independentemente uma teoria de evolução de acordo com a seleção natural, tornando real a idéia de sistemas naturais de classificação.

Taxonomistas rapidamente compreenderam o porquê de algumas espécies se assemelharem umas às outras tão fortemente que era preciso agrupá-las em um gênero: elas eram muito próximas evolutivamente. A partir deste ponto, muito esforço tem sido feito para se construir um sistema de classificação natural.

A teoria da evolução através da seleção natural se tornou aceita e muitas propostas foram feitas para a criação de um sistema. C.E. Bessey (1900), da Universidade de Nebraska, foi um dos pioneiros na reclassificação das espécies de plantas baseada em um sistema filogenético.

Com a descoberta da evolução através da seleção natural, a base para nomeação das plantas foi alterada: A seleção natural mostrou que todos os

organismos estão relacionados geneticamente, alguns mais próximos, outros mais distantes uns dos outros.

No final do século XIX, os taxonomistas perceberam que o sistema de nomeação mais válido cientificamente seria aquele que refletisse as relações evolucionárias. Por isso, adotaram dois alvos:

- o desenvolvimento de um sistema de classificação, no qual os organismos mais próximos seriam classificados juntos, e
- a atribuição de nomes às plantas com base nesta relação evolucionária.

A nomenclatura deveria refletir o sistema natural de classificação. Desta forma, se estabeleceu que a classificação fosse dividida em níveis. Neste sistema, os organismos mais próximos seriam relatados como espécies em comum e classificados em um gênero. Dentro dos gêneros, os próximos entre si seriam agrupados de acordo com suas semelhanças em um grupo de mesma família, e assim por diante.

I.II) NÍVEIS DAS CATEGORIAS TAXONÔMICAS ^[1 e 4]

A sistemática de classificação taxonômica é centralizada e ligada diretamente ao estudo da evolução em geral, desde o estudo dos fósseis, até o estudo das variações genéticas em uma população local. As características das plantas refletem essa relação. As plantas possuem vários graus de relação e um sistema de classificação reflete isso no número de níveis.

O nível mais fundamental na classificação são as espécies, que, teórica e idealmente, é o conjunto de indivíduos próximos relacionados a um descendente de um ancestral em comum. Espécies próximas são agrupadas

dentro de um gênero, mas não existe critério específico para decidir o nível de proximidade para se agrupar em um gênero; a decisão é subjetiva e frequentemente sujeita a grande argumentação entre os taxônomos.

O nível após o gênero é a família; cada família deve ser composta de um ou vários gêneros. A maioria das famílias é bem definida, com difundidos critérios entre espécies e gêneros. Os níveis a seguir são: ordem; classe; divisão; e reino.

Os sistemas de classificação vegetal mais utilizados atualmente são os propostos por: H. Bold, C. Alexopoulos, e T. Delevoryas.

O nome científico das espécies é designado pelo gênero e espécie, nomes em latim, que devem ser usados juntos: o primeiro nome (gênero) inicia-se em maiúsculo e o segundo (espécie), em minúsculo. Ambos os nomes devem estar sublinhados ou em itálico.

I.III) CLASSIFICAÇÃO ATUAL DOS VEGETAIS [1, 4 e 5]

Em muitos casos, esses sistemas parecem ser relativamente simples, afinal é fácil visualmente distinguir um cacto de um girassol, mas se torna fácil apenas em exemplos extremos como estes. Na maioria das vezes, é um pouco mais complicado. A evolução dos organismos não é linear e, por isso, muitas características estabelecidas pela organização em espécie, gênero, família, etc., entram em conflito. Uma planta com algumas características que a colocaria em um gênero pode apresentar características que apenas plantas de outro gênero possuem. É o caso das *Lantanas*, que foram alvo de estudos nesse trabalho. Os problemas das características inconsistentes ou conflitantes ocorrem em todos os níveis do sistema de classificação.

Iniciada a 400 milhões de anos atrás, uma série longa de mutações e seleção natural tornou possível a ascensão do sistema vascular das plantas do solo. Assim, a linha evolucionária tem progredido e se diversificado, ramificando cada vez mais. Milhões de organismos tornaram-se extintos durante esse percurso e só são conhecidos hoje por causa da história gravada em fósseis.

O alvo da taxonomia moderna é compreender cada uma das linhas evolutivas e obter a classificação que reflete a relação entre os membros desta. Embora a diversificação evolutiva seja uma realidade, o sistema de classificação é uma hipótese, um modelo que tende a atender o mapa da evolução. Nosso conhecimento é incompleto e imperfeito, e o sistema de classificação atual é apenas uma aproximação. Não se esperam mudanças bruscas nesse sistema, mas pequenas mudanças feitas periodicamente com a finalidade de atualização.

O sistema de classificação atual engloba:

- o sistema de nomeação de Linné;
- o sistema filogenético (baseado nas relações genéticas entre os indivíduos);
- as semelhanças visuais e adaptativas (paralelismos não genéticos);
- informações citogenéticas, que têm contribuído de forma complementar ou mesmo na reformulação de hipóteses filogenéticas, ambientais ou fisiológicas.

A importância de se apresentar tanto as características genéticas, como os paralelismos não genéticos, pode ser avaliado quando estudamos casos como o apresentado na Figura 1. Nesta figura, uma árvore filogenética, os organismos A, B, C, D, E, F e G apresentam um ancestral em comum do período Mioceno (período entre 23 e 5,3 milhões de anos atrás).

Podem-se fazer as seguintes suposições relativas à Figura 1: A é uma planta de cerrado, B, C e D são plantas encontradas em uma floresta, e E, F e G são plantas encontradas no meio aquático; cada uma delas adaptadas ao sistema em questão. Agora, para contrapor a necessidade das características genéticas e dos paralelismos não genéticos, serão consideradas duas hipóteses apresentadas pelos casos 1 e 2.

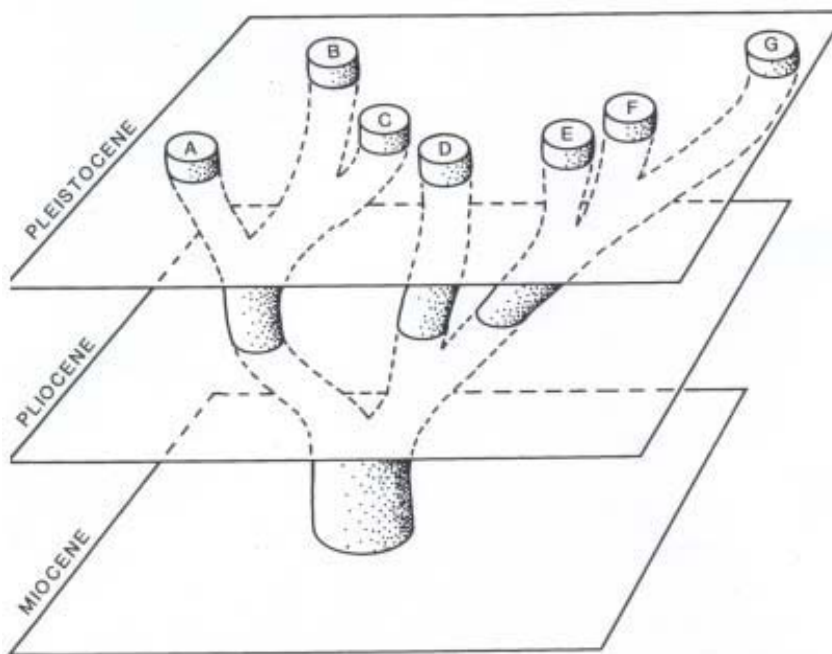


Figura 1 - Árvore filogenética ^[5].

- **Caso 1:** Suponha-se que a planta D apresente uma substância com alta eficiência no combate a células carcinogênicas; no entanto, mudanças bruscas de temperatura e exploração predatória da floresta provocaram a quase extinção dessa planta, que não encontra um ambiente propício para reprodução.

Desta forma, um grupo de pesquisadores, na esperança de encontrar plantas semelhantes a esta que se adaptaram melhor a este meio, descobrem B

e C, que, apesar da semelhança, não apresentam a substância desejada. Por outro lado, se este grupo tivesse procurado por plantas geneticamente semelhantes, verificar-se-ia que no meio aquático há três plantas: E, F e G, que, por ter um ancestral em comum a D, poderiam ter a capacidade de produzir a substância para o combate a células carcinogênicas.

- **Caso 2:** Agora suponha-se que D tenha começado a produzir a substância desejada, devido ao meio físico que esta se encontra. Por acaso, a substância desejada é uma evolução adaptativa para afastar um predador desta planta. O mesmo ocorre com B e C; no entanto, se esta situação fosse analisada apenas pela proximidade genética, não seria possível localizar a substância nos parentes próximos a D.

Esse exemplo mostra a dificuldade de se fazer um estudo taxonômico, quando se tem diversas variáveis no sistema, como meio-ambiente, semelhança genética, evolução contínua ocorrendo, etc.

Desta forma, o desenvolvimento de métodos que possam auxiliar os taxônomos a compreender a sistemática de classificação é muito importante, e, para isso, a técnica de espectrometria de raios-X aliada a quimiometria é proposta neste trabalho para auxiliar o estudo de classificação vegetal, através da discriminação utilizando a ferramenta quimiométrica Análise de Componentes Principais (PCA, *Principal Component Analysis*).

I.IV) PLANTAS ESTUDADAS

Foram utilizados três tipos de amostras vegetais: A) Folhas, B) sementes e C) Pseudofrutos.

I.IV-A) FOLHAS

As folhas estudadas fazem parte do gênero *Lantana*, pertencente a família Verbenaceae. A classificação do Reino Plantae para as espécies analisadas pode ser observada a seguir:

Reino: Plantae (Plantas)

Sub-reino: Tracheobionta (plantas vasculares)

Super-Divisão: Spermatophyta (plantas com sementes)

Divisão: Magnoliophyta (plantas com flores)

Classe: Magnoliopsida (dicotiledônea)

Sub-classe: Asteridae

Ordem: Lamiales

Família: Verbenaceae

Gênero: *Lantana*

Espécie: *L.camara*.

L.canescens.

L.trifolia.^[6]

A família Verbenaceae é caracterizada por apresentar gêneros morfológicamente muito semelhantes, apresentando diversos problemas taxonômicos para a delimitação dos gêneros e espécies, como é o caso dos gêneros *Lippia*, *Aloysia* e *Lantana*. Nesta família, em algumas espécies, como nas variedades de *Aloysia virgata* e *Lantana camara*^[7] também são observadas origens diplóides (onde os cromossomos se organizam em pares de cromossomos semelhantes, possuindo **2n** cromossomos) e poliplóides (onde os cromossomos se organizam em 3 ou mais cromossomos semelhantes, **3n**

cromossomos semelhantes, triplóides; $4n$ cromossomos semelhantes, tetraplóides, etc).

O gênero *Lantana*, descrito por Linné em 1753 [8 e 9], possui mais de 50 espécies, e, dentro de cada espécie, existe um número grande de variedades (*taxa* ou *taxon*), como, por exemplo, a *Lantana camara*, que chega a apresentar mais de 600 variedades. [10] As plantas do gênero *Lantana* são conhecidas no Brasil, com os seguintes nomes populares: cambará, camará, camarázinho, chumbinho, mata-boi, bem-me-quer, mal-me-quer, camará-de-cheiro, cambará-miúdo, mata-pasto, milho-de-grilo, entre muitos outros nomes. Esse gênero é de origem das regiões tropicais e sub-tropicais da América Central e América do Sul, é arbustiva, de flores coloridas (Figura 2), florescendo na maior parte do ano.

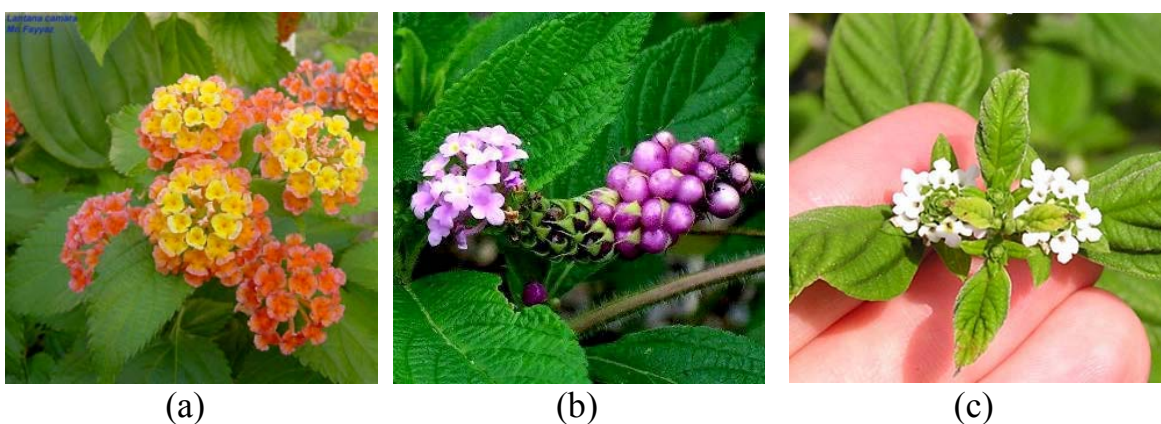


Figura 2 - Fotos de exemplares das espécies (a) *Lantana camara* [11], (b) *Lantana trifolia* [12] e (c) *Lantana canescens* [13].

O gênero *Lantana* se destaca por apresentar espécies com diversas propriedades anti-reumáticas, estimulantes, febrífugas, sudoríferas e contra afecções estomacais e bronco-pulmonares. Existem relatos da utilização de algumas espécies no controle biológico e como repelente de insetos, além do

uso terapêutico, contra doenças como câncer, malária e úlcera. Possui ainda espécies com propriedades tóxicas e a maioria delas é utilizada com fins ornamentais. ^[14 e 15]

As espécies de *Lantana* com variedades (taxa) tóxicas apresentam concentrações de Lantadenos A e B letais, nas doses de 20 a 40 g por kg de folhas para bovinos e ovinos. Mas, provoca adoecimento grave nas doses entre 2,5 a 10 g por kg de folhas, podendo levar esses animais à morte nos pastos em época de estiagem, quando o animal procura reservas alternativas de alimento. ^[9 e 16]

Por apresentar propriedades medicinais e pesticidas, o gênero *Lantana* é alvo de intensa pesquisa, mas a espécie mais estudada dentro desse gênero é a *L. camara*, considerada uma das 100 piores pragas do mundo ^[10]. Essa espécie é uma planta invasora e daninha, que vegeta espontaneamente em local não comum ou não desejado, com controle biológico elevado na Europa e, principalmente, na Austrália, que teve grandes áreas infestadas por esse vegetal, tornando-as improdutíveis ^[9, 17, 18].

Algumas espécies do gênero *Lantana* apresentam propriedades alelopáticas, ou seja, são capazes de interagir bioquimicamente com todos os tipos de plantas e microorganismos, podendo inibir e estimular interações químicas, manipulando ecossistemas inteiros, principalmente em regiões onde não há predadores naturais. Isso é possível mediante a produção de substâncias que são liberadas no ambiente durante o ciclo de vida do vegetal. As propriedades alelopáticas de algumas *Lantanas* as tornam pragas em potencial em regiões onde não há predadores naturais, podendo devastar a vegetação natural de grandes regiões, como acontece na Austrália. ^[11, 18 à 21]

O estudo para biocontrole nas áreas que foram invadidas é contínuo, devido à diversidade genética. Isso ocorre principalmente com a espécie

camara, que apresenta variedades hortícolas invasoras, promovendo cruzamento com outras pragas e também com outras espécies dentro do gênero *Lantana*, resultando numa espécie complexa. [21 e 22]

Como agravante, existem espécies que apresentam variedades com grande diversidade do número de cromossomos em seu material genético. A análise das células mitóticas da *L. camara*, por exemplo, mostra resultados muito diferentes em vários estudos realizados, apresentando: $2n = 22, 33, 55, 44$ ou 56 cromossomos metacêntricos. [7 e 13] Esse pode ser o problema que tem provocado tanta resistência no biocontrole dessa espécie e no estudo de sua classificação taxonômica.

As folhas de *L. camara*, *L. canescens* e *L. trifolia* foram utilizadas para o estudo de espécies de plantas. A importância do estudo desse vegetal está nas classificações conflitantes e inconsistentes, principalmente em variedades de *L. camara*, que é alvo de estudo dos pesquisadores do Instituto de Biologia da UNICAMP, no acompanhamento de sua evolução populacional [7].

I.IV-B) SEMENTES [23]

No estudo do nível taxonômico relativo à família, foram utilizadas sementes de plantas ornamentais.

Da família Asteraceae, foram utilizados os seguintes gêneros: *Zinnia*, *Dahlia* e *Tagete*, das espécies: *Z. lilliput*, *Z. elegans*, *D. pinnata*, e *T. patula*. As flores dessas plantas podem ser observadas nas Figura 3 (a e b) e 4.



(a)



(b)

Figura 3 - Fotos de exemplares das espécies: (a) *Zinnia lilliput* ^[24] e (b) *Zinnia elegans* ^[25].



(a)



(b)

Figura 4 - Fotos de exemplares das espécies (a) *Dahlia pinnata* ^[6] e (b) *Tagete patula* ^[26].

As plantas *Zinnia lilliput* e *Zinnia elegans* são espécies conhecidas popularmente como zínia, capitão, moça-e-velha, capela-de-velho entre outras. É uma angiosperma originária do México, de caule ereto, folhagem áspera e flores pequenas, reunidas em capítulos grandes de várias cores e formas. É cultivada para fins de ornamentação, por ser bela e de grande durabilidade. Multiplica-se por sementes, que podem ser semeadas durante o ano todo, principalmente na primavera e verão. Sua classificação está representada abaixo.

Reino: Plantae (Plantas)

Sub-reino: Tracheobionta (plantas vasculares)

Super-Divisão: Spermatophyta (plantas com sementes)

Divisão: Magnoliophyta (plantas com flores)

Classe: Magnoliopsida (dicotiledônea)

Sub-classe: Asteridae

Ordem: Asterales

Família: Asteraceae

Gênero: *Zinnia*

Espécie: *Z. lilliput*

Z. elegans

A *Dahlia pinnata*, conhecida pelo nome dália, é de origem mexicana, semi-herbácea tuberosa. As flores formam capítulos pequenos ou grandes, de diversas cores. Florescem no verão e sua propagação se faz por estaquia dos ramos, ou divisão de suas raízes tuberculosas. Sua classificação segue abaixo.

Reino: Plantae (Plantas)

Sub-reino: Tracheobionta (plantas vasculares)

Super-Divisão: Spermatophyta (plantas com sementes)

Divisão: Magnoliophyta (plantas com flores)

Classe: Magnoliopsida (dicotiledônea)

Sub-classe: Asteridae

Ordem: Asterales

Família: Asteraceae

Gênero: *Dahlia*

Espécies: *D. pinnata*.

A *Tagete patula*, conhecida popularmente pelo nome de cravo, cravo-de-defunto, botões-de-solteirão, rosa-da-índia, marigold entre outros, é de origem mexicana, ornamental. Costuma ser utilizada como pesticida por espantar formigas, pulgões e ser nematicida. Esta planta floresce principalmente na primavera e no verão. Sua propagação ocorre por sementes. A classificação desta espécie é descrita a seguir.

Reino: Plantae (Plantas)

Sub-reino: Tracheobionta (plantas vasculares)

Super-Divisão: Spermatophyta (plantas com sementes)

Divisão: Magnoliophyta (plantas com flores)

Classe: Magnoliopsida (dicotiledônea)

Sub-classe: Asteridae

Ordem: Asterales

Família: Asteraceae

Gênero: Tagetes

Espécie: *T.patula*.

Da família Portulacaceae, foram utilizadas duas variedades da espécie *Portulaca grandiflora*, (Figura 5 a), planta conhecida popularmente pelos nomes: onze-horas, verdolaga de flor, flor de seda, entre outras; e é originária da Argentina e do Brasil. É rasteira, floresce nos períodos mais quentes do ano. Sua multiplicação ocorre por sementes.

A classificação da espécie *Portulaca grandiflora*, a partir do reino Plantae, é descrito a seguir.

Reino: Plantae (Plantas)

Sub-reino: Tracheobionta (plantas vasculares)

Super-Divisão: Spermatophyta (plantas com sementes)

Divisão: Magnoliophyta (plantas com flores)

Classe: Magnoliopsida (dicotiledônea)

Sub-classe: Caryophyllidae

Ordem: Caryophyllidae

Família: Portulacaceae

Gênero: *Portulaca*

Espécie: *P.grandiflora*.



(a)



(b)

Figura 5 - Fotos de exemplares das espécies (a) *Portulaca grandiflora*^[27] e (b) *Phlox drummondii*.^[28]

Da família Polemoniaceae, foram utilizadas duas variedades de *Phlox drummondii* (Figura 5 b). Sua A *Phlox drummondii*, conhecida pelo nome popular de filó, é originária dos Estados Unidos da América, tem flores pequenas tubulares com 5 pétalas, florescendo o ano todo. Sua propagação ocorre por sementes. Um esquema de sua classificação é apresentado a seguir.

Reino: Plantae (Plantas)

Sub-reino: Tracheobionta (plantas vasculares)

Super-Divisão: Spermatophyta (plantas com sementes)

Divisão: Magnoliophyta (plantas com flores)

Classe: Magnoliopsida (dicotiledônea)

Sub-classe: Asteridae

Ordem: Solanales

Família: Polemoniaceae

Gênero: *Phlox*

Espécie: *P. drummondii*

I.IV-C) PSEUDOFRUTOS ^[29]

A banana é um termo vulgar para denominar a pseudobaga da bananeira, ou seja, um tipo de pseudofruto que se encontra em plantas com ovário ínfero. Sua classificação é apresentada a seguir.

Reino: Plantae (Plantas)

Sub-reino: Tracheobionta (plantas vasculares)

Super-Divisão: Spermatophyta (plantas com sementes)

Divisão: Magnoliophyta (plantas com flores)

Classe: Liliopsida (Monocotiledônea)

Sub-classe: Zingiberidae

Ordem: Zingiberales

Família: Musaceae

Gênero: *Musa*

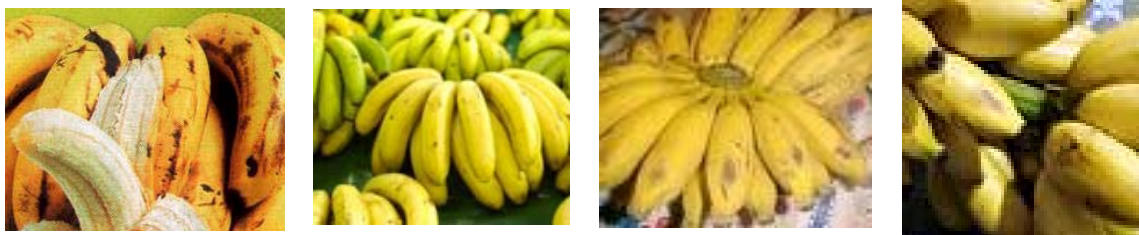
Espécies: *Musa sp.*

O gênero *Musa* é dividido em seções, e cada uma inclui tipos que produzem e que não produzem sementes. Dentre as seções mais importantes, podemos citar as *Callimusa* e *Australimusa*, que apresentam número de cromossomos igual a 10 ($2n = 20$) e as seções *Eumusa* e *Rhodochliamys*, que apresentam número de cromossomos igual a 11 ($2n = 22$). A maior parte das bananas cultivadas (ou *cultivars*) provém do grupo *Eumusa*. Esta é a maior seção do gênero e também a de origem mais difundida geograficamente, com espécies encontradas do sul da Ásia e Índia até as ilhas do Pacífico. A maior parte das espécies cultivadas para consumo provém especificamente de duas espécies: *Musa acuminata* (genoma A) e *Musa balbisiana* (genoma B).

O pseudofruto de *M. acuminata* diplóide (AA) é formado sem fecundação prévia (paternocárpico), e por isso, depende do ser humano para que haja a sua disseminação. As bananeiras triplóides (AAA), também cultivadas, provêm do cruzamento entre as plantas diplóides e subespécies silvestres. Seu fruto é maior e mais calórico.

Em regiões de cultivo de *M. balbisiana*, também houve cruzamentos intencionais com *M. acuminata*, formando híbridos diplóides e triplóides, (AB, AAB e ABB), cultiváveis. Os pseudofrutos de *M. balbisiana* são mais secos e mais resistentes a pragas, tais características são freqüentemente encontradas em tipos cultiváveis com o genoma B. Essa hibridização pode ter provocado um crescimento abrangente das variedades cultivadas com o genoma B. Conseqüentemente, uma diversificada seleção de *Musa* cultivável tem se espalhado nas últimas décadas.

Os “frutos” utilizados (Figura 6) nesse trabalho pertencem à seção *Eumusa* e a espécie a que pertencem estão apresentadas na Tabela 1.



Banana maçã

Banana nanica

Banana prata

Banana ouro

Figura 6 - Pseudofrutos da espécie *Musa sp.*

Tabela 1 - Variedades de *Musa sp* com seus respectivos genomas

Nome popular		Espécie	Genoma
Português	Inglês		
Banana ouro	Sugar banana	<i>Musa acuminata</i>	AA
Banana Prata	Lady's finger banana	<i>Musa acuminata x balbisiana</i>	AB
Banana nanica	Dwarf banana	<i>Musa acuminata</i>	AAA
Banana maçã	Silk banana	<i>Musa acuminata x balbisiana</i>	AAB

No item I.V, são apresentados os fundamentos da técnica de espectrometria de raios-X utilizadas no método para classificar os vegetais.

I.V) TÉCNICA DE ESPECTROMETRIA DE RAIOS X (XRS)

A Fluorescência de Raios-X (FRX) por Dispersão de Energia (EDXRF) é uma variante das técnicas de espectrometria de raios-X e é comumente usada para a determinação de espécies inorgânicas, como por exemplo, metais pesados em cogumelos selvagens comestíveis ^[30], cobre adsorvido em carvão ativo ^[31], elementos de terra rara ^[32], traços de metais em células naturais de

plâncton ^[33], metais em madeira ^[34], em besouros ^[35], em tecidos humanos ^[36] e em artefatos pré-históricos ^[37], dentre muitas outras determinações.

A base da técnica de FRX está na emissão de raios-X característicos produzidos pelo fenômeno fotoelétrico. A radiação eletromagnética incidente interage com a amostra, podendo ocorrer absorção, emissão e espalhamento de radiação eletromagnética ^[38].

Quando os elétrons da camada mais interna do átomo (por exemplo, K e L) interagem com fótons com energia na região dos raios-X, pode ocorrer a fotoejeção desses elétrons, criando-se uma vacância. Para promover a estabilidade, ocorre imediatamente o preenchimento das vagas eletrônicas por elétrons das camadas mais próximas (Figura 7). Como resultado, há um excesso de energia no processo, que é manifestado na forma de emissão de raios-X característicos de cada átomo presente na amostra. Estas emissões características ocorrem em energias definidas para cada elemento e são denominadas linhas $K\alpha$, $K\beta$, $L\alpha$, $L\beta$, etc. ^[39]

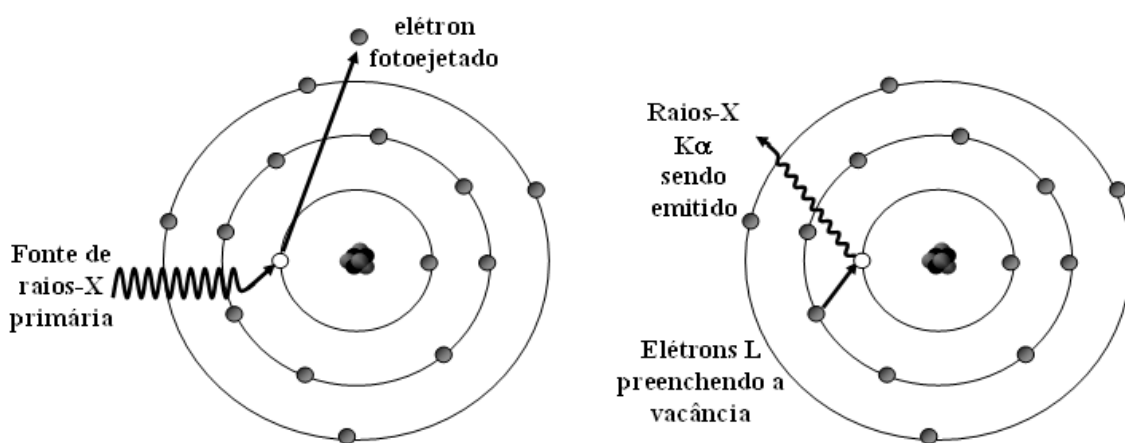


Figura 7 - Representação do efeito fotoelétrico.

O espectrômetro de energia dispersiva consiste basicamente de uma fonte de raios-X primária (geralmente tubo de raios-X de ródio, prata, molibdênio, tungstênio, etc.) e do detector semicondutor, geralmente Si(Li). O semicondutor tem a característica de detectar raios-X com valores de energia entre 1 a 40 keV. Ele é posicionado a 90° (fonte-amostra-detector) e está ligado a um analisador multicanal ^[39]. Os elementos presentes na amostra passíveis de sofrer efeito fotoelétrico são detectados, fornecendo seus respectivos sinais de energia $K\alpha$, $K\beta$, $L\alpha$, $L\beta$, etc.

No entanto, dependendo da amostra e do valor de energia, nem toda a energia incidente é utilizada para fotoejetar elétrons. A interação da energia com a matéria provocará efeitos como: o efeito Rayleigh (coerente), o efeito Compton (incoerente), observado no espectro de raios-X, e o efeito Raman, que não é observado nos espectros de raios-X, obtidos nesse trabalho, fato que será explicado a seguir.

Efeito Rayleigh

O efeito Rayleigh ocorre quando parte da energia incidente da fonte primária de raios-X atravessa o meio sem sofrer qualquer interação sendo espalhada elasticamente (Figura 8) ^[40]. O valor do pico máximo de energia observado no espectro de raios-X para esse efeito será o mesmo valor de energia das linhas $K\alpha$ e $K\beta$ do elemento utilizado na fonte de raios-X. No caso, o elemento ródio (Rh), cujas linhas $K\alpha$ e $K\beta$ são, respectivamente, 20,170 keV e 22,725 keV.

Efeito Compton

O efeito Compton (Figura 8), observado por Arthur Compton em 1929, ^[41] é associado com o espalhamento inelástico acompanhado pela excitação

dos elétrons da camada de valência, ocorrendo perda de energia da fonte de raios-X. [40, 42 e 43]

Efeito Raman

O efeito Raman é causado pelo espalhamento inelástico acompanhado pela ionização dos elétrons-K. A banda Raman apresenta o formato similar ao espectro de absorção da camada K do material. [42 e 44]

O efeito Raman não é observado nos espectros obtidos por fluorescência de raios-X de energia dispersiva (ângulo de 90°) porque o pico Compton sobrepõe completamente a banda Raman. No entanto, esse efeito é o responsável pela maior parte das informações relativas à matriz.

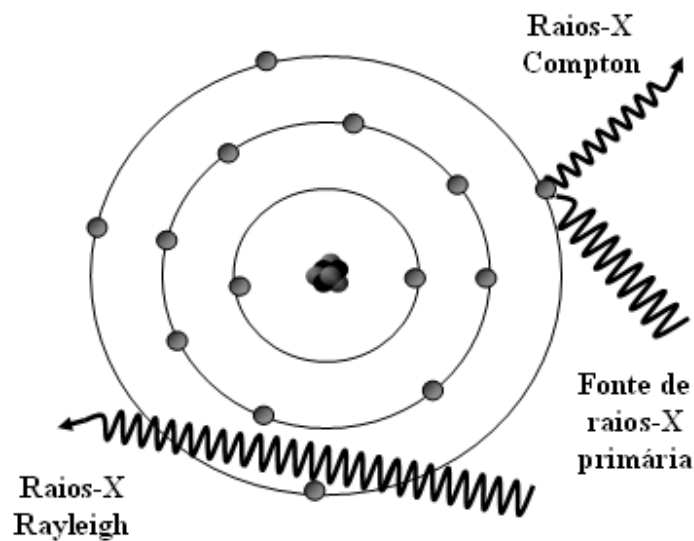


Figura 8 - Esquema das possíveis interações de espalhamento da radiação primária de raios-X com o átomo.

Para amostras com valores de número atômico superior a 20 ($Z > 20$), quando os coeficientes de absorção de raios-X são apreciáveis, como metais, por exemplo, a radiação é muito pouco espalhada, sendo este fenômeno quase

imperceptível (Figura 9). Quando a matriz da amostra é leve (caso de amostras orgânicas, cujos elementos carbono, hidrogênio e oxigênio constituem a maior parte de sua composição), o meio passa a interagir de forma diferenciada com a radiação incidente, ocorrendo um significativo aumento da intensidade do espalhamento da fonte primária de raios-X (Figura 10).

Essa região de espalhamento tem sido, por muitos anos, considerada indesejável pelos analistas por não apresentar, aparentemente, nenhuma informação de interesse. Desta forma, esta região é frequentemente descartada ou utilizada para a correção de matriz, em muitas das vezes de forma não adequada, pois ligeiras alterações na matriz induzem variações consideráveis nas emissões características dos elementos ^[39].

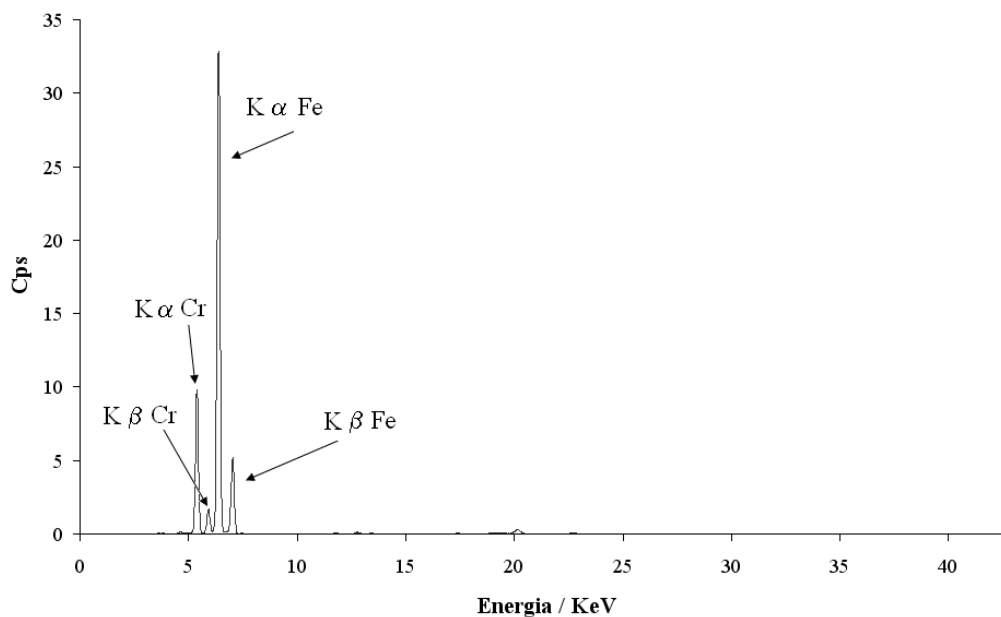


Figura 9 - Espectro de fluorescência de raios-X de uma moeda.

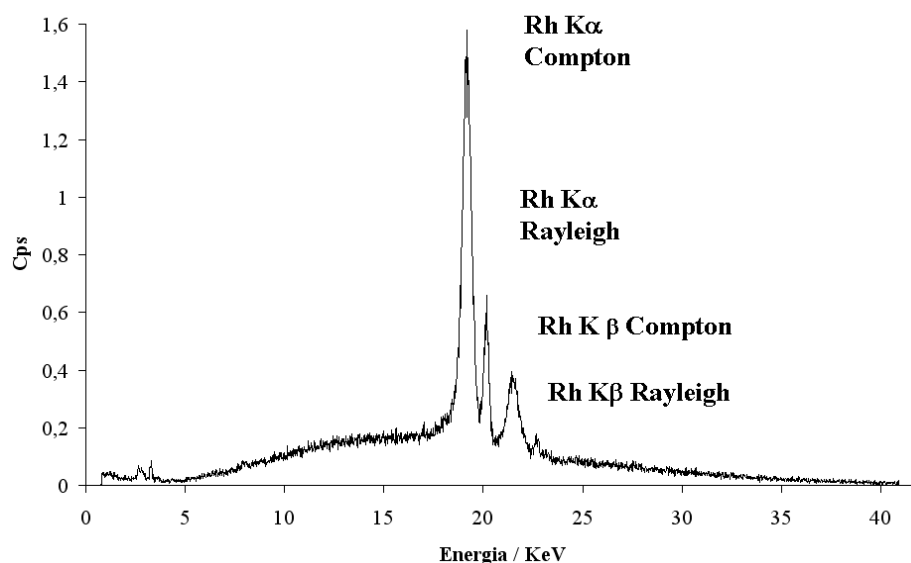


Figura 10 - Espectro de fluorescência de raios-X de banana nanica.

Portanto, para o estudo de amostras orgânicas, essa técnica sempre foi considerada imprópria. A partir de 2005, a aplicação da quimiometria na região de espalhamento de raios-X levou Bueno à publicação de trabalhos para aplicação não-destrutiva em amostras orgânicas, como é o caso da classificação de óleos vegetais ^[45], vernizes ^[46], e gênero de cães e cor de seus pelos ^[47]. Em todos estes casos, irradiaram-se diretamente as amostras, sem qualquer pré-tratamento.

Os resultados que se tem obtido com a espectrometria de raios-X para amostras orgânicas estão sendo verificados para confirmar a potencialidade de se extrair informações preciosas da região de espalhamento de raios-X, que até então eram descartadas ou eram simplesmente usadas para correções das linhas de emissão características.

Após a descoberta do espalhamento Raman na região visível do espectro de radiação por Chandrasekhara Venkata Raman ^[43], ganhador do

Prêmio Nobel de Física em 1930, um efeito similar foi descoberto para a radiação de raios-X, e esta começou a ser estudada.

Entre 1966 e 1970, foram publicados trabalhos que provaram a existência das pequenas variações (espalhamento Raman) que ocorrem ao redor das bandas Compton e Rayleigh em espectros de raios-X de elementos leves, quando ângulos pequenos entre amostra-fonte-detector eram usados.

Suzuki descreveu esta região ^[44] e apresentou considerações suficientes para explicar e provar a existência do espalhamento de raios-X, Rayleigh e Compton, para amostras de lítio, berílio, boro e carbono puros, usando-se a radiação monocromática $K\alpha$ do Cu ^[48].

Mizuno e Ohmura ^[42], em trabalho paralelo, publicaram as considerações teóricas do espalhamento Raman de raios-X, que serão mostrados no tópico I.VI deste trabalho. Estes autores tiveram suas considerações teóricas validadas com os experimentos de Suzuki.

Kazuyuki ^[49] em 1987 mostrou que era possível extrair parâmetros estruturais de análises das oscilações dos espalhamentos Raman, mas somente neste caso, foi possível graças ao advento da radiação síncrotron.

Em 2000, a determinação da razão carbono, hidrogênio e oxigênio foi realizada, utilizando fonte de radiação secundária na obtenção do espalhamento de raios-X, em trabalho para classificação de óleos. ^[50]

Em 2002, novamente essa região foi tema de publicação, quando Van Espen, Lembergue e Van Gysel ^[40] descreveram um novo modelo para a descrição dos picos Compton obtidos nos espectros de raios-X por dispersão de energia. Neste mesmo ano, foi publicado por Vazquez, Boeykens e Bonadeo artigo sobre a classificação de polímeros naturais utilizando a região de espalhamento de espectros de reflexão total de fluorescência de raios-X. ^[51]

Em 2005, Bueno et al. ^[47] extraiu informações importantes sobre amostras orgânicas utilizando o espalhamento Raman do tubo de raios-X ($K\alpha$ do Compton e $K\alpha$ do Rayleigh, Figura 10) de um equipamento por dispersão de energia, de bancada, quando aliada a quimiometria, como ferramenta para visualizar as pequenas variações entre as bandas do espalhamento de raios-X.

Com base nos resultados anteriores obtidos utilizando-se a espectrometria de raios-X (XRS, do inglês *X-Ray Scattering Spectrometry*) aliada a quimiometria, na classificação de óleos vegetais ^[45], vernizes ^[46], e gênero e cor de pelos de cães ^[47], foi proposta a aplicação desta região no estudo de discriminação vegetal e outros parâmetros.

Por serem orgânicos, os vegetais têm característica de espalhar a radiação fornecida pelo tubo de raios-X. Como a diferença na região de espalhamento no espectro de raios-X de amostras orgânicas similares é demasiadamente sutil, é necessário o tratamento quimiométrico para extrair informações significativas dos espectros. Os métodos quimiométricos utilizados nesse trabalho estão explicados no item I.VII.

I.VI) CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

A banda Raman de raios-X, apesar de estar sobreposta pelo pico Compton, é provavelmente o ponto central que fornece informação sobre a matriz. Apesar de sua pouca utilização para análises pela técnica de espectrometria de raios-X, esta região tem se mostrado bastante importante para o fornecimento de informações sobre orgânicos, desta forma seguem abaixo algumas considerações teóricas sobre o espalhamento Raman.

As considerações que seguem estão fundamentadas nos trabalhos publicados em 1967, 1970 e 1987, de Suzuki ^[44]; Suzuki, Kishimoto e Suzuki

[48], e Mizuno e Ohmura [42], respectivamente. Esses autores consideraram em sua pesquisa a existência, a forma e característica da banda Raman de raios-X. O desenvolvimento de suas equações está relacionado ao desenvolvimento da teoria quântica, que é abordada superficialmente à seguir.

O desenvolvimento da mecânica quântica é relativamente recente. Índícios experimentais que questionavam a mecânica clássica começaram a surgir no final do século XIX. Foi necessária toda uma evolução para que fossem formulados os conceitos e equações apropriadas para a descrição da teoria quântica, o que proporcionou uma explosão científica muito grande no século XX. Por isso, será feito um resumo dos fatos, relacionando-os ao desenvolvimento da explicação matemática para a banda Raman.

Em 1900, o físico alemão Max Planck estudou a radiação de corpo negro a partir da termodinâmica. Planck descobriu que poderia reproduzir a distribuição de valores de densidade de energia em função do comprimento de onda, observados experimentalmente, se admitisse que as energias permitidas do oscilador eletromagnético de frequência ν fossem múltiplos de $h\nu$ (Equação 1) [52]. Portanto, a relação de energia para o espalhamento poderia ser expressa pela Equação 2.

$$(E = h\nu)$$

Equação 1

$$h\nu_0 = h\nu + E_0 + \frac{1}{2}m\nu^2$$

Equação 2

Onde h é a constante de Planck, ν_0 é a frequência dos raios-X incidente e ν é a frequência do espalhamento de raios-X; E_0 é a menor energia necessária para excitar um elétron-K; $\frac{1}{2}m\nu^2$ corresponde a energia cinética do “elétron” de recuo (espalhamento Compton).

O momento compartilhado pelo recuo do elétron deve ser considerado no espalhamento Raman de raios-X, o que não era considerado em espalhamentos vibracionais. Portanto, como ν na Equação 2 pode ser arbitrário, e o espectro tem borda fixada em $h\nu_0 - E_0$, estas considerações não são suficientes para explicar o conjunto de formas de bandas e outras características do espectro observado. Para se considerar essas características, o caráter onda-partícula da radiação deve ser considerado. [42, 44 e 48]

O estudo do caráter corpuscular da radiação eletromagnética (incluindo o efeito fotoelétrico) e o estudo do caráter ondulatório das partículas, de 1925, promoveram a compreensão do caráter onda-partícula exibido pela matéria e pela radiação eletromagnética [52].

A mecânica quântica leva em conta a dualidade onda-partícula da matéria admitindo-se que, em lugar de se deslocar ao longo de uma trajetória perfeitamente definida, uma partícula se distribui através do espaço como uma onda. A representação matemática da onda que, na mecânica quântica, substitui o conceito clássico de trajetória, é denominada função de onda, ψ (psi) e pode ser representada pela Equação 3 (para sistemas tridimensionais) e pela Equação 4, como um caso geral. As duas equações são equivalentes [52].

$$-\frac{\hbar}{2m}\nabla^2\psi = V\psi = E\psi \quad \text{Equação 3}$$

$$H\psi = E\psi \quad \text{Equação 4}$$

Onde o termo V é a energia potencial da partícula e depende da posição do operador ∇^2 , onde $\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial X^2} + \frac{\partial^2}{\partial Y^2} + \frac{\partial^2}{\partial Z^2}$; a constante \hbar é uma modificação conveniente da constante de Planck, onde \hbar é $h/2\pi$; H é o operador hamiltoniano do sistema, descrito por $H = -\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V$.

Para o espalhamento de raios-X, o termo principal do Hamiltoniano do sistema é expresso por ^[42]:

$$H = \frac{e^2}{2mc^2} \sum_i \sum_{k,e} \sum_{k_0,e_0} \sqrt{\frac{\hbar}{\nu}} \sqrt{\frac{\hbar}{\nu_0}} \sqrt{n_0} c^2 (e \cdot e_0) \cdot \exp\{-i(k - k_0) \cdot r\} \quad \text{Equação 5}$$

Onde: e é o vetor de polarização, e_0 é o vetor de polarização no estado inicial, k é o vetor de propagação da onda, k_0 é o vetor de propagação de onda no estado inicial, n é o número de fótons incidente, ν é a frequência angular e ν_0 é a frequência angular no estado inicial.

O fator de nosso interesse nesse hamiltoniano é o termo exponencial que Mizuno e Ohmura aproximaram para $\{1 - i(k - k_0) \cdot r\}$. Na aproximação deles a seção diferencial do espalhamento de raios-X é dada pela Equação 6. ^[42]

$$w(\nu, \theta, \phi) d\nu d\Omega = \left(\frac{4Nhe^4 n_0}{L^3 mc^2} \right) (1 + \cos^2 \theta) \sin^2 \frac{\theta}{2} \nu_0^2 t(\nu_0 - \nu) d\nu d\Omega \quad \text{Equação 6}$$

Onde a expressão dada é a probabilidade de transição em uma frequência infinitesimal $d\nu$ e em um ângulo sólido infinitesimal $d\Omega$, sobre a direção k , que é especificado pelos ângulos polares ϕ com respeito a k_0 e θ entre k e k_0 , que nos experimentos realizados por Mizuno, Ohmura, Suzuki e Suzuki, foi variado (Figura 11). N é o número de átomos no sistema, L^3 é o volume do sistema,, $t(\nu_0 - \nu)$ é um termo proporcional à energia de absorção do elétron K.

A Equação 6 representa a expressão final para a probabilidade de transição do espalhamento Raman de raios-X. A solução detalhada das

equações intermediárias que geraram a Equação 6 são apresentadas no artigo de Mizuno e Ohmura ^[42].

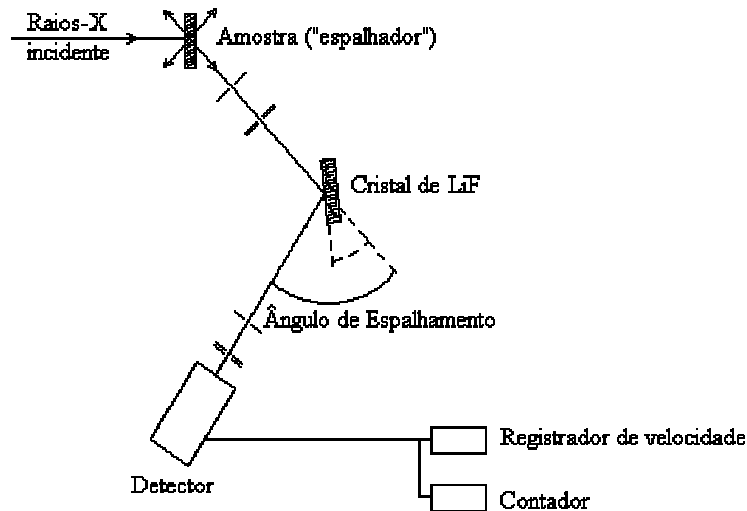


Figura 11 - Representação do esquema da dispersão por comprimento de onda, utilizado por Suzuki, Suzuki, Kishimoto, Mizuno e Ohmura, mostrando a variação de ângulo entre o detector e a amostra na obtenção do deslocamento Raman (*Raman Shift*).^[44]

O desenvolvimento teórico de Mizuno e Ohmura foi confirmado pelos experimentos de Suzuki, que irradiou lítio, berílio, boro e carbono em ângulos fixos entre 30° e 140°. A Figura 12 mostra os resultados, obtidos por Suzuki, utilizando berílio, onde todos os outros experimentos realizados por ele apresentaram o mesmo padrão. Foi observado que, apesar das posições dos comprimentos de ondas do Raman e Rayleigh não sofrerem alteração, o pico Compton apresentou grande variação com o ângulo de espalhamento da radiação. Para altos valores dos ângulos, o pico Compton pode encobrir totalmente o pico Raman, este característico para cada elemento.

O desenvolvimento matemático da Equação 6 gerou as seguintes características para o espalhamento de raios-X Raman:

- O pico de espalhamento Raman não se desloca com a variação em θ (observado na Figura 12);
- A borda do espectro é definida pela energia de excitação mais baixa;
- O espectro é uma banda cujo pico está próximo à energia de ionização;
- O perfil da banda é similar ao espectro de absorção da camada K;
- A intensidade varia como função de θ (Equação 6, Figura 12.);
- O espalhamento ocorre dentro das seguintes condições:

$$\frac{4\pi a_k}{E_0 \lambda} \left(\frac{e\eta}{\hbar c} \frac{\theta}{\lambda} \right) \leq 1$$

Equação 7
Equação 8

On

de λ é o comprimento de onda da radiação incidente, θ é o ângulo de espalhamento, a_k e E_k são, respectivamente, a razão da densidade de carga máxima radial e a energia de ionização dos elétrons-K, respectivamente.

Suzuki, Mizuno e Ohmura provaram a existência da banda Raman

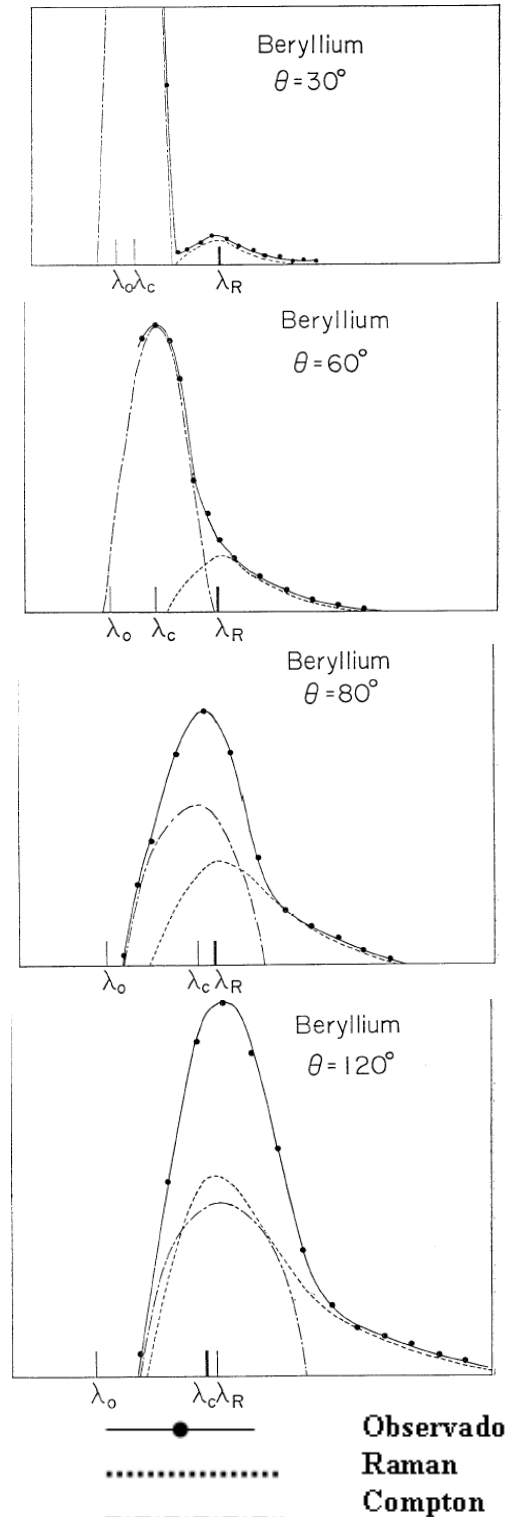


Figura 12 - Deslocamento do pico Compton para o berílio nos ângulos 30°, 60°, 80° e 120°.

de raios-X e a sobreposição dos picos Compton e Rayleigh sobre o Raman, com a variação do ângulo de incidência da radiação (Figura 12).

Esse fator se tornou importante no desenvolvimento da técnica de fluorescência de raios-X, levando à criação de equipamentos com ângulo fixo de 90 graus (EDXRF), quando o Raman fica totalmente encoberto pelo Compton e Rayleigh. Neste ângulo supunha-se estar com o espalhamento da radiação “sob controle”, já que este era considerado o grande inconveniente da técnica de FRX. O operador considerava importante o menor espalhamento possível na quantificação de metais.

No entanto, mesmo nessa condição o espalhamento ocorre, e é intenso para amostras que possuam elementos leves em sua composição, como é o caso de amostras orgânicas. Além de ser intenso, depende fortemente das características da amostra, como composição, estrutura cristalina, concentrações relativas de seus componentes, etc. Em outras palavras, esta região pode ser fonte muito rica em informações sobre a amostra, tanto em relação à sua composição orgânica quanto à correlação com os elementos mais pesados.

I.VII) FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

I.VII-A) ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) foi introduzida em 1901 por Karl Person ^[53]. É a principal base dos métodos modernos de tratamento de dados multivariados,

onde a informação inicial é transformada em um conjunto de informações mais compacto e resumido que o anterior ^[54 e 55].

PCA é um método de modelamento bilinear que torna possível a interpretação e avaliação de informações de tabelas multidimensionais. Portanto, quando um estudo conduz determinações simultâneas de diversas informações em uma ou mais amostras, os métodos multivariados podem ser empregados, reduzindo as dimensões dos dados originais, sem perda de informação relevante. Estes métodos também identificam problemas quando há interferência de linhas de base em métodos espectrométricos, ajudando a interpretação dos resultados. ^[55]

O ponto inicial da análise de componentes principais é a matriz de dados (\mathbf{X}), onde n são as linhas (“objetos”, que no caso correspondem as amostras), e p são as colunas (“variáveis”, no caso, os valores de energia dos espectros de cada amostra). O objetivo de se aplicar PCA na matriz \mathbf{X} é, em geral: simplificar; reduzir a matriz; modelar; detectar *outliers*; identificar as variáveis de maior importância; classificar; prever; ou organizar a matriz de dados. ^[54]

Quando a análise multivariada é aplicada à informação contida nas variáveis originais, ela projeta, em um pequeno número de variáveis subjacentes (variáveis latentes), um novo conjunto de dados contendo apenas informações estatisticamente relevantes. É criado um novo sistema de eixos, componentes principais, que representam as amostras.

A primeira componente principal representa o maior número de informações possível a partir das variações nos dados. A segunda componente principal é ortogonal à primeira (portanto, não-correlacionada a ela) e representa um segundo maior número de variações possíveis nos dados restantes. E, assim por diante, ocorrerá com as demais componentes.

A PCA redireciona as variáveis dentro de um espaço vetorial, ou seja, ela reescreve as variáveis originais em novas variáveis, através da transformação de coordenadas, que é um processo simples, quando feito através de cálculos matriciais. A matriz \mathbf{X} inicial é decomposta em um produto de duas matrizes menores \mathbf{T} e \mathbf{P}' (Equação 9), que possuem as informações essenciais da matriz \mathbf{X} .^[54, 55]

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}' + \mathbf{E}$$

Equação 9

Na Equação 9, \mathbf{T} representa a matriz de “*scores*”, calculada como ($n \times A$), e \mathbf{P}' , a matriz de “*loadings*” obtida como ($A \times p$). O valor de n representa as linhas e p , as colunas. A é a dimensão intrínseca, ou seja, o número de componentes principais, PC, necessário para descrever toda a informação no conjunto de dados. \mathbf{E} representa a matriz dos resíduos.^[55, 56 e 57]

A matriz de *scores* expressa a relação entre as amostras, mostrando as suas coordenadas no novo sistema de eixos. A matriz de “*loadings*” mostra a relação entre as variáveis e representa o quanto cada variável contribui na variação significativa dos dados.^[55, 58]

Através da representação gráfica das componentes principais, é possível visualizar as relações entre as diferentes variáveis, detectar e interpretar um padrão entre as amostras, agrupando as similaridades e diferenças entre estas.

I.VII-B) REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRÁTICOS PARCIAIS.

A regressão por mínimos quadráticos parciais (PLS, do inglês, *Partial Least Square*), proposto inicialmente na década de 70^[59], estabelece uma

relação quantitativa entre um conjunto multivariado de variáveis de predição e um ou mais propriedades físicas ou químicas das amostras de interesse, por exemplo, a relação entre uma matrix espectral e a concentração de um analito. [60, 61]

A regressão PLS, construída pelas propriedades do algoritmo NIPALS, é a forma básica aplicada para apenas uma única variável Y e é denominado PLS1. O PLS pode ser expresso em várias maneiras equivalentes, podendo, também, ser modificado para acomodar duas ou mais variáveis Y simultaneamente (sendo denominado PLS2) e pode acomodar também várias outras propriedades, como alisamento não-linear ou dinâmico e eliminação de variáveis irrelevantes. [59 e 62]

O processo de calibração consiste em dois passos: modelamento e validação. O modelamento estabelece uma relação matemática entre a matrix X ($n \times p$) e uma propriedade conhecida representada pelo vetor y ($n \times 1$), onde n é o número de amostras e p é igual ao número de valores de energia do espectro (variáveis).. Isso é possível através da determinação do coeficiente de regressão vetor b). O passo de validação otimiza esta relação para a melhor descrição de um elemento de interesse. Após a conclusão da calibração, é possível prever valores para amostras desconhecidas (Equação 10). [55 e 59].

$$y_{predito} = x_{desconhecido}^T \cdot x \cdot b$$

Equação 10

Onde, $x_{desconhecido}$ ($p \times 1$) é o espectro de uma nova amostra e b ($p \times 1$) é o vetor de regressão estimado durante a calibração do modelo.

Esse método funciona relativamente bem quando as variáveis expressam informações comuns, havendo grande correlação e linearidade entre os dados.

I.VII-C) VALIDAÇÃO CRUZADA

A validação cruzada (CV, do inglês, *cross validation*) é uma maneira prática e confiável para testar a significância do modelamento de PCA (ou PLS) e tem se tornado um procedimento padrão em ambas as análises. Em um processo de validação cruzada, parte dos dados é removida do modelo primário, e um modelo novo é desenvolvido com o novo conjunto de dados reduzido. Este segundo modelo é utilizado para predizer os valores que foram removidos, comparando com o novo modelo criado. A soma da raiz dos quadrados dos valores observados (RMSEP) mede a capacidade de predição do modelo ^[60 e 62].

I.VIII) TITULAÇÃO PELO MÉTODO EYNON LANE^[63 à 65]

Como comentado na introdução, nas análises realizadas durante esse trabalho, o teor de açúcares apresentou forte influência nos resultados de discriminação utilizando-se os pseudofrutos. Portanto, tornou-se essencial a verificação da influência da concentração de açúcares no espalhamento Raman de raios-X. Por isso, o método Eynon-Lane, que será explicado neste item, foi utilizado para a determinação de açúcar em polpa de caju concentrado e os dados obtidos usados na calibração multivariada usando os espectros de XRS.

Durante esse estudo, foi observado que outras variáveis relacionadas à estrutura dos açúcares também poderiam ser visualizadas pelo método de espectrometria de raios-X aliada à quimiometria. Desta forma, uma diversidade de estudos paralelos foi realizada para verificar o potencial desta técnica no estudo de açúcares, entre elas estão a análise polarimétrica (item

I.X) na inversão da sacarose e a relação do ângulo de rotação específica da luz polarizada e do grau de doçura (I.IX) tabelados de alguns carboidratos. Todos estes parâmetros foram correlacionados de forma multivariada com XRS.

Os carboidratos abrangem um dos maiores grupos de compostos orgânicos encontrados na natureza e, juntamente com as proteínas, formam os constituintes principais dos organismos vivos, além de serem a mais abundante e econômica fonte de energia para o homem.

Os carboidratos formam uma classe de compostos orgânicos que incluem açúcares, amidos e celulose. São divididos em três categorias: monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos. Os monossacarídeos são os mais simples, não podem ser hidrolisados a açúcares de menor massa molar, são facilmente solúveis em água e suas soluções são opticamente ativas. Também reduzem facilmente soluções alcalinas de Cu^{2+} a Cu^{+1} (solução de Fehling). A frutose e a glicose (Figura 13 a e b) são exemplos desse tipo de carboidrato.

Os dissacarídeos são açúcares duplos e, por hidrólise, produzem dois açúcares simples. Deve-se ressaltar as principais características da sacarose (Figura 13 d), que serão utilizadas como base para o estudo da atividade óptica e da calibração de açúcares em suco neste trabalho. A sacarose é um dissacarídeo não redutor, não reagindo com solução de Fehling, e pode ser facilmente hidrolisada, em meio ácido, a glicose e frutose. Também apresenta atividade óptica. A maltose, a sacarose e a lactose também são exemplos de dissacarídeos.

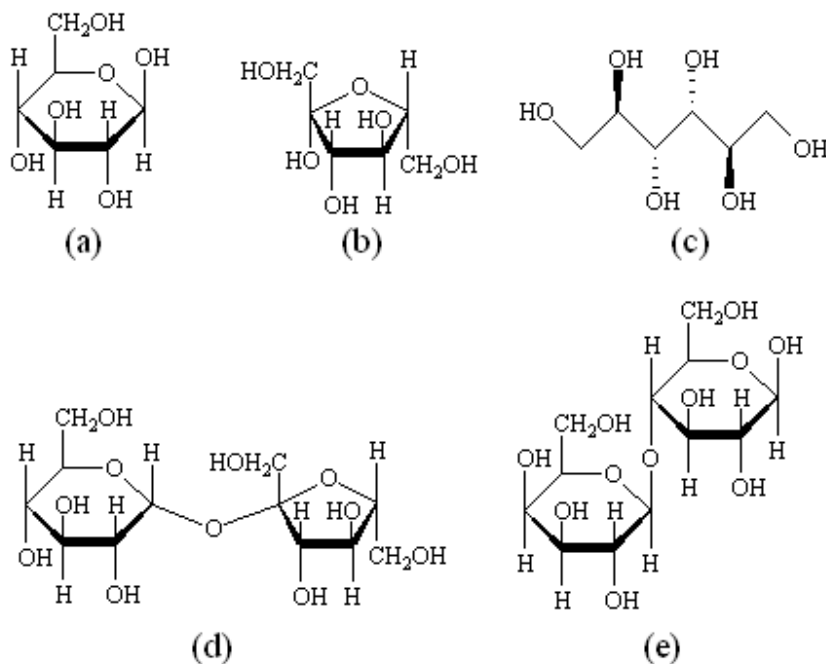


Figura 13 - Estrutura dos carboidratos: (a) glicose, (b) frutose, (c) manitol, (d) sacarose e (e) lactose.

O fato da glicose e da frutose terem a característica de reduzirem Cu^{2+} a Cu^{+1} em meio alcalino, enquanto a sacarose não, há a possibilidade de determinação quantitativa de frutose e glicose, em presença de sacarose. Essa determinação pode ser realizada pelo método de Eynon-Lane, onde é utilizado o reagente de Fehling. . A titulação de Fehling se baseia na reação em que o Cu^{+2} , de coloração azul, é reduzido pela glicose e frutose em meio alcalino quente a Cu^{+1} , formando um precipitado vermelho-alaranjado. ^[65 à 67] A adição de agentes para retirar interferentes quando for o caso, como cálcio em solução, é necessária. O oxalato de potássio pode ser utilizado como agente de-calcificante. ^[68 e 69] O EDTA também é utilizado, quando há a presença de outros metais interferentes.

Desta forma, a determinação da concentração de frutose e glicose pode ser realizada através de uma titulação à quente em meio básico, utilizando Cu^{2+} e um agente para eliminar interferentes, quando for o caso.

I.IX) GRAU DE DOÇURA

Os açúcares têm sido utilizados como um “tempero” há muito tempo; no entanto, por muitos anos ele foi acessível apenas para pessoas de grande poder aquisitivo, como no século XIV, onde a sacarose era vendida como uma especiaria de grande valor ^[70]. Atualmente, os carboidratos têm um amplo leque de possibilidades de usos, associados às suas propriedades e seu sabor agradável. ^[71]

A relação entre a estrutura dos açúcares e sua doçura tem sido estudada há muito tempo ^[72 à 75]. Em 1963, Shallensberger postulou que a unidade básica do sabor doce seria um par de grupos funcionais separados por aproximadamente 3 Å, um agindo como doador de prótons e o outro como receptor de prótons. Durante a interação, estes grupos seriam responsáveis por se combinarem reversivelmente por meio de uma ligação de hidrogênio com unidades complementares no sítio receptor. Este princípio é ilustrado esquematicamente na Figura 14 (a). ^[76 e 77]

Um segundo postulado foi introduzido por Kier ^[78], no qual, embora a teoria da unidade AH-B de Shallensberger fosse suficiente para explicar a relação dos carboidratos com a sensação de doçura, esta teoria se tornava incompleta tendo em vista que a intensidade doce seria fracamente percebida. Desta forma, uma terceira estrutura característica, X (Figura 14 b), seria necessária para intensificar o sabor doce em uma configuração específica com o par AH-B.

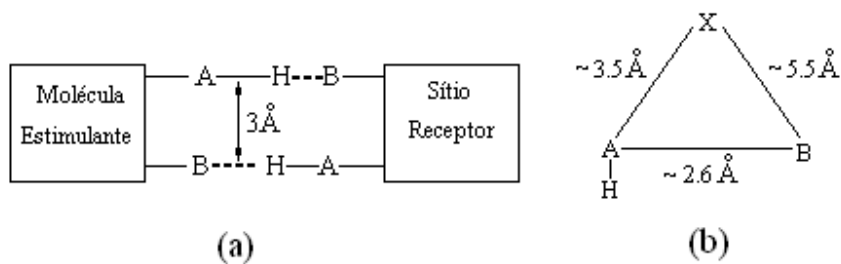


Figura 14 - Princípio de Shallenberger e estrutura X - do princípio de Kier.

Os receptores responsáveis em transmitir a mensagem de doçura ao cérebro se encontram nas células epiteliais da língua. Aproximadamente de 50 a 100 células relacionadas ao sabor estão organizadas nas papilas. Os seres humanos podem detectar e distinguir 5 sabores básicos: doce, salgado, ácido, amargo e “umami” (um sabor exemplificado pelo aminoácido glutamato). A percepção dos sabores salgado e ácido são mediados por canais de íons, enquanto a percepção dos sabores doce, amargo e umami são mediados pela proteína G (G PCR, do inglês, *G-protein-coupled-receptors*) [79, 80, 81, 82 e 83].

Em 1999, Hoon identificou dois supostos receptores GPCR, conhecidos como T1R1 e T1R2. Em 2001, mais seis grupos receptores foram identificados e isolados em ratos. Um deles, o grupo nomeado por T1R3, e encontrado em seres humanos, foi relacionado ao T1R2 na detecção de açúcares. De acordo com Scott, T1R2 juntamente com T1R3 seriam capazes de detectar o sabor doce em adoçantes artificiais. [84 à 91]

Cada substância de sabor doce, natural ou artificial, tem um grau de doçura (Tabela 2). Os valores dessa tabela foram obtidos através de testes sensoriais, uma medida da percepção sensorial do sabor doce. Esses testes são realizados por pessoas treinadas e capazes de discriminar as diferenças entre amostras ou quantificar a intensidade percebida de um dado atributo. A acuidade sensorial é incluída através de critérios primários usados para a

determinação dos melhores degustadores de alimentos e bebidas. O processo de seleção de degustadores é capaz de determinar a habilidade desses em participar dos testes sensoriais (ISO 8586-1 1993) ^[92].

Tabela 2 - Doçura relativa de alguns açúcares em relação a sacarose (por convenção, grau=100) ^[65].

Frutose	175
Manitol	50
Glicose	75
Lactose	16
Sacarose	100

A análise sensorial é extremamente importante no ramo da alimentação, quando as técnicas químicas, como a titulação Eynon-Lane ^[67], são incapazes de quantificar e discriminar parâmetros sensoriais distintos, como é o caso dos açúcares.

A espectrometria de infra-vermelho próximo (NIR) aliada a ferramentas quimiométricas recentemente tem sido utilizada na substituição de testes sensoriais de alguns alimentos, avaliando a dureza ^[93 e 94], elasticidade, odor e aspectos relacionados ao sabor, como doçura, acidez e amargura ^[95 à 97]. Com esta técnica, obtêm-se parâmetros de medidas com velocidade e reprodutibilidade maiores do que as análises sensoriais. E por ser um método não destrutivo, é facilmente aplicado a medidas de constituintes químicos e propriedades em alimentos ^[93 e 97].

Observando-se o bom potencial de aplicação da técnica XRS na calibração do teor de açúcares e dados bibliográficos positivos utilizando-se NIR na determinação de doçura aplicada em indústrias de alimentos, um teste

A reação entre a sacarose e a água, representada pela Figura 15, pode ser acompanhada através da medida do ângulo de rotação específico da luz polarizada, pois a sacarose e a glicose são dextrorotatórias e a frutose é levorotatória (α_D^{20} [frutose] = $-92,4^\circ$; α_D^{20} [sacarose] = $66,5^\circ$ e α_D^{20} [glicose] = $52,7^\circ$ [99]).

A mistura de frutose e glicose é ligeiramente levorotatória por que a frutose (levorotatória) tem um poder de rotação da luz polarizada muito maior do que a glicose (dextrorotatória) [99]. Como a sacarose é convertida em glicose e frutose, o ângulo de rotação acompanhará a reação da direita (positivo) para a esquerda (negativo). Este fenômeno permite acompanhar essa conversão através da medida da variação do ângulo da luz polarizada com um polarímetro. A luz polarizada passa continuamente através de uma cela de vidro preenchida com a solução de amostra, onde a variação do ângulo pode ser visualizada [99 e 100].

II) OBJETIVOS

A Máquina do Mundo

*O Universo é feito essencialmente de
coisa nenhuma.*

*Intervalos, distâncias, buracos,
porosidade etérea.*

Espaço vazio, em suma.

O resto, é a matéria.

Daí, que este arrepio,

*este chamá-lo e tê-lo, erguê-lo e
defrontá-lo,*

*esta fresta de nada aberta no vazio,
deve ser um intervalo.*

Antonio Gedeão

- Através de estudos prévios utilizando amostras orgânicas, avaliar a aplicação da região de espalhamento em análises por espectrometria de raios-X.
- Estudar a aplicação da espectrometria de raios-X no estudo de amostras com elementos leves (C, H, O).
- Diferenciar e discriminar vegetais em grupos relacionados às espécies, gêneros e famílias utilizando folhas, frutos e sementes, através da técnica de espectrometria de raios-X aliada à quimiometria;
- Estudar alguns parâmetros que influenciam o agrupamento destes vegetais, relacionados à presença de carboidratos.
- Como consequência do item anterior, determinar por XRS aliada a quimiometria, a concentração, ângulo de rotação específico da luz polarizada e grau de doçura de carboidratos.

III) EXPERIMENTAL

A Busca da Verdade

*Aparentemente
existe um número infinito de seres vivos
que seguem a lei da probabilidade.
O astrônomo pode calcular
onde se encontrará o planeta Júpiter
em três mil anos.
Mas nenhum biólogo
pode prever
onde a borboleta pousará.*

**Poema de “Breve História da Ciência” - a busca da verdade do
norueguês Irik Newth / Affonso Romano de Sant’Anna**

III.D) ANÁLISE POR XRS

Todas as amostras foram colocadas em celas de polietileno com diâmetro de 32 mm, apropriadas (Figura 16) para irradiação em espectrômetro de fluorescência de raios-X por dispersão de energia. As celas são montadas utilizando um filme de politerftalato (Mylar[®]) de 2,5 µm de espessura, como sustentação para a amostra.

As amostras foram submetidas à irradiação, usando-se o equipamento de bancada de fluorescência de raios-X por dispersão de energia (SHIMADZU, EDX 720), com tubo de raios-X de Ródio (Rh) e detector semicondutor de Si(Li).

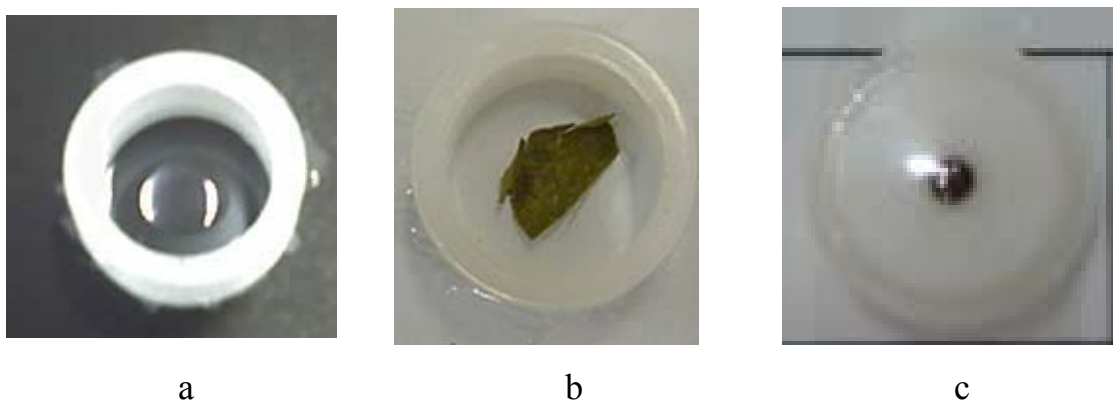


Figura 16 - Celas apropriadas para irradiação em espectrômetro de fluorescência de raios X, a) amostra líquida, b) amostra sólida, c) amostra com espaço reduzido.

Todas as amostras foram irradiadas sob ar, por 100 s, exceto as amostras da análise de cinética de inversão de sacarose, que necessitaram ter o tempo de irradiação reduzido para 80 s. Maiores detalhes desse procedimento serão descritos no item III.VIII.

O tempo morto do detector Si(Li) foi 25 %, 10 mm de colimação do feixe, 50 kV de voltagem e 100 μ A de corrente aplicada ao tubo de raios-X de Ródio. A faixa de energia foi de 0 a 40,96 keV, com resolução de 0,02 keV.

III.II) TRATAMENTO DE DADOS

Os espectros obtidos foram organizados em matriz de dados, foram centrados na média e alisados, pelo método de média móvel (*moving average*, com segmento de 19 pontos). Utilizando-se o software Unscrambler versão 9.2 da CAMO[®], foi realizado (i) análise de componentes principais (PCA), para a discriminação e (ii) regressão por PLS1. Em ambos os tratamentos, foi aplicado modelamento por validação cruzada (*full-cross validation*).

III.III) OBTENÇÃO E PREPARO DAS FOLHAS

Três espécies de *Lantana sp* (Item I.IV-A) foram coletadas na região de Sousas / SP, no período da inflorescência. A coleta foi acompanhada por um biólogo taxônomo do Instituto de Biologia da UNICAMP, para auxiliar na classificação das variedades.

As folhas dessa planta foram utilizadas para a classificação nas seguintes espécies: *Lantana camara* (18 amostras); *Lantana canescens* (2 amostras); *Lantana trifolia* (5 amostras).

Ramos do meio e das pontas das plantas foram coletadas. Os ramos foram levados para o herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP, onde foi feita a classificação de suas variedades por um taxônomo. No laboratório as folhas foram lavadas com água destilada. Três folhas de cada planta coletada foram levadas para análise, onde foram irradiadas em triplicata.

III.IV) OBTENÇÃO E PREPARO DAS SEMENTES

Foram utilizadas sementes de plantas ornamentais (Item I.IV-B), encontradas no mercado, adquiridas no CEASA - Campinas (Centrais de Abastecimento Campinas S.A.). Foram analisados 5 grupos de sementes de três famílias, totalizando 13 variedades distintas:

- Família ASTERACEAE: *Zinnia lilliput e elegans*; *Dahlia pinnata* (dobrada e simples); *Tagete patula* (rosa, amarela e vermelha)
- Família PORTULACACEAE: *Portulaca grandiflora* (simples e dobrada)
- Família POLEMONIACEAE: *Phlox drumondii* (simples e estrelada)

As sementes foram lavadas com água destilada e secas. Para cada variedade e espécie, foram preparadas 5 celas que foram levadas para irradiação em quintuplicata.

Como teste de influência da radiação na germinação das sementes, foram utilizadas sementes de *Portulaca grandiflora*: 5 sementes não irradiadas e 5 irradiadas com cada um dos seguintes tempos: 50 s, 200 s, 500 s e 1000 s. Essas sementes foram plantadas e tiveram seus crescimentos acompanhados até atingirem 8 cm de altura.

III.V) OBTENÇÃO E PREPARO DOS PSEUDOFRUTOS

No estudo de frutos, foi utilizada a banana, cujo pseudofruto, pertencente ao gênero *Musa* (Item I.IV-C), apresenta as seguintes espécies, com suas respectivas origens:

- *Musa acuminata* – variedade AA, (ouro), obtida de dois fornecedores do interior do estado de São Paulo;
- *Musa acuminata x balbisiana* – variedade AB, prata, obtida de seis fornecedores do interior do estado de São Paulo e de um fornecedor do Sul de Minas Gerais/MG.
- *Musa acuminata* - variedade AAA, nanica, obtida de três fornecedores do interior do estado de São Paulo e de um fornecedor do Sul de Minas Gerais/MG;
- *Musa acuminata x balbisiana* – variedade AAB, maçã, obtida de três fornecedores do interior do estado de São Paulo e de um fornecedor do Sul de Minas Gerais/MG;

Para todas as espécies e suas respectivas variedades, três pseudofrutos de cada fornecedor foram descascados, cortados ao meio, e uma fatia do meio foi retirada e levada para ser analisada. Algumas destas amostras foram desidratadas, usando-se lâmpada de luz infravermelho e mantidas em dessecador. Todas as amostras foram levadas para a análise por fluorescência de raios-X, onde foram irradiadas em triplicata.

III.VI) PREPARO DE SOLUÇÕES PARA A REGRESSÃO DE CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES POR XRS E EYNON-LANE

III.VI.I) PREPARO DE SOLUÇÕES AQUOSAS

Foram feitas soluções com três carboidratos: glicose, com concentração entre 0,10 e 40,0 g L⁻¹; frutose, com concentração entre 1,00 e 180,0 g L⁻¹; e

sacarose entre 0,40 e 100 g L⁻¹. Todos os açúcares utilizados são de grau analítico da marca Synth.

Após preparadas, as soluções foram colocadas em celas apropriadas para a análise de fluorescência de raios-X e irradiadas em quintuplicata.

III.VI.II) PREPARO DE SOLUÇÃO EM SUCO DE FRUTA

A polpa de fruta de caju concentrada, adquirida em mercado, foi diluída a 5 % (v/v).

Já que o suco utilizado é previamente cozido, as espécies de açúcares presentes são em grande parte frutose e glicose. Por isso, essa solução teve a concentração de glicose e frutose determinadas através da titulação de Eynon-Lane.

A partir da solução 5 %, foram feitas duas adições de padrão independentes,, sendo a concentração adicionada variando nas faixas:

- 2,00 a 14,00 g L⁻¹ de glicose
- 2,00 a 12,00 g L⁻¹ de frutose.

Para algumas concentrações de adição de padrão de glicose, foi realizada a titulação-padrão de Eynon-Lane para a correlação com os espectros de XRS. As medidas pela titulação foram realizadas em triplicata

Um mililitro de cada uma das soluções foi adicionado em celas apropriadas para análise por fluorescência de raios-X e irradiadas em quintuplicata.

III.VII) PREPARO DE AMOSTRAS PARA A REGRESSÃO DE DOÇURA

Para a regressão de doçura, foram utilizados carboidratos de grau analítico de marcas distintas: frutose (Synth e Vetec), glicose (Synth e Vetec), lactose (Synth e Vetec), manitol (Synth) e sacarose (Synth, Nuclear e Vetec).

Foram preparadas soluções a 2 % (v/v) de cada açúcar e marca. Um mililitro de cada uma das soluções foi colocado em cela apropriada para irradiação por fluorescência de raios-X e levadas para serem analisadas em quintuplicata.

III.VIII) PREPARO DE AMOSTRAS PARA A ANÁLISE DE CINÉTICA DE INVERSÃO DA SACAROSE

Solução de sacarose 30 % (m/v) e solução de HCl 2,0 mol L⁻¹ foram preparadas.

25,00 mL de solução de ácido clorídrico foram adicionados a 25,00 mL de solução de sacarose. Uma alíquota desta solução foi colocada em cela apropriada para análise polarimétrica no mesmo tempo que uma alíquota de mesmo volume foi separada em um recipiente (A), para ser realizada um estudo paralelo através de XRS.

Esse procedimento necessitou da operação simultânea dos dois equipamentos, e para isso foram necessários dois operadores. No momento da obtenção do primeiro espectro, era feita a leitura utilizando o polarímetro. Como o espectro necessita de 80 segundos para ser obtido, foi verificado, no polarímetro, se a variação do ângulo nesse intervalo era significativa,

constatando-se que, por ser pequeno (em torno de meio grau), não haveria problema na calibração.

Para manter a temperatura constante durante as irradiações, uma alíquota de 1,00 mL era retirada do recipiente (A) e levada para irradiação, depois era novamente devolvida para o recipiente. Esse procedimento foi realizado para todos os tempos de obtenção de espectro, de forma que houvesse a menor variação de temperatura possível.

Após as irradiações, os espectros foram tratados quimiometricamente, como descrito no item III.II.

IV) RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tecendo a Manhã

*Um galo sozinho não tece uma manhã:
ele precisará sempre de outros galos.
De um que apanhe esse grito que ele
e o lance a outro; de um outro galo
que apanhe o grito que um galo antes
e o lance a outro; e de outros galos
que com muitos outros galos se cruzem
os fios de sol de seus gritos de galo,
para que a manhã, desde uma teia tênue,
se vá tecendo, entre todos os galos.
E, se encorpando em tela, entre todos,
se erguendo tenda, onde entrem todos,
se entretendo para todos, no toldo
(a manhã) que plana livre de armação.
A manhã, toldo de um tecido tão aéreo
que, tecido, se eleva por si: luz balão.*

João Cabral de Melo Neto

IV.I) DISCRIMINAÇÃO DE VARIEDADES DE *Lantana sp.*

Como comentado na introdução, o desenvolvimento da técnica de XRS aliada à quimiometria tem mostrado boas informações acerca de amostras orgânicas, quando ocorrem pequenas variações na banda de espalhamento Raman de raios-X [45, 46 e 47]. Desta forma, resultados da aplicação do uso da região de espalhamento no estudo de semelhanças e diferenças entre vegetais são apresentados nesse item.

Com a intenção de auxiliar a classificação de plantas que apresentam características que dificultam o desenvolvimento do estudo taxonômico das espécies *Lantana sp.*, a técnica XRS foi aplicada. Através do estudo do espalhamento da radiação-X e da presença de metais, teve-se o intuito de formar grupos distinguindo esse vegetal em variedades ou espécies.

Os espectros adquiridos da irradiação das folhas foram tratados quimiometricamente utilizando a ferramenta PCA. Melhores resultados foram obtidos com o alisamento *Moving Average* dos espectros em 19 segmentos para as amostras de pseudofrutos e sementes. Desta forma, esse mesmo procedimento foi aplicado para folhas.

Como mencionado no item I.V, o espectro obtido na análise por fluorescência de raios-X possui duas regiões de interesse para análise: uma que se refere à região onde ocorre o efeito fotoelétrico, revelando-se, por exemplo, as linhas $K\alpha$ e $K\beta$ referente a cada metal, e a outra região referente ao espalhamento da amostra, onde ocorre o espalhamento Raman de raios-X (Figuras 9 e 10).

Aqui, no entanto, o espalhamento Raman apresenta-se sobreposto pelo pico Compton. Isto é causado pelos elementos constituintes da amostra e pela disposição detector x porta amostra x fonte de raios-X, que se encontram

dispostos a 90° entre si, como já comentado no item I.V. Desta forma, apesar do espalhamento Raman fornecer informações sobre a amostra, será frequentemente citado o pico Compton como responsável pela discriminação na PCA, embora esse mérito seja do efeito Raman de raios-X.

Os resultados da PCA dos espectros de *Lantana sp* de todo o espectro (Figuras 17 e 18) mostram que o espalhamento apresenta informações nas componente principais 1 e 2.

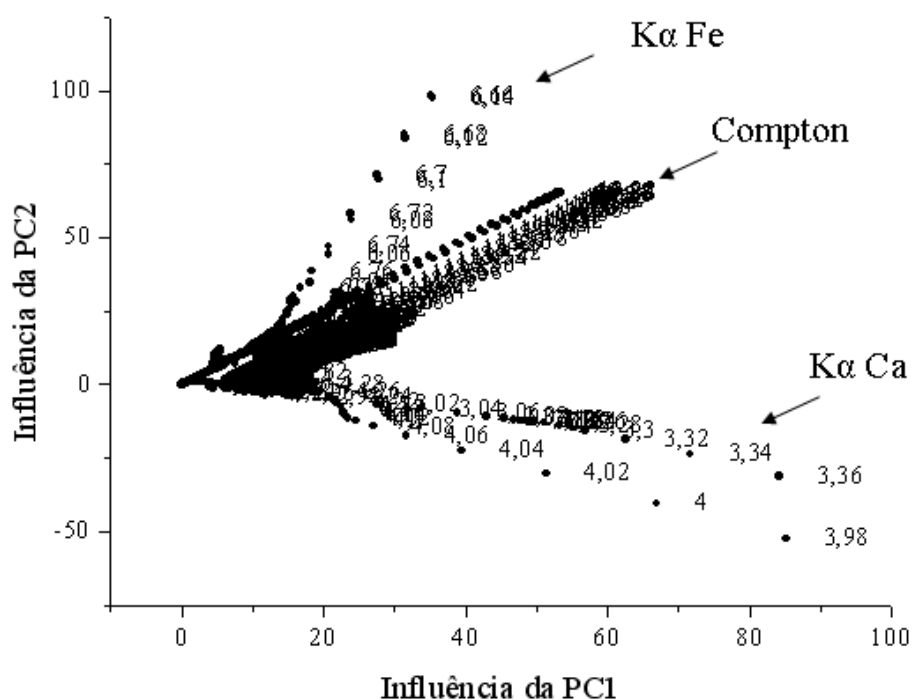


Figura 17 – Gráfico de *loadings* para a região entre 0 e 40,92 keV de *Lantanas sp*.

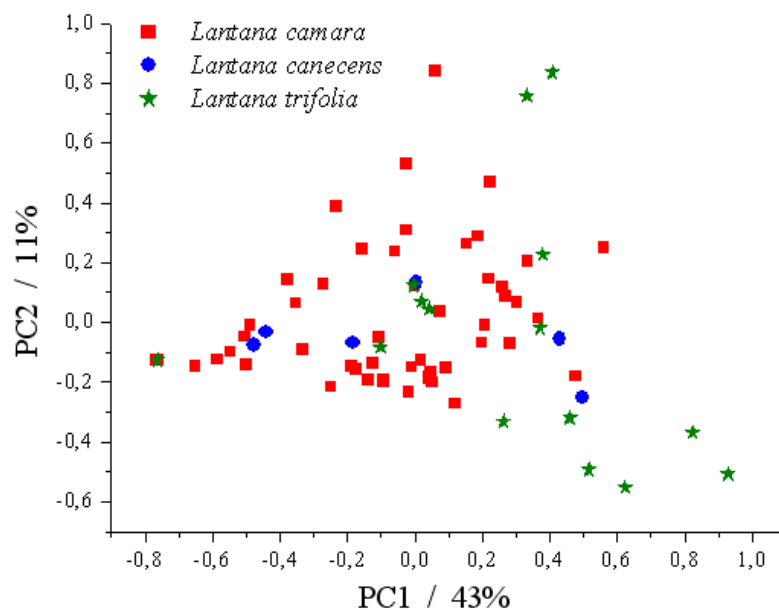


Figura 18 – Gráfico de *scores* da região entre 0 e 40,92 keV dos espectros de *Lantana sp.*

Nos gráficos obtidos pela análise de componentes principais é possível visualizar:

- a importância de cada variável sobre as amostras e quais são as variáveis correlacionadas através da visualização dos *loadings* (Figura 17);
- as semelhanças e diferenças entre as amostras através da visualização dos *scores* (Figura 18).

Nas Figuras 17 e 18, verifica-se que PC1 e PC2 explicam 84% da variância dos dados espectrais, sendo que 3 faixas espectrais mostram-se relevantes: a região $K\alpha$ do Ferro (6,400 keV), $K\alpha$ do Cálcio (3,962 keV), e a de espalhamento de raios-X, mostrado como o pico Rh $K\alpha$ Compton (19,2 keV).

Embora o espalhamento tenha se apresentado importante nas PC's, esse efeito não provocou a discriminação desejada. Foram então, realizadas duas

novas PCA's utilizando: a região relativa somente ao efeito fotoelétrico e a região relativa somente ao espalhamento (Figuras 19 e 20).

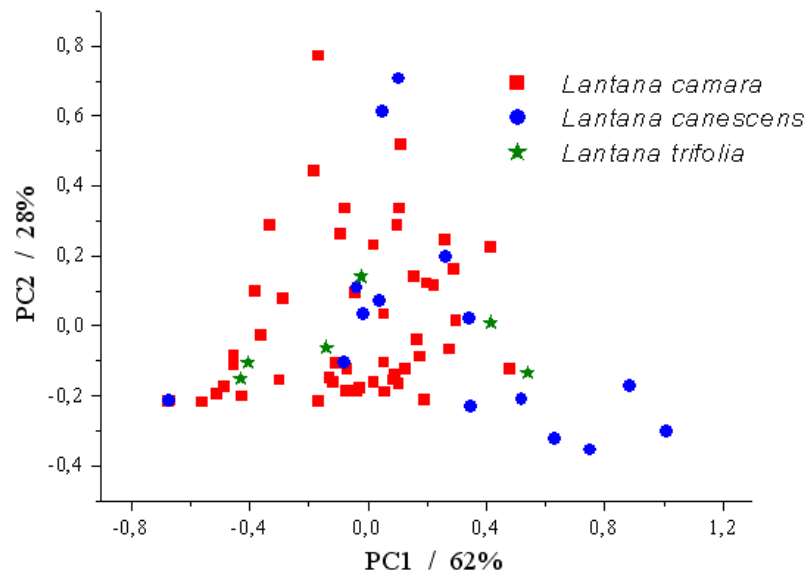


Figura 19 – Gráfico de *scores* da região entre 0 e 16,42 keV dos espectros de *Lantanas sp.*

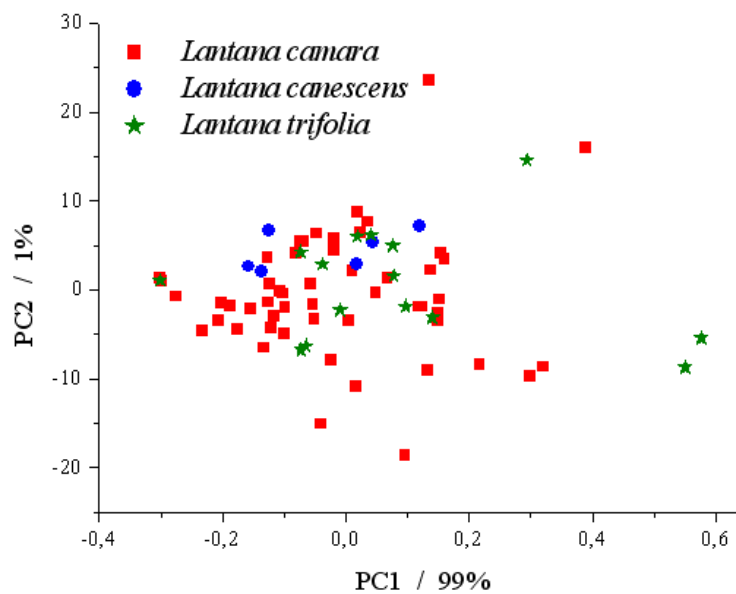


Figura 20 – Gráfico de *scores* da região de espalhamento entre 18,00 e 24,00 keV dos espectros de *Lantanas sp.*

As representações gráficas dos *scores* dos demais processamentos através de PCA para os espectros das lantanas, Figuras 19 e 20, somam, respectivamente, 84%, e ~100% de variância explicada na PC1 e na PC2.

Em nenhum resultado foi verificada discriminação nas análises de componentes principais. Esperava-se que, ao menos, as espécies *L. camara*, com toxinas presentes ^[16], pudessem ser diferenciadas das demais espécies e/ou variedades. Ressaltando que as toxinas comentadas seriam como, por exemplo, alguns lantadenos que foram identificadas em algumas das variedades de *Lantana câmara* analisadas, no trabalho de mestrado do aluno André Gomes de Lima. Era esperado que estas provocassem peso na discriminação, pois pequenas variações no espalhamento Raman de raios-X podem ser observadas utilizando ferramentas quimiométricas.

Duas hipóteses foram colocadas na ocasião da obtenção desses resultados:

- a primeira hipótese seria que o método poderia não ser significativamente específico, e por se tratar de vegetais, a complexidade da matriz e a variedade taxonômica poderiam tornar a aplicação inviável: tudo seria classificado como “planta”. Para colocar essa hipótese em prova, foi realizado um estudo utilizando outras espécies e variedades de plantas. Seus resultados estão apresentados no tópico IV.II e IV.III.
- a segunda hipótese seria que a *Lantana sp* é uma espécie em evolução, como comentado no item I.IV-A. Esse fato seria suficiente para tornar a metodologia proposta realmente inviável nestas condições de amostragem. Seria muito difícil tentar desenvolver a metodologia proposta com uma

família que possui espécies em evolução [8 e 9] não pertencentes a nenhum padrão classificatório.

IV.II) DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DAS FAMÍLIAS ASTERACEAE, PORTULACACEAE E POLEMONIACEAE

O trabalho utilizando sementes de espécies de plantas das famílias Asteraceae, Portulacaceae e Polemoniaceae serviria então como desafio para mostrar que possivelmente o estudo de discriminação das espécies *Lantana sp* não teve sucesso devido à sua evolução populacional. Os resultados da PCA dos espectros de sementes podem ser observados nas Figuras 21 e 22.

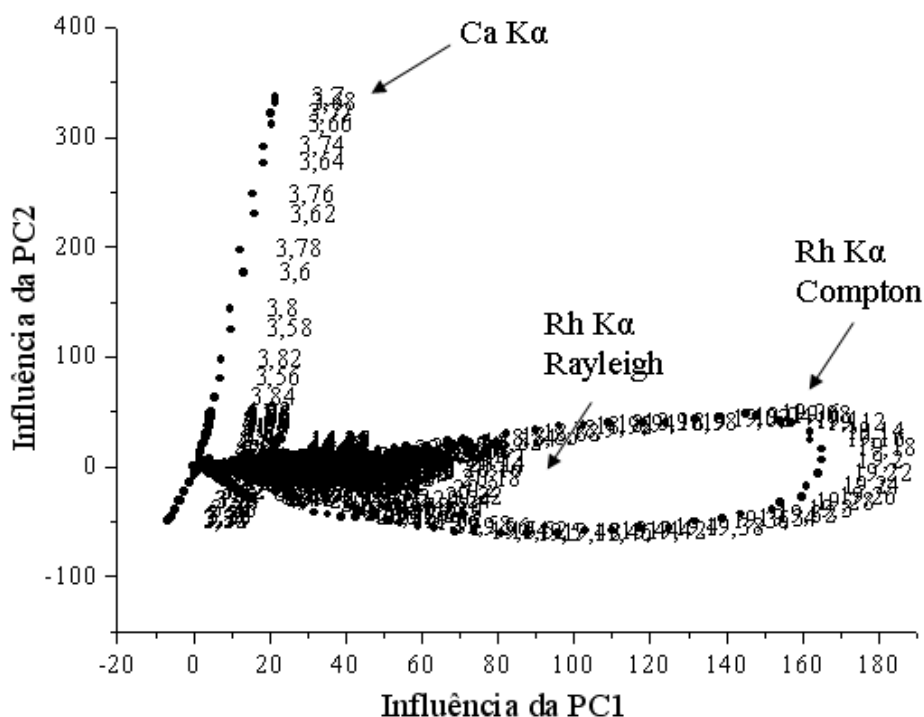


Figura 21 – Gráfico de *loadings* para a região entre 0 e 40,92 keV de sementes.

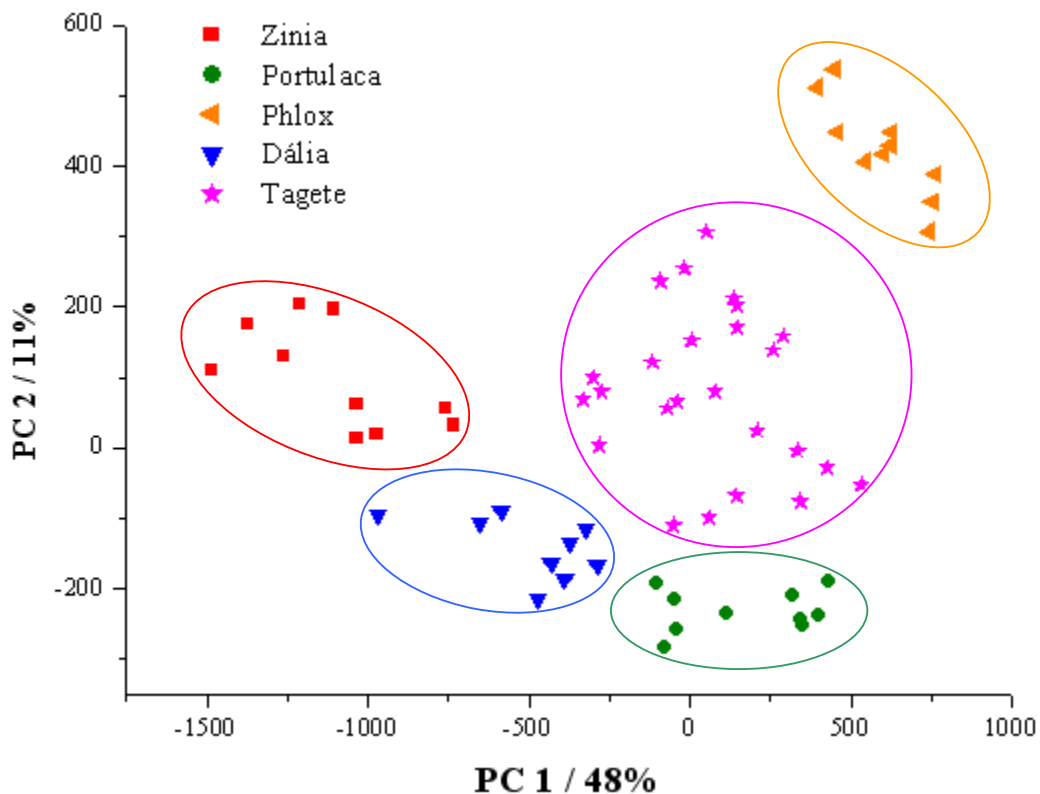


Figura 22 – Gráfico de *scores* dos espectros de sementes.

Na PCA dos espectros de sementes, Figuras 21 e 22, é observada a formação de grupos. Dentro da família Asteraceae, no gênero *Zinnia*, as espécies *Z. lilliput* e *Z. elegans* foram discriminadas (marcadas em vermelho). As variedades de *Dahlia pinnata* (variedades dobrada e simples) formaram outro grupo marcado em azul. As variedades de cravos *Tagete patula* (variedades branca, rosa e amarela vermelha) formaram um grupo marcado em rosa. Dentro da família Portulacaceae, as variedades de *Portulaca grandiflora* (variedade simples e dobrada) formaram um novo grupo, marcado em verde, e dentro da família Polemoniaceae, as variedades de *Phlox drumondii* (simples e estrelada) marcadas em laranja.

As informações fornecidas pelas componentes principais 1 e 2 mostram que, mesmo contendo menos de 60% de toda a informação em relação à soma

de todas as componentes, essas duas componentes mostram uma boa tendência na discriminação em grupos relacionados ao gênero e, mesmo no caso de espécies diferentes, dentro do mesmo gênero (*Zinnia*), foi possível verificar a formação de um grupo.

Tanto a região de espalhamento, na PC1, quanto a região relativa ao pico $K\alpha$ do cálcio, na PC2, estão fornecendo informações para essa discriminação. É importante ressaltar o fato do espalhamento, região relativa à manifestação de compostos formados por elementos leves, descartada com frequência pelos analistas, estar sendo de grande importância na obtenção dos atuais resultados.

Os resultados obtidos utilizando-se as sementes foram satisfatórios e provavelmente estão relacionados à visualização de características do genótipo dessas plantas, pois, por serem sementes, a expressão do gene (ou fenótipo) ainda não deve ter se manifestado ^[1]. A hipótese de que as plantas *Lantana sp* estudadas poderiam estar em evolução foi confirmada com os resultados obtidos nesse item.

IV.III) DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO MUSA

Os pseudofrutos foram utilizados, a princípio, para a realização de um estudo de variedades e foram escolhidas as bananas pela quantidade de variedades conhecidas dessa “fruta”. No entanto, com o estudo aprofundado do assunto, percebeu-se que na verdade as ditas “variedades” de bananas, comentadas erroneamente em alguns artigos e outras produções, não eram variedades e sim, espécies híbridas de reprodução, dependente do cultivo

realizado pelo ser humano [29]. Mesmo assim, o trabalho não foi interrompido e teve o enfoque modificado para classificação das espécies dentro da seção *Eumusa* do gênero *Musa* [65].

Uma análise prévia por PCA com todo o espectro foi realizada. O gráfico de influência das variáveis na classificação das amostras, *loadings*, pode ser observado na Figura 23.

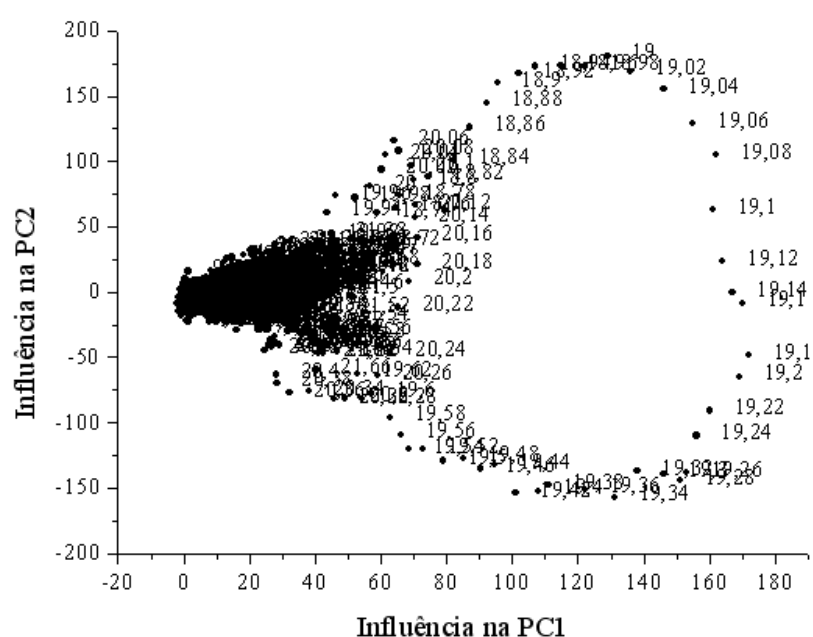


Figura 23 – Gráfico de *loadings* para a região entre 0 e 40,92keV de *Musa sp.*

Nesta figura (Figura 23) é observado que a região de espalhamento tem grande importância, tanto na primeira quanto na segunda componente principal. Comparando-se o gráfico de *loadings* dos pseudofrutos com os das sementes e folhas (Figuras 17 e 21), é notado que o perfil desses é bastante distinto na região onde há o espalhamento.

Baseando-se nas informações obtidas da literatura, apresentadas aqui no item IV e nos resultados mostrados na Figura 11, dois fatores muito importantes modelam o formato do gráfico de *loadings*:

- 1) Na primeira componente principal, a variância explicada é manifestada em função da **intensidade** do pico Compton, em torno de 19,2 keV. Este efeito sobrepõe o Raman, que tem sua amplitude alterada, conforme há variação na **concentração** das espécies químicas constituintes da amostra;
- 2) a variância relativa à largura do pico Compton, que pode ser observada nos espectros das Figuras 24, 25 e 26, está relacionada à **composição química** dos constituintes orgânicos das amostras, provocando alteração na componente principal 2. Este efeito afeta a largura do pico Compton, já que o deslocamento Raman é igual à energia de absorção para a camada K (valor dependente dos elementos presentes na amostra e suas distribuições relativas).

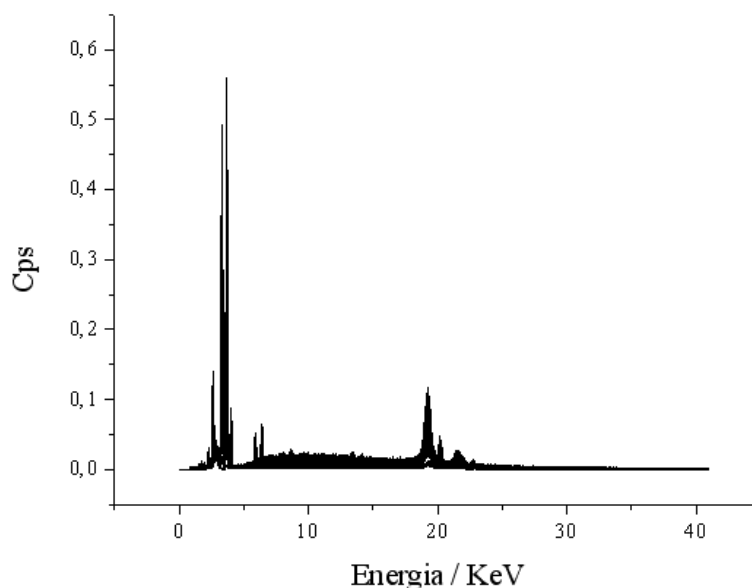


Figura 24 – Espectros sobrepostos de folhas de *Lantana sp.*

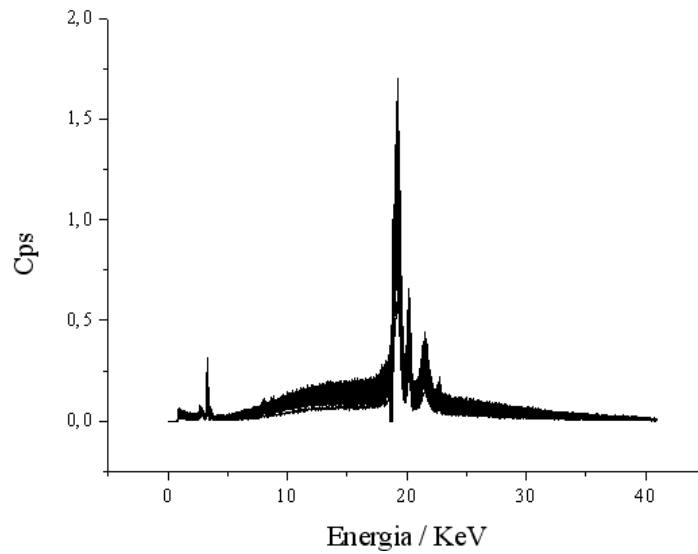


Figura 25 – Espectros sobrepostos de pseudofrutos.

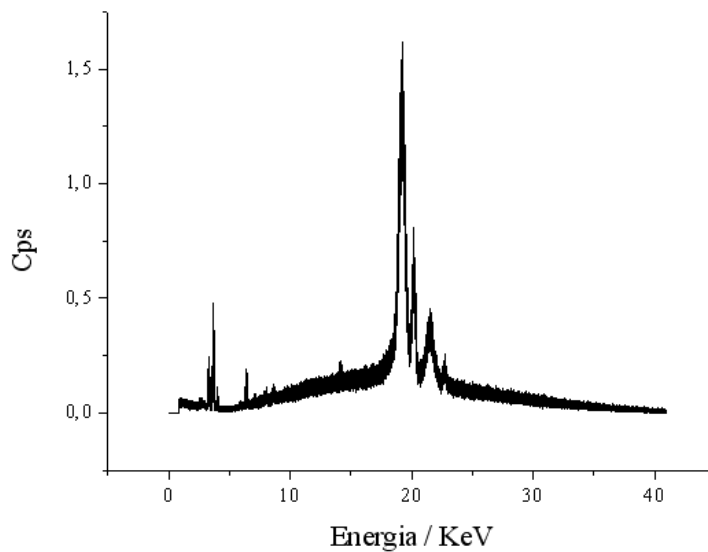


Figura 26 - Espectros sobrepostos de sementes.

Retornando à PCA dos pseudofrutos, Figura 23, foi observado que a região de espalhamento poderia ser suficiente para a discriminação das amostras. Desta forma, uma nova PCA foi realizada, utilizando a região de espalhamento (entre 18 keV e 22 keV). Os resultados são observados nas Figuras 27 e 28.

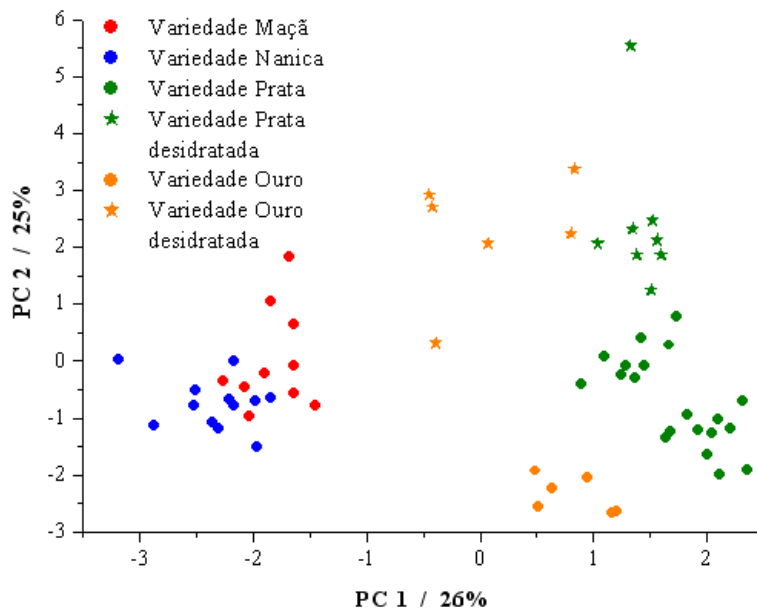


Figura 27 – Gráfico de *scores* representando a PC1xPC2 da região de espalhamento dos espectros de pseudofrutos do gênero Musa.

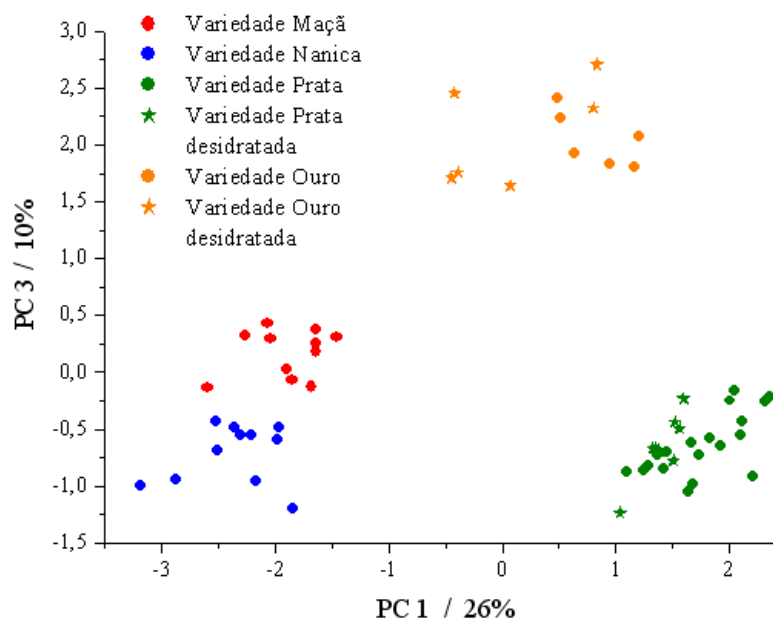


Figura 28 – Gráfico de *scores* representando a PC1xPC3 da região de espalhamento dos espectros de pseudofrutos do gênero Musa.

Nas Figuras 27 e 28 é observado na PC1, com 26% de variância explicada, a relação com a classificação de espécies de *Musa sp.* A PC2, com 25 % de variância explicada, está bastante relacionada à hidratação, já que amostras desidratadas apresentam-se na parte superior do gráfico de *scores*. E, finalmente, a PC3, com 10 % de variância explicada, mostra boa relação com a “doçura” deste fruto. Na Figura 29 é mostrada a representação gráfica dessas três componentes simultaneamente.

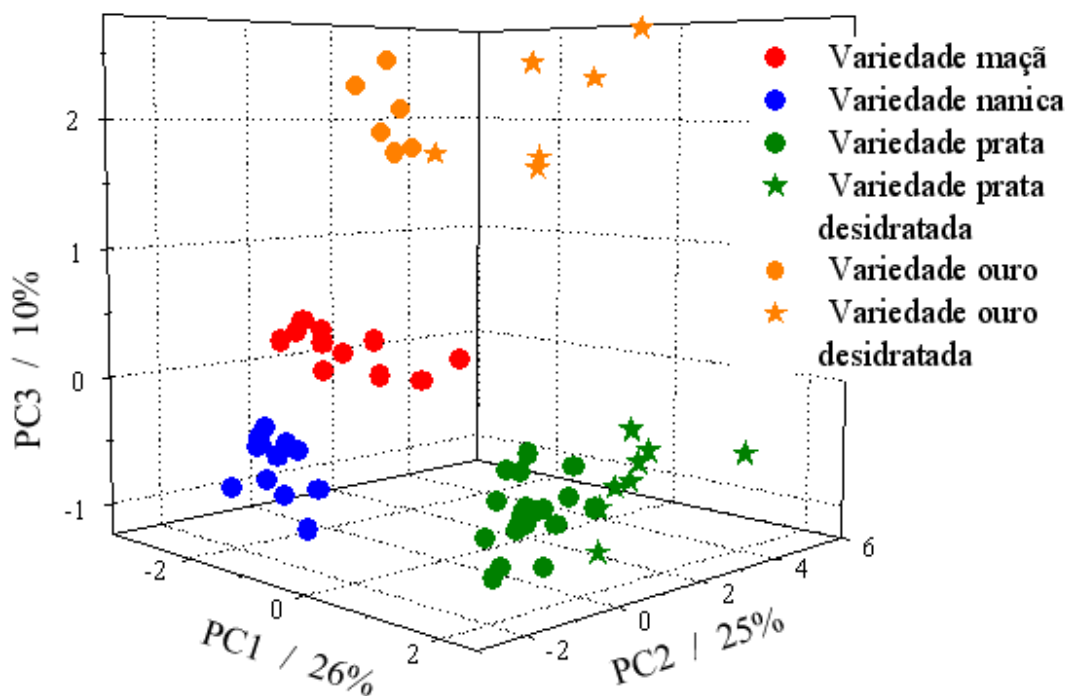


Figura 29 - Gráfico de *scores* tridimensional dos espectros da região de espalhamento de pseudofrutos do gênero *Musa*.

A Figura 29 mostra mais claramente a discriminação das espécies do gênero *Musa*, mesmo para as espécies onde houve desidratação do pseudofruto. Podemos constatar que a PC1 está mesmo relacionada à classificação das espécies. Quando a é confrontada com os dados da Tabela 1,

observa-se que os genomas respectivos às espécies *M.acuminata* (A) e *M. balbisiانا* (B) seguem a ordem da esquerda para direita na PC1: AAA, AAB, AA, AB.

A relação da PC2 com a hidratação dos frutos é visível, observando-se a disposição das amostras representadas por estrelas, desidratadas, e as representadas por bolas, amostras *in natura*. Mesmo discriminando-se de acordo com a hidratação, não houve discriminação das espécies nesta componente principal.

E, na PC3, onde é observada a correlação entre a doçura e a disposição das amostras. É colocado o questionamento: “seria possível uma determinação de teor de açúcar em pseudofrutos, utilizando-se a técnica de XRS aliada à quimiometria?”.

Com essa questão para ser respondida, um estudo de regressão de concentração de açúcares foi realizado, e durante o seu andamento, foi observado que a PCA dos espectros de frutose, glicose e sacarose mostravam uma tendência discriminatória. Novamente, um estudo investigativo foi realizado para verificar a discriminação de açúcares. Regressões por PLS, correlacionando os açúcares a algumas de suas características, como doçura e ângulo específico da rotação da luz polarizada, foram realizadas e, surpreendentemente, foram verificados bons resultados com tais parâmetros.

As regressões apresentadas nos próximos itens são análises preliminares realizadas com o intuito de explicar alguns dos resultados obtidos através dos estudos de plantas. Desta forma, não foi realizado trabalho detalhado de previsão, ficando como propostas para futuros trabalhos de interesse para a indústria alimentícia e de métodos de controle de qualidade.

IV.IV) REGRESSÃO DE TEOR DE AÇÚCARES EM SOLUÇÃO AQUOSA E EM SUCO

A regressão do teor de açúcares, tanto em solução aquosa quanto em suco, foi realizada através da ferramenta PLS, como mencionado anteriormente. Neste estudo, não foram calculadas as figuras de méritos, por uma série de motivos apresentadas a seguir.

A aplicação de quimiometria nos espectros de fluorescência de raios-X tem um número razoável de citações no estudo de metais ^[101]; no entanto, sua aplicação na região de espalhamento de raios-X é recente, e apesar de existirem outros métodos espectrométricos onde a quimiometria é bastante utilizada, por exemplo, no NIR (onde já existem modelos simples para se realizar as figuras de mérito) ^[102 e 103], a utilização destes modelos é inviável neste caso. O estudo com radiação-X espalhada apresenta características diferentes, inviabilizando a obtenção de certos valores utilizados no cálculo das figuras de mérito.

Nos modelos conhecidos para NIR, os cálculos para avaliar a sensibilidade, a seletividade, a razão sinal-ruído e o teste de erro sistemático (Bias), necessitam de valores que não são compatíveis com XRS, como por exemplo os que necessitam da existência de um “branco” ^[104]. E como já dito anteriormente, a essência do XRS está na utilização do espalhamento causada por elementos leves, por terem baixa tendência de absorção da irradiação. Neste caso, a existência de um “branco” fica dificultada. Estudos neste sentido estão sendo direcionados em nosso grupo de pesquisa.

IV.IV.I) REGRESSÃO DE SACAROSE, FRUTOSE E GLICOSE EM ÁGUA

Os espectros obtidos na irradiação de soluções aquosas com diferentes concentrações de glicose, frutose e sacarose foram tratados com a ferramenta quimiométrica PLS1, como comentado anteriormente, obtendo-se desta forma os gráficos de regressão da concentração destes açúcares representados pelas Figuras 30,31 e 32.

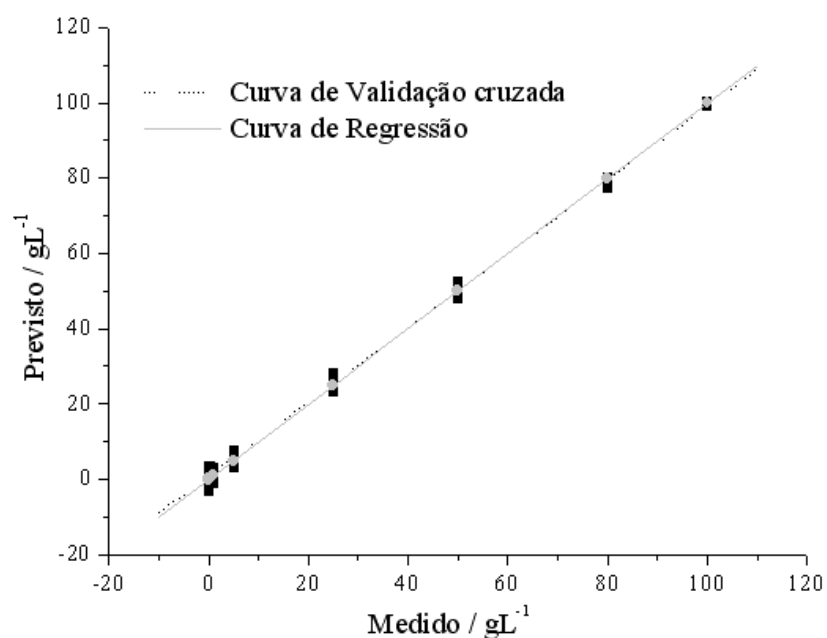


Figura 30 - PLS dos espectros de solução aquosa de sacarose.

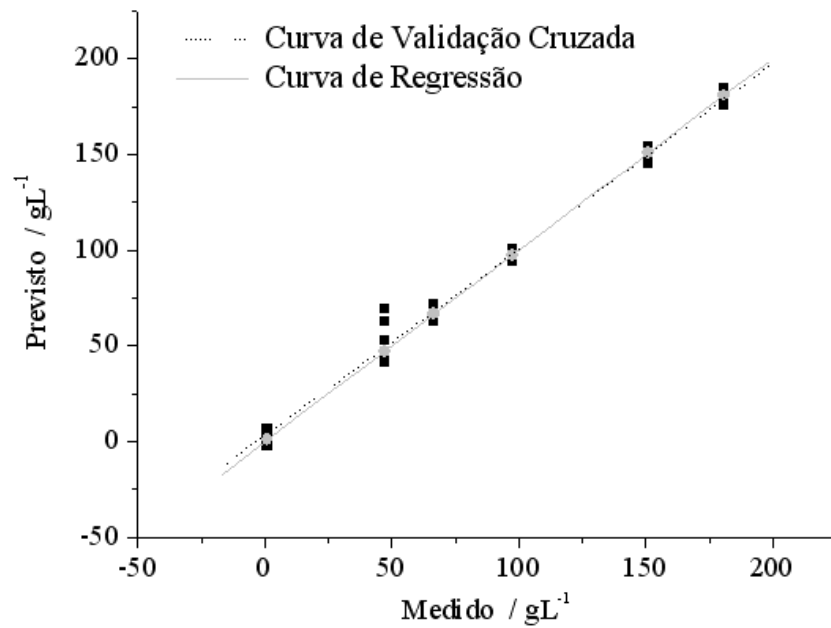


Figura 31 - PLS dos espectros de solução aquosa de frutose.

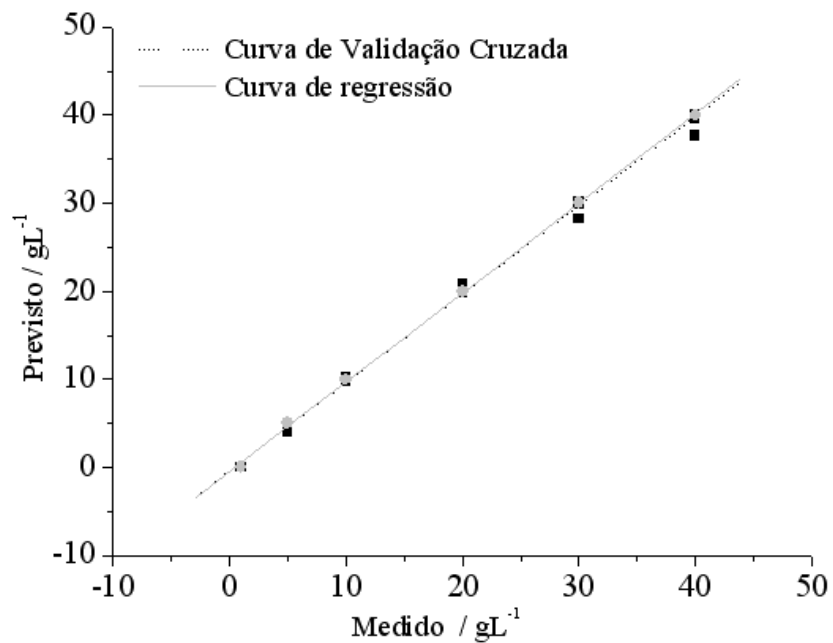


Figura 32 - PLS dos espectros de solução aquosa de glicose.

As Figuras Figura 30, Figura 31 e Figura 32 mostram a relação entre as concentrações medidas e as previstas, apresentando adequados coeficientes de

correlação: frutose (0,995), glicose (0,998) e sacarose (0,998). Os valores de RMSEV (do inglês, *Root Mean Square Error of Validation*) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de RMSEV e número de variáveis latentes para as determinações das concentrações de glicose, frutose e sacarose em solução aquosa.

Regressão	Número de variáveis latentes	RMSEV / %
Sacarose	13	5
Frutose	3	12
Glicose	7	4

Os resultados obtidos com os espectros de solução aquosa de carboidratos mostram que é possível fazer a regressão de concentrações de compostos orgânicos através de XRS. No entanto, como a matriz dos frutos é mais complexa, foi feita a regressão da concentração de carboidratos em suco de fruto, aproximando mais a matriz dos resultados obtidos da irradiação dos frutos *Musa sp*, Figura 29. Estes apresentaram disposição bastante correlacionada com o teor de doçura desses frutos na PC3.

IV.IV.II) REGRESSÃO DE FRUTOSE E GLICOSE EM SUCO

Este estudo foi bastante semelhante à regressão em solução aquosa, no entanto foram realizadas adições de glicose e frutose, separadamente, em suco. Para fins comparativos, foi utilizado o método Eynon-Lane ^[67] para a determinação da concentração inicial de glicose e frutose, e posteriormente, de glicose, nas soluções que sofreram adição-padrão de açúcares. Os espectros

obtidos das soluções foram tratados quimiometricamente usando-se PLS1, cujos resultados estão apresentados nas Figuras 33 e 34.

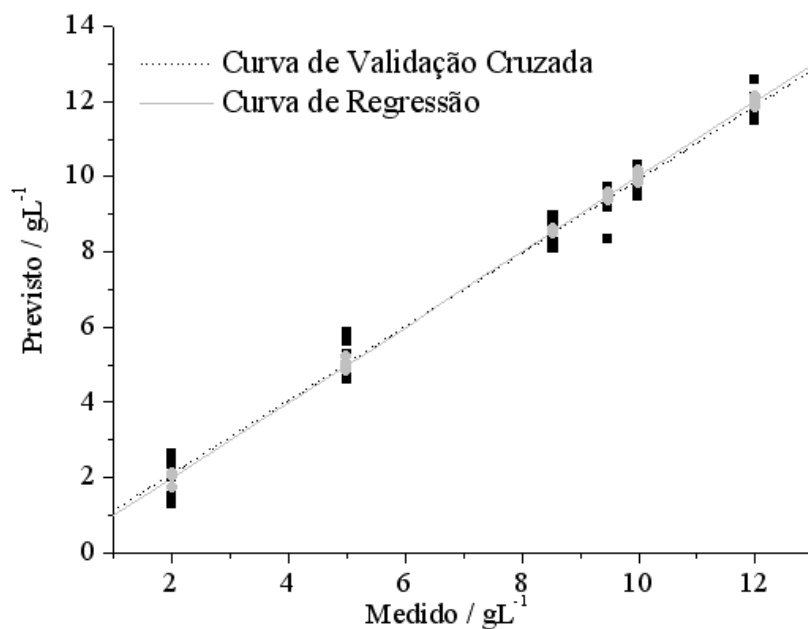


Figura 33 - PLS dos espectros de solução de frutose em suco de fruta.

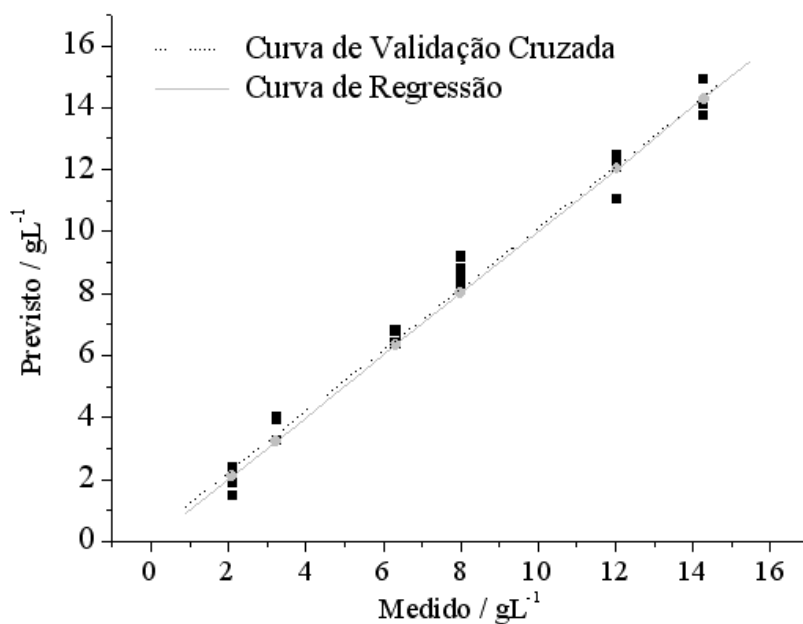


Figura 34 - PLS dos espectros de solução de glicose em suco de fruta.

Observam-se modelos muito adequados nas Figuras 33 e 34, com bons coeficientes de correlação: frutose ($R=0,994$) e glicose ($R=0,991$). Esses resultados comprovam a avaliação prévia da Figura 39, onde foi comentada a influência da concentração de açúcar na classificação dos pseudofrutos na componente principal 3. Os valores de RMSEV das regressões apresentadas se encontram na Tabela 4

Tabela 4: Valores de RMSEV e número de variáveis latentes para as determinações das concentrações de glicose, frutose e sacarose em solução de suco de fruta.

Regressão	Número de variáveis latentes	RMSEV / %
Glicose	4	1%
Frutose	1	1%

O método de Eynon-Lane foi utilizado para a determinação da concentração de frutose e glicose nos sucos e comparado com os resultados obtidos na discriminação de glicose, resultados são apresentados na Tabela 5. A determinação inicial de açúcar na solução 5% pelo método Eynon-Lane no suco de fruta foi de $1,6 (\pm 0,1) \text{ g L}^{-1}$.

Tabela 5 - Medidas da concentração de glicose e frutose pelos métodos Eynon-Lane e XRS aliado à quimiometria.

Métodos de determinação de glicose e frutose / g				T calculado*
Média Eynon-Lane	Desvio padrão	Média XRS/quimiometria	Desvio Padrão	
3	1	2,1	0,3	0,9
4	2	3,6	0,4	0,7
9	5	8,6	0,4	0,3
13	4	11,8	0,6	0,8
15	8	14,5	0,3	0,3

O método de validação utilizado foi t-student.

*T tabelado é: $T_{95\%} = 2,571$. ^[105]

XRS não possibilita a obtenção da concentração inicial de açúcares e atitulação não determina separadamente as concentrações de glicose e frutose. Por isso, para fins de comparação de resultados, na Tabela 5 é apresentada a determinação de glicose pela titulação subtraída da concentração inicial. Todos os resultados foram aprovados pelo teste-t de Student.

IV.V) CINÉTICA DE INVERSÃO DA SACAROSE

Os espectros de frutose, glicose e sacarose apresentam diferentes perfis (Figura 37), desta forma foi feito o questionamento sobre a possibilidade de acompanhar a cinética de inversão da sacarose. Os espectros da inversão da sacarose foram obtidos simultaneamente à obtenção do ângulo de rotação. Para construir a matriz de correlação foram utilizados os valores obtidos pelo método polarimétrico. A regressão é apresentada nas Figuras 35 e 36.

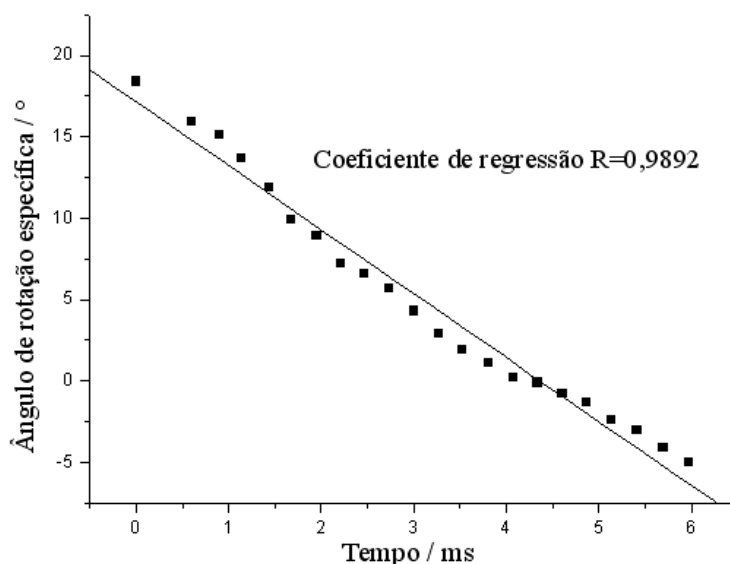


Figura 35 – Curva de cinética de inversão da sacarose pelo método polarimétrico.

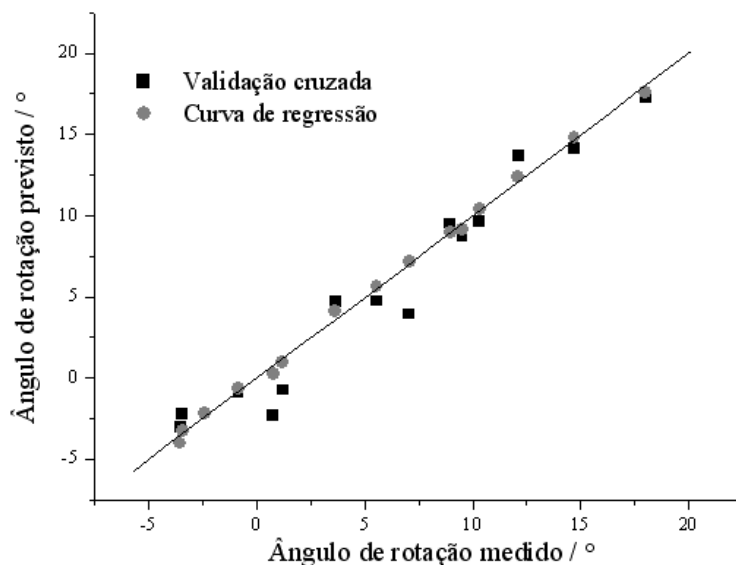


Figura 36 – PLS de cinética de inversão da sacarose por XRS aliada à quimiometria.

Tabela 6 - RMSEV e número de variáveis latentes para a cinética de inversão da sacarose.

Regressão	Número de variáveis latentes	RMSEV / %
Inversão da Sacarose	5	1,7%

A Figura 36 mostra um bom modelo para a inversão da sacarose através de XRS aliada à quimiometria, com coeficiente de correlação de 0,9767 e RMSEV apresentado na Tabela 6. Esse estudo apresenta grande potencial de aplicação futura, principalmente para a indústria alimentícia, que é um mercado produtor, comerciante e consumidor de carboidratos.

IV.VI) DISCRIMANÇÃO DE AÇÚCARES

Os espectros obtidos das soluções de manitol, sacarose, frutose, glicose e lactose (Figura 37) foram tratados com a ferramenta quimiométrica PCA, onde o gráfico de *scores* é apresentado na Figura 38.

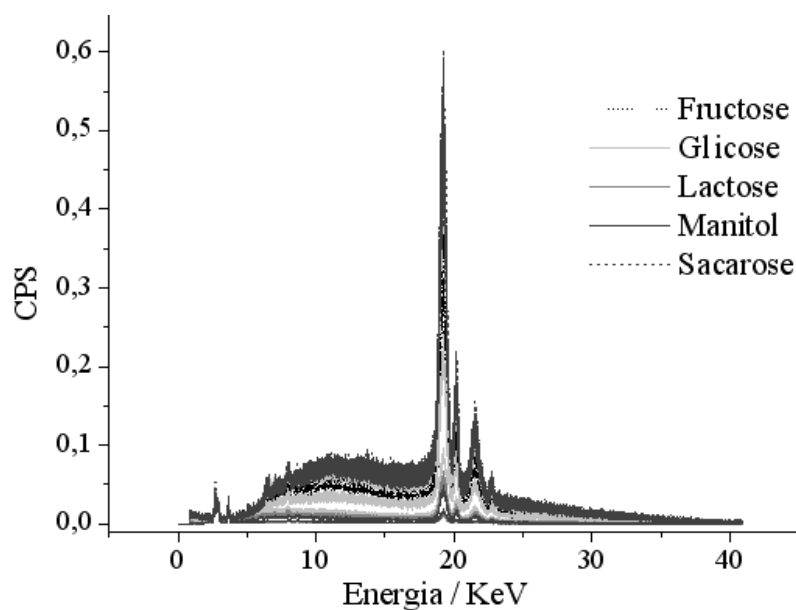


Figura 37 - Espectros sobrepostos de sacarídeos

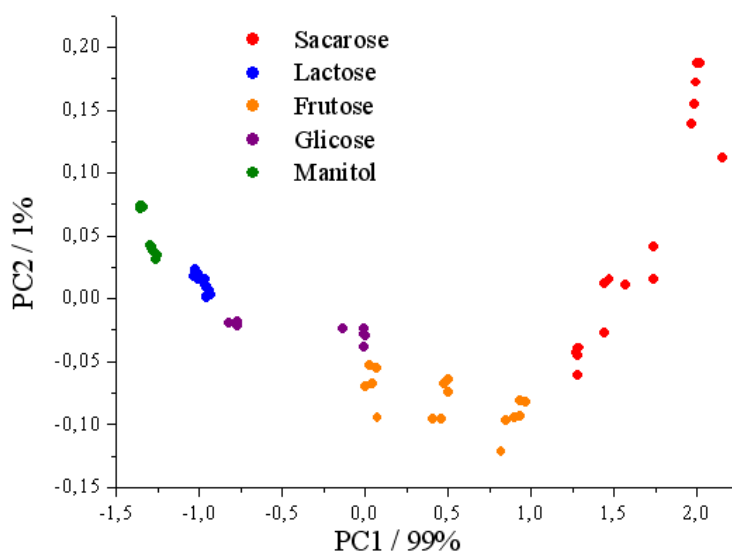


Figura 38 – Gráfico de *scores* da análise de componentes principais de espectros de carboidratos.

Com 98% de informação relatada a disposição dos diferentes açúcares observada na Figura 38 aparece de forma bem mais sutil do que na discriminação de vegetais, provavelmente por esses carboidratos possuírem

uma estrutura muito semelhante (Figura 31) de forma que as diferenças estruturais provocam menores diferenças no meio químico, sendo menos evidente nos espectros obtidos por XRS.

As diferenças estruturais das moléculas de carboidratos são relacionadas ao teor de doçura detectado nas papilas gustativas [72 à 74, 77 e 78], sabendo-se que a técnica XRS aliada à quimiometria está sendo eficiente na percepção de pequenas diferenças estruturais, foi testado XRS para avaliar algumas propriedades desses carboidratos, como é observado no item IV.VII.

IV.VII) REGRESSÃO DE DOÇURA E DE ÂNGULO DE ROTAÇÃO ESPECÍFICA DA LUZ POLARIZADA

Na regressão por PLS, a matriz de dados dos espectros foi correlacionada com o ângulo de rotação específica da luz polarizada [106] e o teor de açúcar [65], como é observado nas Figuras Figura 39 e Figura 40.

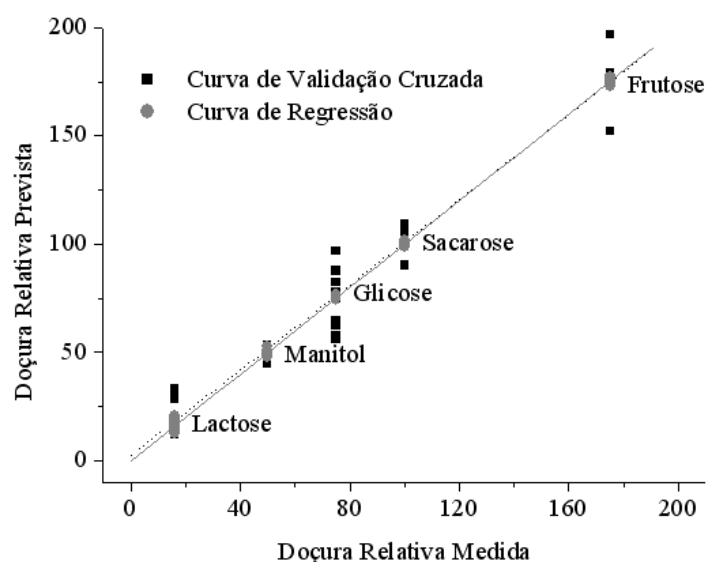


Figura 39 – Correlação entre o índice de doçura e os espectros de FRX de diferentes carboidratos.

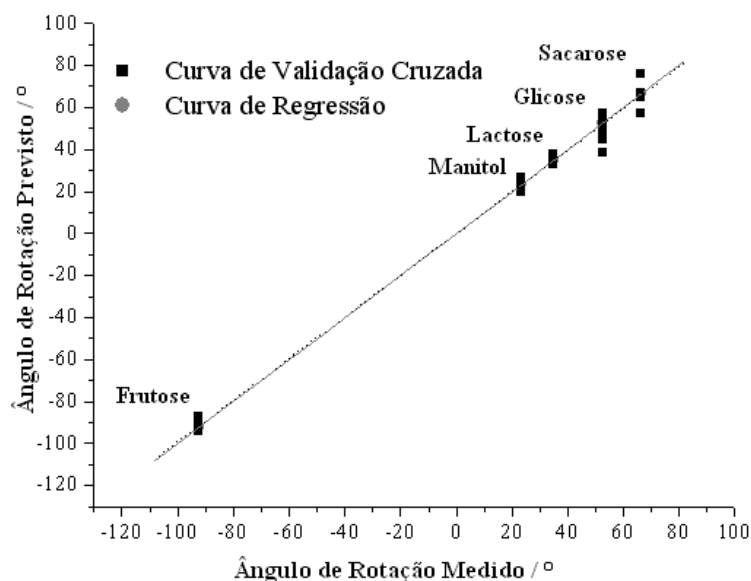


Figura 40 - Correlação entre o ângulo de rotação específico da luz polarizada e os espectros de FRX de diferentes carboidratos.

Nas Figuras 39 e 40, é verificado que duas propriedades dos açúcares diretamente relacionados à sua estrutura podem ser modelados, mesmo que a classificação desses carboidratos não tenha sido muito adequada. Na Tabela 7 são apresentados os valores de RMSEV e coeficiente de correlação para os dois modelos.

Tabela 7 – Valores dos coeficientes de correlação (CC), RMSEV e número de variáveis latentes para as regressões de índice de doçura e ângulo de rotação da luz polarizada (α_D).

Regressão	Nº de variáveis latentes	CC	RMSEV / %
Índice de Doçura	9	0,978	10
α_D	10	0,988	10

Os estudos de açúcares mostraram que é bem provável que o teor de açúcares esteja fornecendo grande influência na discriminação dos grupos de pseudofrutos, e é interessante ressaltar que esta discriminação também está

relacionada com a combinação de híbridos da espécie *M. acuminata* (A) e *M. balbisiana* (B), onde a espécie de genoma B tem a característica de produção de pseudofrutos mais doces.

V) CONCLUSÃO

Fractal

*Fractal pode ter beleza
Fractal, apesar da certeza
Fractal, ô, ô, revela beleza
Dando se tira que em todo aço,
Até no mais puro traço,
Existe um momento tal,
Existe um momento-flor
Que poderá vir a ser fractal
Traço um traço ao lado do traço
Na diagonal da diagonal
Fractal
Uma fractal pode ter beleza
Apesar da certeza
Uma fractal pode ter.
Dedico “Fractal” à bravura e
criatividade dos cientistas da
América Latina.*

César Nascimento / Ale Muniz

Como foi observado por Suzuki, Mizuno e Ohmura ^[44, 42], quando o ângulo entre a amostra e o detector é de 90°, o espalhamento dos metais é bastante reduzido; no entanto, através desse trabalho, foi observado que, para amostras orgânicas, o espalhamento provocado pelos elementos leves se torna bastante intenso e é fonte de muitas informações relacionadas a este tipo de amostras. No entanto, a variação na concentração e composição de espécies orgânicas manifesta-se nos espectros de raios-X de forma bastante tênue, e para poderem ser visualizadas e interpretadas, são necessárias ferramentas quimiométricas.

Apesar da discriminação de folhas de *Lantanas sp* ter apresentado resultados aparentemente insatisfatórios (Figuras 18, 19 e 20), isso não significa que o método não seria o mais adequado. Pelo contrário, a regressão das sementes apresentou resultados de acordo com a sua respectiva classificação taxonômica e, na Figura 22, é possível observar que as sementes de variedades da mesma espécie formam grupos, e estes, por sua vez, também podem se agrupar em gêneros.

Os resultados obtidos com o estudo de sementes e pseudofrutos confirmaram as hipóteses sobre a evolução populacional a respeito das plantas das espécies *Lantana sp*. Esses resultados somente refletiram as dificuldades de se classificar uma população em evolução ^[7 à 9 e 20], que, devido a essas características, se tornou uma das 100 piores pragas do mundo ^[9, 14 à 16 e 19].

Analisando plantas com maior semelhança, ficou bastante claro que a discriminação dos pseudofrutos segue um padrão genético. Um dos fatores relacionados à disposição das amostras está relacionado a um dos fenótipos desses pseudofrutos, ou seja, o grau de doçura (Figura 29).

Essa relação com o grau de doçura dos pseudofrutos propiciou o desenvolvimento do estudo de regressão de açúcares (Figuras 30, 31 e 32),

classificação de açúcares (Figura 38) e correlação de suas propriedades (Figura 39 e 40), que revelaram resultados interessantes, confirmando que pequenas alterações no ambiente químico onde são encontradas essas espécies podem provocar variações quase imperceptíveis nos espectros, mas tratáveis por quimiometria.

Os coeficientes de correlação para as determinações de concentração de açúcares em soluções de sacarose, frutose e glicose, tanto na solução aquosa quanto em suco, mostraram que a técnica XRS aliada a quimiometria diferencia alterações de concentração desses açúcares, que são substâncias orgânicas, mesmo em matrizes orgânicas bastante complexas.

As discriminações de vegetais pela técnica de espectrometria de raios-X aliada a quimiometria também mostra resultados bastante satisfatórios. Considerando que é uma aplicação recente de XRS, a potencialidade que a mesma demonstra com essas poucas análises indica que se tem muito ainda a explorar nesta área.

Vale ressaltar também as vantagens de se realizar análises rápidas, sem necessitar de controle de temperatura durante as medidas (como em NIR), sem geração de resíduos e o custo de análise ser relativamente baixo, principalmente em relação ao dispêndio de reagentes. Além disso, como a técnica de FRX se estabeleceu como uma ferramenta de análise de inorgânicos, ela tem a potencialidade de ser universal, dada a comprovação de também se tornar possível, em estudos mais avançados, classificar e quantificar orgânicos, de forma simultânea.

VI) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A Ciência em si

*Se toda coincidência
Tende a que se entenda
E toda lenda
Quer chegar aqui
A ciência não se aprende
A ciência apreende
A ciência em si
Se toda estrela cadente
Cai pra fazer sentido
E todo mito
Quer ter carne aqui
A ciência não se ensina
A ciência insemina
A ciência em si
Se o que pode ver, ouvir, pegar, medir,
 pesar
Do avião a jato ao jaboti
Desperta o que ainda não, não se pôde
 pensar
Do sono eterno ao eterno devir
Como a órbita da Terra abraça o
 vácuo devagar
Para alcançar o que já estava aqui
Se a crença quer se materializar
Tanto quanto a experiência quer se
 abstrair
A ciência não avança
A ciência alcança
A ciência em si.*

Gilberto Gil / Arnaldo Antunes

- [1] Mauseth, J.D.. **Botany an Introduction to Plant Biology**. 2^a ed. Massachusetts: Jones And Bartlett Publishers, 1998.
- [2] Bold, H.C. **O Reino Vegetal**.. São Paulo: Edgar Blücher Ltda, 1988.
- [3] Blackwelder, R.E.. **Taxonomy: Text and Reference Book**. New York: Wiley, 1967.
- [4] Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellog, E.A.; Stevens, P.F.. **Plant Systematics – A Phylogenetic Approach**. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.
- [5] Stuessy, T.F.. **Plant Taxonomy – The Systematic Evaluation of Comparative Data**. New York: Columbia University, 1990.
- [6] United States Department of Agriculture: Natural Resource Conservation Service. **Plants Database**. Disponível em: <<http://plants.usda.gov/>>. Acesso em 11/10/2006.
- [7] Brandão, A.D.. **Citogenética Comparativa dos Gêneros Lippia, Lantana e Aloysia (Verbenaceae, Lamiales)**. 2003. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas / SP.
- [8] Cronquist A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants** 2nd ed.. New York: The New York Botanical Garden, 1988.
- [9] Ghisalberti, E.L.. *Lantana camara* L (Verbenaceae). **Fitoterapia**. Elsevier; 71:467-486, 2000.
- [10] ISSG Global Invasive Species Database. Disponível em: <<http://www.issg.org/database>>. Acesso em 11/08/2006.
- [11] Department of Biology of Missouri State University. Disponível em <<http://biology.missouristate.edu/>> .Acesso em 11/10/2006.
- [12] Singing Springs Nursery. Disponível em <<http://www.singingspringsnursery.com/page4.html>>. Acesso em 11/10/2006.

- [13] Botanypictures. Disponível em <www.botanypictures.com>. Acesso em 11/10/06.
- [14] Day, M.D.; Naser S.. Factors Influencing the Biological Control of *Lantana camara* in Australia and South Africa. In: **Proceedings of X International Symposium on Biological Control of Weeds**. 1999. Montana State University, Bozeman. 897-908.
- [15] Pereira, J.M., Barreto, R.W.. Additions to the Mycobiota of the Weed *Lantana camara* (Verbenaceae) in Southeastern Brazil. **Mycopathology**. 151: 71-80, 2000.
- [16] Brito, M.F.; Tokarnia, C.H.; Dobereiner, J. A Toxidez de Diversas Lantanas para Bovinos e Ovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 24(3): 153-159, 2004
- [17] Thomas, S.E.; Ellison, C.A.. A Century of Classical Biological Control of *Lantana camara*: Can Pathogens Make a Significant Difference? In: **Proceedings of X International Symposium on Biological Control of Weeds**. 1999. Montana State University, Bozeman. 97-104.
- [18] Sharma, G.P.; Raghubanshi A.S.; Singh, J.S.. Lantana Invasions: an Overview. **Weed Biology and Management**. 5: 157-165, 2005.
- [19] Lorenzi, H.; et all. **Manual de Identificação e Controle de Plantas Daninhas**. 5^a ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2000.
- [20] Rice, E.L.. **Allelopathy**. Orlando: Academic press, 1984.
- [21] Rodal, M.J.N; Sales, M.F.; Silva, M.J.da; Silva, A.G.da. Flora de um Brejo de Flora de um Brejo de Altitude na Escarpa Oriental do Planalto da Borborema, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. 19(4): 843-858, 2005
- [22] Broughton, S.. Review and Evaluation of Lantana Biocontrol Programs **Biological Control**. 17: 272-286, 2000.
- [23] Lorenzi, H.; Souza, H.M.. **Plantas Ornamentais no Brasil: Arbustivas, Herbáceas e Trepadeiras** 2^a ed, Nova Odessa: Instituto Plantarum de estudo da Flora, 1999.

- [24] New Ulm Seed Company. Disponível em <newulmseedcompany.tripod.com> Acesso 11/10/2006.
- [25] American Meadows Wildflowers Information Lookup <<http://www.wildflowerinformation.org/default.asp>> Acesso em 11/10/2006
- [26] Catalogo Online Aggiornato. Disponível em: <<http://www.planta.it/>> Acesso em 11/10/2006
- [27] Horticulture Study Guide for Youth. Disponível em: <www.hort.cornell.edu>. Acesso em 11/10/2006.
- [28] Wildflower Center. Disponível em: <www.wildflower2.org>. Acesso em:11/10/2006.
- [29] Daniells, J.; Jenny, C.; Karamura, D.; Tomekpe, K.. **Musalogue: a Catalogue of *Musa* Germplasm Diversity**. 2^a ed, Rome: IPGRI, 2001.
- [30] Carvalho, M.L.; Pimentel, A.C.; Fernandes, B.. Study of Heavy Metals in Wild Edible Mushrooms Under Different Pollution Conditions by X-ray Fluorescence Spectrometry. **Analytical Sciences**. 21 (7): 747-750, 2005.
- [31] Bueno, M.I.M.S; Amaral, L.C.. X-ray Fluorescence Determination of Absorbed Copper on Activated Charcoal after Glycerin Complexation. **Quimica Nova**. 21 (4): 434-436, 1998.
- [32] Schimidt, F.; Cornejo-Ponce, L.; Bueno, M.I.M.S.; et al. Determination of Some Rare Earth Elements by EDXRF and Artificial Neural Networks. **X-ray Spectrometry**. 32 (6): 423-427, 2003.
- [33] Twining, B.S.; Baines, S.B.; Fisher, N.S.; et al. Quantification and Localization of trace Metals in Natural Plankton Cells Using a Synchrotron X-ray Fluorescence Microprobe. **Journal de Physique IV**. 104: 435-438, 2003.
- [34] Rämö, J.; Sillanpää, M.; Klasila, T.; Piepponen, S.. Determination of Mn, Fe, Cu in Chemically-Treated Wood Pulps by the XRF Addition Method. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**. 370: 1105-1108, 2001.

- [35] Aslan, I.; Budak, G.; Karabulut, A.; Tirasoglu, E.. Determination of K, Ca, Fe and Ni in *Leptinotarsa docemlineata* (say) by EDXRF Spectroscopy. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**. 97: 75-80, 2006.
- [36] Carvalho, M.L.; Brito, J.; Barreiros, M.A.. X-ray Fluorescence Spectrometry: Applications in Trace Elements Studies in Human Tissue from Patients with Cirrhosis. **X-Ray Spectrometry**. 27 (3): 198-204, 1998.
- [37] Araújo, M.F.; Barros, L.; Teixeira, A.C.; Melo, A.A.. EDXRF Study of Artefacts from Quinta do Almaraz (Cacilhas, Portugal). **Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Sect B: Beam Interactions with Materials and Atoms**. 213: 741-746, 2004.
- [38] Skoog, D.A.; Leary, J.J.. **Principles of Instrumental Analysis**. 4th ed. Philadelphia: Saunders, 1992.
- [39] Jenkins, R.; **X-Ray Fluorescence Spectrometry**. 2nd ed. New York: Wiley, 1999.
- [40] Van Gysel, M.; Lemberge, P.; Van Espen, P.. Description of Compton Peaks in Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence Spectra. **X-Ray Spectrometry**. 32:139-147, 2002.
- [41] Compton, A.H.. The Corpuscular Properties of Light. **Physical Review Supplement**. 1: 74-89, 1929.
- [42] Mizuno, Y.; Ohmura, Y.. Theory of X-Ray Raman Scattering. **Journal of the Physical Society of Japan**. 22: 445-449, 1967.
- [43] Raman, C.V.; Krishnan, K.S.. A New Type of Secondary Radiation. **Nature**. 121: 501-502, 1928.
- [44] Suzuki, T.. X-Ray Raman Scattering: Experiment I. **Journal of the Physical Society of Japan**. 22: 1139-1150, 1967.
- [45] Bortoleto, G.C.; Pataca, L.C.M.; Bueno, M.I.M.S.. A New Application of X-Ray Scattering Using Principal Components Analysis – Classification of Vegetables Oils. **Analytica Chimica Acta**. 539: 283-287, 2005.

- [46] Verbi, F.M.; Pereira Filho, E.R.; Bueno, M.I.M.S.. Use of X-Ray Scattering for Studies with Organic Compounds: A Case Study Using Paints. **Microchimica Acta** 150: 131-136, 2005.
- [47] Bueno, M.I.M.S.; Castro, M.T.P.O.; Souza, A.M.; Oliveira, E.B.S.; Teixeira, A.P.. X-Ray Scattering Process and Chemometrics for Differentiating Complex Samples Using Conventional EDXRF Equipment. **Chemometrics Intelligent Laboratory Systems**. 78: 96-102, 2005.
- [48] Suzuki, T.; Kishimoto, T.; Suzuki, T..X-Ray Raman Scattering II: Experiment with Cr K α Radiation. **Journal of the Physical Society of Japan**. 29: 730-736, 1970.
- [49] Kazuyuki, T.; Udagawa, Y.. Novel Approach Structure Analysis by X-Ray Raman Scattering. **Physical Review B: Condensed Matter and Materials Physics**. 36: 9410-9412, 1987.
- [50] Schramm, R.. Chemometrics methods in energy dispersive fluorescence. **Analytica Chimica Acta**. 420:197-203, 2000.
- [51] Vázquez, C.; Boeykens S.; Bonadeo, H.. Total Reflection X-ray Fluorecence Polymer Spectra: Classification by taxonomy statistic tools. **Talanta**. 57:1113-1117, 2002.
- [52] Atkins, P.; Paula, J. de.. **Físico-Química**. 7^a ed. Rio de Janeiro: LTC, V2, 2004.
- [53] Pearson, K.. On Lines and Planes of Closest Fit. **Philosophical Magazine**. 2:559-572, 1901.
- [54] Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P.. Principal Component Analysis. **Chemometrics Intelligent Laboratory Systems**. 2:37-52, 1987.
- [55] Ferreira, M.M.C.; Antunes, A;M.; Melgo, M.S.; Volpe, P.L.O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. **Química. Nova**. 22:724-731, 1999.
- [56] Wold, S.. Cross-Validation Estimation of Number of Components in Factor and Principal Components Models. **Technometrics**. 20: 397-405, 1978.

- [57] Sjöström, M.; Kowalski, B.R.. A Comparison of Five Pattern Recognition Methods Based on the Classification Results from Six Real data Bases. **Analytica Chimica Acta**. 112:11-30, 1979.
- [58] Malinowski, F.; Howery, D.. **Factor Analysis in Chemistry**. New York: Wiley, 1980.
- [59] Geladi, P.; Kowalski, B.R.. Partial Least Square Regression: a Tutorial. **Analytica Chimica Acta**. 185: 1-17, 1986
- [60] Eriksson, L.; Trygg, J.; Johansson, E.; Bro, R.; Wold, S.. Orthogonal Signal Correction, Wavelet Analysis, and Multivariate Calibration of Complicated Process Fluorescence Data. **Analytica Chimica Acta** 420: 181-195, 2000.
- [61] Faber, K.; Kowalski, B.R.. Improved prediction error estimates for multivariate calibration by correcting for the measurement error in the reference values. **Applied Spectroscopy**. 51:660-665, 1997.
- [62] Martens, H.; Naes, T.. **Multivariate Calibration**. Chichester: Wiley, 1993.
- [63] Bobbio, F.O.; Bobbio, P.A.. **Introdução à Química de Alimentos**. 2^a ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992.
- [64] Bobbio, F.O.; Bobbio, P.A.. **Química do Processamento de Alimentos**. Campinas, Fundação Cargil, 1984.
- [65] Sackheim, G.I.; Lehman, D.D.. **Química e Bioquímica para Ciências Biomédicas**. Tradução de Luiz Carlos Carrera. Barueri: Manole, 2001. Título Original: Chemistry for the Health Sciences. 8^a ed.
- [66] Bobbio, F.O.; Bobbio, P.A.. **Manual de Laboratório de Química de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1995.
- [67] Lane, H.; Eynon, L.. Determination of Reducing Sugars by Means of Fehling's Solution with Methylene Blue as Internal Indicator. **Journal of the Society of Chemistry Industry**. 42: 32T-37T, 1923.
- [68] Lane, H.; Eynon, L.. The Influence of Alkaline Earths on Determination of Reducing Sugar by Fehling's Solution. **Journal of the Society of Chemistry Industry**. 42: 144T-146T, 1923.

- [69] Lane, H; Eynon, L.. Clarification of Sugar Products Prior to the Determination of Reducing Sugar. **Journal of the Society of Chemistry Industry**. 42: 463T-466T, 1923.
- [70] Couteur, L.; Burreson, J.. **Napoleon's Buttons**. Jeremy P. Tarcher/Putnam: New York, 2003.
- [71] Solomons, T.W.; Fryle, C.B.. **Organic Chemistry**. 7th ed., LTC, Rio de Janeiro, 2000.
- [72] Shallenberger, R.S.. Sweetness Theory an Its Application the Food Industry. **Food Technology**. 52: 72–76, 1998.
- [73] Eggers, S.C.; Acree, T.E.; ShallenbergerR.S.. Sweetness Chemoreception Theory and Sweetness Transduction. **Food Chemistry**. 68: 45-49, 2000.
- [74] Shallenberger, R.S.; Wiene W.J.. Carbohidrate Stereochemistry. **Journal of Chemical Education**. 66: 67–73, 1989.
- [75] Shallenberger, R.S.. Intrinsic chemistry of fructose. **Pure and Applied Chemistry**. 50: 1409–1420, 1978.
- [76] Shallenberger, R.S.; Robinson, R.B.; Labelle R.L.; Hand D.B.; Moyer, J.C.. Hidrogen bonding and varying sweetness of sugars. **Journal of Food Science**. 28: 584–590, 1963.
- [77] Birch, G.G.; Brennan, G.G.; Parker, K.J.. **Sensory Properties of Foods**. Applied Science Publishers LTD, London, p 67, 1977.
- [78] Kier, L.B..Molecular theory of sweet taste. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 61: 1394–1397, 1972.
- [79] Scott, K.. Taste recognition: food for thought. **Neuron**. 48: 455–464, 2005.
- [80] Hamamichi, R.; Asano-Miyoshi, M.; Emori, Y.. Taste Bud Contains both Short-Lived and Log-Lived Cell Populations. **Neuroscience**. 141: 2129–2138, 2006.
- [81] Drayna, D. Human Taste Genetics. **Annual Review Genomics and Human Genetics**. 6: 217–235, 2005.

- [82] Teixeira, E.; Meinert, E.M.; Barbeta, P.A.. **Análise Sensorial de Alimentos**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1987.
- [83] Kitagawa, M.; Kusakabe, Y.; Miura, H.; Ninomiya, Y.; Hino, A.. Molecular Genetic Identification of Candidate Receptor Gene for Sweet Taste. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 283: 236–242, 2001.
- [84] Hoon, M.A.; Adler, E.; Lindemeier, J.; Battey, J.F.; Ryba, N.J.B.; Zuker, C.S.. Putative Mammalian Taste Receptors: a Class of Taste-Specific GPCRs With Distinct Topographic Selectivity. **Cell**. 96: 541–551, 1999.
- [85] Li, X.; Staszewski, L.; Xu, H.; Durick, K.; Zoller, M.; Adler, E.. Humam Receptors for Sweetand Umami Taste. **Proceedings of National Academy of Sciences of the Unitate States of America**. 99: 4092–4096, 2002.
- [86] Bradbury, J.. Taste Perception: Cracking the Code. **Public Library of Science Biology**. 2: 295–297, 2004
- [87] Max, M.; Shanker, Y.G.; Huang, L.; Rong, M.; Liu, Z.; Campagne, F.; Weinstein, H.; Darnak, S.; Margolskee, R.F.. Tas1R3, Encoding a New Candidate Taste Receptor, Is Allelic to The Sweet Responsiveness Locus Sac. **Nature Genetics**. 28: 58–63, 2001.
- [88] Bachmanov, A.A.; Li, X.; Reed, D.R.; Ohmen, J.D.; Li, S.; Chen, Z.; Tordoff, M.G.; Jong, P.J.; Wu, C.; West, D.B.; Chatterjee, A.; Ross, D.A.; Beauchamp, G.K.. Positional Cloning of The Mouse Saccharin Preference (Sac) Locus. **Chemical Senses**. 26: 925–933, 2001.
- [89] Sainz, E.; Korley, J.N.; Battey, J.F.; Sullivan, S.L.. J. Identification of Novel Member of the T1R Family of Putative Taste Receptors. **Journal of Neurochemistry**. 77: 896–903, 2001
- [90] Nelson, G.; Hoon, M.A.; Chandrashekar, J.; Zhang, Y.; Ryba, N.J.B.; Zuker, C.S.. Mammalian Sweet Taste Receptors. **Cell**. 106: 381–390, 2001.

- [91] Montmayeur, J.P.; Liberles, S.D.; Matsunami, H.; Buck, L.B.. A Candidate Taste Receptor Gene Near a Sweet Taste Locus. **Nature Neuroscience**. 4: 492–498, 2001.
- [92] Calviño, A.; Garrido, D.; Drunday, F.; Tamasi, O.. A Comparison of Methods for Monitoring Individual Performances in Taste Selection Tests. **Journal of Sensory Studies**. 20: 301–312, 2005.
- [93] Sorensen, L.K.; Jepsen, R.. Assessment of Sensory Properties of Cheese by Near-Infrared Spectroscopy. **International Dairy Journal**. 8: 863–871, 1998.
- [94] de Belie, N.; Pedersen, D.K.; Martens, M.; Bro, R.; Munck, L.; de Baerdemaeker, J..The Use of Visible and Near-Infrared Reflectance Measurements to Assess Sensory Changes in Carrot Texture and Sweetness During Heat Treatment. **Biosystems Engineering**. 85: 213–225, 2003.
- [95] Jhal, S.N.; Matsuoka, T.. Non-Destructive Determination of Acid-Brix Ratio of Tomato Juice Using Near-Infrared Spectroscopy. **International Journal of Food Science and Technology**. 39: 425–430, 2004.
- [96] Temma, T.; Hanamatsu, K.; Shinoki, F.. Measuring the Sugar Content of Apples and Apple Juice by Nearinfrared Spectroscopy. **Optical Review**. 9: 40–44, 2002
- [97] Esteban-Díez, I.; González-Sáiz, J.M.; Pizarro, C..GA-ACE: Alternating Conditional Expectations Regresión with Selection of Significant Predictors by Genetic Algorithms. **Analytica Chimica Acta**. 525: 171–182, 2004
- [98] Disponível em: Telalviv University’s Website. <<http://www.tau.ac.il/~phchlab/experiments/Sucrose/Sucrose.htm>> Acesso em: 27/09/2006
- [99] Lide, D.R.. **Handbook of Chemistry and Physics**. Boca Raton: College Edition, 1996.
- [100] Shoemaker, D.P.; Garland, C.W.; Nibler, J.W.. **Experiments in Physical Chemistry**. McGraw-Hill: Boston, 1996.

- [101] Luo, L.. Chemometrics and its application to X-ray spectrometry. **X-ray Spectrometry**. 35:215-225, 2006.
- [102] Ferreira, M. M. C.; Teófilo, R. F.. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**. 29: 338-350, 2006.
- [103] Li, B.; Morris, J.; Martin, E. B.. Model selection for partial least squares regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. 24: 69-89, 2002.
- [104] Braga, J. W. B.; Poppi, R. J.. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de de carbamazepina por espectrometria no infra-vermelho próximo. **Química Nova**. 27:1004-1011, 2004.
- [105] Miller, J.C.; Miller, J.N., **Statistics for Analytical Chemistry**. Ellis Horwood, 3° ed, 1993.
- [106] Weast, R.C.; Selby, S.M.; Hodgman, C.D. - Editors in Chief. **Handbook of Chemistry and Physics**. The Chemical Rubber CO., 45th edition, C-671, 1964.

As Cismas do Destino

*A universal complexidade é que Ela
Compreende. E se, por vezes, se divide,
Mesmo ainda assim, seu todo não reside
No quociente isolado da parcela!*

Augusto dos Anjos