



**Universidade de Brasília**

**Instituto de Química**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

***Análise exploratória de espécies de madeiras tropicais por  
medidas de fluorescência e resolução de curvas multivariadas***

*Natasha Neiva Moura*

***Orientador***

*Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga*

**Brasília, 2013.**



**Universidade de Brasília**

**Instituto de Química**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

***Análise exploratória de espécies de madeiras tropicais por medidas de fluorescência e resolução de curvas multivariadas***

*Natasha Neiva Moura*

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestre em Química.*

***Orientador***

*Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga*

**Brasília, 2013.**

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho a minha mãe, Tancy de Maria Neiva Moura. Obrigada por seu amor, carinho, companheirismo e por ser muito mais que uma mãe, por ser uma amiga e um exemplo. Obrigado pelo apoio e torcida durante toda a trajetória.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente a Deus, por me dar forças, coragem e me proteger durante toda essa caminhada em busca dos meus objetivos;*

*Aos meus pais, Tancy de Maria Neiva Moura e Jonival Moura Guedes por toda a dedicação, amor incondicional, por me orientarem a ser uma pessoa melhor a cada dia e por todo o apoio sempre;*

*A minha irmã, Nayara Neiva Moura, por compartilhar as angústias e correrias que a Universidade proporciona e pelo apoio nos momentos difíceis;*

*Ao meu namorado, Felipe Gomes Neves por todo carinho, paciência, dedicação, compreensão e incentivo. Obrigada pelo apoio e amor que demonstra por mim, por me proporcionar tantas alegrias e sorrisos, e por me ajudar a enfrentar os problemas que apareceram no caminho;*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga, por toda a paciência, pelos ensinamentos, atenção, dedicação, amizade, incentivo e apoio sempre. Posso afirmar que eu não teria escolhido orientador melhor;*

*Ao Laboratório de Produtos Florestais, pelo apoio e disponibilização das amostras de madeira utilizadas neste trabalho. Um agradecimento especial as pesquisadoras Dra. Tereza C. M. Pastore, Dra. Vera T. R. Coradin e M.Sc. José A. A. Camargos por todo o apoio, carinho, paciência e ensinamentos durante todo o projeto;*

*Ao Dr. Alex Wiedenholf do Forest Products Laboratory, Madison (USA) pela cessão de algumas amostras de madeiras.*

*Ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, pela oportunidade em me especializar;*

*Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica, pelo apoio financeiro;*

*A minha madrinha Ieda Guedes, minhas amigas Karinne Batista Domingues, Alana Oliveira, Sabrina Paulino, Mayara Araújo, Juliana Viana, Karolina Paiva, Leyna Gimena, Roberta Cruz, Dani Couto, Nayara Lazzari, meus primos e amigos Bruno Guedes e Brenda Guedes que entenderam minhas ausências, furos e sempre me incentivaram. Obrigada por todo o carinho e força durante toda minha vida;*

*Aos amigos lindos do grupo AQQUA. Como são muitos, sinto que citar nomes seria injusto. Todos fizeram parte da minha vida, sofreram comigo, me ensinaram, apoiaram e ajudaram sempre que precisei. Obrigada pelas gargalhadas, pelo incentivo, amizade e por fazer com que os meus dias na UnB fossem mais alegres e descontraídos;*

*Aos amigos da UnB Diego Arantes, Guilherme Matos, André Felipe Amaral, Hécio Almeida, Fernanda Sampaio, por estarem por perto desde a graduação, pelo incentivo, pelas conversas e risadas e pelo carinho;*

*A todos que, de alguma forma colaboraram ao longo do trabalho, meu sincero obrigado.*

## RESUMO

A madeira é uma matéria prima utilizada para construir estruturas e para fins energéticos desde os primórdios da humanidade. Nesse sentido, a identificação e caracterização da madeira é de extrema importância, pois conforme suas características pode ser utilizada para diferentes fins. Os principais métodos de identificação e classificação são o anatômico convencional e os que utilizam métodos físico-químicos, tais como: determinação de propriedades físicas, espectroscopia no infravermelho ou fluorescência molecular. No entanto, os métodos tradicionais utilizam critérios subjetivos para avaliar a fluorescência. Medidas mais precisas para análises qualitativas e quantitativas da fluorescência molecular são pouco estudadas. Deste modo, esse trabalho teve como objetivo principal realizar um estudo exploratório de 16 espécies de madeiras tropicais através da fluorescência. A fluorescência foi adquirida em três diferentes condições: corpos-de-prova, serragem, e extrato de madeiras em diferentes solventes. Além da madeira, foram utilizados padrões de celulose e lignina para comparações e foram estudadas as influências da oxidação da superfície, da face da madeira utilizada (radial, tangencial e transversal) e da orientação da madeira em uma mesma face (vertical ou horizontal) na intensidade de fluorescência. Foram obtidos espectros de excitação (200 a 550 nm) e emissão (210 a 700 nm). A partir do método de resolução de curvas multivariadas (MCR) foram obtidas estimativas dos espectros de emissão e excitação dos componentes fluorescentes das madeiras estudadas. Alterando a face, a orientação da madeira ou ambos, as intensidades de fluorescência variaram, pois a distribuição dos componentes da madeira (celulose, lignina e extrativos) é diferente em cada face ou orientação. A utilização do MCR (Resolução de Curvas Multivariadas) possibilitou que fossem feitas comparações entre as espécies, pois estimou espectros de excitação e emissão da madeira que, em alguns casos, foram similares. Estas similaridades podem significar que os mesmos fluoróforos estejam presentes em diferentes espécies de madeira. Além disso, os extratos feitos com três solventes distintos (água, diclorometano e etanol) através do método de extração proposto permitiram comparações e a identificação de similaridades entre as espécies.

## **ABSTRACT**

Wood is a raw material used to build structures and for energy purposes since the beginnings of humanity. For that reason, the identification and characterization of the wood is very important, since according to their characteristics it can be used for different purposes. The main identification and classification methods are the conventional anatomic characterization and physicochemical methods, such as determination of physico-chemical properties, infrared spectroscopy and molecular fluorescence. However, anatomic methods presents subjective criterions to evaluate the fluorescence. Accurate measurements for qualitative and quantitative analysis of the molecular fluorescence have received little attention. Therefore, this work expected to realize an exploratory study of the fluorescence of tropical woods. Fluorescence was acquired in three different conditions of wood: sawdust, small blocks and its extracts in different solvents. In addition, standards of lignin and cellulose were used for comparison. Additionally, the influence of the surface oxidation, the face used (radial, tangential and transverse) and the orientation of the wood surface in the same face (vertical or horizontal) in fluorescence intensity were also studied. Excitation (200 to 550 nm) and emission (210 nm to 700 nm) spectra were obtained. Excitation and emission spectra of the fluorescent wood components were studied by the method of multivariate curve resolution (MCR) estimations. Changing the face, the orientation of the wood or both, fluorescence intensities varied because the distribution of the wood components (cellulose, lignin and extractives) is different on each face or orientation. The use MCR (Multivariate curve resolution) enabled comparisons between species through the estimated excitation and emission spectra of the wood, which in some cases were similar. These similarities can mean that these fluorophores are present in different species of timber. Besides, extracts made with three different solvents (water, ethanol and dichloromethane) via the extraction method proposed allowed comparisons and identification of similarities between species.

## ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	MADEIRA.....	17
2.1.1	Estrutura, composição química e principais componentes da madeira .....	17
2.1.2	A análise da madeira por Fluorescência.....	21
2.2	ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA MOLECULAR .....	28
2.2.1	Variáveis que afetam a fluorescência .....	30
2.3	ESPALHAMENTOS RAYLEIGH E RAMAN.....	32
2.3.1	Origens dos espalhamentos Rayleigh e Raman .....	33
2.4	Resolução de Curvas Multivariadas (MCR).....	34
3	PARTE EXPERIMENTAL .....	40
3.1	Obtenção e caracterização das amostras.....	40
3.2	Preparo das amostras.....	41
3.3	Análise por fluorescência .....	43
3.3.1	Acessório para análise de sólido .....	45
3.3.2	Acessório para análise de extrato .....	47
3.4	Análise de dados.....	48
3.4.1	Análise dos dados de fluorescência em corpos de prova e em serragem utilizando MCR .....	48
3.4.2	Análise dos dados de fluorescência em extrato utilizando MCR .....	49
3.4.3	Análise dos dados de fluorescência em madeira para a estimativa da cor utilizando análise RGB.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
4.1	Estudo da preparação da superfície da madeira e da influência das faces de corte para a obtenção das medidas de fluorescência.....	52
4.2	Análise da fluorescência da madeira em corpos de prova de diferentes espécies	62
4.3	Análise da fluorescência da madeira em forma de serragem de diferentes espécies .....	74
4.4	Análise da fluorescência de extratos de madeira .....	77
4.5	Estimativa da cor da fluorescência em madeira utilizando análise RGB .....	89
5	CONCLUSÕES.....	97
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Foto de um disco de madeira retirado da espécie <i>Roupala montana</i> . A imagem mostra as diferenças existentes nos três sentidos de orientação de corte: (1) transversal; (2) radial e (3) tangencial.....	18
<b>Figura 2.</b> Estruturas químicas da (1) celulose; (2) as estruturas das poliooses, (3) alcoóis precursores da lignina <sup>1</sup> (continua).....	19
<b>Figura 3.</b> Ilustração de alguns métodos não-destrutivos utilizados para a análise e caracterização de madeira. ....	28
<b>Figura 4.</b> Esquema do funcionamento de um espectrofluorímetro .....	29
<b>Figura 5.</b> Estruturas de compostos (1) fluoreno e (2) bifenil. <sup>8</sup> .....	31
<b>Figura 6.</b> Ilustração dos mecanismos de espalhamento (a) Stokes; (b) Rayleigh; (c) Anti-Stokes. <sup>19</sup> .....	34
<b>Figura 7.</b> Ilustração do modo em que as análises por MCR são realizadas (A) com uma amostra (B) com mais de uma amostra. ....	36
<b>Figura 8.</b> Representação gráfica dos passos utilizados pelo modelo matemático para a análise com MCR. ....	37
<b>Figura 9.</b> Esquema que retrata o procedimento de extração.....	43
<b>Figura 10.</b> Equipamentos utilizados no trabalho (A) Espectrofluorímetro Varian (B) Gabinete de Fluorescência Prodicil. ....	44
<b>Figura 11.</b> Acessório para análise dos corpos de prova (1) regulagem de distância; (2) regulagem do ângulo e (3) regulagem de altura. ....	46
<b>Figura 12.</b> Acessório para análise da serragem. (1) partes que compõem o acessório (a), (b) e (c); (2) junção das partes (a) e (b); (3) acessório montado e (4) acessório encaixado no equipamento.....	47
<b>Figura 13.</b> Acessório empregado para análise de extratos.....	48
<b>Figura 14.</b> Esquema de como foi realizada a estimativa da cor através dos resultados experimentais.....	50
<b>Figura 15.</b> Varredura nos espectros de emissão e excitação utilizando as regiões de excitação e de emissão 200-550 nm e 210-700 nm, respectivamente.....	52
<b>Figura 16.</b> Intervalo de excitação entre 230-550 nm onde a madeira possui baixa ou nenhuma fluorescência .....	53
<b>Figura 17.</b> Espectros em curvas de nível da região menos energética da espécie <i>Couratari multiflora</i> sem correção do espalhamento.....	54
<b>Figura 18.</b> Espectros da região menos energética da amostra <i>Couratari multiflora</i> : (A) sem correção dos espalhamentos Rayleigh e Raman e (B) com correção do espalhamento.....	55
<b>Figura 19.</b> Espectro 3D de fluorescência para a região mais energética da amostra <i>Couratari multiflora</i> .....	55
<b>Figura 20.</b> Espectro de emissão da lignina (—), da celulose (—) e da espécie <i>Ocotea fragrantissima</i> (—, —, —) na região mais energética com excitação de 218 nm. ....	57

<b>Figura 21.</b> Espectros de emissão relacionados a região menos energética (A) e mais energética (B), excitado em 380 nm e 218 nm, respectivamente, de três espécies: (—) <i>Ocotea fragrantissima</i> , (----) <i>Amburana acreana</i> e (—) <i>Dinizia excelsa</i> .....	58
<b>Figura 22.</b> Vista parcial da face transversal da espécie <i>Roupala montana</i> .....	59
<b>Figura 23.</b> Vista parcial da face tangencial da espécie <i>Roupala montana</i> .....	60
<b>Figura 24.</b> Vista parcial da face radial da espécie <i>Roupala montana</i> .....	60
<b>Figura 25.</b> Espectros de emissão de 480 a 588 nm de duas espécies de madeira esgotadas. (A) <i>Euxylophora paraensis</i> e (B) <i>Amburana acreana</i> .....	62
<b>Figura 26.</b> Espectros de emissão de todas as espécies com excitação em 218nm.....	63
<b>Figura 27.</b> Superfícies de fluorescência para as espécies (A) <i>Euxylophora paraensis</i> ; (B) <i>Rhus typina</i> ; (C) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> , com os espalhamentos corrigidos. ....	64
<b>Figura 28.</b> Espectros de curvas de nível (a direita) e de emissão (a esquerda) das espécies (A) <i>Euxylophora paraensis</i> ; (B) <i>Dinizia excelsa</i> ; (C) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> ; (D) <i>Caryocar glabrum</i> .....	66
<b>Figura 29.</b> Espectros de emissão dos três componentes presentes nas diferentes espécies do gênero <i>Couratari</i> , sendo elas (A) <i>Couratari multiflora</i> ; (B) <i>Couratari stellata</i> ; (C) <i>Couratari macrosperma</i> ; (D) <i>Couratari oblongifolia</i> e (E) <i>Couratari guianensis</i> .....	70
<b>Figura 30.</b> Superfície de fluorescência das espécies de (A) <i>Amburana cearensis</i> e (B) <i>Amburana acreana</i> .....	71
<b>Figura 31.</b> Orientações horizontal (A) e vertical (B) e espectros de emissão das faces (C) radial e (E) transversal da espécie <i>Euxylophora paraensis</i> , sendo 0-3 com a direção da amostra na posição horizontal e 3-6 na posição vertical. Espectros de excitação das faces (D) radial e(F); transversal (—) Componente 1 e (—) Componente 2. ....	72
<b>Figura 32.</b> Espectros de emissão de duas espécies de madeira uma em forma de corpo de prova e outra em forma de serragem, excitandos em um comprimento de onda de excitação de 218 nm.....	75
<b>Figura 33.</b> Espectros em curvas de nível de quatro espécies de madeiras. Os espectros a esquerda são de corpos-de-prova e os espectros a direita são de serragem: (A) <i>Euxylophora paraensis</i> ; (B) <i>Ocotea fragrantissima</i> ; (C) <i>Parkia pendula</i> e (D) <i>Amburana acreana</i> .....	76
<b>Figura 34.</b> Superfície de fluorescência em curvas de nível para os extratos de seis espécies florestais em água. (A) <i>Euxylophora paraensis</i> ; (B) <i>Ocotea fragrantissima</i> ; (C) <i>Parkia pendula</i> ; (D) <i>Parkia multijuga</i> ; (E) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> e (F) <i>Vochysia máxima</i> .....	78
<b>Figura 35.</b> Espectros de emissão do extrato de seis espécies em água obtidos por MCR. (A) <i>Euxylophora paraensis</i> ; (B) <i>Ocotea fragrantissima</i> ; (C) <i>Parkia pendula</i> ; (D) <i>Parkia multijuga</i> ; (E) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> e (F) <i>Vochysia maxima</i> . As letras minúsculas retratam componentes diferentes. ....	79
<b>Figura 36.</b> Espectros de excitação do extrato de seis espécies em água obtidos por MCR. (A) <i>Euxylophora paraensis</i> ; (B) <i>Ocotea fragrantissima</i> ; (C) <i>Parkia pendula</i> ; (D)	

<i>Parkia multijuga</i> ; (E) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> e (F) <i>Vochysia maxima</i> . As letras minúsculas retratam componentes diferentes. ....	80
<b>Figura 37.</b> Espectros em curvas de nível do extrato de seis espécies em diclorometano. (A) <i>Euxylophora paraensis</i> ; (B) <i>Ocotea fragrantissima</i> ; (C) <i>Parkia pendula</i> ; (D) <i>Parkia multijuga</i> ; (E) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> e (F) <i>Vochysia maxima</i> . ....	82
<b>Figura 38.</b> Espectros de emissão do extrato de seis espécies em diclorometano obtidos por MCR. (A) <i>Euxylophora paraensis</i> ; (B) <i>Ocotea fragrantissima</i> ; (C) <i>Parkia pendula</i> ; (D) <i>Parkia multijuga</i> ; (E) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> e (F) <i>Vochysia maxima</i> . As letras minúsculas retratam componentes diferentes. ....	83
<b>Figura 39.</b> Espectros de excitação do extrato de seis espécies em diclorometano obtidos por MCR. (A) <i>Euxylophora paraensis</i> ; (B) <i>Ocotea fragrantissima</i> ; (C) <i>Parkia pendula</i> ; (D) <i>Parkia multijuga</i> ; (E) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> e (F) <i>Vochysia maxima</i> . As letras minúsculas retratam componentes diferentes. ....	84
<b>Figura 40.</b> Espectros em curvas de nível do extrato de seis espécies em etanol. (A) <i>Euxylophora paraensis</i> ; (B) <i>Ocotea fragrantissima</i> ; (C) <i>Parkia pendula</i> ; (D) <i>Parkia multijuga</i> ; (E) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> e (F) <i>Vochysia maxima</i> . ....	86
<b>Figura 41.</b> Espectros de emissão do extrato de seis espécies em etanol obtidos por MCR. (A) <i>Euxylophora paraensis</i> ; (B) <i>Ocotea fragrantissima</i> ; (C) <i>Parkia pendula</i> ; (D) <i>Parkia multijuga</i> ; (E) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> e (F) <i>Vochysia maxima</i> . As letras minúsculas retratam componentes diferentes. ....	87
<b>Figura 42.</b> Espectros de excitação do extrato de seis espécies em etanol obtidos por MCR. (A) <i>Euxylophora paraensis</i> ; (B) <i>Ocotea fragrantissima</i> ; (C) <i>Parkia pendula</i> ; (D) <i>Parkia multijuga</i> ; (E) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> e (F) <i>Vochysia maxima</i> . As letras minúsculas retratam componentes diferentes. ....	88
<b>Figura 43.</b> Fotos do gabinete de fluorescência do LPF – Laboratório de Produtos Florestais.....	90
<b>Figura 44.</b> Soma dos espectros de emissão de cada espécie. (—) <i>Euxylophora paraensis</i> , (—) <i>Rhus typina</i> , (—) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> , (—) <i>Vochysia maxima</i> , (—) <i>Parkia pendula</i> ,(—) <i>Parkia multijuga</i> , (— —) <i>Couratari oblongifolia</i> , (— —) <i>Couratari guianensis</i> , (— —) <i>Couratari macrosperma</i> , (— —) <i>Couratari multiflora</i> , (— —) <i>Couratari stellata</i> ,(— —) <i>Amburana acreana</i> , (— • —) <i>Amburana cearensis</i> , (— • —) <i>Ocotea fragrantissima</i> (— • —) <i>Dinizia excelsa</i> . ....	92
<b>Figura 45.</b> Distribuição das amostras de acordo com seus componentes azul e vermelho.....	94
<b>Figura 46.</b> Cores resultantes da análise RGB (1) <i>Euxylophora paraensis</i> , (2) <i>Rhus typina</i> , (3) <i>Hymenolobium pulcherrimum</i> , (4) <i>Vochysia maxima</i> , (5) <i>Parkia pendula</i> ,(6) <i>Parkia multijuga</i> , (7) <i>Couratari oblongifolia</i> , (8) <i>Couratari guianensis</i> , (9) <i>Couratari macrosperma</i> , (10) <i>Couratari multiflora</i> , (11) <i>Couratari stellata</i> ,(12) <i>Amburana acrean</i> , (13) <i>Amburana cearensis</i> , (14) <i>Ocotea fragrantissima</i> e (15) <i>Dinizia excelsa</i> .....	95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estimativa da Composição Média de Madeiras de Coníferas e Folhosas <sup>1</sup> .....	18
<b>Tabela 2.</b> Exemplos de métodos de extração ou destilação a vácuo e extrativos extraídos utilizados para análise química de madeira <sup>1</sup> .....	21
<b>Tabela 3.</b> Informações sobre os nomes científicos e nomes populares das amostras estudadas.....	41
<b>Tabela 4.</b> Grupos formados para a análise de fluorescência de acordo com o MCR ....	65
<b>Tabela 5.</b> Resultados obtidos para as intensidades relativas (R) de fluorescência dos componentes 1 e 2, apresentados na figura 31.....	73
<b>Tabela 6.</b> Distribuição dos componentes /fluoróforos existentes em cada espécie extraídos com água tamponada a pH 7.....	81
<b>Tabela 7.</b> Distribuição dos componentes/fluoróforos existentes em cada espécie extraídos com diclorometano .....	85
<b>Tabela 8.</b> Distribuição dos componentes/fluoróforos existentes em cada espécie extraídos com diclorometano .....	89
<b>Tabela 9.</b> Espécies de madeiras utilizadas na análise e as cores observadas no gabinete de fluorescência.....	91

# **Introdução e Objetivos**

# 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A madeira é um dos materiais mais conhecidos e utilizados desde a antiguidade e a identificação correta de cada espécie faz com que a madeira possa ser utilizada de forma correta, dependendo de suas características e sua finalidade.<sup>1,2</sup> A identificação e caracterização de madeiras permite obter informações sobre diversas propriedades físicas, químicas, mecânicas e anatômicas além de propiciar a utilização da madeira de forma adequada. Adicionalmente, permite a detecção de enganos na identificação e até mesmo fraudes no comércio e na exploração de madeira.<sup>3</sup>

Apesar da evolução dos métodos de análise química, o principal método para a identificação de madeira ainda é o método botânico, que consiste na utilização de características anatômicas baseadas na observação de flores, frutos e folhas das árvores. Os botânicos também utilizam propriedades organolépticas como cor, cheiro ou textura. Todavia, existem espécies que apresentam propriedades muito semelhantes, que causam dúvidas ou mesmo erros de identificação. Além disso, é comum a busca do nome científico correspondente a um nome popular na literatura específica, sendo que estes nomes variam muito de acordo com a região, proporcionando uma outra fonte de incerteza para a identificação da espécie.<sup>3</sup> Considerando todos os possíveis problemas, têm-se proposto e difundido o uso de métodos ópticos de análise baseados em espectroscopia,<sup>4</sup> por fornecerem resultados confiáveis<sup>3</sup> na identificação de afinidades taxonômicas,<sup>5</sup> ou seja, na identificação de características comuns nas espécies.

Dentre os diversos métodos de análise conhecidos, a fluorescência de madeiras pode ser considerada uma ferramenta útil para a identificação e caracterização de madeiras.<sup>4,5,6</sup> Contudo, não são encontrados muitos trabalhos de análise de madeira na literatura que abordem a fluorescência, apesar de ser um método rápido, não destrutivo e muito sensível.<sup>7,8</sup> Além disso, a maioria dos estudos é focado nas cores observadas visualmente, apenas com o auxílio de uma lâmpada ultravioleta (UV)<sup>4,5,6,</sup> e até o momento

não foram encontrados trabalhos que utilizem padrões para a análise ou detalhem o método utilizado para a preparação das amostras.

A presente dissertação de mestrado teve como seu objetivo principal fazer uma análise exploratória da fluorescência molecular em madeira e utilizar o método de resolução multivariada de curvas (MCR, do inglês “Multivariate Curve Resolution”), realizando deconvolução de sinais com o objetivo de identificar similaridades entre as espécies e estimar a origem da fluorescência em madeira.

Outro objetivo foi estabelecer parâmetros para as medidas de fluorescência na madeira em estado sólido e em seus extratos. Dessa forma, definindo parâmetros como massa de amostra utilizada para a extração, a faixa de comprimento de onda em que a madeira fluoresce, quais os solventes proporcionam uma melhor extração, qual face de orientação de corte é a mais recomendada para análises no espectrofluorímetro e a influência da utilização de lixas antes da análise.

Além disso, foi avaliada a possibilidade de utilizar a fluorescência para separar amostras de espécies diferentes ou da mesma família, além de investigar se a cor da fluorescência observada originalmente pode ser estimada a partir de resultados experimentais utilizando o espectrofluorímetro.

Por fim, pretendeu-se investigar qual é o componente ou os componentes responsáveis pela fluorescência em madeira, identificando se as emissões são originadas da lignina, da celulose, de ambas ou dos extrativos presentes na madeira.

Todas estas considerações visaram fazer com que a fluorescência seja um método complementar na identificação de madeira, facilitando, assim, a discriminação de espécies que apresentem essa característica.

# **Revisão Bibliográfica**

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

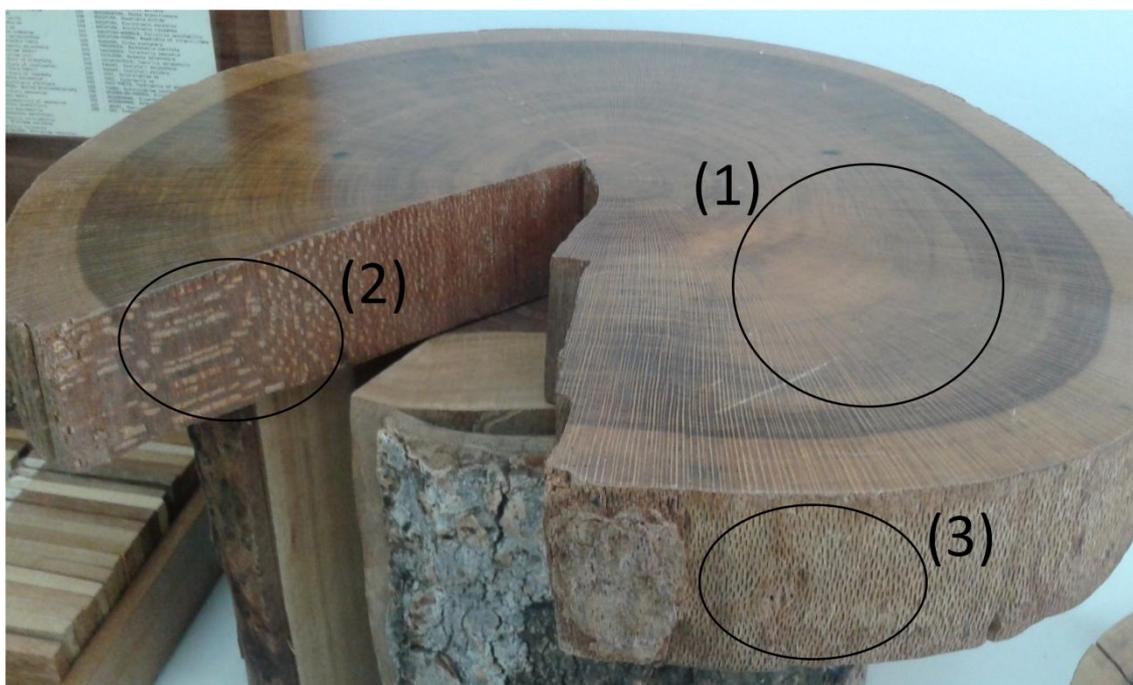
### 2.1 MADEIRA

#### 2.1.1 Estrutura, composição química e principais componentes da madeira

Várias substâncias que compõem o lenho da madeira são empregadas como matéria prima em diversos campos da tecnologia.<sup>2</sup> As polpas de celulose, por exemplo, atualmente são o produto de conversão química da madeira mais importante.<sup>9</sup> Além de ser um recurso renovável por natureza, a madeira tem a vantagem de após cumprir sua função poder ser transformada em seus componentes básicos e ser aproveitada em outros processos. Assim, a madeira é também uma matéria prima reciclável.<sup>2</sup>

Sendo um material biológico e heterogêneo, a madeira possui uma grande variabilidade estrutural e química. A quantidade e a forma com que são distribuídos seus componentes (macroscópicos e microscópicos) define sua estrutura e a torna um material complexo, poroso e com diferentes características em seus dois sentidos de crescimento: transversal e longitudinal (radial e tangencial).<sup>2</sup> A Figura 1 mostra os diferentes sentidos de crescimento da espécie *Roupala montana*.

De acordo com Klock et al. e Fengel et al. a composição química básica da madeira não apresenta grande variação entre espécies, sendo composta basicamente de carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O) e pequenas quantidades de nitrogênio (N) . Algumas substâncias minerais também podem ser encontradas. Contudo, é importante destacar que dentro de uma mesma espécie podem ser encontradas variações nesses componentes básicos devido ao clima e solo da região de plantio, idade da árvore, etc. A Tabela 1 mostra um exemplo de como podem ser divididos os constituintes na madeira.<sup>1,2</sup>



**Figura 1.** Foto de um disco de madeira retirado da espécie *Roupala montana*. A imagem mostra as diferenças existentes nos três sentidos de orientação de corte: (1) transversal; (2) radial e (3) tangencial

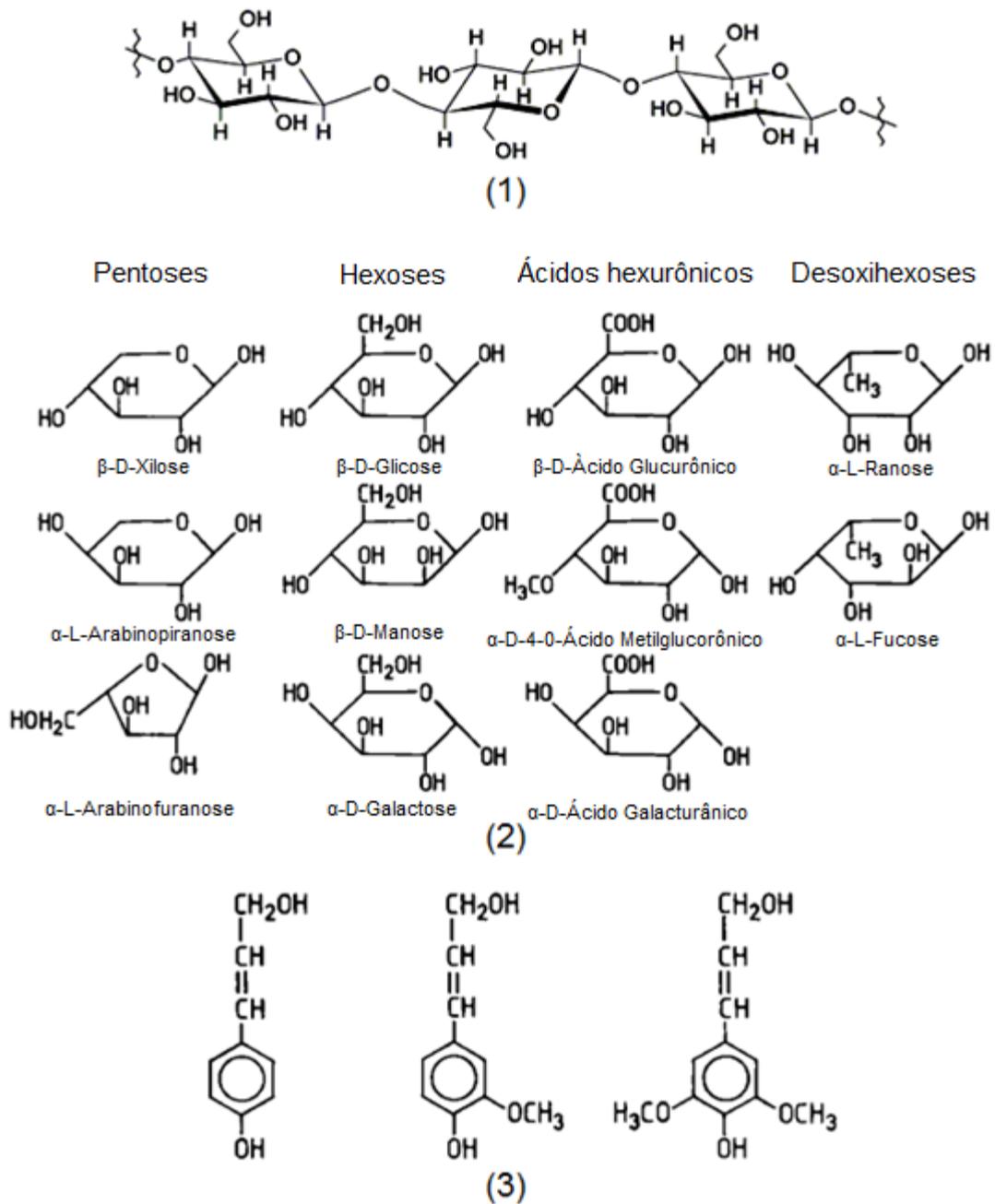
**Tabela 1.** Estimativa da Composição Média de Madeiras de Coníferas e Folhosas<sup>1</sup>

Constituinte	Coníferas (% g/g)	Folhosas (% g/g)
<b>Celulose</b>	42 ± 2	45 ± 2
<b>Polioses</b>	27 ± 2	30 ± 5
<b>Lignina</b>	28 ± 2	20 ± 4
<b>Extrativos</b>	5 ± 3	3 ± 2

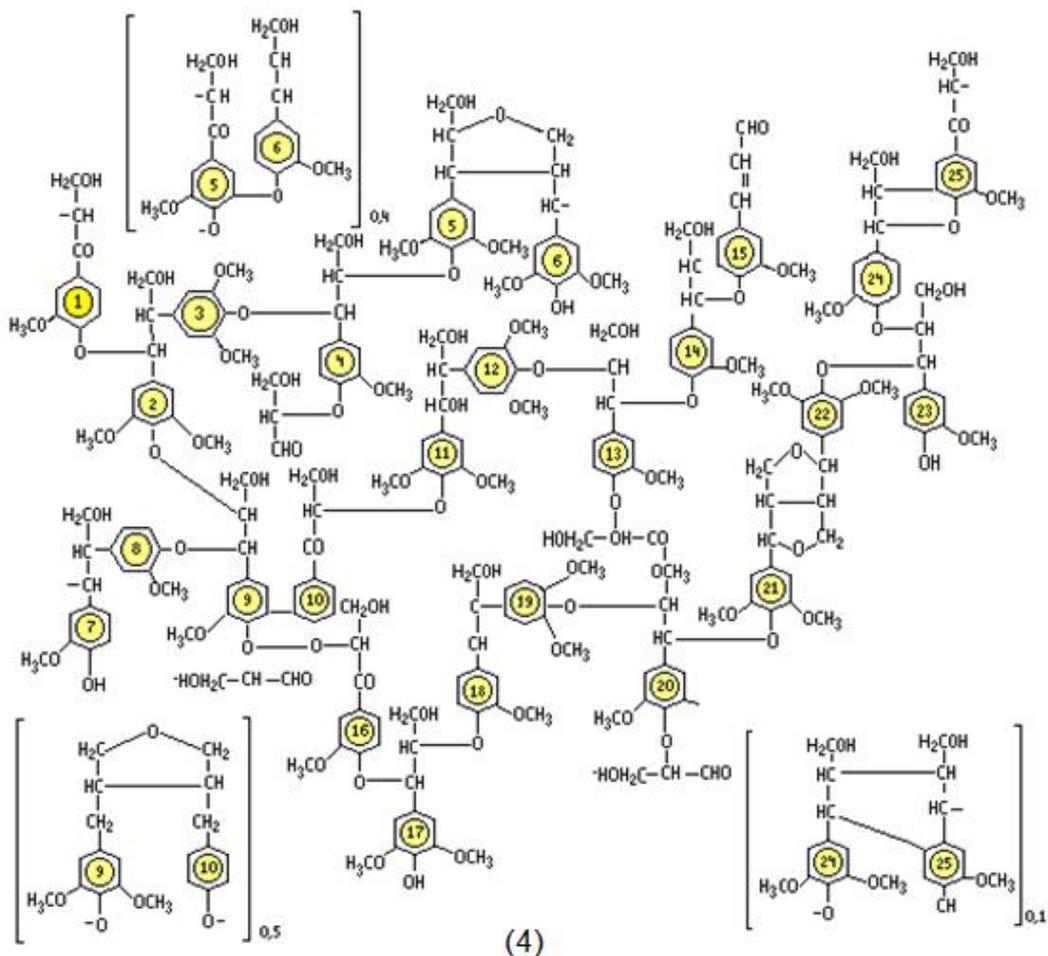
É importante ressaltar que na tabela 1 é mostrada a composição média para espécies de clima temperado. No Brasil, as proporções dos constituintes pode apresentar uma quantidade de extrativos muito superior à apresentada na tabela 1, podendo chegar a proporção de 17%.<sup>10</sup>

Pode-se observar na tabela 1 que a celulose é o componente majoritário, sendo um polímero linear de alto peso molecular, constituído unicamente por  $\beta$ -

D-glucose (figura 2.1) e pode ser considerado o principal componente da parede celular dos vegetais.<sup>1,2</sup>



**Figura 2.** Estruturas químicas da (1) celulose; (2) as estruturas das poliozes, (3) alcoóis precursores da lignina<sup>1</sup> (continua)



**Figura 2.** (Continuação) Estrutura química da (4) Lignina - Esquema estrutural da lignina da angiosperma *Fagus sylvatica* proposto por Nimz (Lewin e Goldstein, 1991).

As polioses (ou hemiceluloses) também compõem a parede celular, sendo constituídas por 5 açúcares neutros: as hexoses (glucose, manose e galactose) e as pentoses (xilose e arabinose). As polioses (Figura 2.2) são cadeias moleculares bem menores que as de celulose, possuindo ou não ramificações e grupos laterais.<sup>1,2</sup>

Outro componente estrutural importante é a lignina. A lignina é formada por um sistema aromático composto de unidades de fenilpropano (Figura 2.3). É incorporada na parede celular durante o desenvolvimento das células, fortalecendo-as e enrijecendo-as.<sup>1,2</sup>

Os extrativos são diversos compostos químicos que representam uma menor percentagem da composição total da madeira em relação a lignina e a celulose. Para sua análise, devem ser isolados utilizando métodos de extração ou destilação a vácuo como exemplificado na Tabela 2.<sup>1,2</sup>

**Tabela 2.** Exemplos de métodos de extração ou destilação a vácuo e extrativos extraídos utilizados para análise química de madeira<sup>1</sup>

<b>Extração</b>		<b>Grupos Principais</b>	<b>Subgrupos</b>	<b>Substâncias Individuais</b>
<b>Destilação a vácuo</b>	<b>a</b>	Terpenos, fenóis, hidrocarbonos, lignanas	Monoterpenos, sesquiterpenos, di, tri, tetraterpenos, politerpenos	Conifeno, careno, limoneno, pineno, borneol
<b>Éter</b>		Ácidos graxos, óleos, gorduras, ceras, resinas, ácidos resinosos, esteróis	Ácidos graxos não saturados, ácidos graxos saturados	Ácido oléico, ácido linoléico
<b>Extração alcoólica</b>		Pigmentos coloridos, flobafenos, taninos, estilbenos	Flavonóides, antociaminas	Taxifolin, quercetin
<b>Extração água</b>	<b>com</b>	Carboidratos, proteínas, alcalóides, matéria inorgânica	Monosacarídeos, amido, material péptico, cátions e ânions	Arabinose, galactose, rafitone, Ca, K, Mg, Na, Fe

### 2.1.2 A análise da madeira por Fluorescência

Existem poucos estudos relacionados à fluorescência em madeira<sup>1</sup>, contudo, existem diversos trabalhos direcionados as polpas de celulose.<sup>4, 11,12</sup> As maiores diferenças entre as polpas ricas em lignina e a madeira podem ser atribuídas aos cromóforos presentes no papel gerados no seu processo de produção e refinamento.<sup>13</sup>

A lignina é considerada responsável pela fluorescência do papel, por ser um polímero complexo e possuir potenciais grupos fotoativos.<sup>9, 14</sup> Entretanto, alguns autores sugerem que a celulose também contribui expressivamente para a emissão de fluorescência, sendo que a lignina ou alguns de seus componentes podem agir como supressores da fluorescência ou serem fonte de emissão de fluorescência.<sup>12</sup>

Dentre os trabalhos encontrados, é importante ressaltar que apenas o trabalho de Pandey et. al. menciona que alguns dos sinais de fluorescência são causados por compostos presentes nos extratos em metanol e atribui alguns dos sinais a lignina e a celulose.<sup>4</sup> Os outros dois trabalhos não atribuem este fenômeno aos extrativos presentes nas amostras, mas sim a lignina<sup>11</sup> ou a celulose<sup>12</sup> separadamente. Sendo assim, é possível perceber que não há um consenso em relação a qual composto ou grupo de compostos é responsável pela fluorescência das polpas e, conseqüentemente, da madeira.

As análises de fluorescência em madeira seguem basicamente duas estratégias. A maioria dos estudos está relacionado a utilização de lâmpadas de UV em câmaras escuras onde o pesquisador julga a fluorescência de acordo com a sua capacidade visual, sendo uma medida subjetiva.<sup>3,5,6,15,16</sup> Estudos objetivos da fluorescência utilizando espectrofluorímetros, foram descritos apenas em poucos trabalhos.<sup>4,11,12</sup>

O comitê da Associação Internacional de Anatomistas de Madeira (IAWA, do inglês International Association of Wood Anatomists) listou diversos procedimentos para serem seguidos para realizar análise de fluorescência em madeira. Se forem utilizados pedaços de madeira, é necessário remover algumas aparas da superfície com uma faca para expor a mesma. Posteriormente, a superfície exposta é colocada a uma distância de aproximadamente 10 cm de uma lâmpada UV em uma câmara escura. A fluorescência que o analista enxerga pode variar de amarelada para esverdeada, apesar de algumas espécies demonstrarem nuances de laranja e rosa. Se a amostra parecer azul ou roxa, a mesma não é considerada fluorescente, pois essas cores são atribuídas a reflexão da luz UV. Um exemplo desse tipo de interferência por reflexão pode ser observado em

algumas espécies que possuem o cerne amarelado e parecem fluorescentes por causa da reflexão. Vários fatores podem influenciar ou afetar a análise de madeira por fluorescência, tais como exposição a altas temperaturas, apodrecimento da madeira ou condições ambientais extremas.<sup>17</sup>

Se a análise de fluorescência for feita com extrato em água, a mesma deve ser destilada e estar tamponada a pH 6,86. Caso o extrato seja alcoólico, deve ser utilizado etanol 95%. Para ambos, aparas de madeira são retiradas e colocadas juntamente com o solvente em um vial (pequeno frasco que pode ser substituído por um tubo de ensaio com tampa). Em seguida é necessária uma agitação vigorosa de 10 a 15 segundos. Por fim, os vials são colocados sob a luz UV. A fluorescência observada nessas condições geralmente é azulada, e algumas vezes esverdeada.<sup>17</sup>

A seguir são apresentados alguns trabalhos que ilustram a utilização da fluorescência utilizando lâmpadas UV e câmaras escuras para as análises de diferentes espécies de madeira.

Avella et al.<sup>15</sup> investigaram a fluorescência de 10.610 espécies da madeira de madeiras da coleção da Xiloteca de Tervuren, Bélgica. Os testes foram conduzidos utilizando procedimento descrito no manual da IAWA<sup>17</sup>, sendo diferente apenas em relação ao posicionamento da superfície recém-lixada da madeira. Em vez de 10 cm, a madeira foi posicionada a 25 cm da lâmpada UV em uma sala fracamente iluminada. Quando possível, era utilizada mais de uma amostra de uma mesma espécie para certificar que a fluorescência não era devido a fatores alheios a análise ou a heterogeneidade da amostra. Os autores concluíram que 1.237 espécies eram nitidamente fluorescentes (12% do total examinado) e 2.272 outras possuíam fluorescência de baixa intensidade (21%). É importante ressaltar que os autores não atribuíram a fluorescência violeta à reflexão da lâmpada UV. Sendo assim, amostras com a cor de violeta foram consideradas fluorescentes.<sup>15</sup>

Em 1988, Dyer<sup>16</sup> publicou um trabalho onde investigou a fluorescência de árvores nativas da África do Sul. Foram avaliadas 179 espécies representando 108 gêneros e 46 famílias. No procedimento realizado a superfície que foi colocada sob a luz UV deveria estar fresca (como anteriormente) e as amostras

foram classificadas como fluorescentes e não fluorescentes. As cores de fluorescência observadas nas amostras foram amarelo, verde, roxo, laranja e azul. Todas as espécies analisadas apresentaram fluorescência. Testes com extrato em água e etanol também foram realizados de acordo com o procedimento proposto pela IAWA<sup>17</sup>. As cores de fluorescência observadas em extratos aquosos e alcoólicos foram azul, verde, amarela e roxa. O autor concluiu que a fluorescência provou ser válida para auxiliar no processo de identificação das espécies de madeira.<sup>16</sup>

Miller<sup>5</sup> observou cerca de 50.000 espécimes da coleção de madeira do Laboratório de Produtos Florestais de Wisconsin sob uma luz UV em câmara escura. Além de seguir o procedimento que a IAWA<sup>17</sup> determina, o autor usou espécimes que foram cortadas, lixadas ou raspadas para expor uma superfície fresca. As observações aconteceram em uma sala fracamente iluminada e várias pessoas, após olharem os espécimes fluorescentes, foram questionadas a respeito da cor e da intensidade emitida. Todos esses cuidados foram utilizados a fim de tentar diminuir a subjetividade das observações. Nesse trabalho fluorescência foi classificada como muito forte ou muito brilhante, forte ou positiva e fraca. A fluorescência amarelada, com tons de verde ou esverdeada é considerada fluorescência normal. A fluorescência azulada ou arroxeadada não foi entendida como fluorescência, e sim como a reflexão da luz UV a partir da superfície da madeira.<sup>5</sup>

Miller et al. cita um exemplo de como a fluorescência pode ser útil para diminuir dúvidas no processo de identificação de madeiras. O autor compara duas espécies da América do Norte que possuem visualmente uma grande semelhança. As espécies *Robinia pseudoacacia* (“black locust”) e as espécies *Morus alba* e *Morus rubra* (“white” e “red mulberry” respectivamente) são muito parecidas a olho nu, mas medindo a fluorescência, nota-se que a “black locust” tem uma fluorescência amarela brilhante e as “mulberries” não são fluorescentes.<sup>5</sup>

Guzmán et al.<sup>6</sup> analisaram 579 amostras de madeira do México atribuídos a 92 gêneros e pertencentes a 40 famílias. Novamente a análise seguiu os padrões da IAWA<sup>17</sup> com pequenas modificações. Neste estudo, foram

analisadas diferentes faces de uma mesma amostra (face transversal e faces longitudinais). As amostras foram classificadas como fluorescentes e não fluorescentes. Foram estudados também os extratos em água e etanol. A fluorescência variou principalmente em tons de azul e verde e mais raramente amarelo e laranja. Os autores afirmam que a fluorescência pode ajudar a resolver problemas relacionados a discriminação de madeiras com aparência similar e que a maioria dos laboratórios de anatomia utilizam esta técnica, mas os resultados são raramente publicados.<sup>6</sup>

No trabalho desenvolvido por Teixeira<sup>3</sup> foram analisadas amostras de madeira de duas fontes: parte das amostras foi cedida por uma madeireira de Campo Grande (RJ) e a outra parte foi fornecida pela xiloteca do Laboratório de Anatomia e Qualidade da Madeira do Departamento de Produtos Florestais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foram utilizadas 4 replicatas (amostras diferentes da mesma espécie) para proporcionar mais confiabilidade aos resultados. Todas as amostras foram expostas a radiação UV com comprimento de onda de 365 nm em uma câmara escura. As superfícies foram recém raspadas antes de serem colocadas sob a radiação. A fluorescência observada variou de esverdeada para amarelada. A autora considera a fluorescência violeta.<sup>3</sup>

Em seu trabalho, Teixeira<sup>3</sup> apresenta uma tabela contendo o nome científico, o nome popular, a família, a cor da fluorescência emitida e a intensidade da fluorescência (forte e fraco). A autora também destaca que a fluorescência pode ser afetada por diversos fatores tais como exposição a altas temperaturas, exposição a condições ambientais extremas, dentre outros.

Pode-se considerar que existam diversas espécies comuns nos trabalhos de todos os autores citados anteriormente e que provavelmente a caracterização da cor ou intensidade da fluorescência seja diferente. Essa incerteza se deve a interpretação do que é ou não fluorescente ser subjetiva e determinante para a caracterização. Outros fatores também podem influenciar nessas diferenças tais como a disponibilidade de espécimes nas coleções, a fonte de radiação UV utilizada, a identificação errada de determinada espécie, mudanças taxonômicas de nome, dentre outros.

Além de técnicas que utilizam as lâmpadas UV, existem diversas técnicas óticas baseadas, como a espectroscopia na região do infravermelho, que vêm sendo largamente utilizadas para estudos da identificação dos constituintes da madeira, identificação de madeira degradada ou não, dentre outros.<sup>16</sup> Considerando que a espectroscopia de fluorescência possui alta sensibilidade, esta pode ser utilizada eficientemente para a determinação de pequenas quantidades de substâncias químicas.<sup>7,8</sup> Além disso, a utilização de um equipamento, possibilita uma medida da intensidade de emissão livre de observações subjetivas. A seguir são apresentados alguns trabalhos que utilizam espectrofluorímetros para a análise da madeira em suas diferentes formas: sólida (lascas), em pó ou extratos.

Pandey et al.<sup>4</sup> realizaram um estudo com blocos sólidos de madeira, pó e extrato em metanol de algumas espécies coletadas no Instituto de Ciência e Tecnologia da Madeira, na Índia. O pó foi prensado entre dois pratos de quartzo para que fosse feita a análise e os extratos foram preparados com a adição do pó em metanol seguido por aquecimento lento, resfriamento a temperatura ambiente, filtração e posterior leitura. Foram obtidos vários espectros de diferentes espécies. Os autores indicam no artigo que os espectros em lascas e em pó apresentam o mesmo comportamento, mas os espectros das lascas de madeira não foram apresentados no trabalho para comparação. Com um  $\lambda_{ex}$  de 375 nm, o espectro de emissão obtido apresentou dois máximos, um em 440 nm e o outro em 540 nm. Considerando que os extrativos são apenas uma pequena parte da madeira, estas bandas foram atribuídos pelos autores, respectivamente, como a celulose e lignina. Os autores ainda indicam que os espectros obtidos em lascas de madeira e em pó não mostram dependência em relação ao comprimento de onda de excitação. Contudo não especificam se essa dependência se refere apenas ao perfil espectral ou ao perfil espectral e a intensidade.<sup>4</sup>

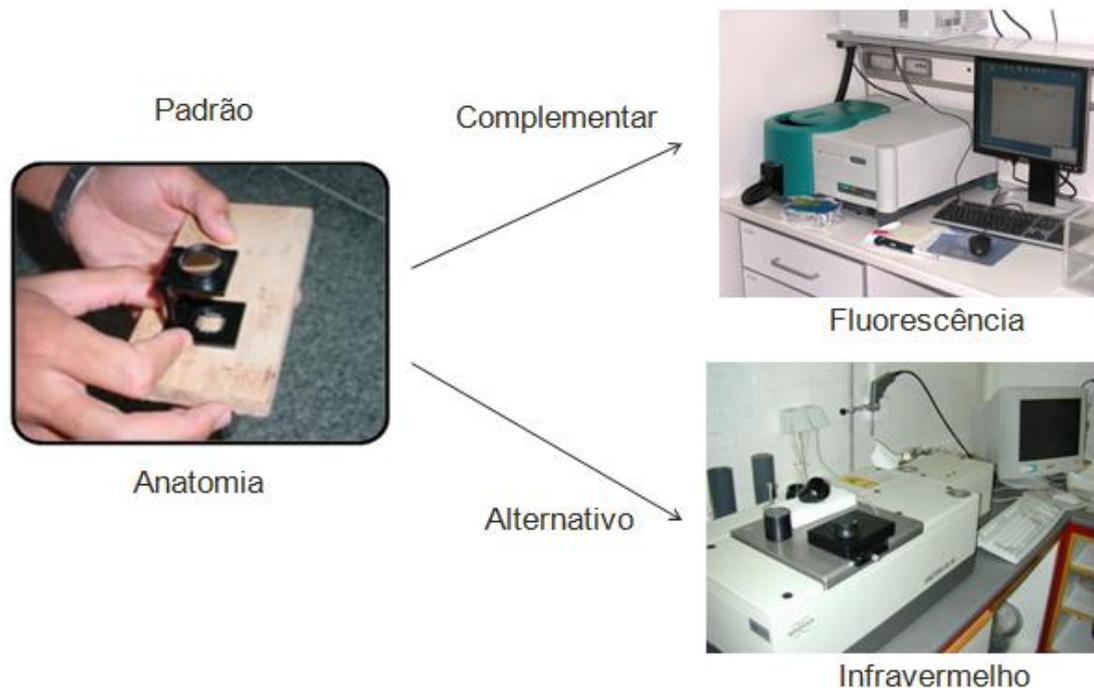
Em seu trabalho, Djikanovi et al. utilizaram três variedades de lignina: lignina obtida das espécies de álamo - *Populus tremuloides* e abeto - *Picea abies* (L.) e um modelo de lignina DHP (dehydrogenative polymer) sintetizada por eles.<sup>11</sup>

Nesse estudo, os autores obtiveram espectros semelhantes ao trabalho de Pandey et al.<sup>4</sup>, mas atribuíram as duas bandas observadas a lignina (390 e 430 nm), diferentemente de Pandey et al.<sup>4</sup>

De acordo com o que foi citado anteriormente, as polpas de celulose tendem a ter espectros de fluorescência característicos parecidos com os da madeira, sendo estes sinais atribuídos a lignina e celulose. Em um trabalho realizado por Olmstead e Gray<sup>12</sup>, usando suas fontes de celulose (polpa de celulose de madeira, algodão, bactéria e alga), os autores apresentam resultados relacionados a fluorescência da celulose. Em um comprimento de onda de excitação de 320 nm, as amostras geraram um espectro de emissão característico com um máximo em 420 nm e um ombro em 390 nm.<sup>12</sup>

Diversos métodos podem ser utilizados para a análise e caracterização da madeira. Dependendo do objetivo podem ser empregados métodos destrutivos onde a madeira é triturada, extraída, dissolvida, etc., sendo que esse tipo de preparo varia em função do componente ou característica que se deseja determinar. Além disso, podem ser empregados métodos não destrutivos, tais como os anatômicos ou espectroscópicos (infravermelho e fluorescência), ilustrados na Figura 3.

O método anatômico pode ser considerado um método consagrado, pois já é utilizado há muito tempo e possui resultados consistentes e reconhecidos na literatura.<sup>3,5,6,15,16</sup> Apesar de ser um método muito preciso e eficiente, a fluorescência não é comumente utilizada, pois nem todas as madeiras são fluorescentes, fazendo com que a fluorescência seja classificada como um método complementar ao anatômico ou ao infravermelho. Contudo, a fluorescência é um método pouco estudado, sendo necessárias mais informações para uma melhor classificação do método como alternativo ou complementar.



**Figura 3.** Ilustração de alguns métodos não-destrutivos utilizados para a análise e caracterização de madeira.

## 2.2 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

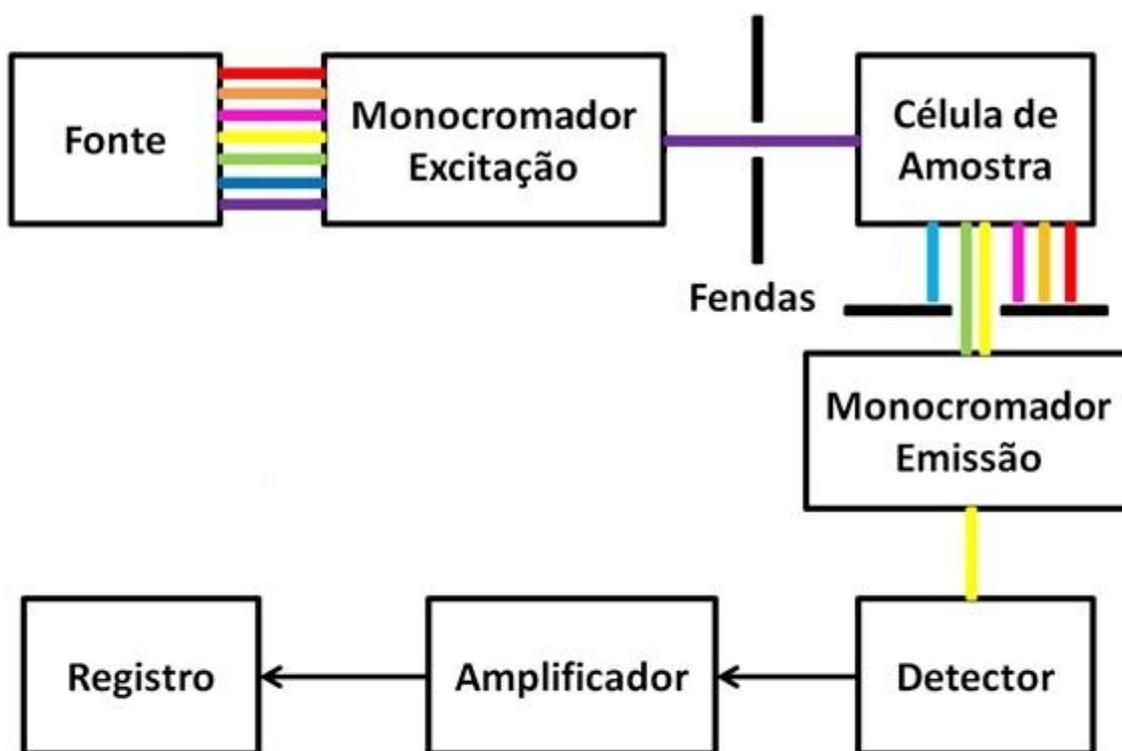
A fluorescência pode ser definida como a emissão de luz a partir de qualquer estado excitado de uma molécula.<sup>7</sup> A excitação é feita por absorção de fótons e as transições eletrônicas não envolvem mudança de spin eletrônico. Por isso, os estados excitados possuem tempo de vida curto, sendo que a fluorescência ocorre em comprimentos de onda maiores que os da radiação de excitação.<sup>8</sup>

Uma das características mais atrativas dos métodos luminescentes é a sua inerente sensibilidade, com limites de detecção que são até três ordens de magnitude melhores que aqueles encontrados na espectrometria de absorção.<sup>7,8</sup> De fato, para determinadas espécies, sob condições controladas, uma única molécula pode ser detectada por espectroscopia de fluorescência.<sup>7,8</sup> Outra vantagem dos métodos fotoluminescentes é a sua grande faixa linear de concentração, que também é significativamente maior que a dos métodos de absorção. Como os estados excitados são suscetíveis a desativação pelas colisões e outros processos, muitas moléculas não apresentam fluorescência.

Devido a esses processos de desativação, os métodos luminescentes quantitativos estão sujeitos a sérios efeitos de interferência. Por isso, as medidas de luminescência são frequentemente combinadas com técnicas de separação, como cromatografia e eletroforese.<sup>8</sup>

A fluorescência pode ocorrer em sistemas químicos gasosos, líquidos e sólidos que podem ser simples ou complexos.

A Figura 4 mostra um esquema com os principais componentes de um espectrofluorímetro. Inicialmente, uma fonte emite radiação em direção ao monocromador de excitação. No monocromador, um comprimento de onda de excitação é selecionado e a luminescência produzida pela amostra é direcionada para um segundo monocromador, normalmente posicionado a 90° em relação a radiação incidente. Se o comprimento de onda de excitação for fixo e o equipamento realizar a varredura em um determinado intervalo de  $\lambda$  (lambda) para a fluorescência emitida, é obtido um espectro de emissão. Um espectro de emissão é um gráfico de intensidade de emissão em função do comprimento de onda de emissão.<sup>7</sup>



**Figura 4.** Esquema do funcionamento de um espectrofluorímetro

Contudo, alguns instrumentos de fluorescência permitem realizar a varredura dos comprimentos de onda de emissão em diferentes  $\lambda$  de excitação gerando ao final uma superfície de fluorescência.<sup>8</sup>

### 2.2.1 Variáveis que afetam a fluorescência

A fluorescência é uma técnica muito sensível e eficaz para analisar os mais variados tipos de amostras, sendo elas sólidas, em gás ou em solução. Entretanto, existem diversas variáveis que afetam a análise de fluorescência que devem ser consideradas, tais como: o tipo de transição eletrônica, a estrutura da molécula a ser analisada, a temperatura, o solvente, o pH, dentre outros.

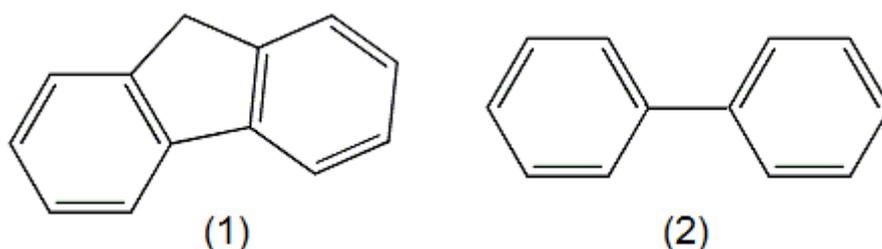
É possível observar empiricamente que a fluorescência é mais comum em compostos nos quais a transição de menor energia é aquela do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  (estado singlete excitado  $\pi$ ,  $\pi^*$ ) do que em compostos nos quais a transição de energia menor é do tipo  $n \rightarrow \pi^*$  (estado excitado  $n$ ,  $\pi^*$ ); isto mostra que a eficiência quântica para transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  é maior.<sup>8,18</sup>

É importante ressaltar que a fluorescência dificilmente é resultado da absorção da radiação ultravioleta de comprimentos de onda menores que 250 nm, pois essa radiação é muito energética e pode causar desativação dos estados excitados pela pré-dissociação ou dissociação. Por exemplo, a radiação de 200 nm corresponde a cerca de 140 kcal/mol. A maioria das moléculas orgânicas tem pelo menos algumas ligações que podem ser rompidas por energias dessa magnitude.<sup>8</sup>

A estrutura também influencia na análise da fluorescência. São observados sinais mais intensos em compostos contendo grupos funcionais aromáticos com transições de baixa energia. Compostos que contêm estruturas alifáticas e carbonilas alicíclicas ou estrutura com duplas ligações altamente conjugadas também podem apresentar fluorescência, mas em menor número que nos sistemas aromáticos.<sup>8</sup>

Empiricamente, observa-se que em estruturas rígidas a fluorescência é favorecida. Por exemplo, as eficiências quânticas para o fluoreno (estrutura

mais rígida) e o bifenil (Figura 5) são aproximadamente 1,0 e 0,2, respectivamente, sob condições semelhantes de medida, ou seja, o fluoreno é mais fluorescente, pois quanto maior a eficiência quântica, maior será a fluorescência. A diferença no comportamento resulta principalmente do aumento da rigidez, causado pelo grupo metileno no fluoreno. Muitos exemplos similares podem ser citados. Uma molécula pouco rígida pode aumentar a velocidade de conversão interna (passar de um estado singleto a outro estado singleto), aumentando, conseqüentemente, a facilidade de desativação não-radioativa. Uma parte de uma molécula não rígida pode sofrer vibrações de baixa frequência em relação as outras partes; esses movimentos explicam perda de energia.<sup>8</sup>



**Figura 5.** Estruturas de compostos (1) fluoreno e (2) bifenil.<sup>8</sup>

Com o aumento da temperatura, a frequência das colisões entre as moléculas aumenta, e conseqüentemente, é aumentada a probabilidade da desativação por conversão externa (passar de um estado singleto para o estado fundamental), diminuindo, assim, a fluorescência.<sup>8,18</sup>

O solvente pode influenciar de várias formas. A diminuição da viscosidade, por exemplo, aumenta a facilidade da conversão externa, causando um decréscimo da fluorescência. Além disso, a fluorescência de uma molécula diminui pelo efeito de solventes contendo átomos pesados, ou outros solutos contendo esses átomos, na sua estrutura, tais como o tetrabrometo de carbono e iodeto de etila. O efeito é similar aquele que ocorre quando os átomos pesados são substituídos nos compostos fluorescentes; as interações spin-orbital resultam em um aumento na velocidade de formação de tripleto e uma correspondente diminuição na fluorescência.<sup>8,18</sup>

O pH é um fator importante a ser considerado, pois o comprimento de onda e a intensidade de emissão são diferentes para formas protonadas, desprotonadas e neutras. Como resultado das diferenças de energia no estado fundamental e estados excitados, os espectros de fluorescência são pH-dependentes.

Avaliando todos os fatores que influenciam a fluorescência, pode-se concluir que existem várias fontes de interferência que influenciam na análise. Uma das influências mais fácil de ser observada é o aparecimento de espalhamentos nos espectros, que é detalhada na próxima seção.

### **2.3 ESPALHAMENTOS RAYLEIGH E RAMAN**

São efeitos causados pelo espalhamento da radiação durante a análise. Quando uma molécula é irradiada, a energia pode ser transmitida, absorvida, ou espalhada.<sup>8, 19</sup> No espalhamento, a energia que incide em uma direção é desviada (espalhada) para outras direções, havendo a produção de radiação difusa. Os dois tipos mais comuns e conhecidos são o Rayleigh e o Raman.

No espalhamento Rayleigh, a radiação de moléculas ou agregados de moléculas pequenas, com tamanhos significativamente menores que o comprimento de onda da radiação, espalha-se.<sup>8</sup> A interação da molécula com o fóton não provoca mudanças nos níveis de energia vibracional e/ou rotacional da molécula. Assim, as frequências da luz incidente e espalhada são as mesmas, por isto o espalhamento Rayleigh é considerado elástico.<sup>21</sup> A intensidade desse efeito é proporcional ao inverso da quarta potência do comprimento de onda, à dimensão das partículas que promovem o espalhamento e ao quadrado da polarizabilidade das partículas. A cor azul do céu, por exemplo, é causada pelo espalhamento Rayleigh, resultado do alto espalhamento dos comprimentos de onda menores do espectro visível.<sup>8</sup> Devido a sensibilidade da técnica de fluorescência, são determinadas moléculas pequenas até mesmo em baixas concentrações, sendo assim, a mesma pode sofrer interferências do espalhamento Rayleigh.

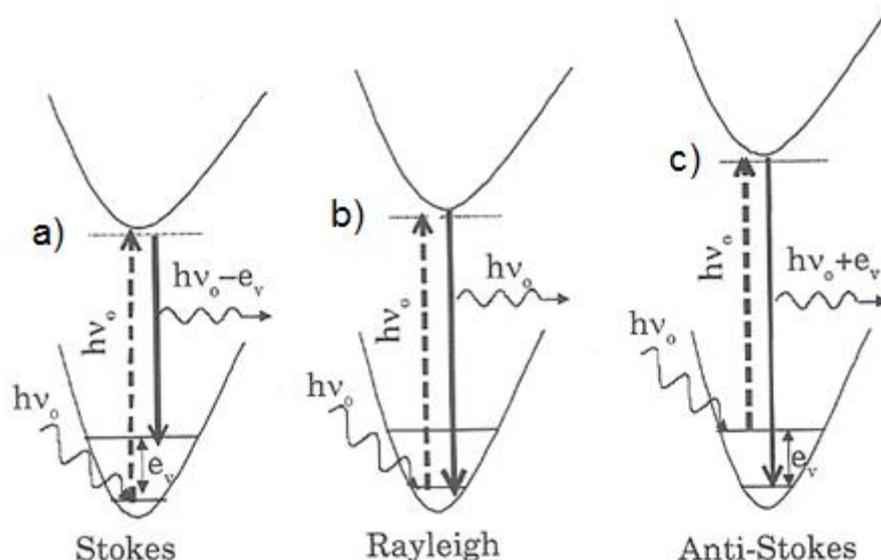
O espalhamento Raman é diferente dos outros tipos de espalhamento, pois parte da radiação espalhada sofre alterações quantizadas de frequência.<sup>8</sup> O

efeito Raman pode ser explicado pela colisão não-elástica entre o fóton incidente e a molécula. Tal colisão muda os níveis das energias vibracional e/ou rotacional da molécula por um incremento de ( $\pm\Delta E$ ). De acordo com a lei de conservação de energia, isto significa que as energias dos fótons incidente e espalhado serão diferentes, ou seja  $v_{\text{incidente}} \neq v_{\text{espalhada}}$ . Se a molécula absorve energia,  $\Delta E$  é positiva,  $v_{\text{incidente}} > v_{\text{espalhada}}$ , estas são linhas Stokes do espectro. Se a molécula perde energia,  $\Delta E$  é negativa,  $v_{\text{incidente}} < v_{\text{espalhada}}$ , linhas anti-Stokes do espectro.<sup>19</sup> Em fluorescência, temos a influência do Espalhamento Raman Stokes nos espectros.

### 2.3.1 Origens dos espalhamentos Rayleigh e Raman

A figura 6 ilustra as principais formas de espalhamento. No espalhamento Raman Stokes a molécula no estado fundamental colide com o fóton de energia  $h\nu_0$ , passa para um estado intermediário (ou virtual), que não precisa ser um estado estacionário da molécula, e decai em seguida para um estado vibracionalmente excitado, de energia  $e\nu$ ; o fóton espalhado,  $h\nu_0 - e\nu$ , terá energia menor do que o incidente. No espalhamento Rayleigh, após a interação do fóton com a molécula esta volta ao mesmo nível de energia inicial e o fóton é espalhado sem modificação de frequência (espalhamento elástico). No espalhamento Raman anti-Stokes o fóton encontra a molécula já num estado excitado e após a interação a molécula decai para o estado fundamental. Esta diferença é somada a energia do fóton, que é espalhado com energia  $h\nu_0 + e\nu$ .<sup>19,20</sup>

Considerando que a população dos estados excitados segue a distribuição de Boltzmann, deve-se esperar menor intensidade para as bandas anti-Stokes do que para as bandas Stokes.<sup>19</sup> Além disso, o espalhamento Rayleigh tem uma probabilidade de ocorrência consideravelmente maior do que o espalhamento Raman pois o evento mais provável é a transferência de energia para moléculas do estado fundamental e reemissão pelo retorno destas moléculas a este mesmo estado. Finalmente, deve ser notado que a razão entre as intensidades anti-Stokes e Stokes aumenta com a temperatura porque uma maior fração das moléculas encontra-se, sob estas condições, no primeiro estado excitado vibracional.<sup>8</sup>



**Figura 6.** Ilustração dos mecanismos de espalhamento (a) Stokes; (b) Rayleigh; (c) Anti-Stokes.<sup>19</sup>

## 2.4 Resolução de Curvas Multivariadas (MCR)

O método de resolução de curvas multivariadas (MCR, do inglês “*Multivariate Curve Resolution*”) é uma metodologia generalizada para a análise de dados que pode ser aplicada na deconvolução de sinais organizados na forma de uma matriz.<sup>21</sup>

O MCR tem demonstrado ser uma ferramenta importante na investigação de vários tipos de sistemas químicos para fins qualitativos<sup>22</sup> e quantitativos<sup>23,24</sup>, tais como em análises de equilíbrios ácido-base, para análises de água<sup>25</sup>, análises de separação de amostras complexas<sup>26</sup>, análise para determinação de pesticidas<sup>28</sup>, dentre outros.

O modelo utiliza o algoritmo iterativo de mínimos quadrados alternantes (ALS, do inglês “*Alternating Least Squares*”) que é baseado na decomposição bilinear de dados, representado matematicamente pela expressão (1)<sup>21,22,23,26,26,27,28,29,30,31</sup>:

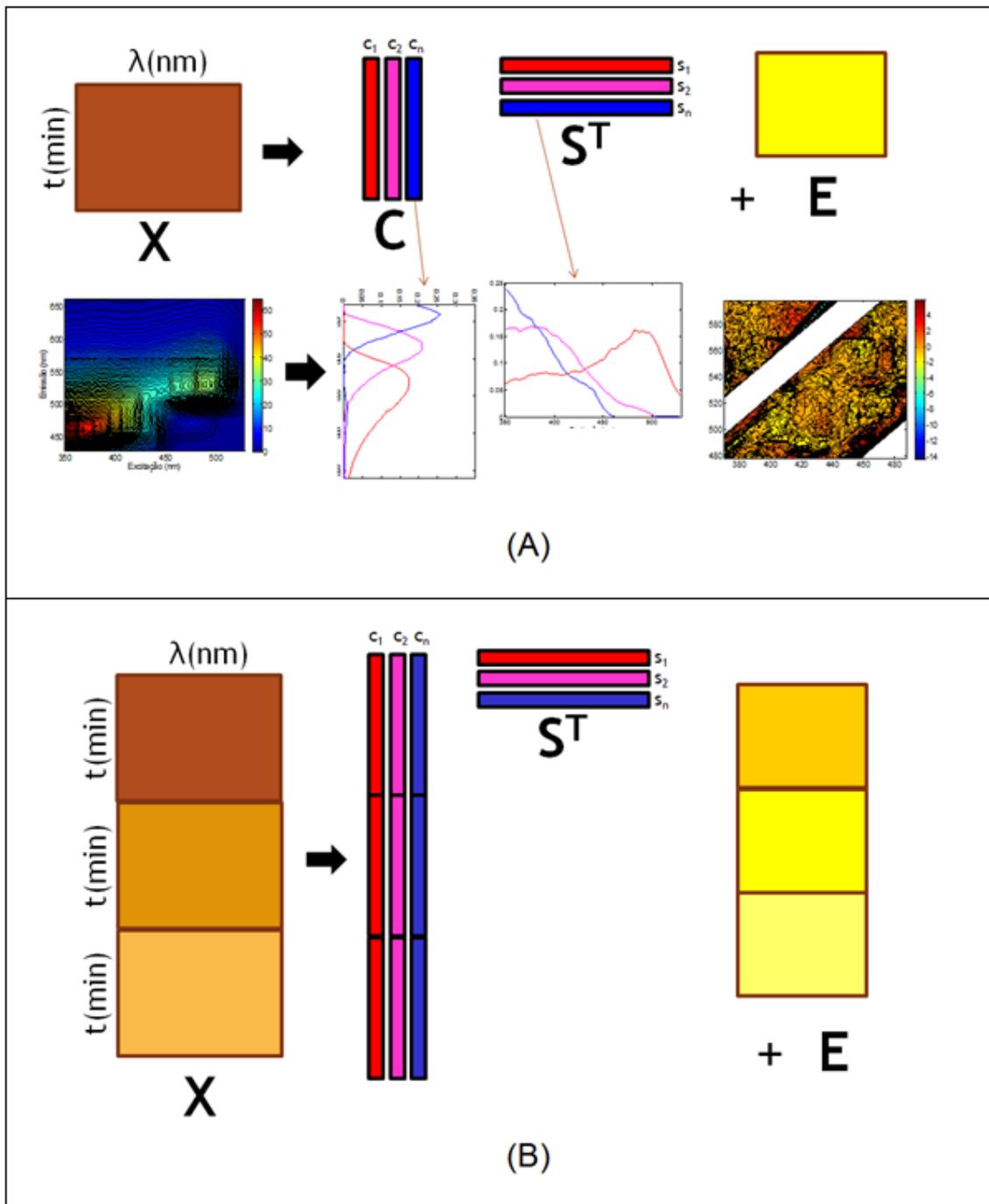
$$\mathbf{X}_i = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E}_i \quad (1)$$

sendo  $\mathbf{X}_i$  ( $m \times n$ ) uma matriz de dados de uma amostra “i” com “m” linhas e “n” colunas,  $\mathbf{C}$  ( $m \times F$ ) a estimativa dos perfis característicos na dimensão m para

os  $F$  componentes responsáveis pelos sinais presentes em  $\mathbf{X}_i$ ,  $\mathbf{S}^T$  ( $F \times n$ ) a estimativa dos perfis característicos na dimensão  $n$  e  $\mathbf{E}_i$  ( $m \times n$ ) a matriz de resíduos. Para que o MCR possa ser inicializado, é necessário que se tenham estimativas para o número de  $F$  componentes presentes na amostra e para os valores de  $\mathbf{C}$  ou de  $\mathbf{S}$ . Essas estimativas podem ser obtidas por meio de diversos métodos, sendo um dos mais comuns a estimativa pelo método iterativo de pureza de variáveis descrito por Windig e Guilment.<sup>32</sup>

Uma vantagem do MCR em relação a outros métodos de deconvolução descritos na literatura é que ele pode ser aplicado na análise tanto um conjunto de dados formado por várias matrizes, cada uma obtida para uma amostra diferente, quanto na deconvolução uma única amostra (Figura 7). Isto ocorre, pois este modelo é baseado na decomposição bilinear dos dados. Quando o MCR é aplicado para a mais de uma amostra simultaneamente, as matrizes são dispostas uma “em cima” da outra ou uma “ao lado” da outra, dependendo do objetivo da análise e se as estimativas iniciais são relacionadas a  $\mathbf{C}$  ou a  $\mathbf{S}$ .<sup>27, 33</sup>

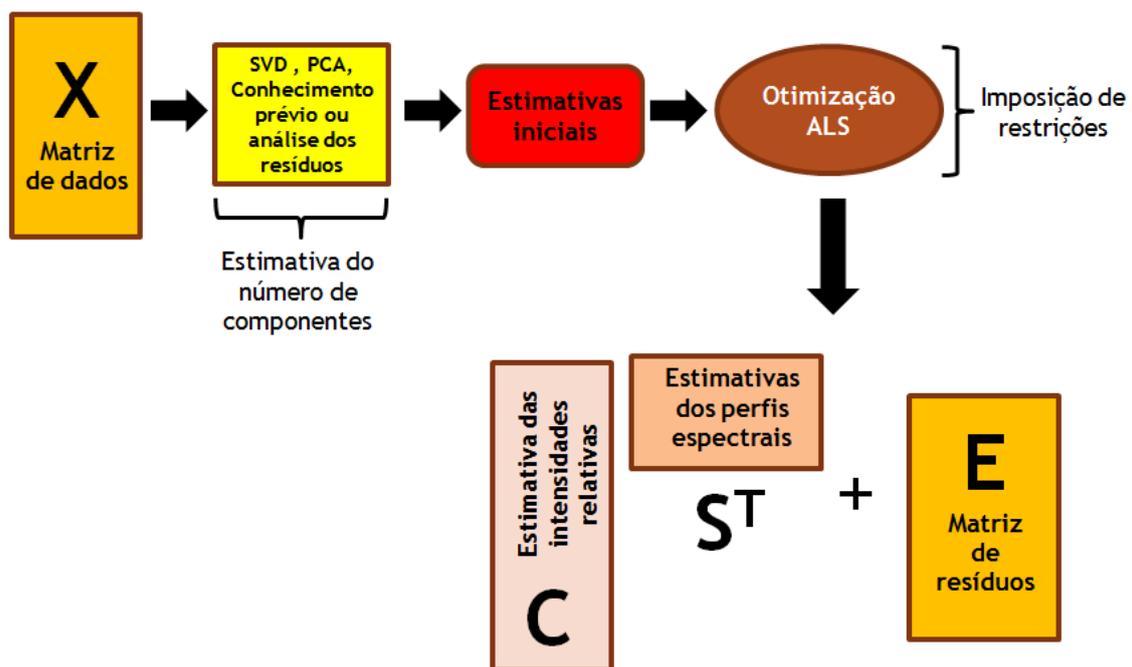
A Figura 7 mostra o modo como as análises por MCR são realizadas. Na figura 7(A) temos uma matriz  $\mathbf{X}$  que, após a aplicação do MCR, gera seus espectros puros de emissão ( $\mathbf{C}$ ), de excitação ( $\mathbf{S}^T$ ) e uma matriz de resíduos (gerada pela diferença de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{C}$  e  $\mathbf{S}^T$ ). Na Figura 7 (B) temos a representação da disposição da matriz  $\mathbf{X}$  utilizando mais de uma amostra. Nesse caso, os espectros de excitação ( $\mathbf{S}^T$ ) são estimados e mantidos fixos para cada amostra e as estimativas dos espectros de emissão ( $\mathbf{C}$ ) são estimadas para as três amostras individualmente.



**Figura 7.** Ilustração do modo em que as análises por MCR são realizadas (A) com uma amostra (B) com mais de uma amostra.

A Figura 8 ilustra as etapas utilizadas pelo modelo matemático. Para analisar uma matriz de dados por MCR, deve-se ter inicialmente uma estimativa do número de componentes. Esta estimativa é feita utilizando decomposição em valores singulares (SVD, do inglês “Singular Value Decomposition”), análise de componentes principais (PCA, do inglês “Principal

Component Analysis”), conhecimento prévio da amostra ou análise dos resíduos deixados pelo modelo. No caso da análise de resíduos, por exemplo, aplica-se o MCR e avalia-se se a matriz de resíduos possui intensidades baixas e apenas ruído aleatório, ou seja, se o MCR modelou adequadamente a matriz. Com a definição dos componentes, utiliza-se as estimativas iniciais desses componentes, obtidas pelo método de pureza de variáveis, e o MCR realiza a otimização pelo algoritmo ALS e, por fim, são gerados os resultados da deconvolução.



**Figura 8.** Representação gráfica dos passos utilizados pelo modelo matemático para a análise com MCR.

Deve-se destacar que em consequência da decomposição bilinear dos dados o MCR possui um problema de ambiguidade, ou seja, mais de um conjunto de perfis característicos que apresentam um mesmo ajuste de dados podem ser obtidos. Isto pode ser observado matematicamente através da expressão.<sup>28,33</sup>

$$CS^T = CZZ^{-1}S^T$$

onde Z é qualquer matriz não singular de dimensão (F,F), as matrizes CZ e  $Z^{-1}S^T$  representam outro conjunto de perfis nas dimensões m e n, mas que apresentam exatamente o mesmo ajuste de dados obtido com C e  $S^T$ . Para

minimizar esta limitação do MCR, é necessário utilizar restrições.<sup>21,22</sup> como não negatividade, seletividade, normalização, trilinearidade e outras, dependendo da quantidade de matrizes utilizadas.<sup>28,29</sup> Estas restrições podem ser ativadas e desativadas, aplicadas separadamente ou juntas, dependendo do sistema químico presente ou dos dados utilizados.<sup>21</sup>

Neste trabalho a única restrição utilizada foi a de não negatividade, a fim de evitar que os espectros gerados a partir da análise com o MCR possuíssem valores negativos.

# **Materiais e Métodos**

### **3 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Obtenção e caracterização das amostras**

As amostras de madeira utilizadas nas análises deste trabalho foram oferecidas pela Xiloteca Dr. Harry van der Slooten do Laboratório de Produtos Florestais (LPF) do Serviço Florestal Brasileiro (SFB) e pela xiloteca do Forest Products Laboratory do American Forest Service (USDA).

Foram selecionadas amostras de 16 espécies diferentes (tabela 3), sendo cinco pertencentes ao gênero *Couratari*, duas do gênero *Amburana*, duas do gênero *Parkia* e as outras sete escolhidas por possuírem elevada fluorescência. A identificação de cada espécie foi realizada pelos anatomistas Dra. Vera Coradin e M.Sc. José Arlete Camargo (LPF/SFB) e Dr. Alex Widenhoeft (FPL/USDA), responsáveis pelas xilotecas.

Considerando que existem poucos estudos sobre fluorescência em madeira e a mesma é um material complexo e heterogêneo, é necessário avaliá-la de diferentes formas. Por essa razão, as espécies foram analisadas em três diferentes formas: corpos de prova (cubos de madeira de dimensões 2x2x2 cm aproximadamente), em forma de serragem e em forma de extrato.

**Tabela 3.** Informações sobre os nomes científicos e nomes populares das amostras estudadas

<b>Código da Espécie</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Nome popular</b>
1	<i>Caryocar glabrum</i> Aubl.	Piquiarana
2	<i>Parkia pendula</i> Benth	Faveira
3	<i>Parkia multijuga</i> (Willd.) Benth. ex Walp.	Faveira
4	<i>Dinizia excelsa</i> Ducke	Angelim vermelho
5	<i>Vochysia maxima</i> Ducke	Quaruba
6	<i>Euxylophora paraensis</i> Huber	Pau amarelo
7	<i>Ocotea fragrantissima</i> Ducke	Louro-preto
8	<i>Hymenolobium pulcherrimum</i> Ducke	Angelim-pedra
9	<i>Couratari multiflora</i> (Sm.) Eyma	Tauari
10	<i>Couratari stellata</i> A.C.Sm.	Tauari
11	<i>Couratari macrosperma</i> A.C.Sm.	Pedrao
12	<i>Couratari oblongifolia</i> Ducke & Kunth	Tauari-amarelo
13	<i>Couratari guianensis</i> Aubl.	Abricó-de-macaco
14	<i>Amburana acreana</i> (Ducke) A.C.Sm.	Cerejeira
15	<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C.Sm	Cerejeira
16	<i>Rhus typhina</i> Lineo	Fustetê

### 3.2 Preparo das amostras

#### - Madeira em corpos de prova

Foram selecionados pedaços de cunha médio de madeira de cada espécie citada anteriormente na xiloteca do LPF. De cada pedaço foi retirado um corpo de prova de 2x2x2 cm.

#### - Serragem

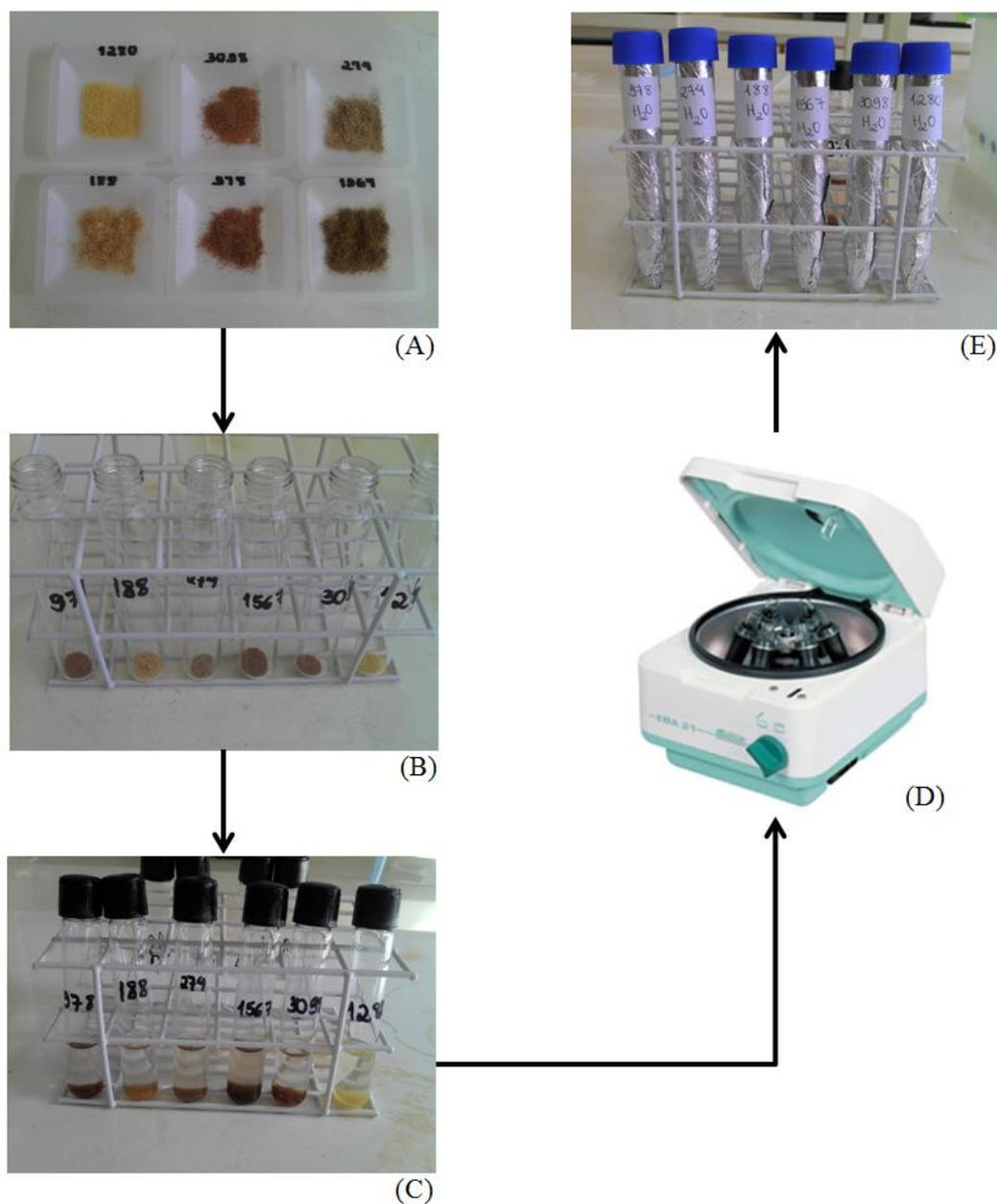
Com os pedaços de madeira que não foram utilizados na confecção dos corpos de prova foi produzida a serragem de cada espécie. Não foi possível utilizar o moinho de facas, pois o mesmo produz serragem com alta

granulometria. Por isso, um ralador de aço inoxidável foi usado para a produção da serragem. Após este processo, a serragem obtida foi peneirada sendo que a porção de serragem que passou na peneira de 40 mesh e ficou retida na peneira de 60 mesh foi utilizada para as análises. Através desse procedimento foi produzida uma quantidade de serragem suficiente para realizar as análises como “pó” e como extrato utilizando os acessórios e equipamentos descritos a seguir.

#### **- Extrato**

Foram utilizados três solventes para a obtenção dos extratos: diclorometano, etanol e água destilada tamponada com tampão fosfato. Foi preparada 1L de uma solução tampão 0,02 M de fosfato de sódio dibásico a partir de uma solução tampão de concentração 0,2 M. O pH foi ajustado com soluções de NaOH e ácido fosfórico com concentração desconhecida (provavelmente 0,01 M) gerando um pH 7,0.

Foram pesados 0,05g de serragem de cada espécie (Figura 9A). A serragem pesada foi transferida para um tubo de ensaio e em seguida foram adicionados 5 ml do solvente (figura 9B). O solvente ficou em contato com a amostra por 15 minutos (Figura 9C), com agitação manual de 5 em 5 minutos. Depois de passados os quinze minutos, os tubos de ensaio foram colocados em uma centrífuga por 10 minutos (Figura 9D). O extrato foi separado por decantação em outro tubo de ensaio (Figura 9E). Por fim, o extrato obtido foi analisado no espectrofluorímetro a uma temperatura de 23°C.



**Figura 9.** Esquema que retrata o procedimento de extração

### 3.3 Análise por fluorescência

Fotografias dos equipamentos utilizados na análise por fluorescência são apresentadas na figura 10. O gabinete de fluorescência foi usado para a observação da fluorescência visual dos corpos de prova. A faixa de comprimento de onda emitida pela lâmpada ultravioleta (SANKIO DENKI, 15 w) presente neste equipamento é de 315 a 400 nm.

O espectrofluorímetro Cary Eclipse da marca Varian foi utilizado para a análise da madeira nas suas três formas (corpos-de-prova, serragem e extrato). Este equipamento possui acessórios que propiciam análises de amostras sólidas, em forma de pó e em solução.



**Figura 10.** Equipamentos utilizados no trabalho (A) Espectrofluorímetro Varian (B) Gabinete de Fluorescência Prodicil.

Foram realizados experimentos utilizando três faixas de comprimentos de onda de excitação. Uma mais ampla de 200 a 550 nm e as outras duas de 200 a 230nm e de 350 a 550 nm. Para os comprimentos de onda de emissão, foram utilizadas duas faixas: de 210 a 700 nm e de 360 a 660 nm.

Em cada um dos intervalos dos comprimentos de onda descritos acima, foi realizada uma medida de referência (dark), obstruindo a fonte de luz do equipamento. Essa medida representa o nível de ruído instrumental do equipamento e foi utilizado como referência para as deconvoluções no MCR. É importante ressaltar que durante as análises a sala foi mantida em temperatura fixa de 23°C.

Considerando as diferenças de forma da madeira (corpos de prova, serragem e extrato), foi necessário utilizar acessórios diferentes para cada forma de apresentação das amostras.

Para a análise inicial e definição de parâmetros foram utilizadas 10 espécies diferentes de madeira para verificar a influência das faces de orientação de corte na obtenção das medidas de fluorescência. As espécies escolhidas foram

as seguintes: *Couratari oblongifolia*, *Couratari guianensis*, *Couratari multiflora*, *Couratari macrosperma*, *Couratari stellata*, *Amburana acreana*, *Amburana cearensis*, *Ocotea fragrantissima*, *Dinizia excelsa* e *Euxylophora paraensis*. Três destas espécies (*Ocotea fragrantissima*, *Dinizia excelsa* e *Amburana Acreana*) foram usadas para testar a influência da utilização de lixas para madeira na intensidade de fluorescência. As medidas foram realizadas antes e depois de lixar as três diferentes faces de orientação de corte das amostras (tangencial, radial e transversal) com lixas de papel de grão 400 (lixa fina) e grão 150 (lixa grossa).

Os espectros de excitação e emissão foram obtidos através de varreduras de 200 a 550 nm e 210 a 700 nm, respectivamente. Padrões de lignina (lignina alcalina e lignina organosolv) e celulose em pó (Aldrich Chemical Co.) também foram analisados.

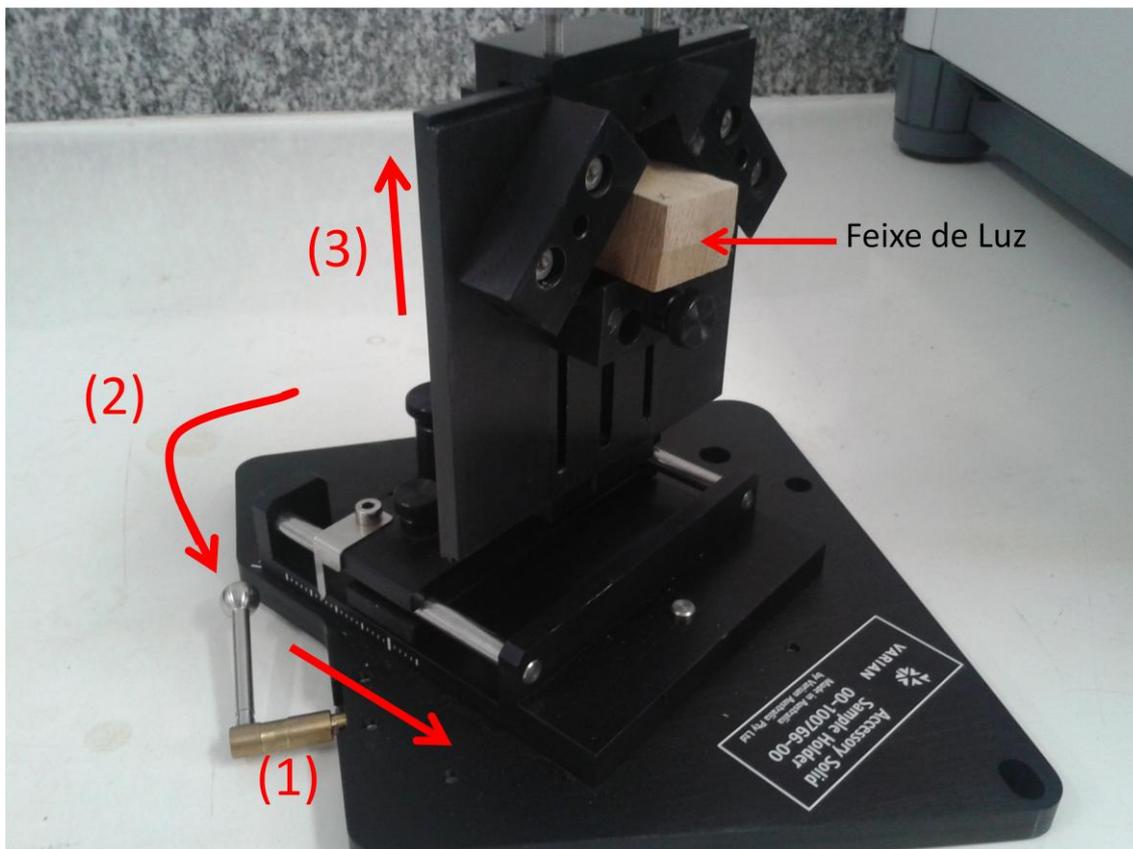
### **3.3.1 Acessório para análise de sólido**

#### **- Madeira em corpos de prova**

Para a análise, foi necessário que os anatomistas do LPF identificassem cada face de orientação de corte diferente da madeira (transversal, tangencial e radial). Após a identificação, foram feitas análises preliminares com cada uma das faces de três diferentes formas: sem lixar, lixando apenas com a lixa grossa (grão 150) e lixando com a grossa e posteriormente a fina (grão 400).

Esse procedimento foi utilizado como teste preliminar para confirmar qual seria a condição em que seriam obtidas as maiores intensidades de fluorescência.

A figura 11 mostra o acessório utilizado para a análise do material lixado. Neste acessório existem regulagens de altura, ângulo e distância, sendo que a madeira fica presa no centro do mesmo. Todas as regulagens foram otimizadas utilizando um planejamento fatorial  $3^3$ , procurando obter os maiores valores de intensidade de fluorescência.



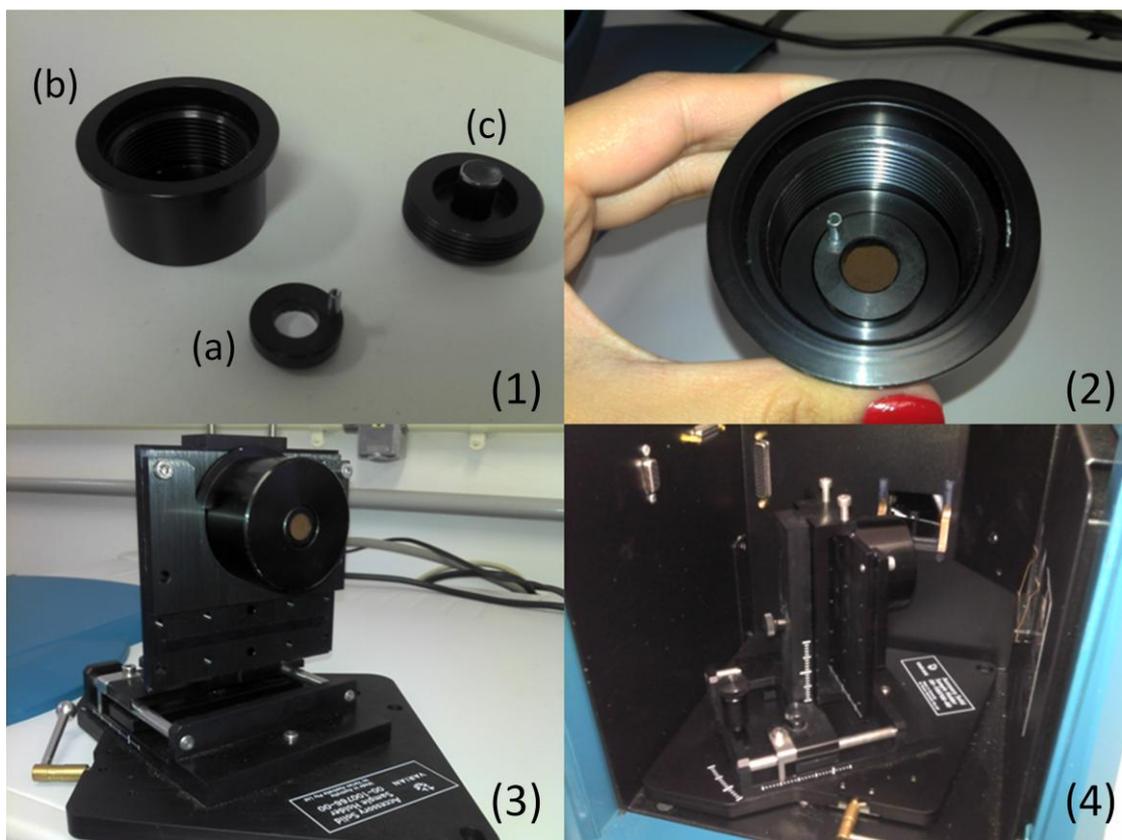
**Figura 11.** Acessório para análise de corpos de prova (1) regulagem de distância; (2) regulagem do ângulo e (3) regulagem de altura.

#### **- Madeira em forma de serragem**

Como a serragem já se encontra pronta para a análise, não foi necessário fazer mais nenhum procedimento anterior à análise.

No acessório utilizado para analisar a serragem, foram utilizadas as mesmas regulagens usadas nos corpos de prova. A figura 12 mostra como a serragem fica alocada no acessório para a análise.

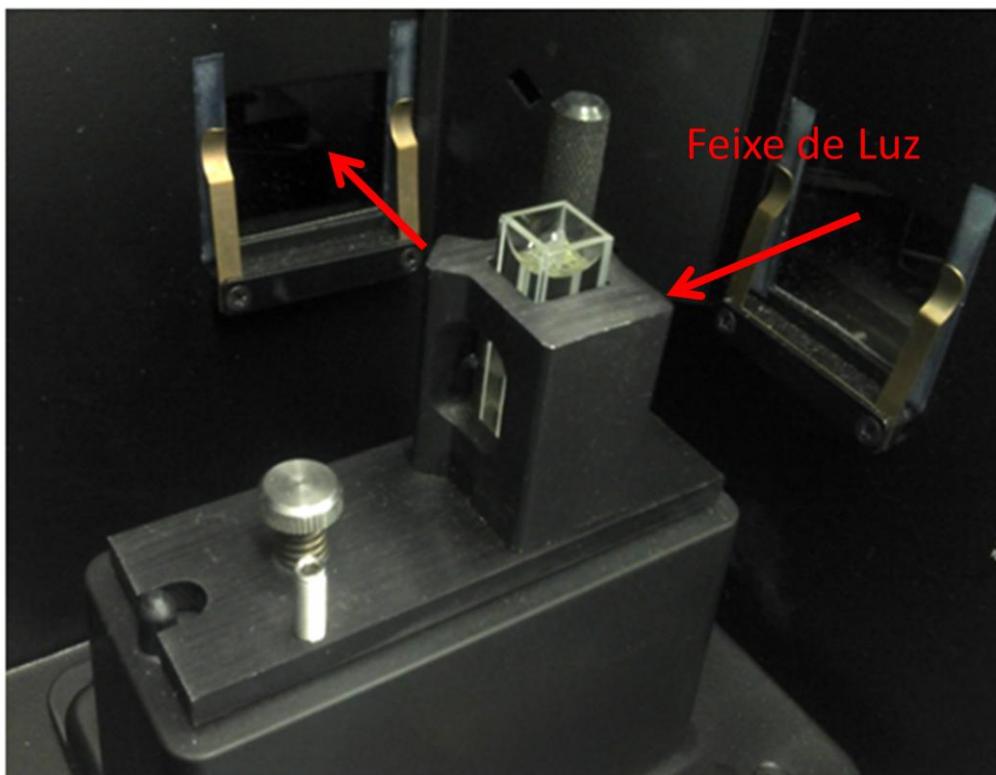
A Figura 12(1) apresenta as partes que compõem o acessório de análise em "pó". No pequeno acessório (a) a serragem é colocada. Posteriormente, (a) é encaixado em (b), gerando a foto da Figura 12(2). Por fim, (a) e (b) são prensados por (c) e encaixados na estrutura do acessório, gerando a foto da Figura 12(3). A Figura 12(4) mostra o acessório encaixado no espectrofluorímetro.



**Figura 12.** Acessório para análise da serragem. (1) partes que compõem o acessório (a), (b) e (c); (2) junção das partes (a) e (b); (3) acessório montado e (4) acessório encaixado no equipamento.

### 3.3.2 Acessório para análise de extrato

Para a análise do extrato o acessório utilizado foi o mais comum para medidas de fluorescência, ilustrado na figura 13. Foi utilizada uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico para colocar o extrato. Quando houve mudança de extrato, a cubeta foi lavada com água destilada no caso dos solventes etanol e água. Quando os extratos foram preparados em diclorometano, esse mesmo solvente foi utilizado para a lavagem da cubeta.



**Figura 13.** Acessório empregado para análise de extratos

### **3.4 Análise de dados**

Com o objetivo de facilitar a análise de um grupo muito grande de dados, os mesmos foram exportados para o programa Matlab. Este programa permite utilizar o MCR para a análise dos dados. Esta análise será abordada com mais detalhes nos tópicos abaixo.

#### **3.4.1 Análise dos dados de fluorescência em corpos de prova e em serragem utilizando MCR**

Cada amostra foi analisada separadamente através do MCR e a partir dos perfis espectrais estimados, as amostras similares foram agrupadas. Por fim, os grupos ficaram divididos de acordo com as cores de fluorescência observadas ou de acordo com o gênero da espécie de madeira e cada grupo foi analisado utilizando MCR.

Foi imposta a restrição de não negatividade para ambas as dimensões espectral e de concentração para evitar que os espectros gerados possuíssem

valores negativos. Além disso, as estimativas iniciais para a execução do MCR foram obtidas diretamente pela interface gráfica do PLS Toolbox.

O número de fatores em cada situação em que o MCR foi executado foi estabelecido observando a matriz de resíduos do modelo, sendo que esta matriz de resíduos deveria apresentar uma baixa intensidade e comportamento a princípio aleatório, com exceção dos espalhamentos eventualmente presentes.

As amostras que não se encaixavam em nenhum grupo ou que possuíam espectros muito distintos foram analisadas separadamente. Em todos os casos o branco (matriz contendo a estimativa do ruído instrumental) foi utilizado para os cálculos.

### **3.4.2 Análise dos dados de fluorescência em extrato utilizando MCR**

Foram escolhidas 6 amostras de espécies diferentes de madeira, dentre as 16 estudadas, e cada uma foi extraída com três solventes diferentes (água, diclorometano e etanol). Cada amostra foi analisada separadamente com MCR.

A restrição de não negatividade para ambas as dimensões espectral e de concentração também foi imposta. Além disso, as estimativas iniciais para a execução do MCR foram obtidas diretamente pela interface gráfica do software PLS Toolbox (versão 6.5).

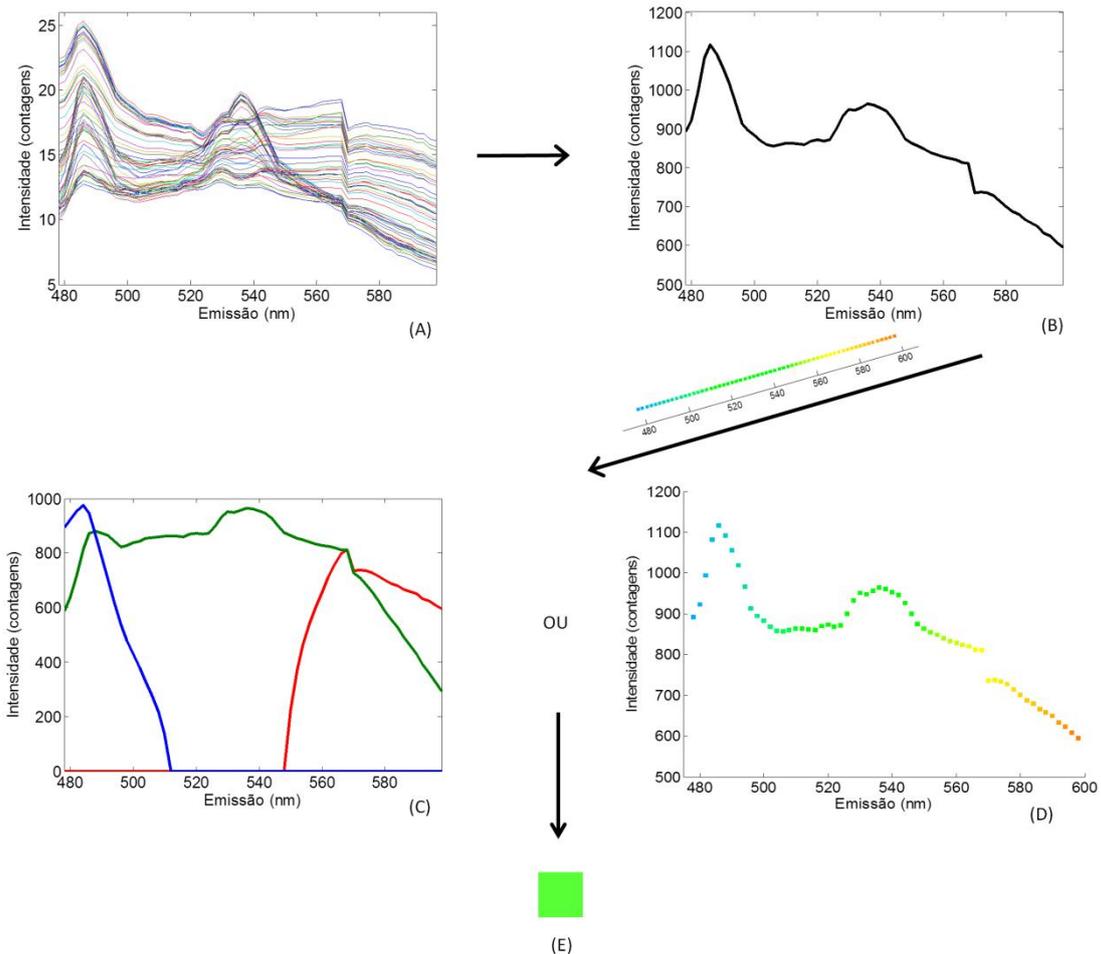
O número de fatores em cada situação em que o MCR foi executado foi estabelecido observando a matriz de resíduos do modelo, e esta matriz deveria apresentar uma baixa intensidade e comportamento a princípio aleatório. O branco foi utilizado para todas as análises.

### **3.4.3 Análise dos dados de fluorescência em madeira para a estimativa da cor utilizando análise RGB**

Possuindo os resultados experimentais já analisados com o MCR (figura 14A), para estimar a cor de fluorescência, foi utilizada a análise RGB. Esta

análise considera a proporção das cores vermelho, verde e azul para mensurar a cor.

Primeiramente os espectros de emissão obtidos foram somados, gerando um único espectro (figura 14B). Correlacionando este espectro resultante da soma com o espectro eletromagnético são obtidos resultados como os ilustrados nas figuras 14C E 14D. Estes dois espectros retratam os mesmos resultados, mas de maneiras diferentes. A figura 14C, mostra o quanto cada componente RGB está presente de acordo com o espectro, enquanto que a figura 14D mostra o espectro da soma colorido com as respectivas cores do espectro eletromagnético para cada comprimento de onda. A soma dessas cores gera a cor resultante (figura 14E)



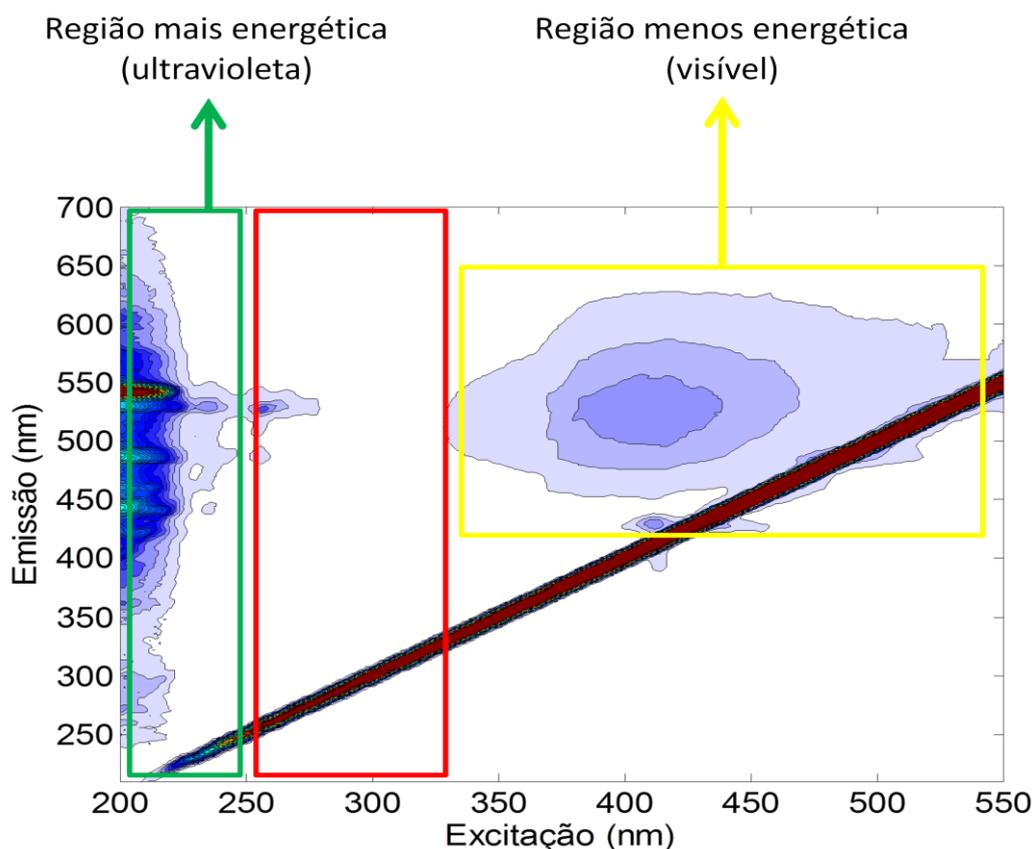
**Figura 14.** Esquema de como foi realizada a estimativa da cor através dos resultados experimentais

# **Resultados e Discussão**

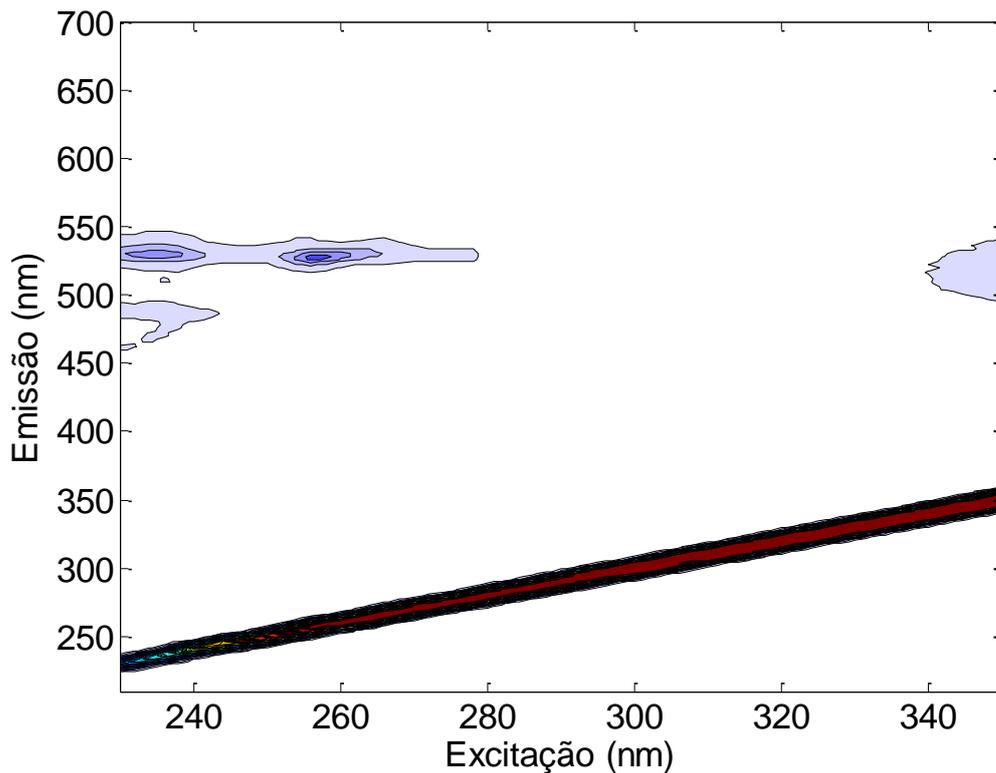
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudo da preparação da superfície da madeira e da influência das faces de corte para a obtenção das medidas de fluorescência

A figura 15 mostra a superfície de fluorescência obtida através de uma varredura nos espectros de emissão (210 a 700 nm) e excitação (200 a 550 nm) para a espécie *Euxylophora paraensis*. As curvas de nível, retratadas em tons de azul, representam a fluorescência da amostra e a faixa vermelha é o espalhamento. Foi possível perceber que existe uma parte do espectro (parte destacada em vermelho) onde não há nenhum sinal de emissão (entre 235 e 345 nm). Verificou-se assim, que nessa faixa de comprimento de onda a madeira não fluoresce (Figura 16).



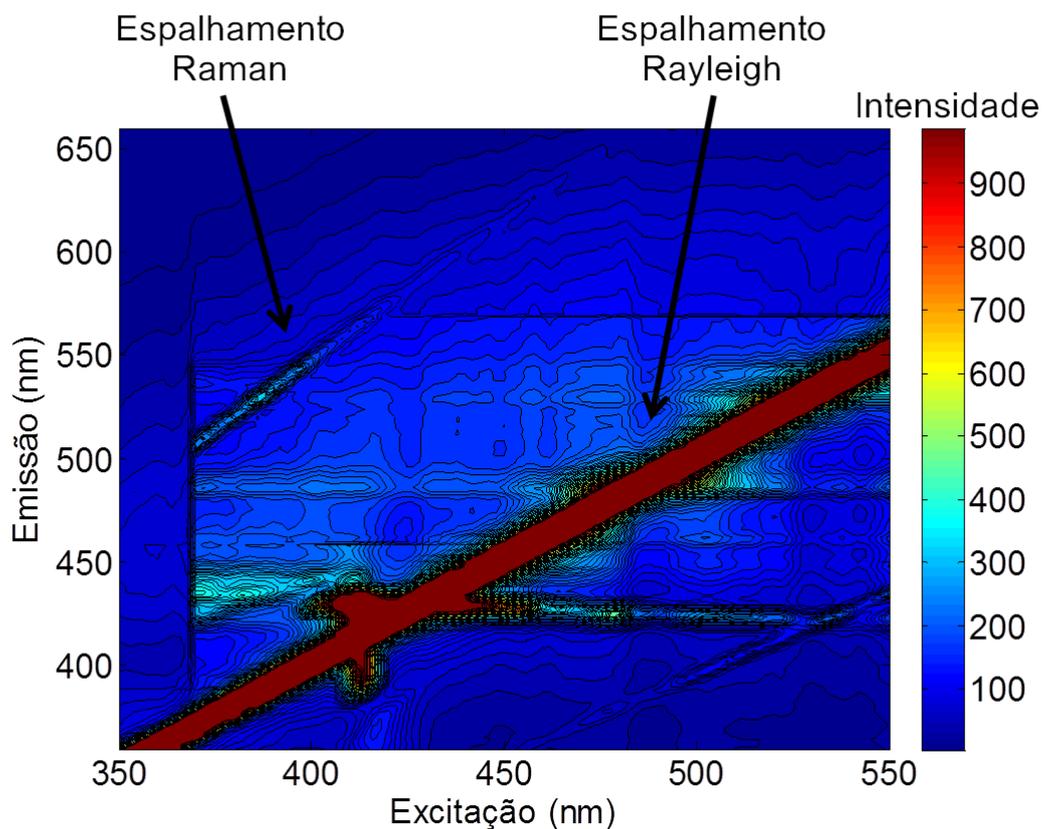
**Figura 15.** Varredura nos espectros de emissão e excitação utilizando as regiões de excitação e de emissão 200-550 nm e 210-700 nm, respectivamente.



**Figura 16.** Intervalo de excitação entre 230-550 nm onde a madeira possui baixa ou nenhuma fluorescência

As duas regiões independentes observadas no espectro de excitação estão localizadas em intervalos diferentes do espectro eletromagnético. Uma se encontra com excitação no início do ultravioleta, entre 200 e 230 nm (região mais energética) e outra que possui excitação no final do ultravioleta e início da região do visível, entre 350 e 550 nm (região menos energética). Após a constatação da existência de duas regiões, as análises foram realizadas utilizando estas regiões distintas, otimizando, assim, o tempo da aquisição dos dados. A análise dos resultados de cada região específica será detalhada posteriormente.

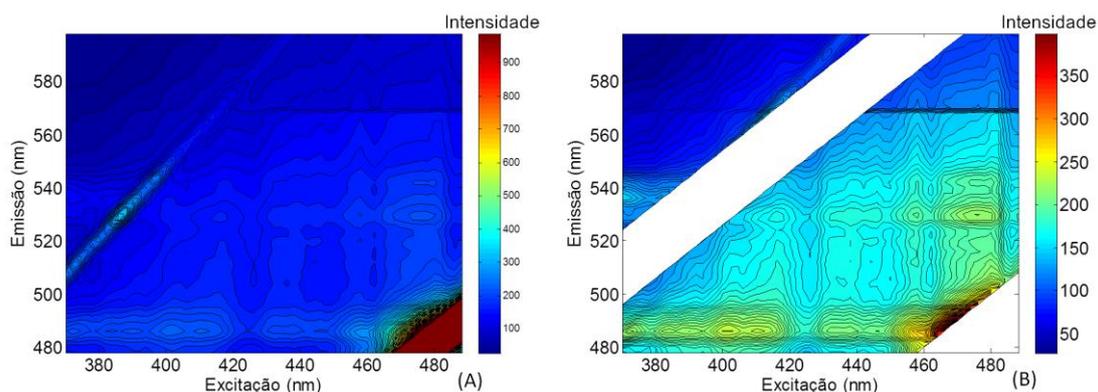
Na figura 17 está ilustrado o intervalo da região menos energética do espectro, utilizando excitação entre 350 e 550 nm e emissão entre 360 a 660 nm. As faixas com comportamento linear em diagonal que aparecem na figura são os espalhamentos Rayleigh e Raman. Cabe ressaltar que a intensidade de ambos espalhamentos varia com os comprimentos de onda de excitação e de emissão.



**Figura 17.** Espectros em curvas de nível da região menos energética da espécie *Couratari multiflora* sem correção do espalhamento

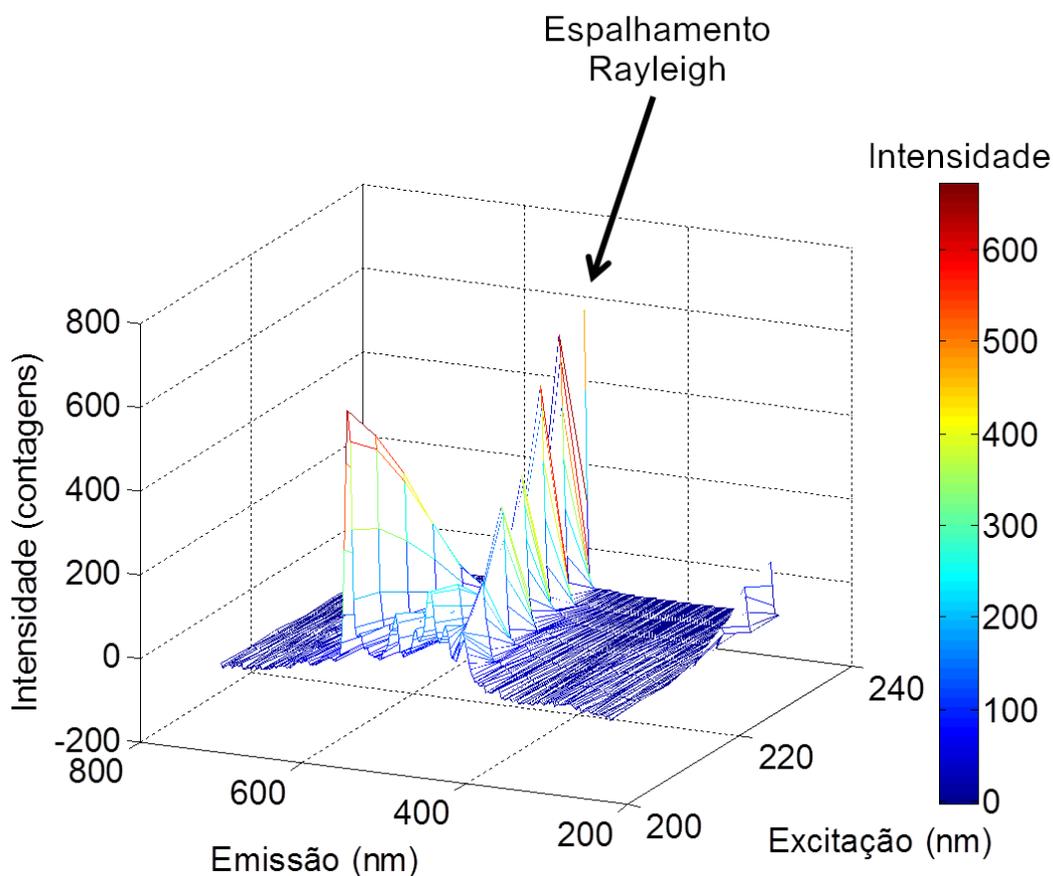
Considerando que a região apresentada na figura 17 ainda é muito ampla, foi necessário diminuí-la para a análise dos dados com MCR. Para definir a melhor região, foram realizados testes com cortes diferentes e o corte em que o MCR modelou a matriz de forma mais completa, com maiores sinais e menor espalhamento, foi escolhido para a análise de todas as espécies estudadas. Por isto, foram utilizados os intervalos de excitação e de emissão de 370 a 488 nm e 478 a 598 nm, respectivamente.

Na figura 18, a seguir, são mostrados espectros da região menos energética (A) com correção dos espalhamentos e (B) sem a correção dos espalhamentos Rayleigh e Raman, onde se percebe que, após a retirada dos espalhamentos, os sinais de fluorescência ficam muito mais nítidos.



**Figura 18.** Espectros da região menos energética da amostra *Couratari multiflora*: (A) sem correção dos espalhamentos Rayleigh e Raman e (B) com correção do espalhamento.

Na região mais energética, a influência do espalhamento Rayleigh também é observada, conforme apresentado na figura 19, por isso também foram necessárias correções nos espectros.

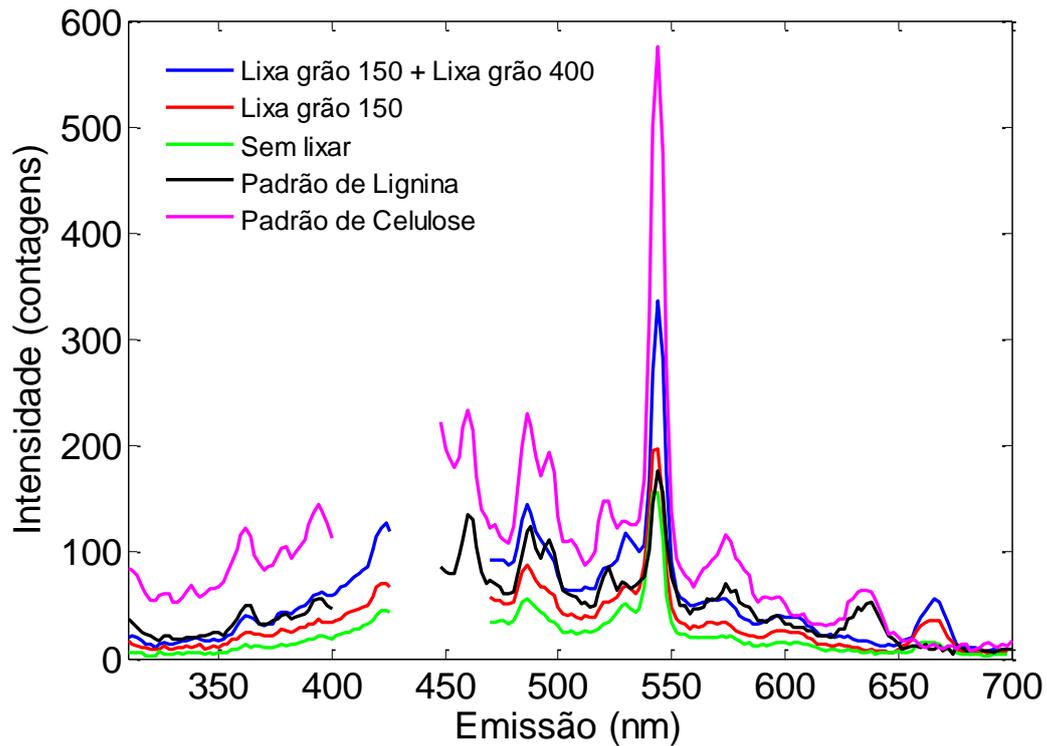


**Figura 19.** Espectro 3D de fluorescência para a região mais energética da amostra *Couratari multiflora*

As análises dos padrões de lignina e celulose revelaram que estes compostos fluorescem nas duas regiões (ultravioleta e visível). Entretanto, o espectro característico de ambas é percebido na região mais energética do espectro, entre 200 e 230 nm, como apresentado na figura 20.

Foi observado que os padrões de lignina e celulose dão origem a um espectro muito similar quando excitados entre 200 e 230 nm. Em todas as espécies de madeira estudadas, quando excitada nas mesmas condições, dá origem a espectros com praticamente as mesmas bandas, o que indica que apenas a celulose e a lignina fluorescem nessa região. O mesmo comportamento foi encontrado para todas as outras espécies estudadas. A figura 20 demonstra a similaridade dos perfis espectrais de emissão na região do ultravioleta dos padrões de lignina e celulose e da espécie *Ocotea Fragrantissima*.

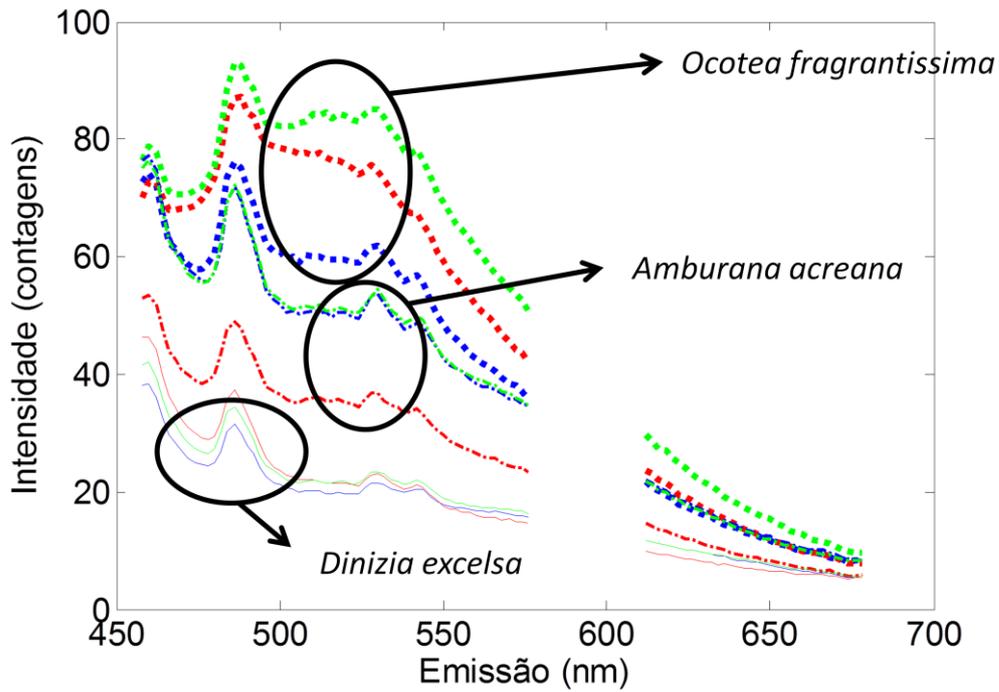
Além disso, nota-se na Figura 20 que os corpos de prova lixados com as lixas de grão 400 possuem intensidade mais alta em comparação com as amostras não lixadas ou lixadas apenas com a lixa grossa (grão 150). Uma possível explicação para essa observação é que a superfície lixada apenas com a lixa grossa se apresenta mais irregular, podendo gerar perdas por reflexão e, conseqüentemente, diminuição da intensidade de fluorescência. É importante destacar que o espectro era imediatamente obtido após lixar a face da madeira.



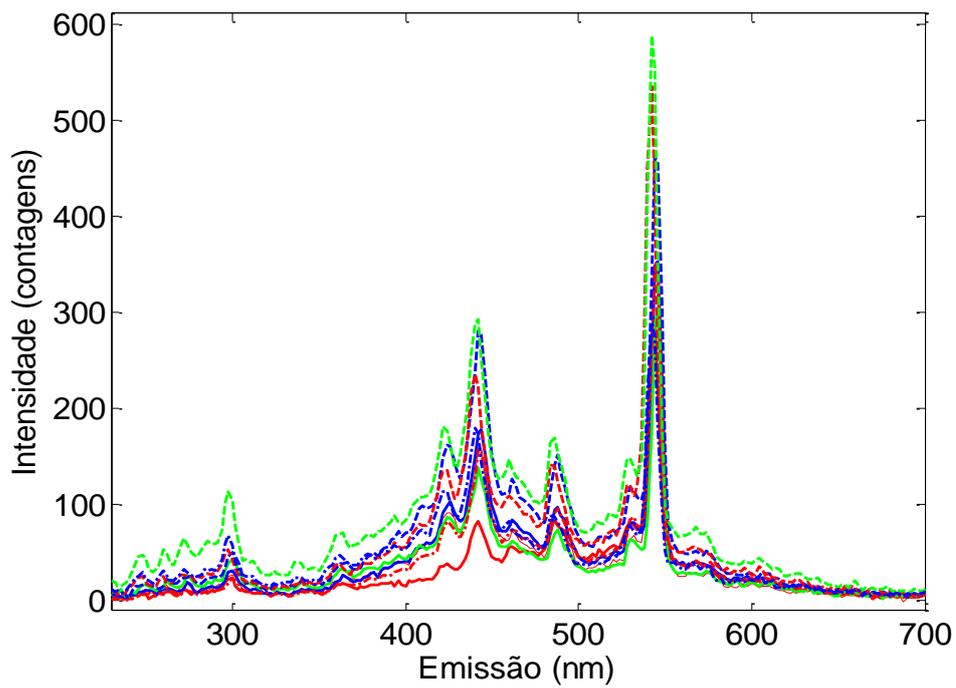
**Figura 20.** Espectro de emissão da lignina (—), da celulose (—) e da espécie *Ocotea fragrantissima* (—, —, —) na região mais energética com excitação de 218 nm.

A figura 21(A) mostra os resultados obtidos para a região menos energética de três espécies distintas nas três faces ou sentidos de crescimento da madeira. Pode-se observar que a face radial apresentou maiores intensidades do que a face tangencial e transversal para a maioria das espécies estudadas. Esta observação pode ser explicada devido a orientação do raio em cada corte da madeira. Os extrativos estão concentrados nas células parenquimáticas do raio.

A figura 21 (B) retrata os resultados para a região mais energética para as três espécies nas diferentes faces (transversal, tangencial e radial). A intensidade dos espectros nessa região também foi maior na face radial, mas é mais difícil de ser notada pois as intensidades dos espectros são mais próximas.



(A)



(B)

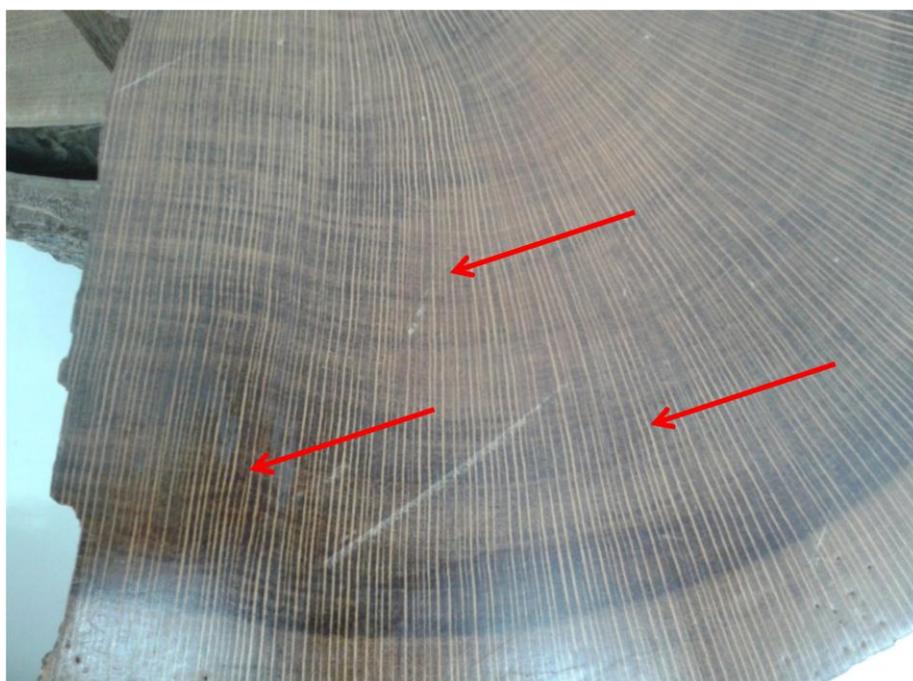
— Radial    — Transversal    — Tangencial

**Figura 21.** Espectros de emissão relacionados a região menos energética (A) e mais energética (B), excitado em 380 nm e 218 nm, respectivamente, de três espécies: (—) *Ocotea fragrantissima*, (----) *Amburana acreana* e (—) *Dinizia excelsa*.

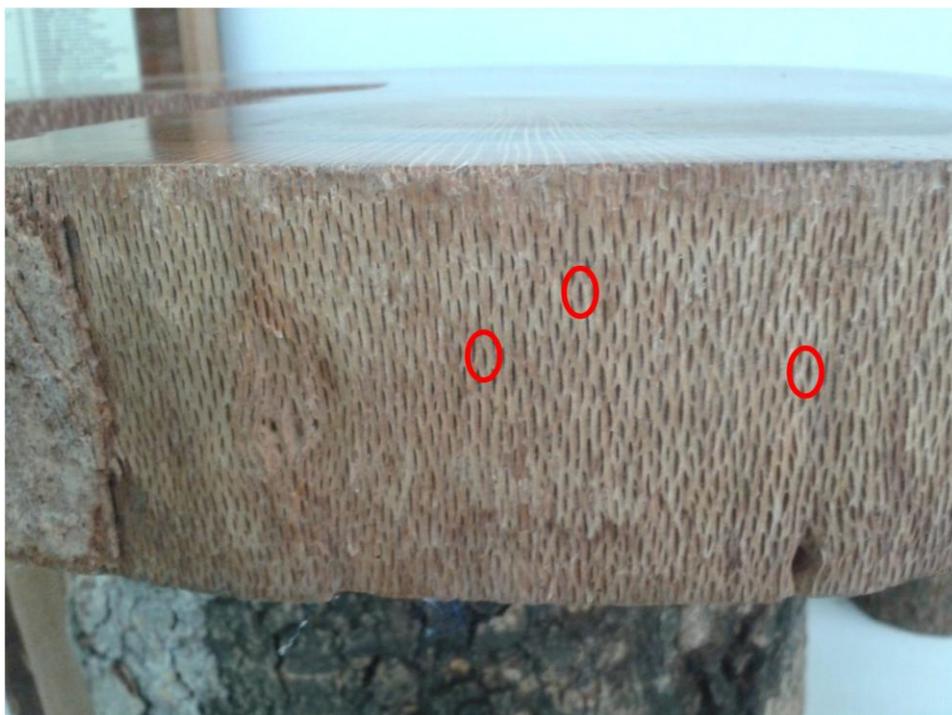
As três orientações de corte da madeira da espécie *Roupala montana* serão ilustradas a seguir. Essa espécie foi tomada como exemplo por possuir um desenho que torna as diferenças entre as faces bem evidentes, apesar de não ter sido utilizada neste estudo. Quando a análise é realizada na face transversal tem-se uma visão superior dos raios. Os raios são as “linhas” na madeira indicadas por setas na Figura 22. Assim, o feixe de luz da análise interage com os extrativos presentes nos raios expostos na superfície da madeira, mas como estes possuem uma espessura pequena, a intensidade não é tão grande.

Na face tangencial, a visão é de um corte perpendicular em relação ao comprimento do raio, ou seja, observa-se apenas um orifício (Figura 23). Sendo assim, poucas moléculas de extrativos estarão expostas, pois a superfície de contato com o feixe de luz da análise é ainda menor do que na face transversal.

Na face radial, a visão é de um corte lateral do raio, sendo, assim, a face que possui maior probabilidade do feixe de luz interagir com um maior número de moléculas de extrativos presentes na superfície da amostra, e, conseqüentemente, gera um sinal fluorescente maior (Figura 24).



**Figura 22.** Vista parcial da face transversal da espécie *Roupala montana*



**Figura 23.** Vista parcial da face tangencial da espécie *Roupala montana*



**Figura 24.** Vista parcial da face radial da espécie *Roupala montana*

Apesar de todas as diferenças existentes entre as amostras e de algumas delas não serem fluorescente a olho nu na câmara, todas apresentaram fluorescência conforme os resultados obtidos no espectrofluorímetro. Uma

análise mais aprofundada dos diferentes perfis de fluorescência será discutida posteriormente.

Com base nas evidências apresentadas em relação ao tipo de lixa e a face de corte, definiu-se pela utilização das duas lixas, grão 150 e grão 400, nesta ordem, e a face radial para a realização das análises.

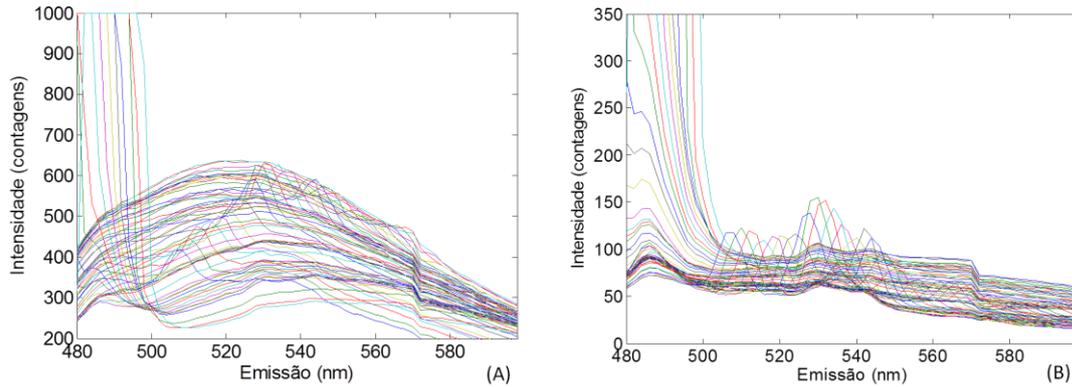
Após a escolha da melhor face de orientação de corte e da melhor procedimento para lixar as amostras, foi necessário escolher um padrão para fazer o branco a fim de avaliar a influência de fatores alheios à análise na medida de fluorescência, tais como o dia da análise, variações no detector do equipamento, variações de temperatura, dentre outros.

É importante considerar que foi difícil encontrar um padrão que fosse similar à madeira, que não fluoresça e que seja estável.

Os primeiros testes foram realizados com os padrões de lignina e celulose. Foi possível observar que nenhum dos padrões foi estável. Dependendo do dia em que fossem realizadas as análises, os espectros da lignina e da celulose variaram consideravelmente.

Além dos padrões de lignina e celulose foram realizados testes com papel, mas como este apresenta fluorescência, não foi possível utilizá-lo.

Duas espécies de madeira, *Euxylophora paraensis* e *Amburana acreana*, foram extraídas em soxhlet com os solventes de forma sequencial: álcool, álcool/tolueno (1:3 v/v) e água, até toda coloração ser esgotada com o objetivo serem usadas como padrão. Depois da extração era esperado que os sinais de fluorescência diminuíssem ou chegassem a zero, ou seja, que os fluoróforos fossem extraídos. A figura 25 mostra os espectros de emissão das madeiras mencionadas após a tentativa de retirar os extrativos. Ao observar os espectros, ainda com o espalhamento, nota-se que não foi possível esgotar as madeiras a ponto de não ser observado qualquer sinal de fluorescência, sendo, assim, impraticável utilizar qualquer uma como branco. A existência de sinais mesmo após a extração pode ser consequência da estrutura rígida da madeira. Os extrativos encontram-se presos e são mais difíceis de ser extraídos.



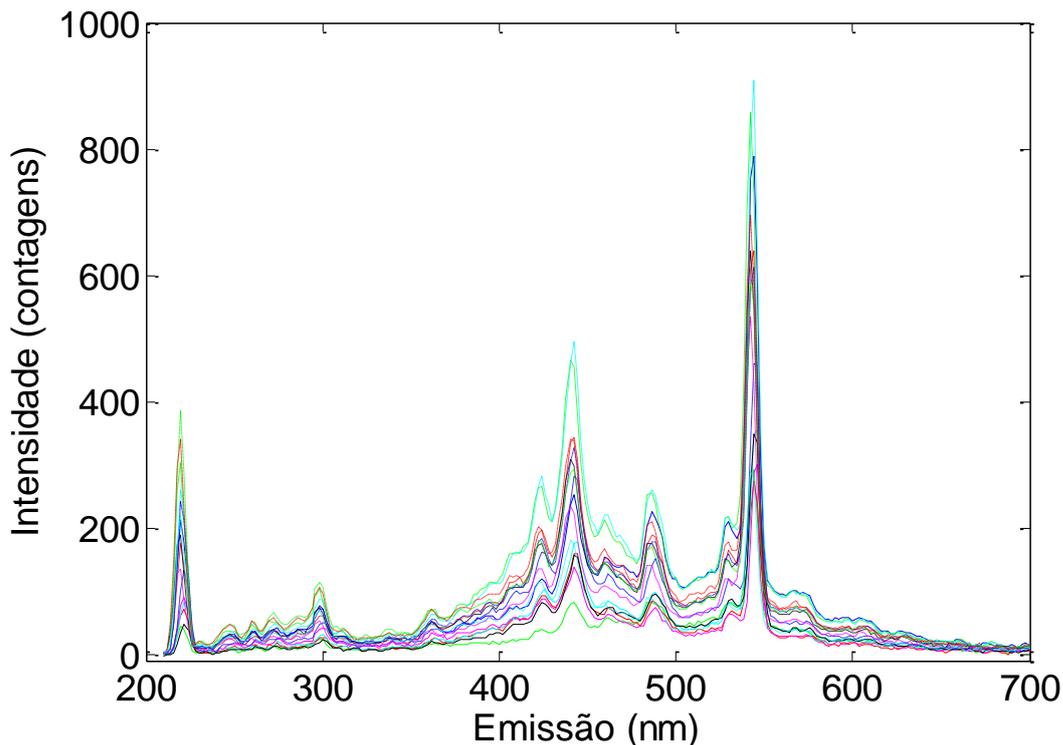
**Figura 25.** Espectros de emissão de 480 a 588 nm de duas espécies de madeira esgotadas. (A) *Euxylophora paraensis* e (B) *Amburana acreana*.

Por fim, optou-se como melhor forma de registrar o “branco ou sinal de fundo” durante as análises bloqueando o feixe de luz do espectrofluorímetro.

#### **4.2 Análise da fluorescência da madeira em corpos de prova de diferentes espécies**

As madeiras lixadas com grana 400 foram analisadas no espectrofluorímetro nas duas regiões espectrais discutidas na seção anterior (mais e menos energética). Contudo, as diferenças entre as espécies somente foram observadas na região menos energética.

A Figura 26 retrata os espectros de todas as 16 madeiras estudadas excitadas na região do ultravioleta na região mais energética (200 a 230 nm), onde se pode observar que os espectros apresentam o mesmo perfil espectral, variando apenas na sua intensidade. Considerando que a espécie *Ocotea fragrantissima* apresentou o perfil espectral muito similar ao de todas as outras espécies (figura 26) e que também possui perfil espectral com as mesmas bandas observadas nos padrões de lignina e celulose (figura 20), pode-se inferir que todas as madeiras estudadas possuem fluorescência nessa região, e que esta pode estar sendo gerada somente pelos constituintes principais da madeira (celulose e lignina) e não por seus extrativos.

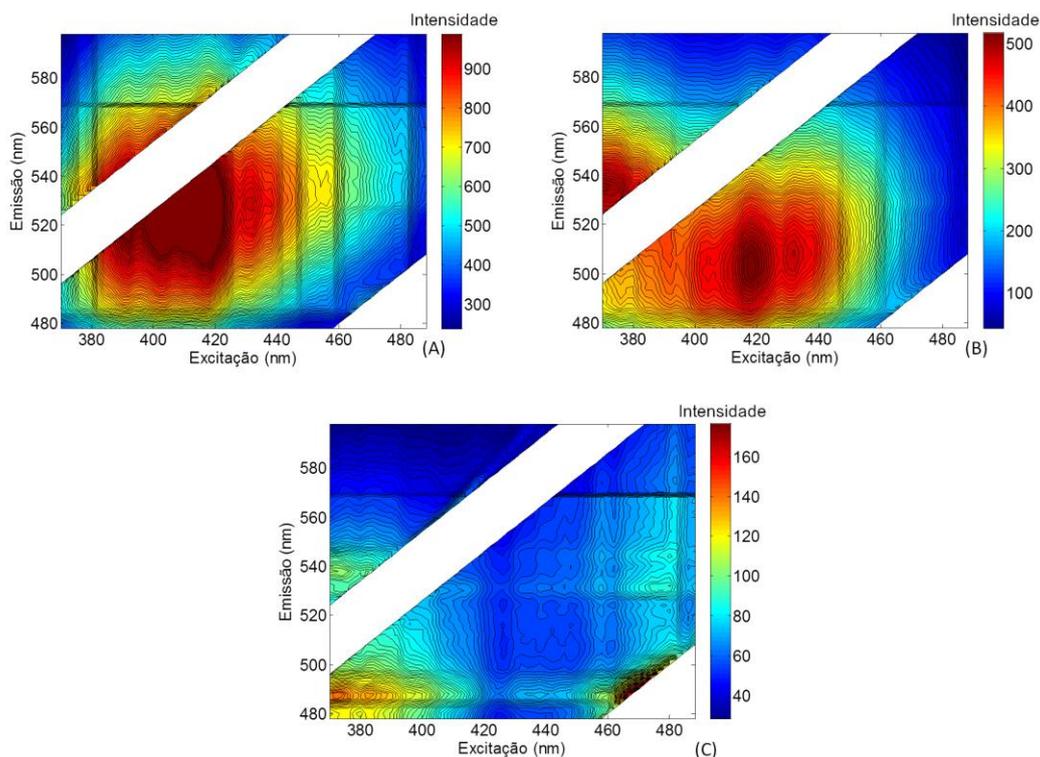


**Figura 26.** Espectros de emissão de todas as espécies com excitação em 218nm.

Ao contrário da região mais energética, na região menos energética é possível observar que existem comportamentos distintos entre os espectros de fluorescência de diferentes espécies entre as espécies de madeira estudadas. A figura 27 mostra a superfície de fluorescência em curvas de nível de três diferentes espécies, as quais apresentam os principais comportamentos espectrais observados nas 16 espécies estudadas. O comportamento dos espectros de emissão com o aumento do comprimento de onda de excitação foi bem diferente em cada espécie. Além disso, as intensidades observadas foram muito distintas.

Espectros como os das figuras 27 (A), da *Euxylophora paraensis*, e 27(B), da *Rhus typina*, foram diferentes dos obtidos para as outras espécies estudadas, pois além de possuírem perfis espectrais mais característicos, apresentaram grandes intensidades. De forma geral, a maioria das espécies apresentou espectros como o da figura 27 (C), da espécie *Hymenolobium pulcherrimum*, sendo que foram observadas variações nas intensidades dos picos de acordo com a espécie analisada. Ademais, as espécies que possuíam a mesma cor

nas observações com gabinete de fluorescência, mostraram comportamentos espectrais semelhantes.



**Figura 27.** Superfícies de fluorescência para as espécies (A) *Euxylophora paraensis*; (B) *Rhus typina*; (C) *Hymenolobium pulcherrimum*, com os espalhamentos corrigidos.

Ao observar similaridades entre as espécies, optou-se por separar as espécies por família ou pela cor observada e semelhança de perfil espectral. As amostras que não se encaixavam em nenhuma das duas formas de separação foram analisadas separadamente. A tabela 4 mostra os grupos formados para a análise com MCR, de acordo com os critérios mencionados.

Conforme discutido anteriormente, os dados de cada amostra foram analisados separadamente com o MCR e os que apresentaram perfis espectrais próximos foram agrupados para que fosse realizada uma nova análise com MCR, agora, organizando em uma mesma matriz de dados mais de uma amostra.

O grupo 1 foi formado por espécies de um mesmo gênero e que possuem a mesma cor de fluorescência de acordo com observações feitas no gabinete de fluorescência. Os grupos 2 e 3 foram formados por dois gêneros distintos

com espécies que possuem fluorescência amarelada ou nenhuma fluorescência observada a olho nu. O grupo 4, foi formado por duas espécies de gêneros diferentes. Contudo, essas espécies apresentaram a mesma cor de fluorescência e geraram espectros similares quando analisadas isoladamente por MCR.

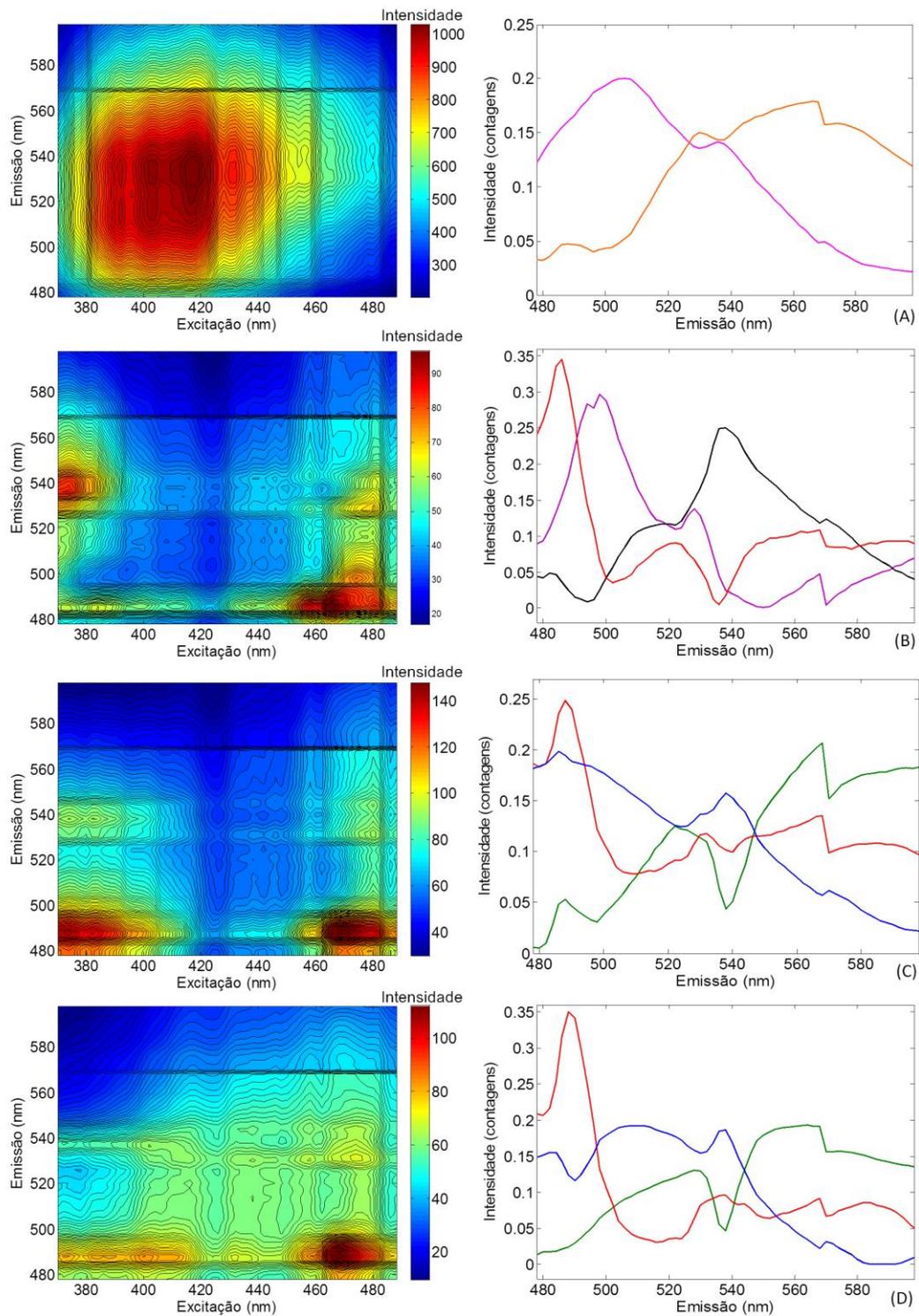
**Tabela 4.** Grupos formados para a análise de fluorescência de acordo com o MCR

Nome da Espécie	Fluorescência observada	Grupo
<i>Parkia pendula</i> e <i>Parkia multijuga</i>	Laranja	1
<i>Amburana acreana</i> e <i>Amburana cearenses</i>	Amarela ou Não-fluorescente	2
<i>Couratari multiflora</i> , <i>Couratari stellata</i> , <i>Couratari macrosperma</i> , <i>Couratari oblongifolia</i> e <i>Couratari guianensis</i>	Amarela ou Não-fluorescente	3
<i>Vochysia máxima</i> e <i>Hymenolobium pulcherrimum</i>	Laranja	4
<i>Caryocar glabrum</i>	Azul	5
<i>Dinizia excelsea</i>	Amarela	6
<i>Euxylophora paraenses</i>	Amarela	7
<i>Ocotea fragrantissima</i>	Amarela	8
<i>Rhus typina</i>	Amarela esverdeada	9

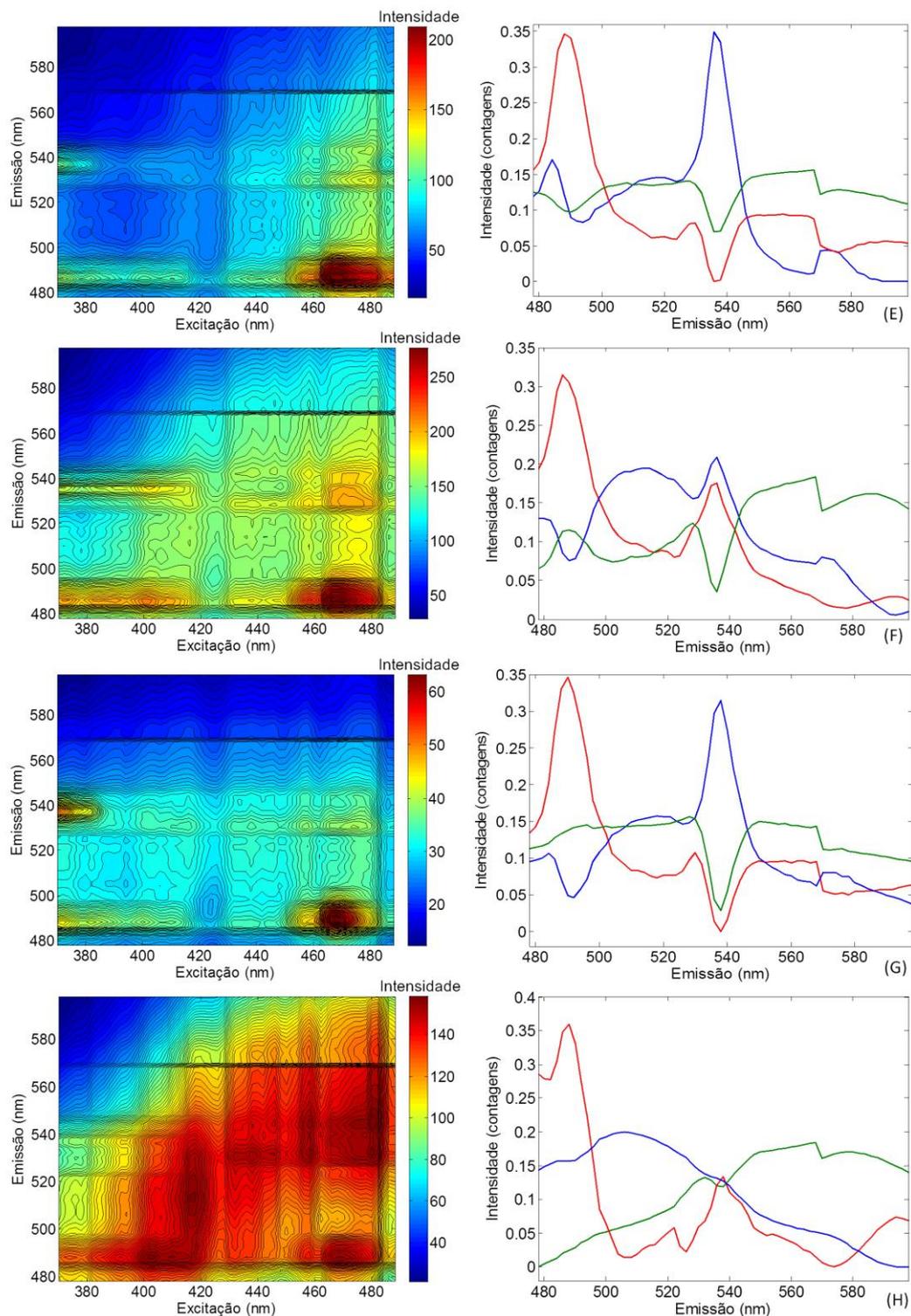
Os grupos 5, 6, 7, 8 e 9 foram formados por apenas uma espécie de madeira. Estas espécies foram analisadas separadamente, pois seu comportamento espectral mostrou-se muito diferente das demais, não se encaixando, assim, em nenhum grupo.

A figura 28 mostra as superfícies de fluorescência e os perfis espectrais estimados pelo MCR para 8 espécies dentre as estudadas. Observou-se que apenas a madeira da espécie *Euxylophora paraenses* presente no gráfico da figura 28 (A) possui dois componentes. Constatou-se que esta foi a espécie que apresentou o comportamento mais distinto das demais, pois os espectros de emissão obtidos foram mais intensos e diferentes das outras espécies. As demais amostras mostradas nessa figura apresentaram três componentes, e,

observando os espectros de emissão, é possível perceber as diferenças e similaridades existentes.



**Figura 28.** Espectros de curvas de nível (a direita) e de emissão (a esquerda) das espécies (A) *Euxylophora paraensis*; (B) *Dinizia excelsa*; (C) *Hymenolobium pulcherrimum*; (D) *Caryocar glabrum*.



**Figura 28.** Continuação. Espectros de curvas de nível (a direita) e de emissão (a esquerda) das espécies: (E) *Amburana acreana*; (F) *Couratari oblongifolia*; (G) *Ocotea fragrantissima* e (H) *Parkia pendula*.

É importante ressaltar que o termo “componente” representa a fluorescência caracterizada por um par de espectros de emissão e excitação

obtidos pelo MCR, sendo que esses espectros característicos são gerados por um grupo fluorescente (fluoróforo) que pode estar presente em um único composto, conjunto de compostos ou classes de compostos presentes na madeira.

Considerando que cada cor refere-se a um componente distinto, tem-se que as figuras 28 (C) para o *Hymenolobium pulcherrimum*, (D) *Caryocar glabrum*, (E) *Amburana acreana*, (F) *Couratari oblongifolia*, (G) *Ocotea fragrantissima* e (H) *Parkia pendula* apresentaram os mesmos componentes. As maiores diferenças entre estes espectros foram observadas na região próxima a 540 nm, sendo que estas podem ser devido a um erro de modelagem do MCR causada pela exclusão da região de ocorrência de espalhamento. Dentre estas espécies, tem-se fluorescência com a cor amarelada fraca (Figura 28 E, F e G), alaranjada (Figura 28 C e H) e azulada (Figura 28 D). Esta cor observada visualmente pode ser consequência da mistura da cor/intensidade emitida por cada componente. Assim, mesmo possuindo a princípio os mesmos componentes fluorescentes, devido a proporções diferentes podem ser geradas cores distintas.

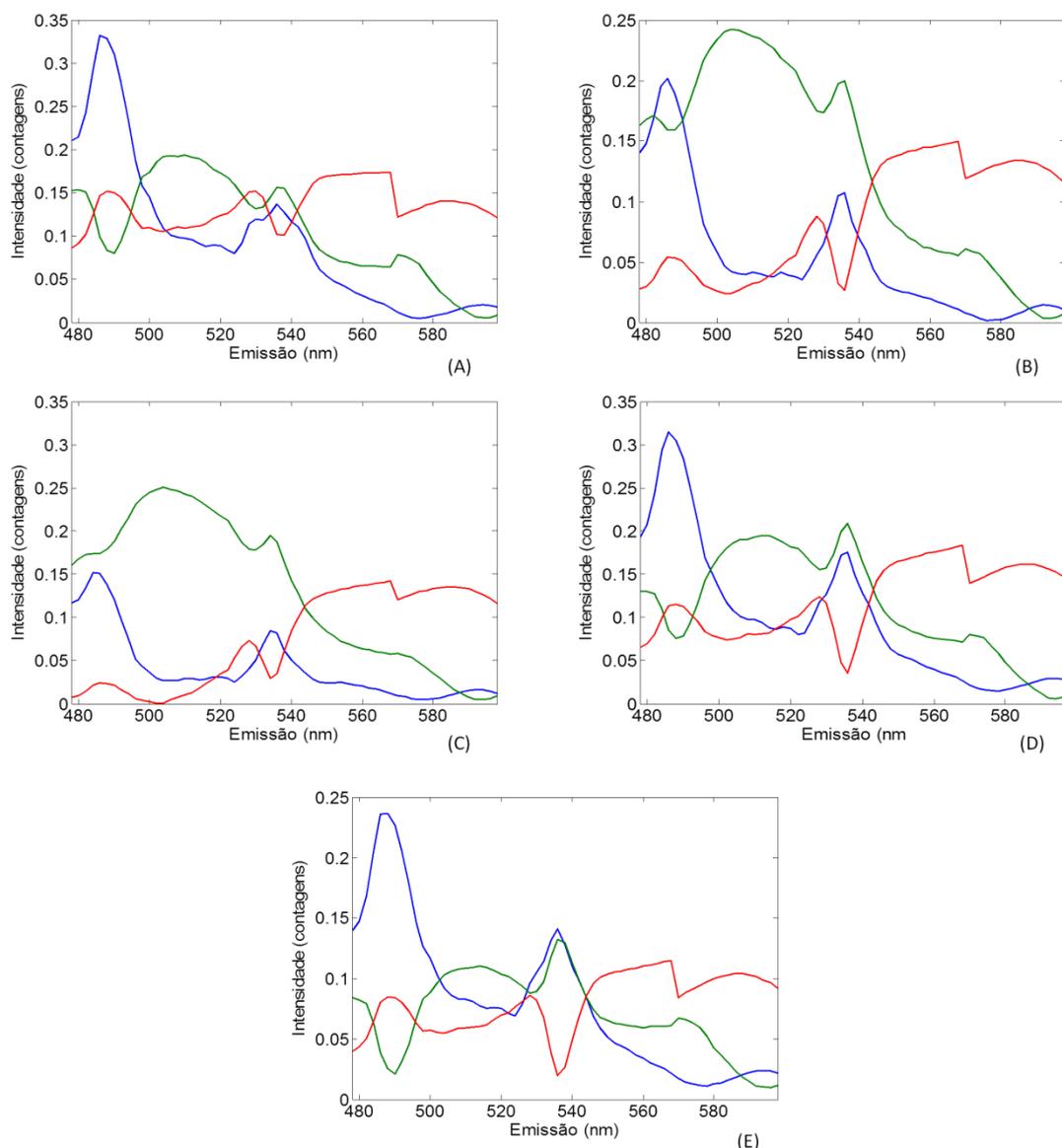
O espectro de emissão observado na Figura 28 (B) da *Dinizia excelsa* apresentou três componentes e apenas o espectro vermelho foi semelhante aos espectros expostos da Figura 28 (C) até a Figura 28 (H). Os outros dois componentes, nas cores roxa e preta, foram diferentes dos demais. Foi observado que a espécie *Dinizia Excelsa* possui fluorescência amarelada e foi considerada uma das mais fluorescentes dentre as espécies estudadas.

É importante ressaltar que na maioria das referências<sup>3,5,6,15,16</sup>, quando fluorescência azul é observada, a espécie era considerada não-fluorescente, pois a fluorescência azul foi tida como uma reflexão da lâmpada UV do gabinete de fluorescência. Na figura 28 (D) é apresentada a fluorescência do espectro da espécie *Caryocar glabrum* na região do visível que apresentou fluorescência de cor azul a olho nu, quando observada no gabinete de fluorescência. Assim, pode-se concluir que no caso desta espécie de madeira, a fluorescência não pode ser atribuída a reflexão da lâmpada UV, já que na análise de fluorescência com espectrofluorímetro são utilizados

monocromadores dispostos em ângulo de 90° que selecionam comprimentos de onda de emissão específicos, e praticamente eliminam o efeito da reflexão da lâmpada.

A figura 29 mostra os espectros de emissão após o MCR das cinco espécies de Courataris (grupo 3). Cada gráfico apresentou três espectros de emissão, o que indica que cada espécie de madeira apresentou três componentes pela melhor estimativa do MCR. Observa-se que os espectros plotados com a mesma cor apresentam grande similaridade, correspondendo, assim, a um fluoróforo comum a todas as espécies. Portanto pode-se inferir que esses espectros presentes em diferentes espécies na figura 29 referem-se ao mesmo fluoróforo, sendo que a diferença observada entre eles seria apenas na intensidade do sinal ou na proporção desses componentes.

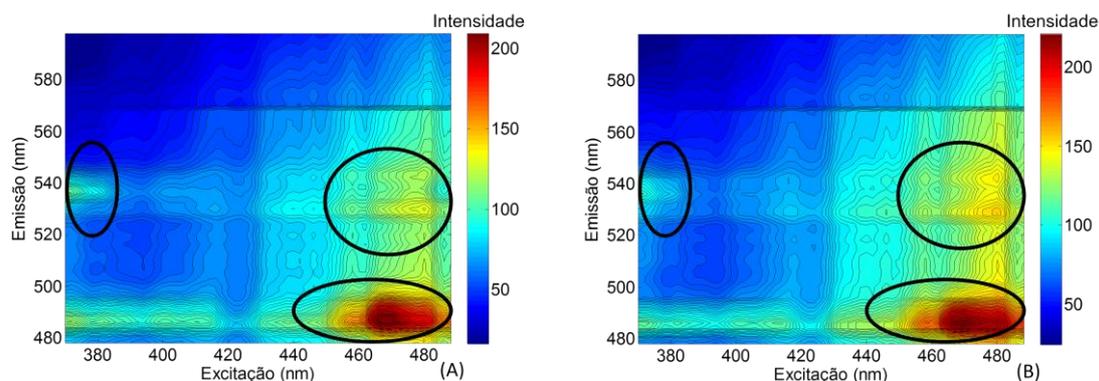
Alguns dos espectros representados pela cor azul (figura 28) e pela cor verde (figura 29) apresentaram dois máximos, um em torno de 510 nm e outro em 540 nm. No trabalho de Pandey et al são informados dois máximos, um em 440 nm e outro em 540 nm os quais são atribuídos a celulose e lignina, respectivamente.<sup>8</sup> Sendo assim, pode-se inferir que o mesmo componente ou conjunto de componentes fluoresce na maioria das madeiras estudadas e, considerando o trabalho de Pandey et al., estes espectros podem ser atribuídos a lignina. O deslocamento existente no primeiro sinal (de 440 nm para 510 nm) pode ser atribuído a algum componente que pode estar interagindo de forma diferente com a lignina, gerando, assim, um sinal diferente.



**Figura 29.** Espectros de emissão dos três componentes presentes nas diferentes espécies do gênero *Couratari*, sendo elas (A) *Couratari multiflora*; (B) *Couratari stellata*; (C) *Couratari macrosperma*; (D) *Couratari oblongifolia* e (E) *Couratari guianensis*.

A figura 30 mostra as superfícies de fluorescência estimadas por MCR de duas espécies da família das Amburanas. Observa-se que a fluorescência de ambas as amostras é muito semelhante. A figura 30 (B) apresentou todas as regiões circuladas com intensidade maior que a figura 30 (A). Isto pode ser visto considerando a barra de cores, que mostra a intensidade da primeira com máximo próximo a 200 e a segunda com máximo acima de 200. Observou-se que uma das espécies, a *A. acreana*, é fluorescente a olho nu (Ver Tabela 9) e

a *A. cearensis* não. Isto pode ser confirmado pela intensidade de fluorescência observada entre elas.



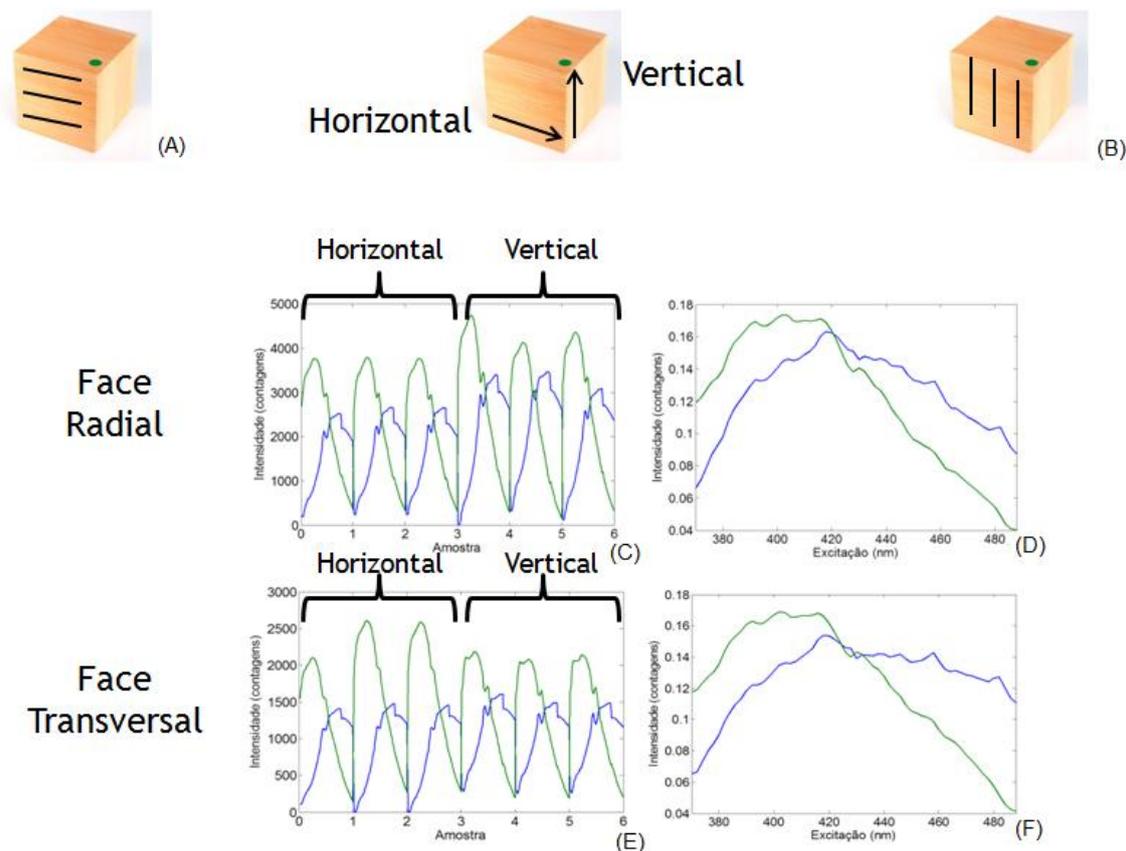
**Figura 30.** Superfície de fluorescência das espécies de (A) *Amburana cearensis* e (B) *Amburana acreana*

Com o objetivo de analisar a precisão do método e as principais diferenças entre as faces (transversal, tangencial e radial), uma amostra da espécie *Euxylophora paraensis* foi analisada nas posições horizontal e vertical (Figuras 31 A e B, respectivamente), em três alturas diferentes perfazendo o total de 6 medidas em cada face dos corpos de prova de 2x2x2 cm.

A figura 31 (C) mostra os espectros de emissão da face radial. Foram encontrados dois componentes de acordo com o MCR. Os seis primeiros espectros (três verdes e três azuis) são referentes a orientação horizontal, enquanto que os outros seis são os obtidos na orientação vertical.

Na figura 31 (E) são apresentados dois componentes na face transversal. Os primeiros espectros (3 verdes e 3 azuis) da figura 31 (E) são referentes a orientação horizontal e os outros 6 são referentes a face vertical.

As figuras 31 (D) e 31 (F) mostram os espectros de excitação. Como a espécie era a mesma, apenas com orientações diferentes, os espectros mostraram-se iguais, como já era esperado.



**Figura 31.** Orientações horizontal (A) e vertical (B) e espectros de emissão das faces (C) radial e (E) transversal da espécie *Euxylophora paraensis*, sendo 0-3 com a direção da amostra na posição horizontal e 3-6 na posição vertical. Espectros de excitação das faces (D) radial e (F) transversal (—) Componente 1 e (—) Componente 2.

A tabela 5 mostra os resultados encontrados para as intensidades relativas (R) de cada um dos componentes apresentado na figura 31.

Utilizando os resultados da tabela 5 foi possível realizar dois testes. O teste F para avaliar a diferença entre as variâncias dos resultados e o teste t para avaliar se existe diferença significativa nas intensidades relativas estimadas encontradas.

Considerando que o teste t, com 95% de confiança e 4 graus de liberdade, a diferença entre as orientações horizontal e vertical foi significativa na face radial para ambos os componentes. Contudo, a diferença entre os desvios padrões nas orientações desta face não foi significativa, pelo teste F com 95% de confiança e 2,2 graus de liberdade.

**Tabela 5.** Resultados obtidos para as intensidades relativas (R) de fluorescência dos componentes 1 e 2, apresentados na figura 31.

Face	Orientação	Componente	R <sup>b</sup>	Desvio Padrão <sup>a,b</sup>	Variância
Radial	Horizontal	1	1,05	0,04	0,0016
		2	1,33	0,10	0,0010
	Vertical	1	1,43	0,01	0,0001
		2	1,62	0,12	0,0144
Transversal	Horizontal	1	0,559	0,005	0,0002
		2	0,925	0,125	0,1550
	Vertical	1	0,658	0,031	0,0096
		2	0,825	0,017	0,0031

(a) Unidades arbitrárias. (b) nº de medidas com (N) igual a 3.

Utilizando o mesmo raciocínio, pode-se concluir que o teste t, com 95% de confiança e 2 graus de liberdade, a diferença entre as orientações horizontal e vertical não foi significativa na face transversal. Entretanto, a diferença entre os desvios padrões nas orientações desta face foi significativa, pelo teste F com 95% de confiança e 2,2 graus de liberdade.

Estes resultados mostraram que a precisão das medidas não variou de forma significativa na face radial. Contudo, quanto aos valores de intensidade para os componentes 1 e 2 houve diferença em analisar na orientação vertical ou horizontal.

Já para a face transversal, houve uma grande variação na análise realizada em cada região da madeira (mais alto, no meio ou mais baixo), mas não houve diferença significativa ao se utilizar as orientações horizontal e vertical.

Anatomicamente isto pode ser explicado novamente pela orientação do raio. Na face radial, a diferença entre as orientações horizontal e vertical é significativa, pois foi possível enxergar pedaços do raio na orientação vertical e o raio “mais completo” na orientação horizontal. A diferença relacionada a posição do feixe (mais acima, no meio ou abaixo do corpo de prova) sofre

menor influência, pois os raios aparecem largos na face radial, independente da altura em que está sendo realizada a análise.

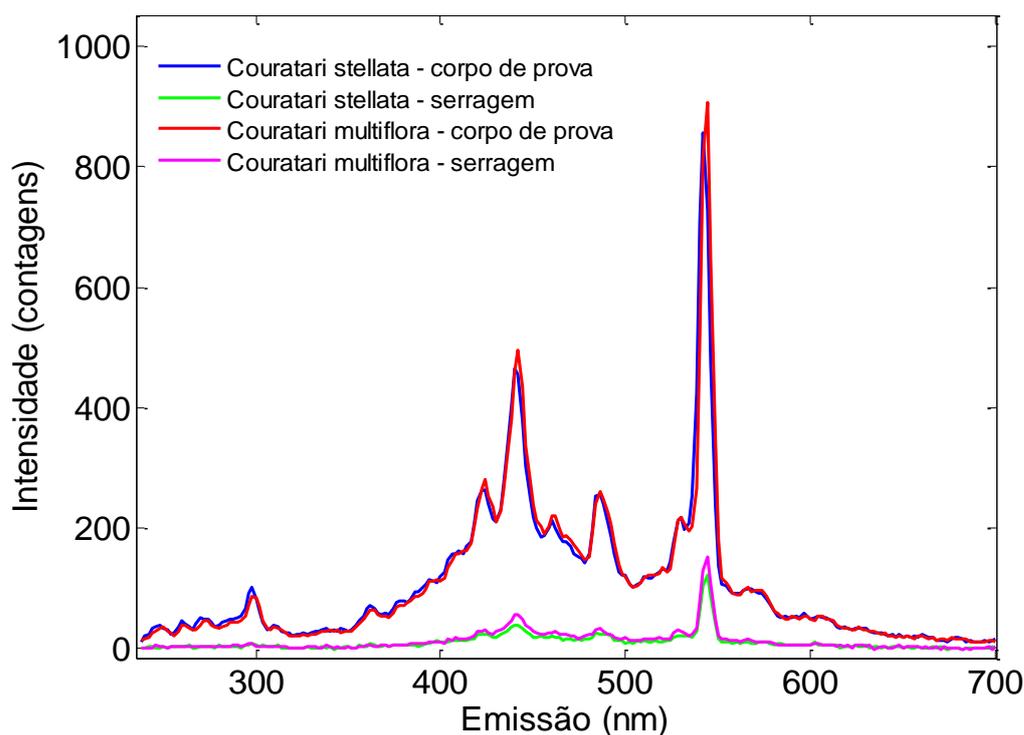
Na face transversal, o raciocínio foi oposto. Como a distância entre os raios e o diâmetro deles é pequeno, não houve diferença significativa em analisar nas orientações vertical e horizontal. Quanto a posição do feixe, a diferença foi significativa, pois ao mudar a região, o analista pode não conseguir posicionar o feixe em cima do raio, e sim entre dois raios.

Além disso, é importante observar que o feixe de radiação incidido na madeira tinha aproximadamente 1 mm por 10 mm de largura e comprimento, respectivamente. Sendo assim, o feixe de radiação apresenta dimensões suficientes para realizar a excitação de uma área relativamente grande, mas que ainda depende da orientação e de algumas estruturas anatômicas que podem estar presentes, dependendo da espécie analisada.

### **4.3 Análise da fluorescência da madeira em forma de serragem de diferentes espécies**

A análise com a madeira em forma de serragem seguiu os mesmos parâmetros utilizados para a madeira em corpos-de-prova, com exceção dos estudos de faces ou de lixas, pois a madeira já se encontra em forma de “pó”. As madeiras também foram separadas em grupos, conforme a tabela 4 da sessão anterior.

A maior diferença encontrada na madeira nessas duas formas de apresentação foi a intensidade de fluorescência dos espectros. A figura 32 apresenta os espectros de duas espécies de madeira, em forma de serragem e em corpo de prova. Foi observado que os espectros de maior intensidade foram de análises feitas com madeira em corpos-de-prova. Uma possível explicação para a menor intensidade em serragem foi que com o aumento da superfície de contato da madeira em forma de “pó”, houve um favorecimento da oxidação dos componentes da madeira, diminuindo, assim, a intensidade de fluorescência medida.

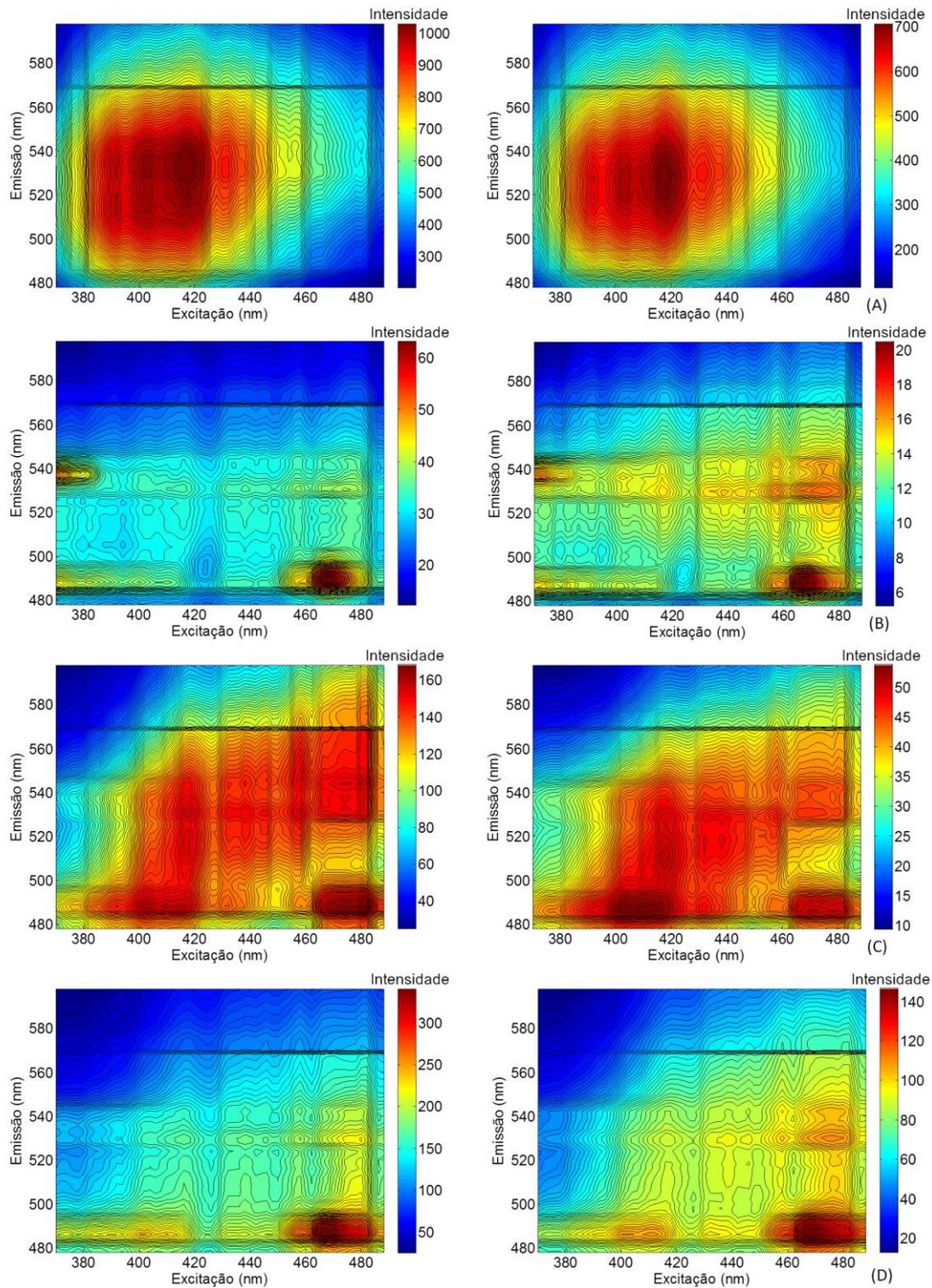


**Figura 32.** Espectros de emissão de duas espécies de madeira uma em forma de corpo de prova e outra em forma de serragem, excitados em um comprimento de onda de excitação de 218 nm.

A figura 33 mostra a superfície de fluorescência de curvas de nível de quatro amostras diferentes em corpos-de-prova (a esquerda) e serragem (a direita). Foi possível notar que as superfícies foram muito similares, sendo a maior mudança observada relacionada à intensidade do sinal, que foi maior para as amostras de madeira em corpos de prova.

Avaliando e comparando os resultados obtidos em madeira em forma de corpos de prova ou em forma de serragem foi possível inferir que a análise realizada em corpos de prova é mais prática, pois proporciona maiores intensidades e pode ser realizada em campo mais facilmente.

Em contrapartida, as análises realizadas com serragem geram resultados menos intensos, mas por ser feita de forma homogênea, os resultados proporcionam menores variações.



**Figura 33.** Espectros em curvas de nível de quatro espécies de madeiras. Os espectros a esquerda são de corpos-de-prova e os espectros a direita são de serragem: (A) *Euxylophora paraensis*; (B) *Ocotea fragrantissima*; (C) *Parkia pendula* e (D) *Amburana acreana*.

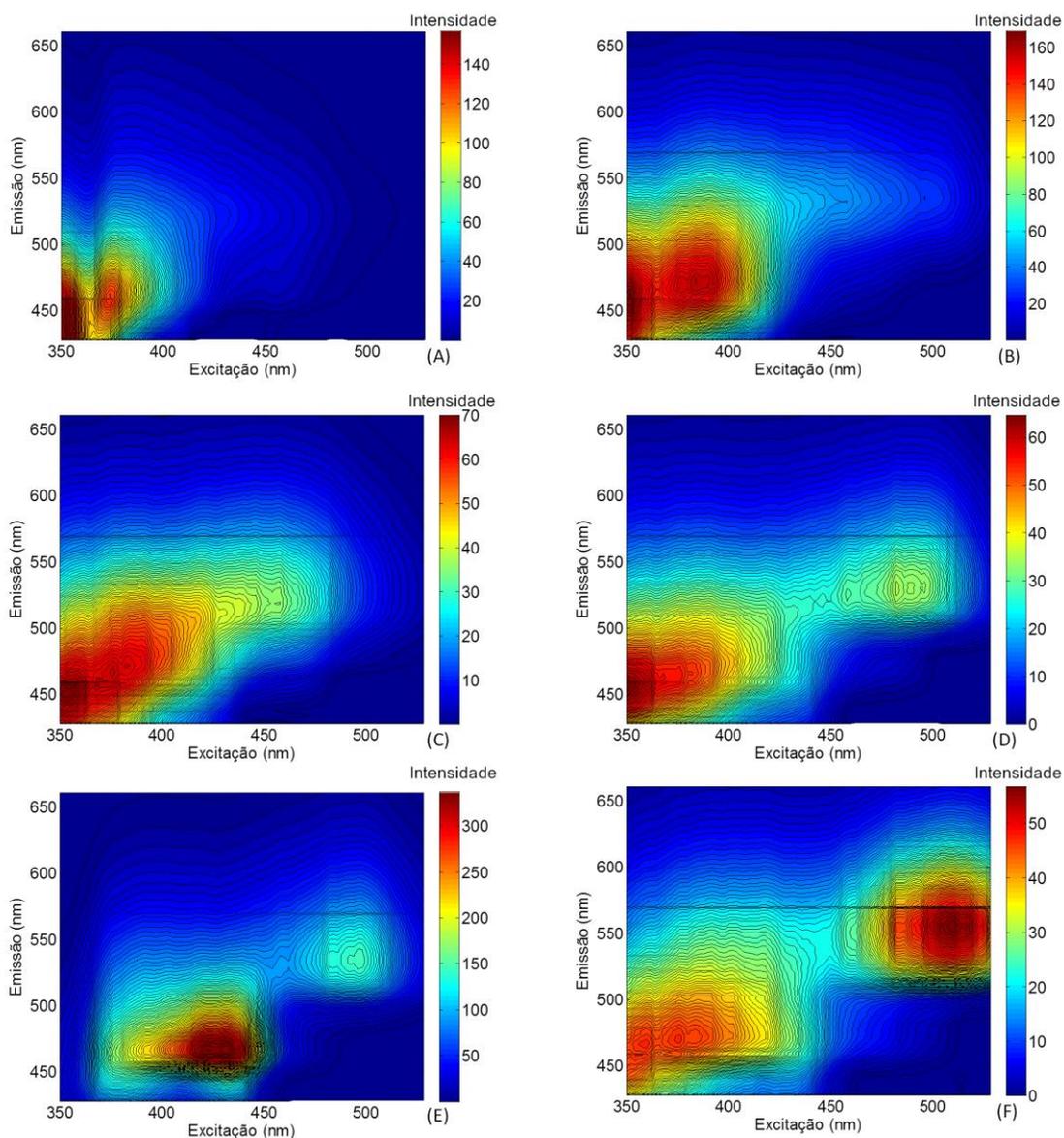
#### 4.4 Análise da fluorescência de extratos de madeira

De acordo com as referências bibliográficas,<sup>4,17</sup> as extrações mais usuais para amostras de madeira são realizadas com água tamponada com pH em torno de 7 e com etanol. Entretanto, para avaliar a extração com diferentes solventes, nesse trabalho foram produzidos extratos em três solventes: água tamponada a pH 7, diclorometano e etanol. A figura 34 mostra os espectros em curvas de nível da fluorescência do extrato de seis espécies diferentes extraídas com água tamponada. As Figuras 34 (B) da *Ocotea fragrantissima* e 34 (C) da *Parkia pendula*; apresentaram emissões semelhantes, ou seja, a água pode ter extraído os mesmos componentes nessas amostras. O mesmo comportamento foi observado nas figuras 34 (D) da *Parkia multijuga* 34 (E) da *Hymenolobium pulcherrimum* e 34 (F) da *Vochysia maxima* onde se observou uma banda com máximos em 490 e 540 nm de excitação e emissão respectivamente. Já a figura 34 (A) da *Euxylophora paraensis* apresentou emissões distintas dos demais.

Por outro lado, ao analisar os espectros de emissão obtidos pela análise de MCR (figura 35), notou-se que todas as espécies apresentaram três fluoróforos e espectros com grande semelhança entre si. Isto sugere que, em algumas das espécies de madeira estudadas, a água extrai os mesmos compostos ou grupo de compostos químicos, estando estes presentes em todas as espécies estudadas.

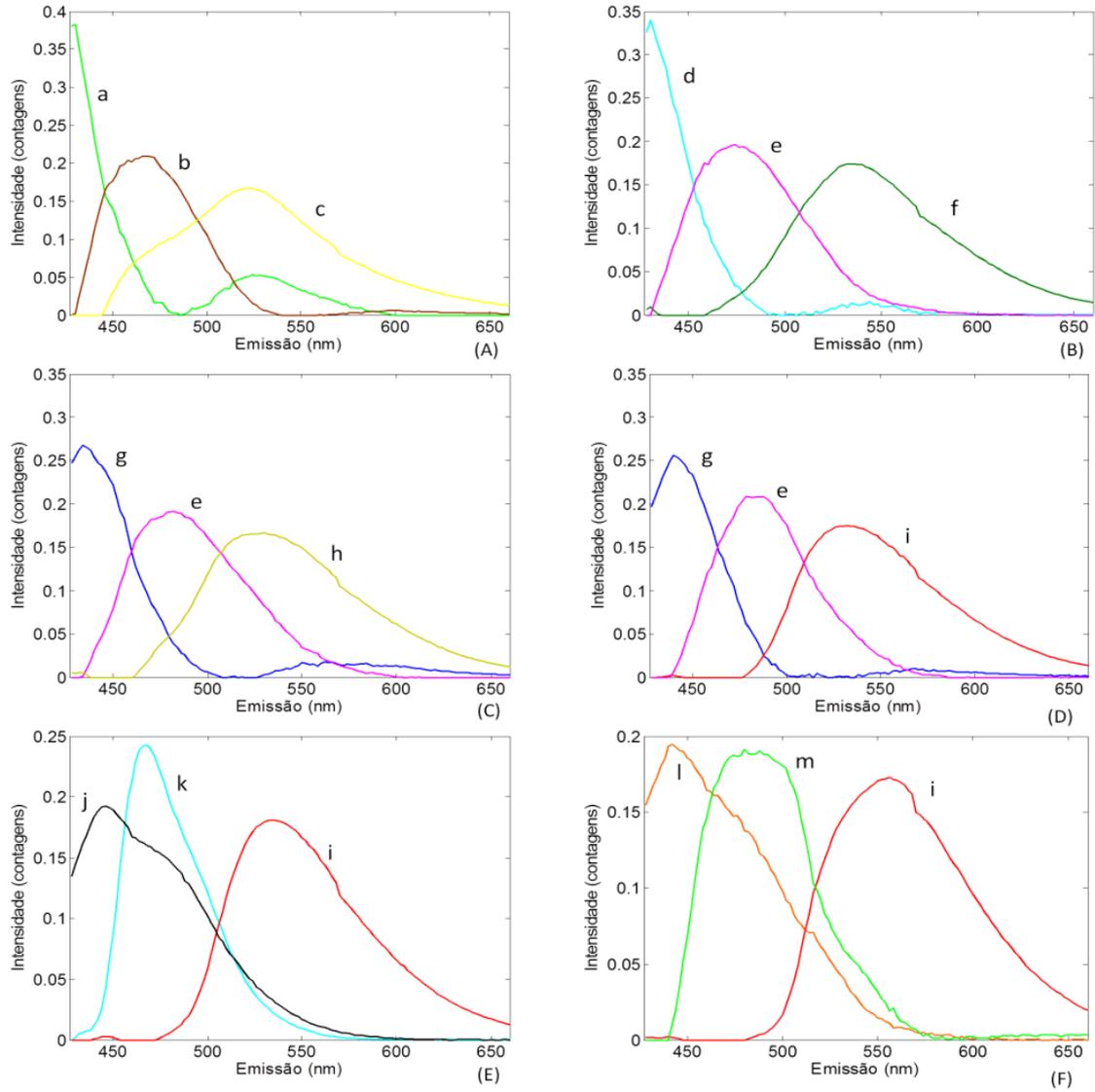
Para avaliar se os mesmos componentes estavam sendo extraídos em diferentes espécies, apenas os espectros de emissão não foram suficientes. Por isto, também devem ser analisados os espectros de excitação. Se ambos forem iguais, é possível sugerir que o mesmo fluoróforo pode estar presente em mais de uma espécie.

A figura 36 mostra os espectros de excitação das mesmas espécies anteriormente citadas, extraídas com água tamponada. Analisando os espectros de emissão juntamente com os de excitação, observou-se que o componente retratado com a cor azul nos espectros aparece nas figuras 35 e 36 (C) e (D), podendo ser o mesmo fluoróforo que está presente em duas espécies diferentes.

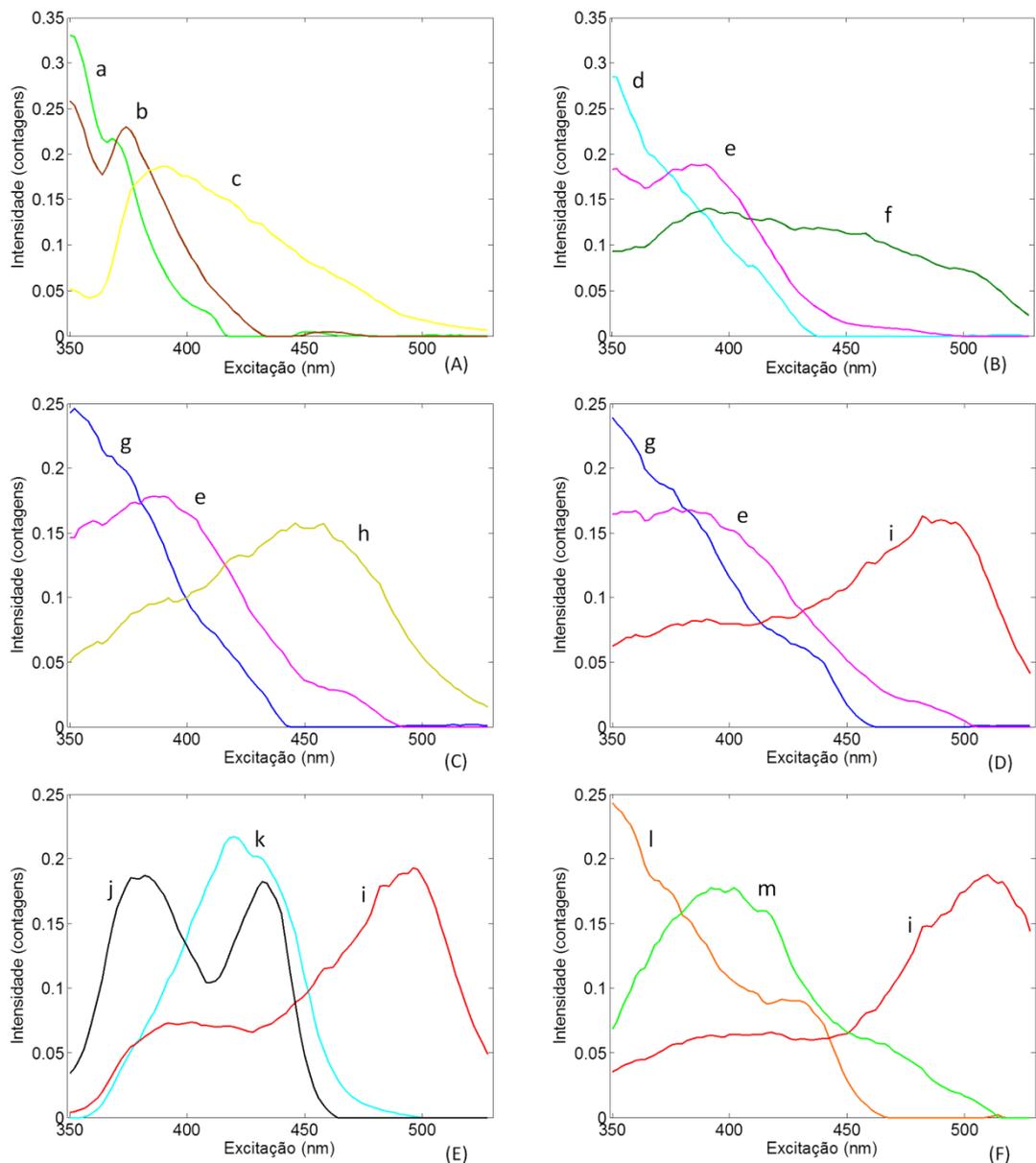


**Figura 34.** Superfície de fluorescência em curvas de nível para os extratos de seis espécies florestais em água. (A) *Euxylophora paraensis*; (B) *Ocotea fragrantissima*; (C) *Parkia pendula*; (D) *Parkia multijuga*; (E) *Hymenolobium pulcherrimum* e (F) *Vochysia máxima*

As amostras das figuras 35 e 36 (C) e (D), parecem possuir os dois fluoróforos iguais, pois possuem todos os espectros apresentados com as cores azul e rosa muito semelhantes. Observou-se que o componente retratado com a cor vermelha nos espectros das figuras 35 e 36 (D), (E) e (F) esteve presente em 3 espécies distintas.



**Figura 35.** Espectros de emissão do extrato de seis espécies em água obtidos por MCR. (A) *Euxylophora paraensis*; (B) *Ocotea fragrantissima*; (C) *Parkia pendula*; (D) *Parkia multijuga*; (E) *Hymenolobium pulcherrimum* e (F) *Vochysia maxima*. As letras minúsculas retratam componentes diferentes.



**Figura 36.** Espectros de excitação do extrato de seis espécies em água obtidos por MCR. (A) *Euxylophora paraensis*; (B) *Ocotea fragrantissima*; (C) *Parkia pendula*; (D) *Parkia multijuga*; (E) *Hymenolobium pulcherrimum* e (F) *Vochysia maxima*. As letras minúsculas retratam componentes diferentes.

Considerando as semelhanças discutidas anteriormente observou-se que os fluoróforos “e” e “i” se repetiram em três espécies, o “g” em duas e as demais presentes em apenas uma espécie (Tabela 6). Portanto, no extrato aquoso foram observados um total de 13 componentes/fluoróforos diferentes.

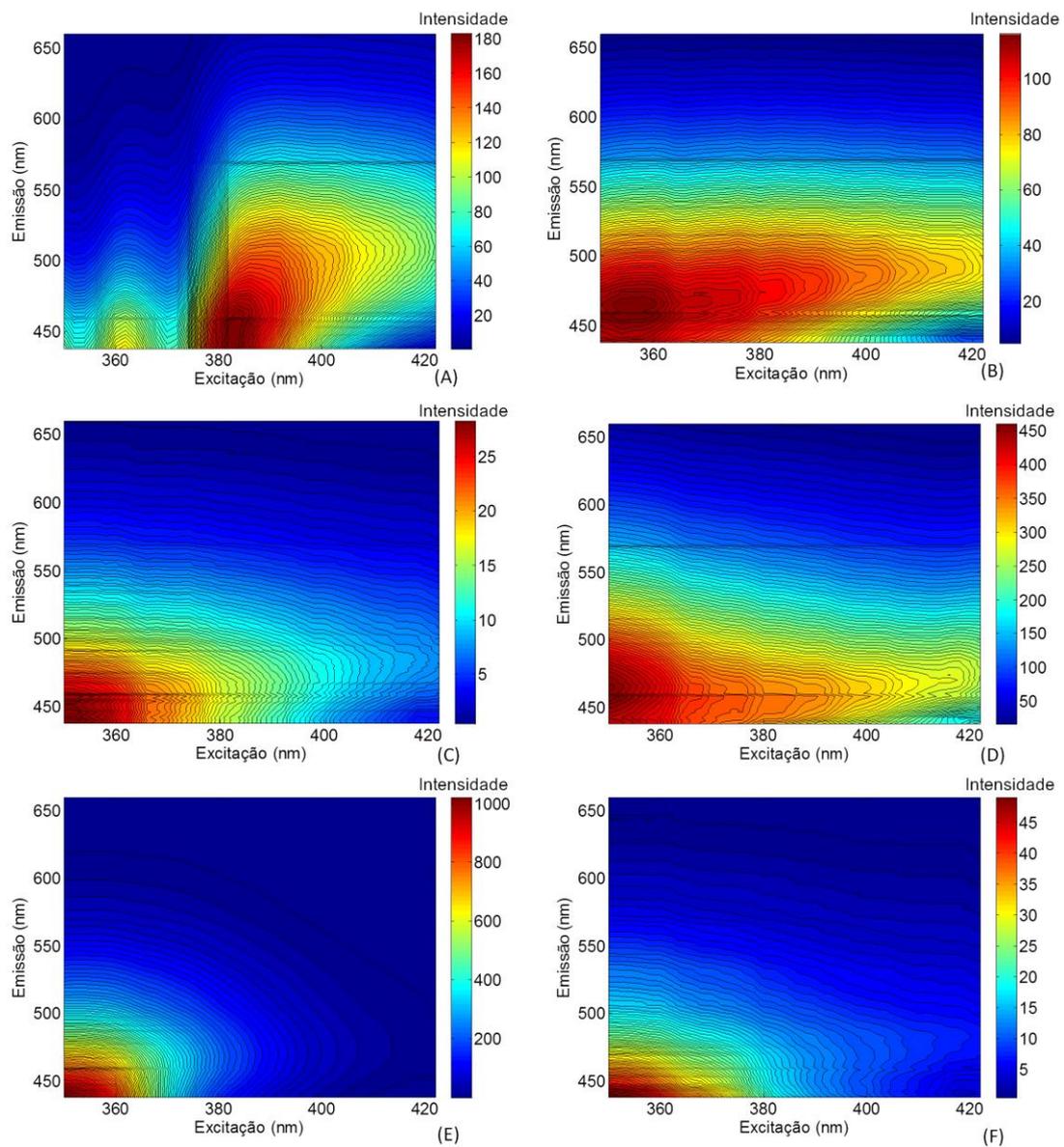
**Tabela 6.** Distribuição dos componentes /fluoróforos existentes em cada espécie extraídos com água tamponada a pH 7

<b>Espécie</b>	<b>Componente /Fluoróforo</b>										
<b>A</b>	a	b	c								
<b>B</b>				d	e	f					
<b>C</b>					e		g	h			
<b>D</b>					e		g		i		
<b>E</b>									i	j	k
<b>F</b>									i		l m

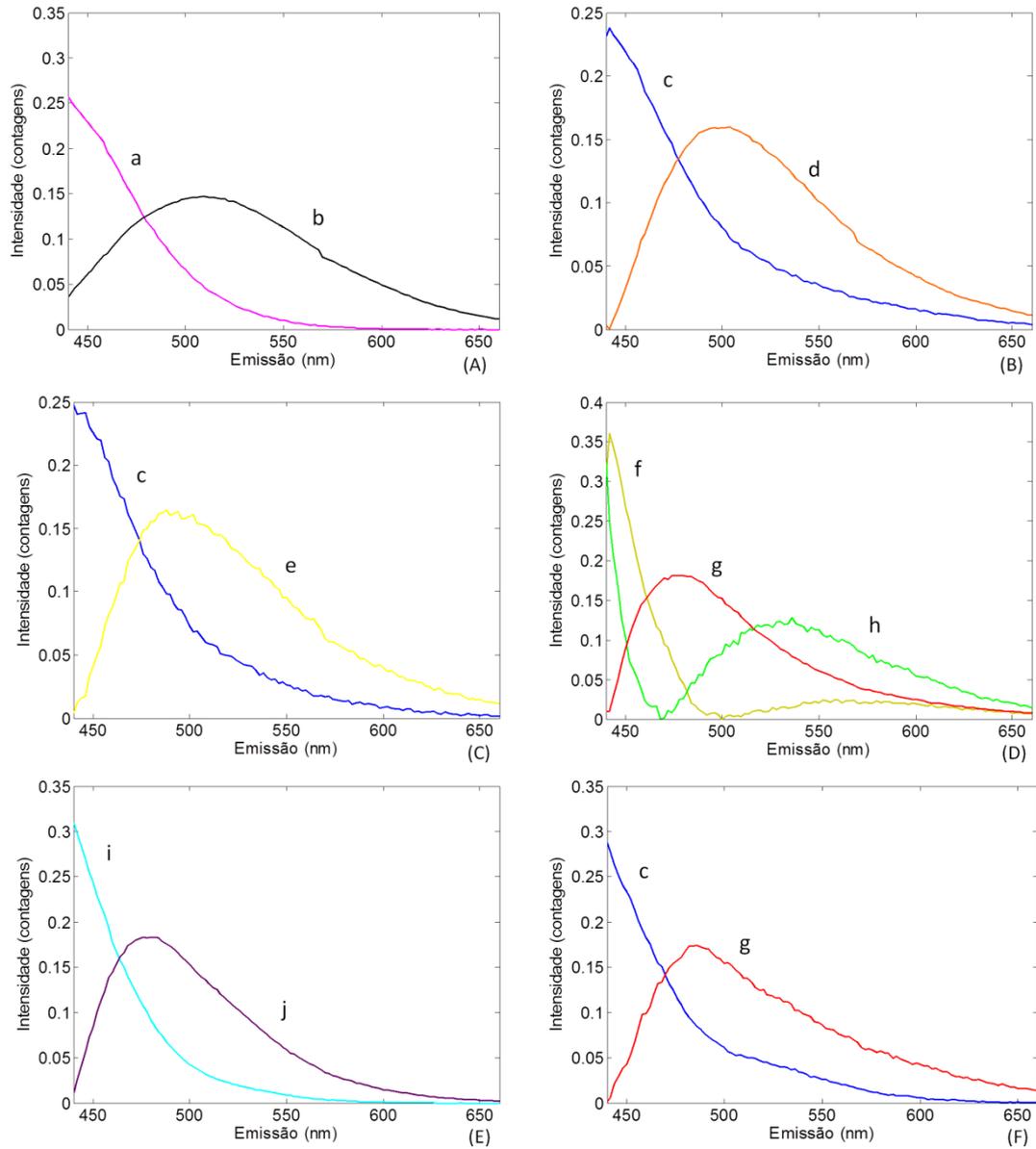
A figura 37 mostra os espectros de curvas de nível do extrato das mesmas amostras extraídas com água, só que agora, extraídas com diclorometano. Os espectros mostraram possuir comportamentos bastante distintos, apesar das figuras 37 (B), 37 (C) e 37 (F) possuírem similaridades.

Analisando os espectros de emissão obtidos após o MCR (figura 38), notou-se que todas apresentaram dois componentes, com exceção da figura 38 D que apresentou somente três. Foram observados espectros semelhantes em algumas, mudando, apenas, as intensidades.

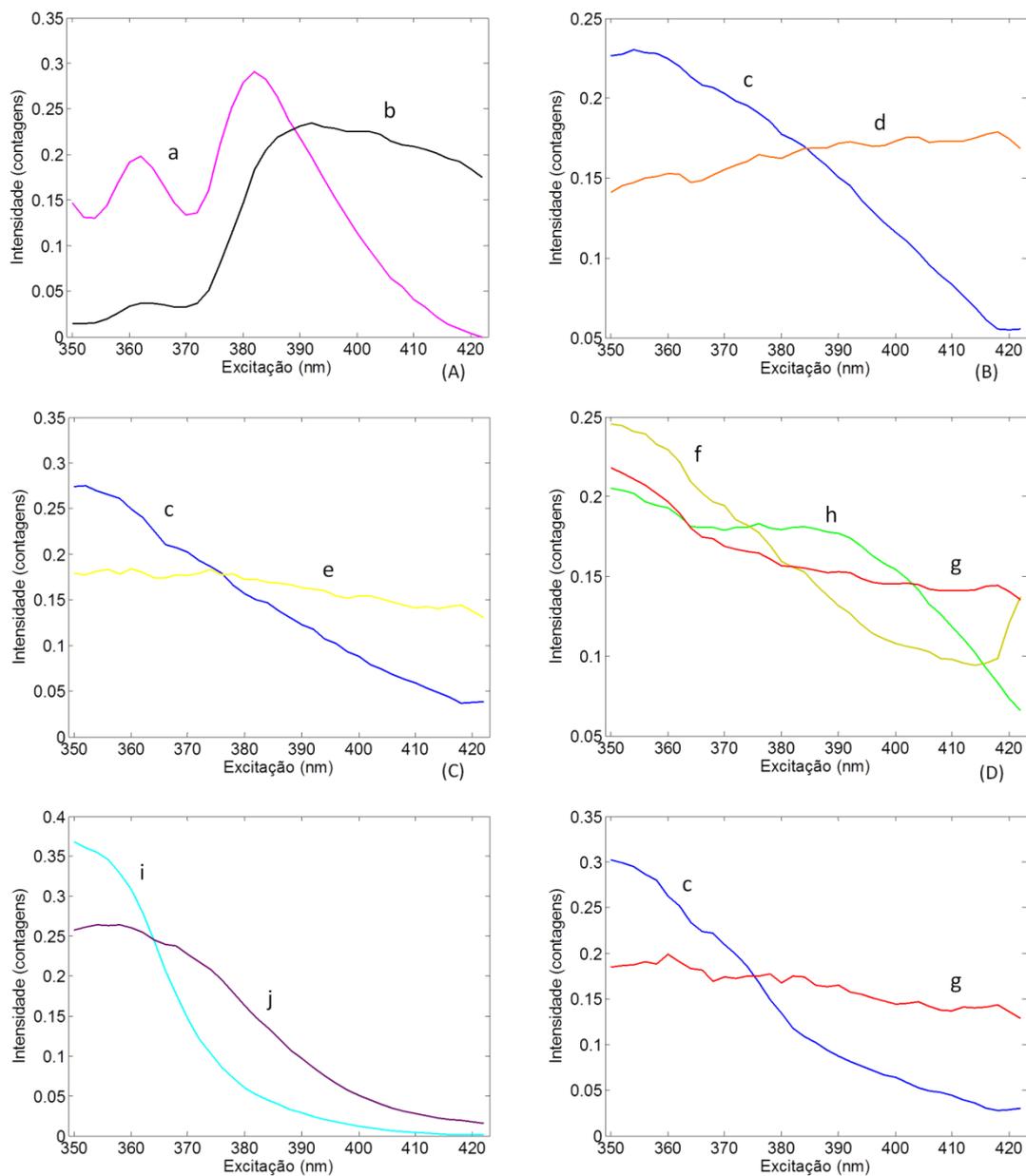
Analisando os espectros de emissão (Figura 38) juntamente com os de excitação (Figura 39), observa-se que o componente retratado com a cor vermelha esteve presente nas figuras 38 e 39 (D) e (F). Da mesma forma, as espécies das figuras 38 e 39 (B), (C) e (F), mostraram possuir um mesmo fluoróforo, retratado com a cor azul.



**Figura 37.** Espectros em curvas de nível do extrato de seis espécies em diclorometano. (A) *Euxylophora paraensis*; (B) *Ocotea fragrantissima*; (C) *Parkia pendula*; (D) *Parkia multijuga*; (E) *Hymenolobium pulcherrimum* e (F) *Vochysia maxima*.



**Figura 38.** Espectros de emissão do extrato de seis espécies em diclorometano obtidos por MCR. (A) *Euxylophora paraensis*; (B) *Ocotea fragrantissima*; (C) *Parkia pendula*; (D) *Parkia multijuga*; (E) *Hymenolobium pulcherrimum* e (F) *Vochysia maxima*. As letras minúsculas retratam componentes diferentes.



**Figura 39.** Espectros de excitação do extrato de seis espécies em diclorometano obtidos por MCR. (A) *Euxylophora paraensis*; (B) *Ocotea fragrantissima*; (C) *Parkia pendula*; (D) *Parkia multijuga*; (E) *Hymenolobium pulcherrimum* e (F) *Vochysia maxima*. As letras minúsculas retratam componentes diferentes.

Considerando as semelhanças discutidas anteriormente observou-se que o fluoróforo c se repete em três espécies, o “g” em duas e as demais presentes em apenas uma espécie (Tabela 7). Portanto, com extrato em diclorometano foram observados um total de 10 componentes/fluoróforos diferentes.

**Tabela 7.** Distribuição dos componentes/fluoróforos existentes em cada espécie extraídos com diclorometano

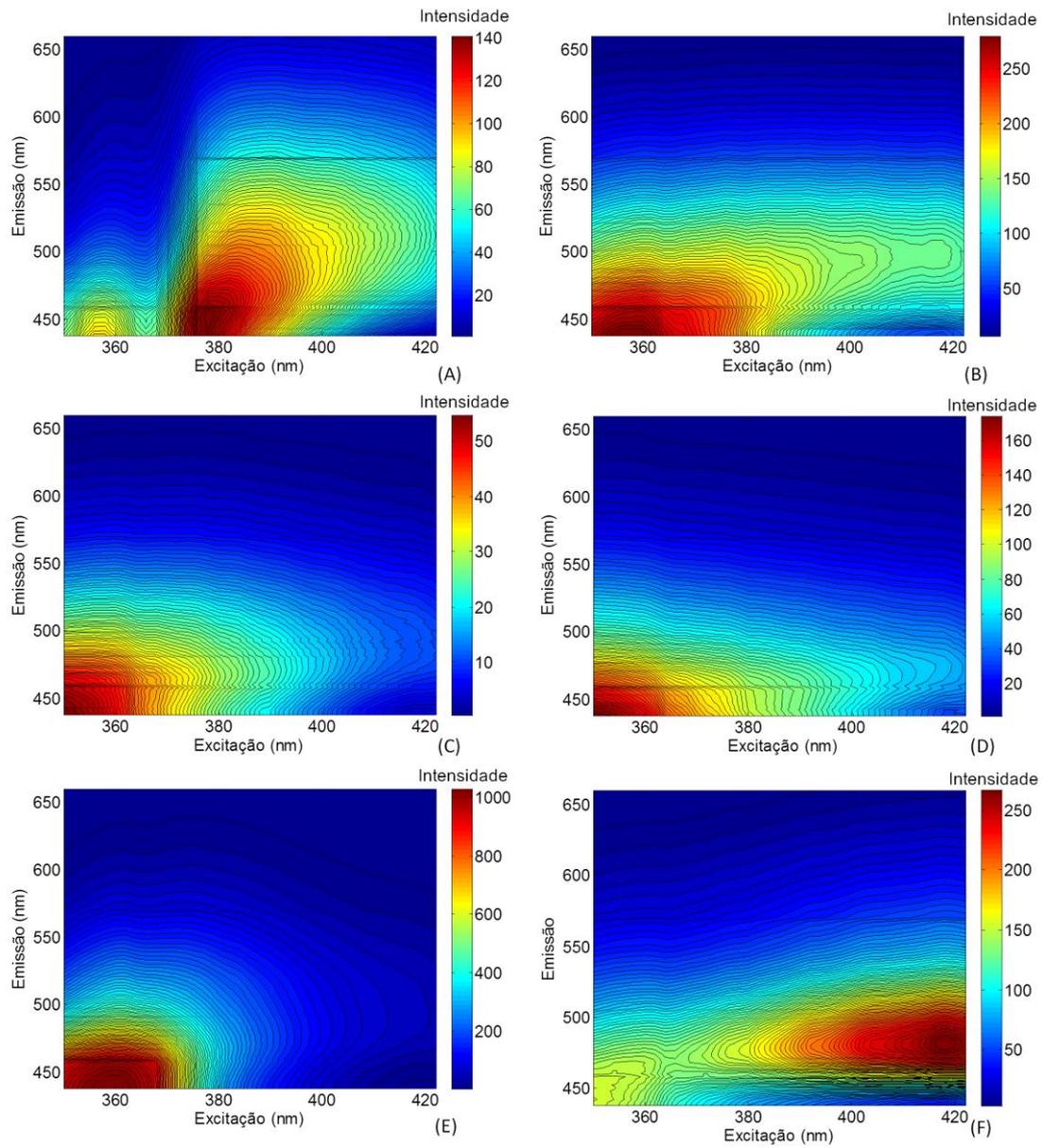
<b>Espécie</b>	<b>Componente/Fluoróforo</b>	
<b>A</b>	a	b
<b>B</b>		c d
<b>C</b>	c	e
<b>D</b>		f g h
<b>E</b>		i j
<b>F</b>	c	g

Na análise utilizando etanol como solvente de extração foram obtidos os espectros retratados na figura 40. Os espectros apresentaram comportamentos distintos, significando, assim, que o etanol provavelmente extraia componentes diferentes nas diferentes espécies estudadas.

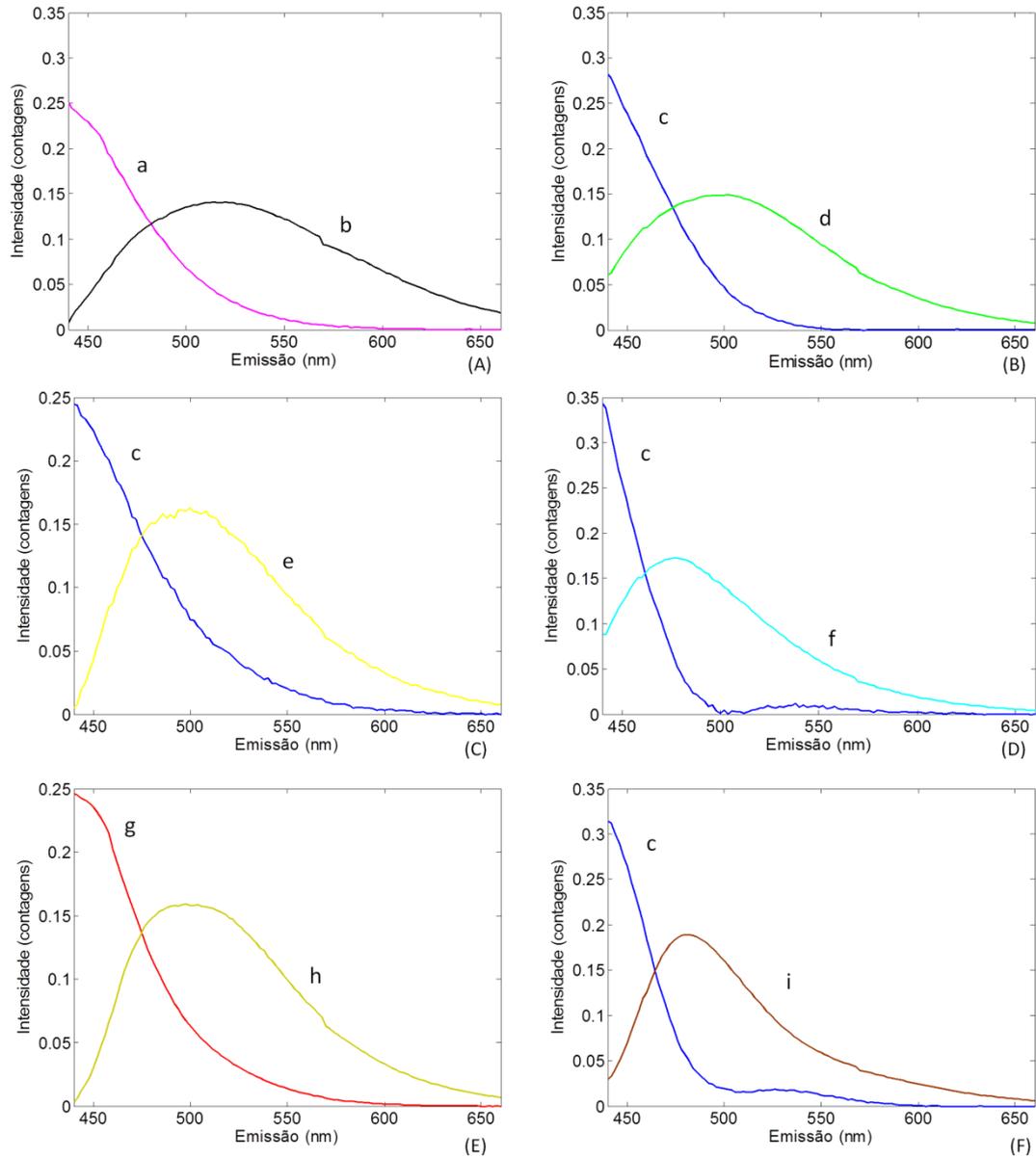
Observando os espectros de emissão obtidos com a extração em etanol (figura 41), notou-se que todas apresentaram dois componentes e espectros semelhantes, mudando, apenas, as intensidades.

As figuras 41 e 42 retratam os espectros de emissão e excitação, respectivamente, dos extratos em etanol.

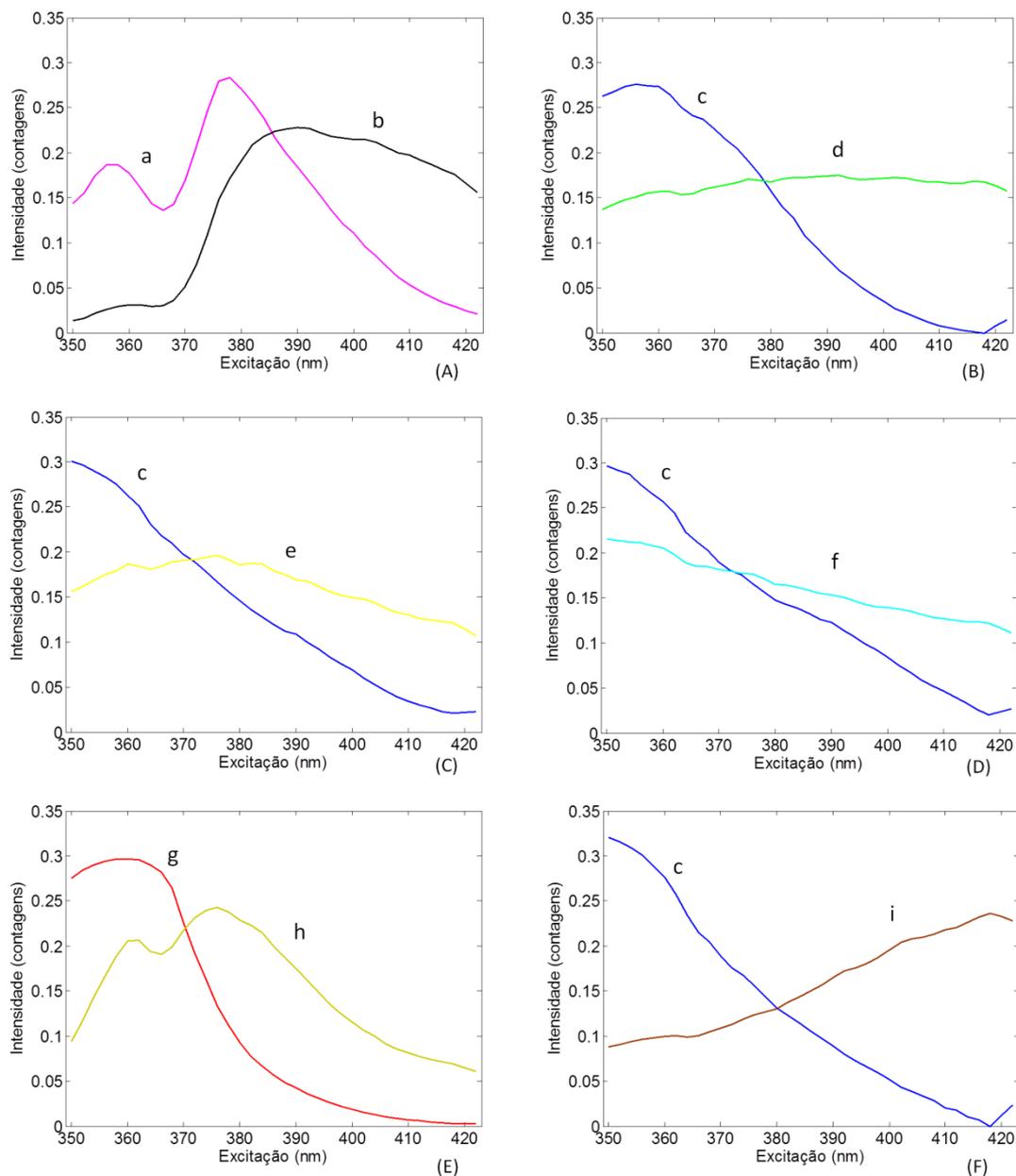
No caso da extração com diclorometano, aparentemente apenas os espectros indicados com a cor azul nas figuras 41 e 42 (B), (C), (D) e (F) foram do mesmo fluoróforo.



**Figura 40.** Espectros em curvas de nível do extrato de seis espécies em etanol. (A) *Euxylophora paraensis*; (B) *Ocotea fragrantissima*; (C) *Parkia pendula*; (D) *Parkia multijuga*; (E) *Hymenolobium pulcherrimum* e (F) *Vochysia maxima*.



**Figura 41.** Espectros de emissão do extrato de seis espécies em etanol obtidos por MCR. (A) *Euxylophora paraensis*; (B) *Ocotea fragrantissima*; (C) *Parkia pendula*; (D) *Parkia multijuga*; (E) *Hymenolobium pulcherrimum* e (F) *Vochysia maxima*. As letras minúsculas retratam componentes diferentes.



**Figura 42.** Espectros de excitação do extrato de seis espécies em etanol obtidos por MCR. (A) *Euxylophora paraensis*; (B) *Ocotea fragrantissima*; (C) *Parkia pendula*; (D) *Parkia multijuga*; (E) *Hymenolobium pulcherrimum* e (F) *Vochysia maxima*. As letras minúsculas retratam componentes diferentes.

Considerando as semelhanças discutidas anteriormente observou-se que o fluoróforo c se repete em quatro espécies e as demais estavam presentes em apenas uma espécie (Tabela 8). Portanto, com extrato etanólico foram observados um total de 9 componentes/fluoróforos diferentes.

**Tabela 8.** Distribuição dos componentes/fluoróforos existentes em cada espécie extraídos com diclorometano

<b>Espécies</b>	<b>Componentes/Fluoróforos</b>									
<b>A</b>	a	b								
<b>B</b>			c	d						
<b>C</b>			c		e					
<b>D</b>			c			f				
<b>E</b>							g	h		
<b>F</b>			c							i

Por fim, observou-se que três compostos “a”, “b” e “c” (representados pelas cores rosa, preto e azul, respectivamente), parecem ter sido extraídos com diclorometano e etanol, dois solventes orgânicos, mas com polaridades diferentes.

É importante ressaltar que cada solvente pode estar extraíndo um ou até vários componentes que possuem o mesmo fluoróforo, gerando, por consequência, espectros com o mesmo perfil de excitação e emissão.

#### **4.5 Estimativa da cor da fluorescência em madeira utilizando análise RGB**

Sempre se associa a fluorescência com a palavra “cor”, pois o fenômeno é visual. Com a madeira não é diferente, ao se observar um corpo-de-prova em um gabinete de fluorescência (figura 43), foram observadas cores diferentes dependendo da espécie.

A tabela 9 apresenta as espécies estudadas e as cores observadas visualmente. Portanto, a cor observada pode variar de acordo com o observador.



**Figura 43.** Fotos do gabinete de fluorescência do LPF – Laboratório de Produtos Florestais.

Considerando que os espectros de emissão foram gerados em diversos comprimentos de onda de excitação no espectrofluorímetro, uma ideia geral do perfil de emissão observado no gabinete de fluorescência pode ser estimado pela soma desses espectros para cada espécie. A figura 44 mostra os perfis somados de cada espécie estudada. A espécie *Euxylophora paraensis* apresentou uma intensidade de fluorescência muito superior as das outras espécies estudadas. Além disso, o seu perfil espectral foi o mais distinto. A amostra *Rhus typina* foi a que apresentou o espectro mais próximo da amostra *Euxylophora paraensis*, apesar de muito menos intenso. As demais espécies estudadas geraram espectros de emissão muito similares, sendo a principal variação observada devido a mudança na intensidade.

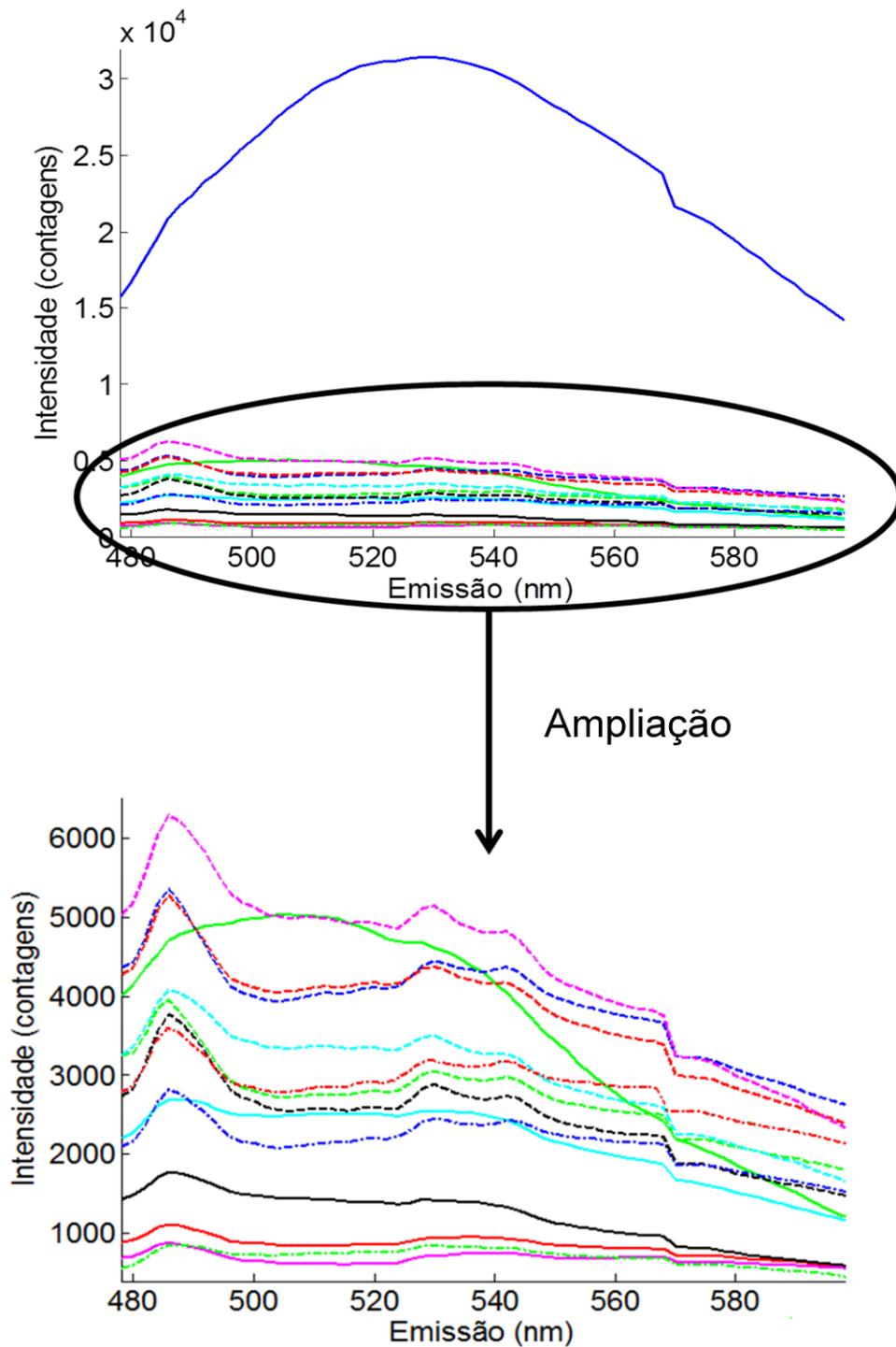
A análise RGB, que utiliza como base as cores vermelha, verde e azul, relaciona as cores com o espectro de onda eletromagnético. Em todas as espécies de madeira estudadas o componente verde atingiu valor máximo, não

sendo, assim, padrão de comparação. Sabe-se que o somatório dos três componentes é que dá origem a cor, sendo assim, as diferenças estão na proporção entre os componentes vermelho e azul.

**Tabela 9.** Espécies de madeiras utilizadas na análise e as cores observadas no gabinete de fluorescência.

<b>Código da espécie</b>	<b>Nome</b>	<b>Fluorescência/cor</b>
1	<i>Caryocar glabrum</i>	Sim/azul
2	<i>Parkia pendula</i>	Sim, laranja
3	<i>Parkia multijuga</i>	Sim, laranja
4	<i>Dinizia excelsa</i>	Sim, amarela
5	<i>Vochysia máxima</i>	Sim, laranja
6	<i>Euxylophora paraensis</i>	Sim, amarela
7	<i>Ocotea fragrantissima ducke</i>	Sim, amarela
8	<i>Hymenolobium pulcherrimum</i>	Sim, alaranja
9	<i>Couratari multiflora</i>	Não
10	<i>Couratari stellata</i>	Não
11	<i>Couratari macrosperma</i>	Não
12	<i>Couratari oblongifolia</i>	Sim, amarela
13	<i>Couratari guianensis</i>	Não
14	<i>Amburana acreana</i>	Sim, amarela
15	<i>Amburana cearensis</i>	Não
16	<i>Rhus typina</i>	Sim, amarela

A Figura 45 mostra a distribuição das espécies de acordo com os componentes azul e vermelho. A espécie 1 (*Euxylophora paraensis*) novamente aparece como a que apresentou maior diferença em relação as demais espécies estudadas. É uma espécie possui muito do componente vermelho e pouco do componente azul.



**Figura 44.** Soma dos espectros de emissão de cada espécie. (—) *Euxylophora paraensis*, (—) *Rhus typina*, (—) *Hymenolobium pulcherrimum*, (—) *Vochysia maxima*, (—) *Parkia pendula*, (—) *Parkia multijuga*, (—) *Couratari oblongifolia*, (—) *Couratari guianensis*, (—) *Couratari macrosperma*, (—) *Couratari multiflora*, (—) *Couratari stellata*, (—) *Amburana acreana*, (—) *Amburana cearensis*, (—) *Ocotea fragrantissima* (—) *Dinizia excelsa*.

A espécie 2 (*Rhus typina*) apresentou fluorescência amarela esverdeada, possuindo muito do componente azul e pouco do componente vermelho.

As espécies 3 (*Hymenolobium pulcherrimum*), 4 (*Vochysia maxima*), 5 (*Parkia pendula*) e 6 (*Parkia multijuga*) apresentaram, visualmente, fluorescência alaranjada. Com exceção da espécie 6, as outras apresentaram valores próximos do componente azul. Considerando o componente vermelho, a variação é significativa.

As espécies 7 (*Couratari oblongifolia*), 8 (*Couratari guianensis*), 9 (*Couratari macrosperma*), 10 (*Couratari multiflora*) e 11 (*Couratari stellata*) são do gênero *Couratari*. Foi observado que a maioria dessas espécies não são fluorescentes ou possuem fluorescência fraca com os valores dos componentes azul e vermelho próximos.

Apesar de serem do gênero das *Amburanas*, as amostras 12 (*Amburana acreana*), 13 (*Amburana cearensis*), apresentaram uma diferença significativa em relação as quantidades das componentes.

As amostras 14 (*Ocotea fragrantissima*) e 15 (*Dinizia excelsa*), apresentaram grande quantidade do componente vermelho, e pouco do componente azul, mostrando um perfil parecido com a amostra 1, que também apresentou fluorescência amarelada.

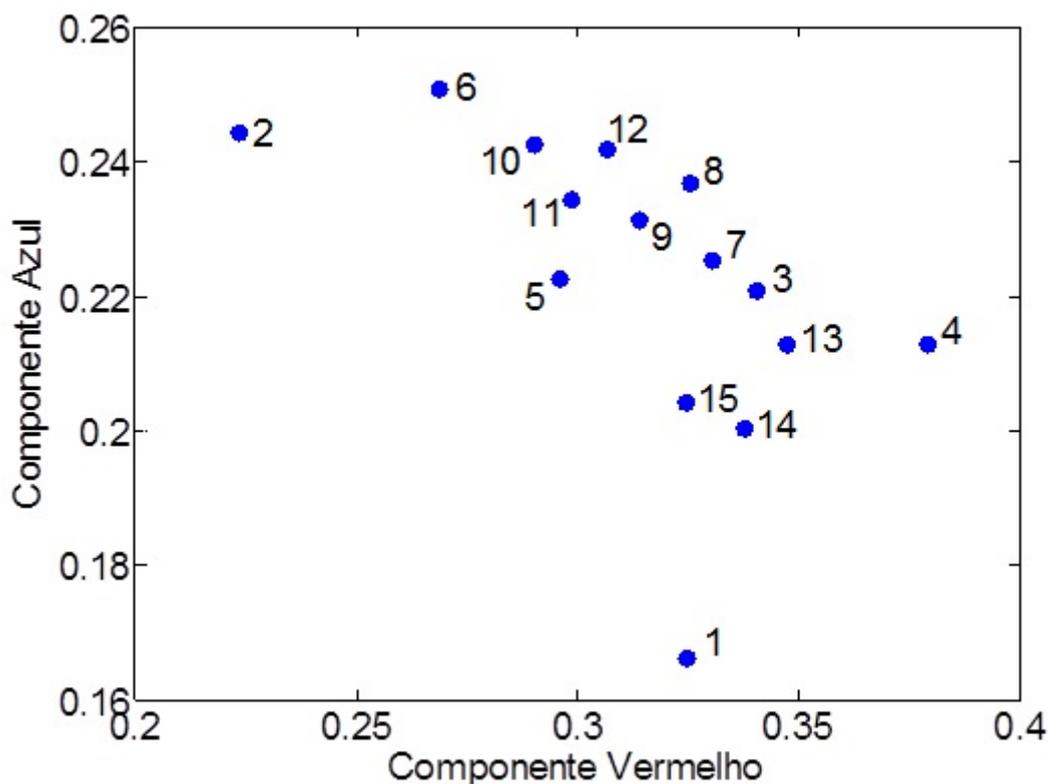
Ainda na Figura 45 é interessante notar que as espécies do gênero *Couratari* mostraram-se próximas, sendo de simples diferenciação em relação as demais espécies. Além disso, algumas espécies, como as de números 1, 2 e 4 foram facilmente separadas das demais estudadas.

A fluorescência, através da análise RGB, proporcionou estimativas viáveis para a identificação de algumas espécies de madeira, devido a separação das mesmas apresentada na Figura 45.

A Figura 46 mostra as cores estimadas utilizando o procedimento descrito na seção 4.4.3.

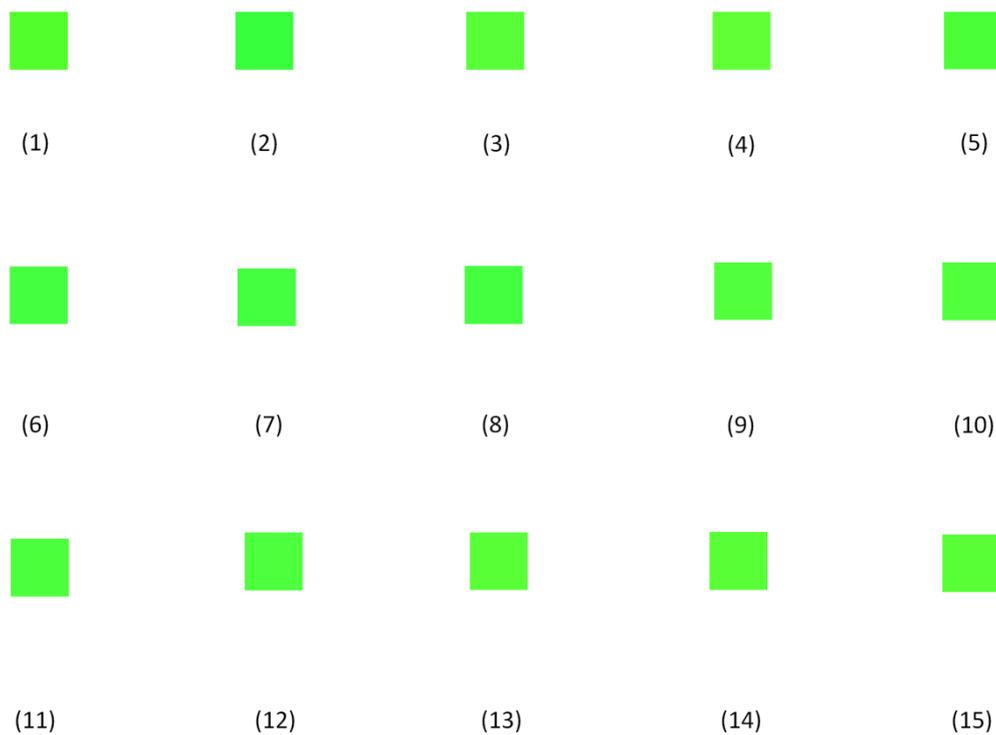
Todos as madeiras apresentaram a cor verde como resultado, variando pouco o tom. Este resultado foi coerente com os espectros obtidos, pois ao se

observar os espectros de cada amostra (Figura 44) foi possível notar que os mesmos apresentaram bandas largas na região do verde (500 a 550 nm) e nas regiões do vermelho (640 a 700 nm) e do azul (420 a 490 nm) houve pouca contribuição.



**Figura 45.** Distribuição das amostras de acordo com seus componentes azul e vermelho.

As observações visuais sugerem um comportamento muito diferente do obtido pela estimativa de cor pelo espectro tendo em vista que foi observada fluorescência amarela, amarela esverdeada, laranja sendo que na maioria não houve fluorescência. Essa diferença pode ser reflexo de vários fatores tais como a influência do visor do gabinete de fluorescência, fenômenos de auto absorção ou até mesmo a condições do ambiente onde está sendo realizada análise visual que não podem ser reproduzidas com a utilização do espectrofluorímetro.



**Figura 46.** Cores resultantes da análise RGB (1) *Euxylophora paraensis*, (2) *Rhus typina*, (3) *Hymenolobium pulcherrimum*, (4) *Vochysia maxima*, (5) *Parkia pendula*, (6) *Parkia multijuga*, (7) *Couratari oblongifolia*, (8) *Couratari guianensis*, (9) *Couratari macrosperma*, (10) *Couratari multiflora*, (11) *Couratari stellata*, (12) *Amburana acrean*, (13) *Amburana cearensis*, (14) *Ocotea fragrantissima* e (15) *Dinizia excelsa*.

# **Conclusões**

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados revelaram que o espectro de fluorescência da madeira depende da distribuição de seus componentes (celulose, lignina, polioses e extrativos), sendo que as variações observadas entre as espécies no perfil do espectro e as intensidades medidas são devidas à mudança na proporção desses componentes.

Foi possível concluir que os extrativos são os maiores responsáveis pela fluorescência em madeira, uma vez que foi observado que lignina e celulose apresentam maior fluorescência apenas na região do ultravioleta.

Utilizando o MCR (Resolução de Curvas Multivariadas), os espectros de excitação e emissão da madeira nas três formas (maciça na forma de corpos-de-prova, em forma de serragem e extratos em diferentes solventes) foram estimados, permitindo que fossem feitas as comparações entre as espécies.

O método de extração proposto foi eficiente para os três solventes (água, diclorometano e etanol), pois, apesar do tempo de contato entre a serragem e o solvente ter sido de apenas 25 minutos, foi possível identificar que existem algumas espécies que possuem os mesmos espectros, significando a presença dos mesmos fluoróforos. Além disso, observou-se que os solventes etanol e diclorometano geraram extratos que deram origem aos mesmos espectros de excitação e emissão de fluorescência, podendo ter extraído um mesmo composto ou classe de compostos que contem o mesmo fluoróforo. Com essas considerações este método sugerido pode facilitar a realização de futuros trabalhos nessa área de pesquisa.

As análises realizadas permitiram concluir que dependendo da face, a intensidade de fluorescência é diferente. A face radial proporcionou espectros com maiores intensidades na maioria das espécies. Além disso, ao realizar as análises em uma mesma face, mudando a orientação de horizontal para vertical, os resultados variaram. Sendo assim, é importante ressaltar que a heterogeneidade da madeira é um fator importante a ser considerado na

análise e os parâmetros como face analisada e orientação da mesma são importantes.

Com a utilização do espectrofluorímetro foi possível determinar os principais comprimentos de onda de excitação e emissão para as espécies estudadas e, possuindo essas informações, podem ser desenvolvidos equipamentos de baixo custo para medir a fluorescência em madeira para propósitos de identificação de espécies.

Uma vez que se observou que os espectros de fluorescência apresentam diferenças em função dos componentes presentes e de suas proporções, pode-se sugerir que a fluorescência pode ser utilizada para complementar outros métodos de análise e discriminação de madeira. Novos estudos devem ser realizados de forma que comprovem e avaliem seu potencial para essa finalidade.

# **Referências Bibliográficas**

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 
- <sup>1</sup> Fengel, D.; Weneger, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. New York, 1983.
- <sup>2</sup> Klock, U.; Muniz, G. I. B.; Hernandez J. A.; Andrade, A. S. Química da madeira. Manual didático - 3ª edição. Universidade Federal do Paraná. Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal. Curitiba, 2005.
- <sup>3</sup> Teixeira, J. G. Teste de fluorescência em madeiras nativas brasileiras e exóticas. Monografia de graduação do curso de Engenharia Florestal. Universidade Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.
- <sup>4</sup> Pandey, K. K.; Upreti, N. K.; Arinivasan, V. V. Wood Sci. Technol, 32, 1998, 32, 309-315.
- <sup>5</sup> Miller, R. B. In: J. H. Flynn (ed.). For. Prod. Soc. Madison, Wisconsin, 2007, 271-304.
- <sup>6</sup> Guzmán, J. A. S.; Richter, H. G.; Anda, R. R.; Talavera, F. J. F. IAWA J, 29 (3), 2008, 311-322.
- <sup>7</sup> Harris, D. C. Análise Química Quantitativa. 6ª Edição, LTC, Rio de Janeiro, 2005.
- <sup>8</sup> Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch S. R. Princípios de Análise Instrumental. 6ª edição, Bookman, Porto Alegre, 2009.
- <sup>9</sup> Castellan, A.; Davison, R. S. J. Photochem. Photobiol A: Chem, 78, 1994, 275-279
- <sup>10</sup> Santana, M. A. E.; Okino, E. Y. A. Holzforschung, Vol. 61 (5), 2007, 469-477.
- <sup>11</sup> Djikanovi, D.; Kalauzi, A.; Radoti, K.; Lapierre, C.; Jeremi, M. *Russian J. Phys. Chem. A*, 81(9), 2007, 1425-1428.
- <sup>12</sup> Olmstead, J. A.; Gray, D. G. J. Pulp. Pap. Sci. 23 (13), 1997, 571-581.
- <sup>13</sup> Castellan, A.; Choudhury, H.; Davison, R. S; Grelier, S. J. Photochem. Photobiol A, Chem 81, 1994, 123-130
- <sup>14</sup> Castellan, A.; Choudhury, H.; Davison, R. S; Grelier, S. J. Photochem. Photobiol A, Chem 81, 1994, 117-122.
- <sup>15</sup> Avella, T.; Dechamps, R.; Bastin, M. IAWA Bull. 9 (4), 1988, 346-352.
- <sup>16</sup> Dyer, S. T. IAWA Bull. 9 (1), 1988: 75-87
- <sup>17</sup> Wheeler, E. A.; Baas, P.; Gasson, P.E. (editores). IAWA committee. Bull. n.s. 10 (3), 1989, 219-332.
- <sup>18</sup> Miller J. N.; Miller J. C. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. 5ª Edição, Pearson Education Limited, 2005.

- 
- <sup>19</sup> Sala, O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho. 2ª Edição, Unesp, São Paulo.
- <sup>20</sup> Sala, O. Qui. Nova, 31 (4), 2008, 914-920.
- <sup>21</sup> Ruckebusch, C.; Blanchet L. Anal. Chim. Acta, 765, 2013, 28-36.
- <sup>22</sup> Jaumot, J.; Tauler, R. Chemom. Intell. Lab. Syst., 103, 2010, 96–107.
- <sup>23</sup> Juan A.; Rutan, S. C.; Tauler, R. Comprehensive Chemometrics Chem. Biochem. Data Anal. 2, 2009, 325-344.
- <sup>24</sup> Dasashi, M.; Addollahi H.; Tauler R. Chemom. Intell. Lab. Syst. 118, 2012, 33–40.
- <sup>25</sup> Terrado, M.; Barceló D.; Tauler R. Anal. Chim. Acta, 657, 2010: 19–27.
- <sup>26</sup> Hantao L. W.; Aleme H. G.; Pedroso M. P.; Sabin G. P.; Poppi R. J.; Augusto F. Anal. Chim. Acta, 731, 2012, 11– 23.
- <sup>27</sup> Rodriguez-Cuesta, M. J.; Boque R.; Rius F.X.; Martinez Vidal J. L.; Garrido Frenich A. Chemom Intell. Lab. Syst. 77, 2005: 251– 260.
- <sup>28</sup> Abdollahi, H.; Tauler, R. Chemom. Intell. Lab. Syst. 108, 2011: 100–111.
- <sup>29</sup> Hantao L. W.; Aleme H. G.; Pedroso M. P.; Sabin G. P.; Poppi R. J.; Augusto F. Anal. Chim. Acta, 731, 2012: 11– 23.
- <sup>30</sup> Del Rio, V.; Larrechi, M. S.; Callao M. P. Anal. Chim. Acta, 676, 2010: 28–33.
- <sup>31</sup> Dantas, C.; Tauler R.; Ferreira, M. M. C. Anal. Bioanal. Chem. 405, 2013, 1293–1302.
- <sup>32</sup> Windig W.; Guilment, J. Anal. Chem. 63, 1991, 1425-1432.
- <sup>33</sup> Braga, J. W. B. Aplicação e validação de modelos de calibração de segunda ordem em química analítica. Tese de Doutorado. Campinas: 2008.