



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

***Estudo da homogeneidade e discriminação de madeiras
através de espectroscopia de imagens, imagens digitais e
ferramentas quimiométricas.***

Carla Jovania Gomes Colares

Orientador

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Coorientadora

Dr^a. Vera Teresinha Rauber Coradin

Brasília, 2016.



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

***Estudo da homogeneidade e discriminação de madeiras
através de espectroscopia de imagens, imagens digitais e
ferramentas quimiométricas.***

Carla Jovania Gomes Colares

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

Orientador

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Coorientadora

Dr^a. Vera Teresinha Rauber Coradin

Brasília, 2016.

COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese de Doutorado do (a) aluno (a) Carla Jovania Gomes Colares, matrícula nº 12/0081598, intitulada “***Estudo da homogeneidade e discriminação de madeiras através de espectroscopia de imagens, imagens digitais e ferramentas quimiométricas***”, apresentada no (a) Auditório do CDT da Universidade de Brasília (UnB) em 4 de março de 2016.

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Alexandre Florian da Costa

Membro Titular (FT/UnB)

Prof. Dr. Marcelo Martins de Senna

Membro Titular (UFMG)

Prof. Dr. Fabrício Machado Silva

Membro Titular (IQ/UnB)

Prof.^a Dr.^a Fernanda Vasconcelos de Almeida

Membro Titular (IQ/UnB)

Dr. Márcio Talhavini

Membro Suplente (INC/PF)

Em 4 de março de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe (“in memoriam”) e meu esposo, expresso minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força e convicção para concluir esta tão sonhada etapa da minha vida, em que os obstáculos foram superados com fé e coragem para vencer e jamais desistir.

A minha mãe (“in memoriam”) que soube me ensinar o caminho da honestidade e da humildade, com sabedoria e amor. Saudades eternas.

Ao meu amado esposo, que sempre esteve ao meu lado, com apoio incondicional foi sem dúvida meu grande incentivador. As 41 mil palavras que compõem esta tese não são suficientes para expressar minha gratidão, carinho e respeito.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga pela sua enorme paciência e prestatividade em orientar este trabalho com atenção, sabedoria, inteligência e principalmente a confiança depositada nestes 4 anos. Receba com toda a expressão que possa existir nestas palavras, minha admiração e meu sincero muito obrigada.

A minha coorientadora Dra. Vera Teresinha Rauber Coradin pela colaboração neste trabalho, orientação e aprendizagem.

A Dra. Tereza Cristina Monteiro Pastore pela colaboração com amostras para as aplicações da tese e ajuda na escrita dos artigos. Ao Serviço Florestal Brasileiro (SFB) pela disponibilização das dependências do Laboratório de Produtos Florestais (LPF) para a realização desse trabalho, dando acesso às amostras de madeira do acervo da Área de Anatomia e Morfologia e outras amostras.

Aos pesquisadores da Área de Química e Adesivos do LPF/SFB, Ma. Esmeralda Yoshico Arakaki Okino, Dr. Marcos Antonio Eduardo Santana pela colaboração. Um agradecimento especial ao Me. Alessandro César de Oliveira Moreira e ao Técnico de Laboratório Francisco Lopes de Araújo pela colaboração nas análises laboratoriais.

Ao Luiz Fernando Marques, Me. José Arlete Alves Camargos e Me. Alexandre Bahia Gontijo do LPF, pesquisadores da Área de Anatomia e Morfologia do

LPF/SFB, pelo apoio na identificação e disponibilização de amostras e materiais de pesquisa.

Aos funcionários da Carpintaria do LPF/SFB, Elivelton Araújo Sousa, Elvis Mariano Alves e Ricardo Pereira de Oliveira dos Santos, pela colaboração no corte das amostras e preparo dos corpos de prova.

Às empresas Madeireiras MadeiFlora Empreendimentos Florestais Ind. e Com., Alternativa Comércio de Madeiras LTDA, Madeireira Alvorada Brasília LTDA, J B Madeiras ME e do Distrito Federal pela doação de espécies de madeira.

Ao professor Dr. Joel Camargo Rubim (IQ-Unb) pela colaboração com as análises por espectroscopia Raman.

Ao professor Dr. Ronei Jesus Poppi (LAQUA-Unicamp) pela colaboração com as análises por espectroscopia no infravermelho próximo e ao Dr. Guilherme Lionello Alexandrino pelo apoio prestado na realização das análises.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica (INCTBio) pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processos 473936/2013-5 e 307223/2012-4 pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) pela oportunidade de realizar o doutorado.

À Ma. Rosylane Elaine Costa Lopes pela cessão dos corpos de prova para realização da terceira aplicação da tese.

Ao professor Dr. Alexandre Florian da Costa da Faculdade de Tecnologia- Departamento de Engenharia Florestal pela cessão de amostras de eucalipto e ao Prof. Dr. Fabrício Machado do Instituto de Química pela cessão de padrões de lignina.

Aos professores do Laboratório de Automação, Quimiometria e Química Ambiental (AQQUA) da Universidade de Brasília, Dr^a. Fernanda Vasconcelos de Almeida, Dr^a. Ana Cristi Basile Dias, Dr. Fernando Fabríz Sodrê, Dr^a. Valéria Regina Bellotto, aos quais tive a oportunidade de compartilhar os quatro anos de doutorado e cursar disciplinas que foram essenciais para minha formação. Em especial,

agradeço ao Prof. Dr. Alexandre Fonseca, que compõe este grupo, pela imensurável colaboração na construção da câmara escura e sugestões para a aplicação prática de imagens digitais.

Aos colegas do grupo Aqqua (2011-2013/2014-2015): Lorena, Gabi, Douglas, Everaldo, João, Joyce, Rafael, Raphael, Juliana, Gabriel, Hadassa, Eduardo (Dudu), Alan Mol, agradeço pela amizade e convívio.

Ao Daniel pelos conselhos e incentivo, ao Thiago pela troca de experiência e aprendizado, à Millena e Jackeline pela ajuda, sugestões e amizade. Ao Victor e à Damiana pela prestatividade e generosidade. À Lilian e Laiz pela amizade, incentivo e caronas.

Um agradecimento especial à Tati, cuja amizade vem de longa data e sempre proferiu palavras de incentivo para que eu ingressasse no doutorado. À Rosy, pelos vários favores que me prestou ao longo do curso e pela amizade. À Camila, pelo apoio e ajuda em inúmeras ocasiões.

Fechando o grupo Aqqua, faço um agradecimento especial à Angélica, pela amizade, incentivo e apoio em momentos difíceis, a Ciça pela ajuda na construção dos modelos e pela abençoada convivência e a mamãe Nancy (e o Tony), que me ofereceu inúmeros momentos de amizade, companheirismo, acolhimento, carona e hospedagem.

A Suzana e Weslany, colegas que dividiram a moradia em Brasília, e um agradecimento especial para a Taynara pela amizade, carinho, palavras de incentivo e principalmente os bons momentos de risada e descontração.

Agradeço a todos os meus amigos próximos ou distantes, especialmente à Karen, que me apoiaram direta ou indiretamente para que eu nunca desistisse dos meus objetivos.

RESUMO

A aplicação de métodos espectroscópicos tem demonstrado um grande potencial para caracterização, quantificação e classificação. Contudo, ainda são necessários trabalhos que investiguem a utilização destas técnicas aliadas à quimiometria e à análise de imagens para a obtenção de informações sobre a estrutura química com resolução espacial. Neste sentido, na primeira aplicação desta tese a imagem hiperespectral e a espectroscopia Raman foram utilizadas para o estudo da homogeneidade dos constituintes presentes nas espécies *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, um híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis* e *Swietenia macrophylla* King, sendo construídos mapas de concentração com a utilização da ferramenta quimiométrica Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS), destacando a homogeneidade e a distribuição da holocelulose e da lignina total nas diferentes estruturas anatômicas presentes no plano transversal. Como resultado, os mapas de concentração foram coerentes com as interpretações esperadas para as estruturas anatômicas observadas nas imagens. Contudo, não foi possível a avaliação dos extrativos devido à sua fluorescência. Na segunda aplicação, a distribuição de holocelulose, lignina total e extrativos foi estudada nestas espécies com a utilização da imagem hiperespectral e espectroscopia no infravermelho próximo e MCR-ALS nos planos tangencial, transversal e radial, e um estudo mais detalhado da distribuição dos constituintes com a construção de mapas de concentração demonstrou a distribuição espacial destes compostos em diferentes estruturas anatômicas a nível microscópico. Os resultados foram mais precisos e concordantes com o esperado, quando comparados aos resultados obtidos com a espectroscopia Raman, além de ser possível estimar a concentração de extrativos. Na terceira aplicação, foram desenvolvidos modelos de discriminação das espécies de madeira *Erismia uncinatum* Warm., *Cedrela odorata* L., *Micropholis melinoniana*, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King, utilizando um equipamento de baixo custo para a medida da fluorescência em imagens digitais para a obtenção de histogramas de frequência RGB gerados a partir das fotos dos corpos de prova de cada espécie no plano transversal. Foram construídos modelos com a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS1-DA) e foi possível discriminar corretamente 88,3 %, 85,6 %, 83,7 % e 95,9 % dos histogramas registrados para as espécies *Cedrela odorata* L., *Micropholis melinoniana*, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King, respectivamente, e 100 % para *Erismia uncinatum* Warm.

ABSTRACT

The application of spectroscopic methods to analyze wood has demonstrated promising potential in regards to its characterization, quantification, and classification. However, there is still remains a necessity to investigate the implementation of these techniques with chemometrics and analysis of the images to obtain necessary information with pertaining to chemical structure and spatial arrangement. In this sense, the first application in this thesis was the use of a hyperspectral image along with Raman spectroscopy utilized to study the homogeneity of the present constituents in the species *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, a hybrid cross between *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus camaldulensis* and *Swietenia macrophylla* King. Moreover, they have constructed concentration maps via the employment of chemometrics, specifically, with use Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS) with an emphasis for the uniformity and distribution of holocellulose and total lignin was present at different anatomical structures in the transverse plane. As a result, the concentration maps were consistent with the expected interpretations of the anatomical structures observed in the images. Nonetheless, it was not possible to accurately evaluate the extractives due to the presence of its fluorescence. In the second application, the distribution of holocellulose, total lignin, and extractives were studied within these species via the application of hyperspectral imaging by near infrared spectroscopy and MCR -ALS on the tangential, transversal and radial planes, and a more detailed study regarding the distribution of the constituents with building of concentration maps, which demonstrated the spatial distribution of these compounds in different anatomical structures and microscopic levels. The results were more precise and consistent with the expected results, when compared with Raman spectroscopy, moreover was possible to estimate the concentration of extractives. In the third application, discrimination models were developed on the wood species, *Erisma uncinatum* Warm., *Cedrela odorata* L., *Micropholis melinoniana*, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King. These models were developed utilizing low cost equipment, to measure of fluorescence on digital images, in order to obtain frequency RGB histograms, generated from the photos of each species on the transverse plane. Models were developed using Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS1 -DA), and therefore it was possible to discriminate correctly 88.3 %, 85.6 %, 83.7 % and 95.9% of reported histograms for the species *Cedrela odorata* L., *Micropholis melinoniana*, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Swietenia macrophylla* King, respectively, and 100% for *Erisma uncinatum* Warm.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xix
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	2
1.1 INTRODUÇÃO	2
1.2 OBJETIVOS	5
CAPÍTULO 2	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MADEIRA	8
2.1.1. Celulose	10
2.1.2. Hemicelulose.....	11
2.1.3. Holocelulose.....	12
2.1.4. Lignina.....	12
2.1.5 Extrativos.....	13
2.2 ASPECTOS ANATÔMICOS.....	14
2.3 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS PARA A ANÁLISE DE MADEIRA.....	15
2.3.1 Espectroscopia Raman de imagem.....	15
2.3.2 Espectroscopia no infravermelho próximo e imagem hiperespectral.....	17
2.4 IDENTIFICAÇÃO E DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE MADEIRA.....	18
2.4.1 Técnicas aplicadas à identificação e discriminação de espécies de madeira	21
2.4.1.1 Espectroscopia no infravermelho próximo.....	21
2.4.1.2 Fluorescência	21
2.4.1.3 Imagem digitais	23
CAPÍTULO 3	25
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	26

3.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN	26
3.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	29
3.3 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA MOLECULAR	34
3.4 ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM.....	35
3.5 IMAGENS EM ESCALA RGB.....	36
3.6 QUIMIOMETRIA.....	38
3.6.1 Definição	38
3.6.2 Análise de Componentes Principais	40
3.6.3 Regressão por mínimos quadrados parciais	40
3.6.3.1 Pré-processamentos	42
3.6.3.2 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais.....	43
3.6.3.2.1 Validação cruzada e determinação do número de variáveis latentes...44	
3.6.3.2.2 Detecção de amostras anômalas	46
3.6.4 Figuras de mérito.....	46
3.6.5 Resolução multivariada de curvas.....	49
3.6.5.1 Resolução Multivariada de Curvas por Mínimos Quadrados Alternantes..49	
CAPÍTULO 4	54
4. ANÁLISE EXPLORATÓRIA DA DISTRIBUIÇÃO DE HOLOCELULOSE E LIGNINA TOTAL EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MADEIRA POR IMAGEM HIPERESPECTRAL E ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	55
4.1 EXPERIMENTAL.....	56
4.1.1 Determinação do teor de extrativos, lignina e holocelulose pelos métodos de referência	56
4.1.1.1 Teor de extrativos.....	56
4.1.1.2 Teor de lignina insolúvel, solúvel e total	57
4.1.1.2.1 Teor de lignina insolúvel.....	57
4.1.1.2.2 Teor de lignina solúvel.....	58
4.1.1.2.3 Teor de lignina total	59
4.1.1.3 Teor de holocelulose	59

4.1.2 Preparo das lâminas para análise por espectroscopia Raman de imagem.....	61
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.2.1 Teor de extrativos.....	63
4.2.2 Teor de lignina insolúvel, solúvel e total	64
4.2.3 Teor de holocelulose	65
4.2.4 Identificação das estruturas anatômicas	66
4.2.5 Pré-processamento dos dados iniciais	67
4.2.6 Análise dos dados por MCR-ALS utilizando o espectro completo.....	70
4.2.7 Análise dos dados por MCR-ALS com seleção de regiões espectrais	78
4.2.8 Estimativas das concentrações de holocelulose e lignina total por MCR-ALS	83
4.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO	91
CAPÍTULO 5	92
5. IMAGEM HIPERESPECTRAL NIRS E MCR-ALS APLICADOS AO MAPEAMENTO QUÍMICO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MADEIRA.....	93
5.1 EXPERIMENTAL.....	93
5.1.1 Preparo dos corpos de prova para a aplicação da HIS-NIRS	93
5.1.2 Estimativas das concentrações	96
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
5.2.1 Identificação das estruturas anatômicas	96
5.2.2 Pré-processamento dos dados iniciais	98
5.2.3 Análise dos dados por MCR-ALS com seleção da região espectral.....	100
5.2.4 Estimativas das concentrações de holocelulose, lignina total e extrativos por MCR-ALS	108
5.2.4.1 <i>E. grandis</i> nos planos tangencial, transversal e radial.....	108
5.2.4.2 Híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i> nos planos tangencial, transversal e radial.....	113
5.2.4.3 <i>E. urophylla</i> nos planos tangencial, transversal e radial.....	116
5.2.4.4 <i>S. macrophylla</i> King nos planos tangencial, transversal e radial.....	119
5.2.5 Valores máximos, mínimos e desvio padrão da holocelulose, lignina total e extrativos nos planos tangencial, transversal e radial	122

5.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO	124
CAPÍTULO 6	125
6. DISCRIMINAÇÃO DE CINCO MADEIRAS SIMILARES POR FLUORESCÊNCIA E IMAGENS DIGITAIS.....	126
6.1 EXPERIMENTAL.....	127
6.1.1 Obtenção e preparo dos corpos de prova	127
6.1.2 Montagem da câmara com a lâmpada ultravioleta e microscópio para obtenção das imagens.....	128
6.1.3 Análise dos dados e etapas para construção dos modelos de discriminação	132
6.1.4 Avaliação da repetitividade e precisão intermediária.....	135
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	136
6.2.1 Construção dos modelos de discriminação para <i>Cedrela odorata</i> , <i>Erisma uncinatum</i> Warm., <i>Micropholis melinoniana</i> , <i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden e <i>Swietenia macrophylla</i> King	136
6.2.2 Repetitividade e precisão intermediária dos modelos de discriminação...	140
6.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO	142
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	144
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

CITES	Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (do inglês, <i>Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora</i>)
CV	Validação Cruzada (do inglês, <i>Cross-Validation</i>)
CVCE	Erro de classificação de validação cruzada (do inglês, <i>Cross-Validation Classification Error</i>)
DPR	Desvio Padrão Relativo
EFA	Análise de Fatores Evolucionários (do inglês, <i>Evolving Factor Analysis</i>)
FIR	Infravermelho Distante (do inglês, <i>Far Infrared</i>)
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Infrared</i>)
FT-NIR	Infravermelho próximo com Transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Near Infrared</i>)
HIS-NIRS	imagem hiperespectral por Espectroscopia no Infravermelho Próximo (do inglês <i>Hyperspectral Image by Near Infrared Spectroscopy</i>)
HIS-Raman	Imagem hiperespectral por espectroscopia Raman (do inglês <i>Hyperspectral Image by Raman</i>)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IQ/UnB	Instituto de Química da Universidade de Brasília
IR	Infravermelho (do inglês, <i>Infrared</i>)
LIBS	Espectroscopia de Emissão em Plasma Induzido por Laser (do inglês, <i>Laser-induced Breakdown Spectroscopy</i>)

LPF/SFB	Laboratório de Produtos Florestais do Serviço Florestal Brasileiro
MIA	Análise multivariada de imagem (do inglês, <i>Multivariate Image Analysis</i>)
MCR	Resolução Multivariada de Curvas (do inglês, <i>Multivariate Curve Resolution</i>)
MCR-ALS	Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (do inglês, <i>Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares</i>)
MIR	Infravermelho Médio (do inglês, <i>Medium Infrared</i>)
MMA	Ministério do Meio Ambiente
NIPALS	Mínimos Quadrados Parciais Iterativo não Linear (do inglês, <i>Nonlinear Iterative Partial Least Squares</i>)
NIR	Infravermelho Próximo (do inglês, <i>Near Infrared</i>)
NIRS	Espectroscopia no Infravermelho Próximo (do inglês, <i>Near Infrared Spectroscopy</i>)
PCA	Análise de Componentes Principais (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>)
PCR	Regressão por componentes principais (do inglês <i>Principal Components Regression</i>)
PLS	Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, <i>Partial Least Squares</i>)
PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>)
RMSEC	Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (do inglês, <i>Root Mean Squared Error of Calibration</i>)
RMSECV	Raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (<i>Root Mean Squared Error of Cross-Validation</i>)
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (do inglês, <i>Root Mean Squared Error of Prediction</i>)

SIMCA	Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classes (do inglês, <i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>)
SIMPLS	Modificação Estatisticamente Inspirada do PLS (do inglês, <i>Statistically Inspired Modification of PLS</i>)
VL	Variável Latente

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição da espécie, família e nomes usuais de cinco madeiras com caracteres similares.....	20
Tabela 2. Limites aproximados para cada região espectral do infravermelho	29
Tabela 3. Descrição dos termos utilizados para cálculo das figuras de mérito	47
Tabela 4. Condições cromatográficas para determinação da glicose, xilose, arabinose, galactose e manose.....	60
Tabela 5. Níveis de concentrações utilizados para construção das curvas de calibração da glicose, xilose, arabinose, galactose e manose.	61
Tabela 6. Teor de extrativos.....	63
Tabela 7. Teor de lignina insolúvel, lignina solúvel e lignina total	64
Tabela 8. Teor de holocelulose obtido pela análise cromatográfica.....	65
Tabela 9. Mínimo, máximo e desvio padrão do teor de holocelulose e lignina obtidos nos histogramas do <i>E.grandis</i> , híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> , <i>E. urophylla</i> e <i>S. macrophylla</i> King, com intervalo de 98 % de confiança.....	90
Tabela 10. Descrição das bandas observadas na Figura 50.....	104
Tabela 11. Descrição das bandas observadas na Figura 51.....	106
Tabela 12. Descrição das bandas observadas na Figura 52.....	108
Tabela 13. Valores mínimos, máximos e desvios padrão dos teores de holocelulose obtidos a partir dos histogramas do <i>E. grandis</i> , híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i> , <i>E. urophylla</i> e <i>S. macrophylla</i> King para um intervalo de 99 % de confiança.	122
Tabela 14. Quantidade de amostras utilizadas nos conjuntos de treinamento e teste para a construção dos modelos PLS1-DA.....	133

Tabela 15. Parâmetros de discriminação do conjunto de treinamento para as cinco espécies estudadas.....	137
Tabela 16. Erros médios, <i>outliers</i> e figuras de mérito do conjunto teste	139
Tabela 17. Valor de classe para a avaliação da repetitividade.....	140
Tabela 18. Figuras de mérito para a avaliação da precisão intermediária.	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático de uma seção transversal do tronco de uma árvore	8
Figura 2. Composição química média de madeiras de coníferas e folhosas.....	10
Figura 3. Estrutura química da celulose.	11
Figura 4. Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses.....	12
Figura 5. Monômeros formadores da estrutura da lignina.	13
Figura 6. Foto da madeira de <i>Swietenia macrophylla</i> King. As imagens ilustram as diferenças existentes nos três planos de orientação: (a) longitudinal radial, (b) longitudinal tangencial e (c) transversal	14
Figura 7. Mecanismos de espalhamentos Rayleigh e Raman Stokes e Anti-Stokes.	26
Figura 8. Espectro Raman do CCl_4 . As linhas Stokes e as linhas anti-Stokes são imagens modificadas uma da outra, refletidas por meio da frequência de excitação. Uma linha anti-Stokes tem intensidade menor que a linha de Stokes correspondentes.....	28
Figura 9. Diagrama de energia de vibração em função da distância interatômica para o oscilador harmônico em uma molécula diatômica.	32
Figura 10. Diagrama de energia de vibração em função da distância interatômica para o oscilador anarmônico em uma molécula diatômica.....	32
Figura 11. Diagrama de energia para fluorescência.....	34
Figura 12. Arranjo tridimensional dos dados gerados em espectroscopia de imagem.	36

Figura 13. Representação do cubo de cores RGB.....	37
Figura 14. Desenho esquemático do modelo PLS1-DA.....	44
Figura 15. Restrições utilizadas no MCR-ALS (a) não negatividade, (b) balanço de massa e (c) unimodalidade.....	52
Figura 16. Representação esquemática da aplicação do MCR-ALS aos dados de espectroscopia de imagem.....	53
Figura 17. Procedimento realizado no preparo das lâminas para análise de espectroscopia Raman, (a) cortes micrométricos no plano transversal, (b) processo de extração, (c) secagem, (d) lâmina para microscopia e (e) equipamento Raman In Via Renishaw utilizado para obtenção dos espectros.....	62
Figura 18. Fotos obtidas no espectrômetro dispersivo Raman In Via Renishaw com o aumento de 20 vezes no plano transversal (a) <i>S. macrophylla</i> King, (b) híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> e (c) <i>E. urophylla</i>	66
Figura 19. Espectros Raman iniciais (a) híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> , (b) <i>E. grandis</i> , (c) <i>E. urophylla</i> e (d) <i>S. macrophylla</i> King.....	68
Figura 20. Espectros Raman após a aplicação do filtro (a) híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> , (b) <i>E. grandis</i> , (c) <i>E. urophylla</i> e (d) <i>S. macrophylla</i> King.....	68
Figura 21. Etapas para a realização da análise por MCR-ALS com espectro completo.....	71
Figura 22. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS para a matriz de dados espectrais, demonstrando os quatro espectros do híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i>	72
Figura 23. Perfil do espectro recuperado pelo MCR-ALS da lignina referente ao híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> , apresentado como Componente 2 na Figura 22.....	73

Figura 24. Perfil do espectro recuperado pelo MCR-ALS da interferência de fundo (<i>background</i>) referente ao híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> , apresentado como Componente 3 na Figura 22.	74
Figura 25. Perfil do espectro recuperado pelo MCR-ALS da celulose e hemicelulose referente ao híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> , apresentado como Componente 4 na Figura 22.	75
Figura 26. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS para <i>S. macrophylla</i> King. (a) quatro espectros, (b) lignina, (c) interferência de fundo (<i>background</i>) e (d) celulose e hemicelulose.	76
Figura 27. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS do <i>E. grandis</i> (a) quatro espectros, (b) lignina, (c) interferência de fundo (<i>background</i>) e (d) celulose e hemicelulose.	77
Figura 28. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS do <i>E. urophylla</i> (a) quatro espectros, (b) lignina, (c) interferência de fundo (<i>background</i>) e (d) celulose e hemicelulose.	77
Figura 29. Etapas para a realização da análise por MCR-ALS com seleção de região espectral para determinação da celulose e hemicelulose.	79
Figura 30. Etapas para a realização da análise por MCR-ALS com seleção de região espectral para determinação de lignina.	80
Figura 31. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS do híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> com seleção da região espectral (a) (----) padrão de celulose (sobreposição), (—) celulose e hemicelulose, (—) interferência de fundo, (—) interferência do vidro; (b) (—) lignina e (—) interferência de fundo.	81
Figura 32. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS para <i>S. macrophylla</i> King com seleção da região espectral (a) (----) padrão de celulose (sobreposição), (—) celulose e hemicelulose, (—) interferência de fundo, (—) interferência do vidro; (b) (—) lignina e (—) interferência de fundo.	81

Figura 33. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS do <i>E. grandis</i> com seleção da região espectral (a) (-----) padrão de celulose (sobreposição), (—) celulose e hemicelulose, (—) interferência de fundo, (—) interferência do vidro; (b) (—) lignina e (—) interferência de fundo.....	82
Figura 34. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS do <i>E. urophylla</i> com seleção da região espectral (a) (-----) padrão de celulose (sobreposição), (—) celulose e hemicelulose, (—) interferência de fundo, (—) interferência do vidro; (b) (—) lignina e (—) interferência de fundo.....	82
Figura 35. Mapa de intensidade relativa atribuído à lâmina de vidro (a) híbrido de <i>E.urophylla x E.camaldulensis</i> , (b) <i>S. macrophylla</i> King e (c) <i>E. urophylla</i>	84
Figura 36. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o híbrido de <i>E.urophylla x E.camaldulensis</i> (a, c) holocelulose, (b, d) lignina total. As barras vermelhas representam 1,0 % dos percentis de distribuição	85
Figura 37. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para <i>S. macrophylla</i> King (a, c) holocelulose, (b, d) lignina total. As barras vermelhas representam 1,0 % dos percentis de distribuição	87
Figura 38. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o <i>E. grandis</i> (a, c) holocelulose, (b, d) lignina total. As barras vermelhas representam 1,0 % dos percentis de distribuição.....	88
Figura 39. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o <i>E. urophylla</i> (a, c) holocelulose, (b, d) lignina total. As barras vermelhas representam 1,0 % dos percentis de distribuição.....	89
Figura 40. Ilustração dos corpos de prova (a) corte com lâmina, (b) corpo de prova com as dimensões 1,0 cm x 1,5 cm x 0,5 cm (comprimento x largura x espessura).	94
Figura 41. Spotligh 400 N acoplado ao sistema de imagem da marca PerkinElmer, (1) compartimento da óptica do microscópio, (2) posicionador de amostra, (3) espectrofotômetro NIRS e (4) controlador de posição.....	95

Figura 42. Fotos do plano tangencial das espécies (a) <i>E. grandis</i> , (b) híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> , (c) <i>E. urophylla</i> e (d) <i>S. macrophylla</i> King.....	97
Figura 43. Fotos do plano transversal das espécies (a) <i>E. grandis</i> , (b) híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> , (c) <i>E. urophylla</i> e (d) <i>S. macrophylla</i> King.....	97
Figura 44. Fotos do plano radial das espécies (a) <i>E. grandis</i> , (b) híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> , (c) <i>E. urophylla</i> e (d) <i>S. macrophylla</i> King.....	98
Figura 45. Espectros NIRS do híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> no plano radial (a) antes da aplicação do pré-processamento, (b) após a aplicação da primeira derivada.....	99
Figura 46. Espectros NIRS do padrão de celulose (a) antes da aplicação do pré-processamento, (b) após a aplicação da primeira derivada.	99
Figura 47. Espectros NIRS do padrão de lignina (a) antes da aplicação do pré-processamento, (b) após a aplicação da primeira derivada.	100
Figura 48. Representação esquemática do MCR-ALS aplicado aos dados de espectroscopia de imagem com matriz aumentada, na qual a cor cinza corresponde aos 6400 espectros da espécie estudada, a cor azul e a cor vermelha representam os 100 espectros de celulose e lignina, respectivamente, adicionados à matriz.	101
Figura 49. Etapas para a realização da análise por MCR-ALS com seleção de região espectral e matriz aumentada.	102
Figura 50. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS da celulose e hemicelulose (a) <i>E. grandis</i> , (b) híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i> , (c) <i>E.urophylla</i> , (d) <i>S. macrophylla</i> King, (----) padrão de celulose, (—) tangencial, (—) transversal e (—) radial.	103
Figura 51. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS da lignina (a) <i>E. grandis</i> , (b) híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i> , (c) <i>E. urophylla</i> , (d) <i>S. macrophylla</i> King, (----) lignina padrão, (—) tangencial, (—) transversal e (—) radial.....	105

Figura 52. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS dos extrativos (a) <i>E. grandis</i> , (b) híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i> , (c) <i>E. urophylla</i> , (d) <i>S. macrophylla</i> King, (----) lignina padrão, (—) tangencial, (—) transversal e (—) radial.....	107
Figura 53. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o <i>E. grandis</i> no plano tangencial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.	109
Figura 54. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o <i>E. grandis</i> no plano transversal (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.	111
Figura 55. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o <i>E. grandis</i> no plano radial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.	112
Figura 56. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i> no plano tangencial (a e d) holocelulose, (b e e) lignina total e (c e f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.	113
Figura 57. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i> no plano transversal (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.....	114
Figura 58. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i> no plano radial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.....	115

Figura 59. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o <i>E. urophylla</i> no plano tangencial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.	116
Figura 60. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o <i>E. urophylla</i> no plano transversal (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.	117
Figura 61. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o <i>E. urophylla</i> no plano radial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.	118
Figura 62. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para <i>S. macrophylla</i> King no plano tangencial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.	119
Figura 63. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para <i>S. macrophylla</i> King no plano transversal (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.	120
Figura 64. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para <i>S. macrophylla</i> King no plano radial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.	121
Figura 65. Montagem da câmara para obtenção das imagens (a) suporte para os corpos de prova, (b) lâmpadas fluorescentes instaladas na parte superior, (c) fundo da câmara com a chapa fotográfica para eliminar o reflexo e (d) montagem final com destaque para a parte interna e posicionamento do corpo de prova.	128
Figura 66. Espectro da lâmpada UV com máximo de absorção em 368 nm.	129

Figura 67. (a) Aspecto interno da câmara com destaque para o microscópio, posicionamento do corpo de prova e as lâmpadas UV, (b) aspecto interno da câmara, (c) lente utilizada como filtro e (d) aquisição das imagens.	130
Figura 68. Configurações utilizadas para padronização das imagens.	131
Figura 69. Etapas realizadas para decomposição das imagens e construção dos modelos PLS1-DA.....	132
Figura 70. Etapas realizadas para construção do conjunto de treinamento e detecção de <i>outliers</i>	135
Figura 71. Ilustração dos histogramas para as espécies <i>Cedrela odorata</i> (cedro), <i>Erisma uncinatum</i> Warm.(cedrinho), <i>Micropholis melinoniana</i> (curupixá), <i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden e <i>Swietenia macrophylla</i> King (mogno)....	136
Figura 72. Resultados para os conjuntos de treinamento e teste para a discriminação de: (a) ▼ <i>Cedrela odorata</i> (cedro) em relação às outras espécies, (b) * <i>Erisma uncinatum</i> Warm (cedrinho) em relação às outras espécies, (c) ■ <i>Micropholis melinoniana</i> (curupixá) em relação às outras espécies, (d) + <i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden (eucalipto) em relação às outras espécies e (e) ◇ <i>Swietenia macrophylla</i> King (mogno) em relação às outras espécies, (— —) limite de discriminação LD.	138

CAPÍTULO 1

Introdução e Objetivos

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Em análise química, várias etapas são necessárias, desde a amostragem, preparo de amostra até a seleção do método e análise dos resultados obtidos. É importante ressaltar que para o preparo de amostra pode ser necessária à aplicação de técnicas de extração ou separação, que requerem a destruição da amostra para que se tenha o analito em uma forma fisicamente detectável pela técnica instrumental utilizada.

Técnicas analíticas não destrutivas, com o emprego de nenhum ou de um mínimo preparo, têm se destacado por poupar tempo e custos e ainda preservar as propriedades físicas e químicas da amostra e as técnicas espectroscópicas satisfazem estas características.

A espectroscopia vibracional estuda os movimentos rotovibracionais das moléculas na forma da espectroscopia de absorção na região espectral do infravermelho (IR) e espectroscopia Raman. A absorção da radiação IR por uma molécula requer que ocorra uma mudança em seu momento de dipolo permanente na medida que ocorrem seus movimentos de rotação e/ou vibração. A espectroscopia Raman é baseada no espalhamento inelástico da radiação que interage com a molécula e as frequências vibracionais são determinadas pelas diferenças entre a frequência da radiação espalhada e da radiação incidente. Como resultado da espectroscopia vibracional tem-se sinais oriundos das vibrações moleculares de grupos funcionais pertencentes aos componentes presentes na amostra, sendo assim, a informação espectral obtida pode ser utilizada para prever a sua identificação, caracterização e a quantificação dos compostos químicos presentes a partir de análises rápidas e não destrutivas.¹

A madeira é produzida pelas árvores e pode ser definida como um conjunto heterogêneo de diferentes tipos de células com propriedades específicas para desempenharem as funções de condução de líquidos, armazenamento e transporte de substâncias nutritivas e sustentação do vegetal.² Com relação à composição química da parede celular da madeira, esta é basicamente composta por celulose, hemicelulose e lignina. Além destas substâncias, existem os componentes

denominados de extrativos que não fazem parte da parede celular.³ Com relação as técnicas aplicadas para determinação destes componentes, a espectroscopia Raman, oferece seletividade química e é utilizada na investigação da distribuição de celulose, hemicelulose e lignina.^{4,5}

Complementarmente, a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS, do inglês *Near Infrared Spectroscopy*) oferece a obtenção de espectros com rapidez, reprodutibilidade e de forma não destrutiva. Portanto, a NIRS tem grande potencial para aplicações em análise de madeira, pois esta região é rica em informações relacionadas aos grupos funcionais presentes na estrutura molecular dos seus principais constituintes.⁶

Novas possibilidades para a aplicação de caracterização de materiais de diferentes áreas tecnológicas estão na utilização da extensão da espectroscopia convencional, denominada espectroscopia de imagem (ou imagem hiperespectral), que consiste na medida de um espectro completo por unidade de superfície da amostra, sendo esta unidade definida como *pixel*. Os resultados são visualizados como um arranjo tridimensional, em que seleciona-se uma área da amostra, com dimensões espaciais x e y e, a terceira dimensão consiste nos números de onda ou comprimentos de onda provenientes dos espectros.

Enquanto que em uma análise clássica obtém-se a composição média do analito de interesse, a espectroscopia de imagem permite obter informações referentes à distribuição espacial dos constituintes presentes, gerando uma grande quantidade de dados, que devem ser tratados por ferramentas matemáticas adequadas. Assim, a espectroscopia de imagem Raman e NIRS juntamente com a utilização de ferramentas quimiométricas permitem a interpretação das diferentes respostas obtidas a fim de se extrair as informações relevantes de forma eficiente.

A espectroscopia Raman^{7,8} aliada à imagem^{4,9-11} é reportada na literatura como uma técnica eficaz aplicada na investigação dos constituintes da parede celular em espécies de madeira. Com relação à utilização da NIRS, esta tem grande importância no que diz respeito à descrição da estrutura molecular⁶, previsão das propriedades químicas e mecânicas¹²⁻¹⁴ e para a discriminação e identificação de diferentes espécies produtoras de madeira.^{15,16}

Além da NIRS, a análise por fluorescência é uma técnica capaz de oferecer a identificação e a discriminação de madeiras.¹⁷⁻¹⁹ A análise por fluorescência consiste num método qualitativo, direto e não destrutivo e segue basicamente duas formas de medida. A primeira consiste na exposição da espécie de madeira à luz ultravioleta (UV), com a utilização de lâmpadas UV com comprimento de onda em 365 nm em uma câmara escura. A identificação é estabelecida nas espécies florestais que apresentam fluorescência de sua madeira ao emitirem luz visível quando iluminadas por luz UV. A observação da fluorescência ocorre pela avaliação visual da intensidade de cor.²⁰ A segunda é com a utilização de espectrofluorímetros.

Neste contexto, a análise de fluorescência como avaliação visual pode ser melhor explorada com a utilização de imagens digitais. As cores visíveis são obtidas através da combinação das imagens em três componentes de cores distintas, criando um sistema aditivo: uma imagem utilizando intensidade da cor vermelha, uma imagem com a intensidade da cor verde e uma imagem com a intensidade da cor azul (RGB, do inglês *Red, Green, Blue*).²¹ Para a extração das informações que sejam capazes de estabelecer critérios de identificação, são necessárias a utilização de ferramentas matemáticas, com o emprego de análise multivariada de imagens (MIA, do inglês *Multivariate Image Analysis*).²²

A tese foi dividida em oito capítulos, em que após esta introdução e objetivos, são apresentados a revisão bibliográfica e uma breve fundamentação teórica. Em seguida, as aplicações foram descritas na forma de três capítulos, e cada um aborda de forma distinta as etapas experimentais realizadas e os resultados obtidos e finaliza-se com as conclusões e as referências bibliográficas.

O Capítulo 2 apresenta a revisão bibliográfica dos conteúdos pertinentes a esta pesquisa. São descritos nesse capítulo, assuntos relativos à estrutura, composição e aspectos anatômicos da madeira e também uma breve descrição de trabalhos publicados com a utilização de espectroscopia, fluorescência e imagem digitais para análise de madeira. No capítulo 3, a fundamentação teórica aborda a espectroscopia Raman, espectroscopia no infravermelho próximo, espectroscopia de imagem, imagens digitais e as ferramentas quimiométricas que foram empregadas nesta tese.

O primeiro estudo de caso, descrito no Capítulo 4, consistiu na aplicação da imagem hiperespectral por espectroscopia Raman (HIS-Raman, do inglês *Hyperspectral Image by Raman*) para a avaliação da homogeneidade dos constituintes presentes nas espécies florestais produtoras de madeira *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, um híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis* e *Swietenia macrophylla* King (Mogno).

No Capítulo 5, a técnica de imagem hiperespectral por NIRS (HIS-NIRS, do inglês *Hyperspectral Image by Near Infrared Spectroscopy*) foi aplicada às mesmas espécies para o mapeamento químico da holocelulose e lignina, e também dos extrativos.

No Capítulo 6, foi estudado o uso de imagens digitais no sistema RGB e da fluorescência da madeira para discriminar cinco espécies com caracteres similares, *Erismia uncinatum* Warm. (cedrinho), *Cedrela odorata* L. (cedro), *Micropholis melinoniana* (curupixá), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e o *Swietenia macrophylla* King (mogno).

Por fim, o Capítulo 7 apresenta as conclusões gerais e o Capítulo 8 as referências bibliográficas.

1.2 OBJETIVOS

Tendo em vista a relevância do estudo da composição química e da identificação correta das espécies produtoras de madeira, esta tese teve como objetivo aplicar a quimiometria como ferramenta analítica para a análise de imagens provenientes da técnica de espectroscopia de imagem Raman e na região do infravermelho próximo e o uso de imagens digitais e fluorescência para a análise exploratória da composição química e identificação da espécie de diversas espécies produtoras de madeira, respectivamente. Como objetivos específicos, tem-se:

- Realizar a análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total através da construção de mapas de concentração com a utilização da HIS-Raman e a ferramenta quimiométrica resolução multivariada de curvas por mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS, do inglês *Multivariate Curve Resolution - Alternating Least*

Squares) em três diferentes espécies no plano transversal: *Eucalyptus grandis*, o *Eucalyptus urophylla*, *Swietenia macrophylla* King (Mogno) e um híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*.

-Aplicar a HIS-NIRS e o MCR-ALS para avaliar a distribuição e quantificar a holocelulose, lignina total e extrativos através da construção de mapas de concentração nos planos tangencial, transversal e radial nas mesmas espécies descritas anteriormente, com a utilização do MCR-ALS.

-Realizar a discriminação de cinco espécies de madeira com caracteres similares: *Erismia uncinatum* Warm. (cedrinho), *Cedrela odorata* L. (cedro), *Micropholis melinoniana* (curupixá), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King (mogno) através da medida de fluorescência com a utilização de lâmpada UV e câmara escura, imagens digitais para a formação de histogramas de cores e a construção de modelos por análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS1-DA, do inglês *Partial Least Square for Discriminant Analysis*).

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MADEIRA

A madeira é um material heterogêneo, que possui inúmeras aplicações nos segmentos da construção, indústria e comércio. Sua maior vantagem está em ser um recurso natural e renovável.²

As árvores crescem e desenvolvem-se tanto em altura quanto em espessura. O crescimento em altura é denominado crescimento primário e esse processo é responsável pelo alongamento do tronco e ramos. O crescimento secundário corresponde ao aumento em diâmetro da árvore. O tronco (Figura 1) desempenha as funções de sustentação, condução de soluções minerais absorvidas pelas raízes e armazenamento de substâncias. O xilema secundário, também denominado lenho, contribui para o crescimento em espessura, em consequência da adição de novas células e este constitui a madeira.^{23,24}

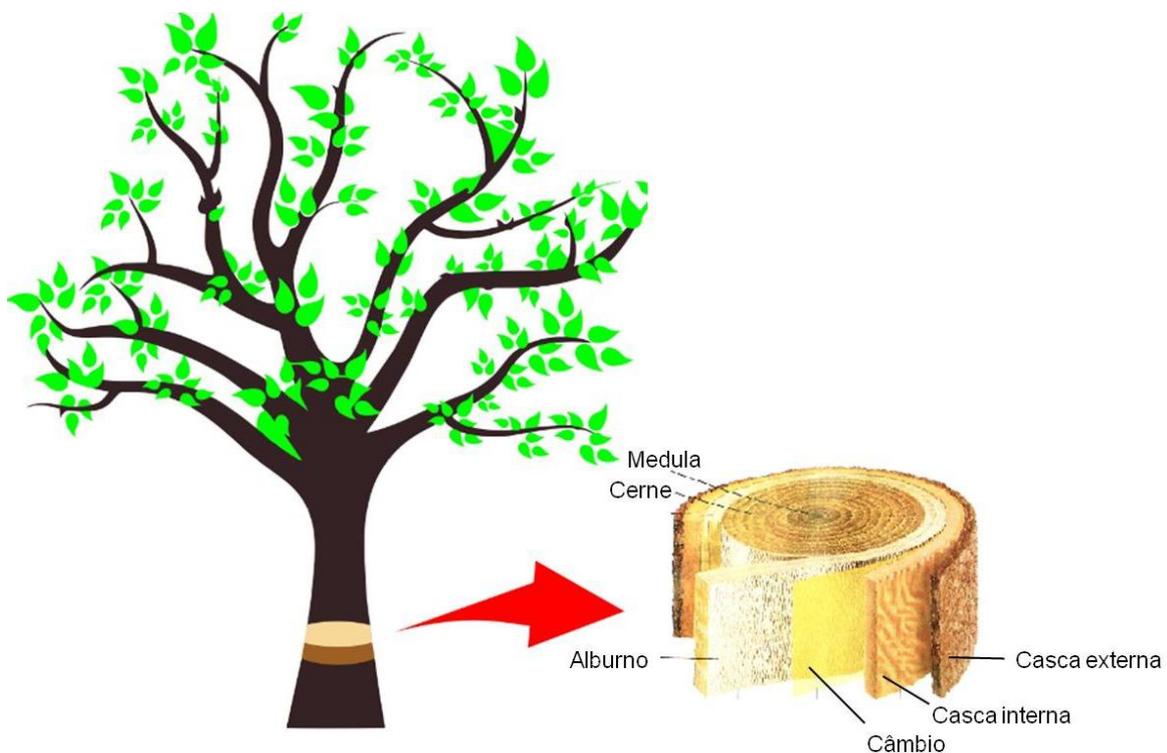


Figura 1. Desenho esquemático de uma seção transversal do tronco de uma árvore (Adaptado da Referência 2)

Analisando-se o desenho esquemático da seção transversal do tronco de uma árvore (Figura 1), são observadas as seguintes camadas:

- ✓ Casca externa: parte seca e totalmente inerte que tem a função proteção para o tronco.²
- ✓ Casca interna (ou floema): é um conjunto de tecidos vivos especializados para transporte de seiva elaborada (nutrientes gerados a partir da fotossíntese) a ser distribuída aos demais tecidos da planta.²
- ✓ Cambio: película de espessura microscópica responsável pela geração de novos elementos celulares da madeira, sendo responsável pelo crescimento e aumento do diâmetro do tronco.^{24,25}
- ✓ Alburno: região formada por células vivas responsáveis pela condução em movimento ascendente da seiva bruta através do tronco da árvore. É considerado como um tecido condutor que perde as suas funções de condução e reserva com o tempo e se transforma em parte do cerne.²⁶
- ✓ Cerne: é a camada mais interna do xilema secundário, que perde a sua atividade fisiológica e apresenta uma coloração mais escura, justificada pela presença de taninos, gorduras, carboidratos e outras substâncias.²⁶
- ✓ Medula: parte central do caule, formada por tecido parenquimático não fazendo parte do xilema secundário ou madeira. Tem a função de armazenar substâncias nutritivas para a árvore durante a fase inicial de crescimento.^{24,26}

De modo geral, as madeiras podem ser agrupadas em duas categorias distintas: “moles” (*softwoods*) e “duras” (*hardwoods*), mas estes termos não necessariamente indicam a dureza da madeira. As madeiras denominadas como *softwoods* ou coníferas pertencem ao grupo das gimnospermas, que apresentam como características distintivas a folhagem na forma de agulha e a ausência de frutos (sementes descobertas). As madeiras denominadas *hardwoods* ou folhosas pertencem ao grupo das angiospermas dicotiledôneas, que apresentam como características distintivas folhas largas e sementes encerradas em frutos.²⁷

A madeira é um material de alta complexidade e possui uma variabilidade estrutural e química. A composição química elementar não apresenta grandes variações entre espécies, sendo composta pelos elementos: carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O) e o nitrogênio (N) em pequenas quantidades.³

Com relação aos componentes macromoleculares, a parede celular é constituída de celulose, hemiceluloses (ou polioses) e lignina, que são responsáveis pela maioria das propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas da madeira.^{3,23} Os extrativos estão presentes em menores proporções e não compõem a parede celular. A composição química difere nas coníferas e nas folhosas, podendo ser influenciadas pelas condições climáticas, características do solo e idade da árvore, sendo esta composição média encontrada em espécies de regiões de clima temperado e representada na Figura 2.^{3,23}

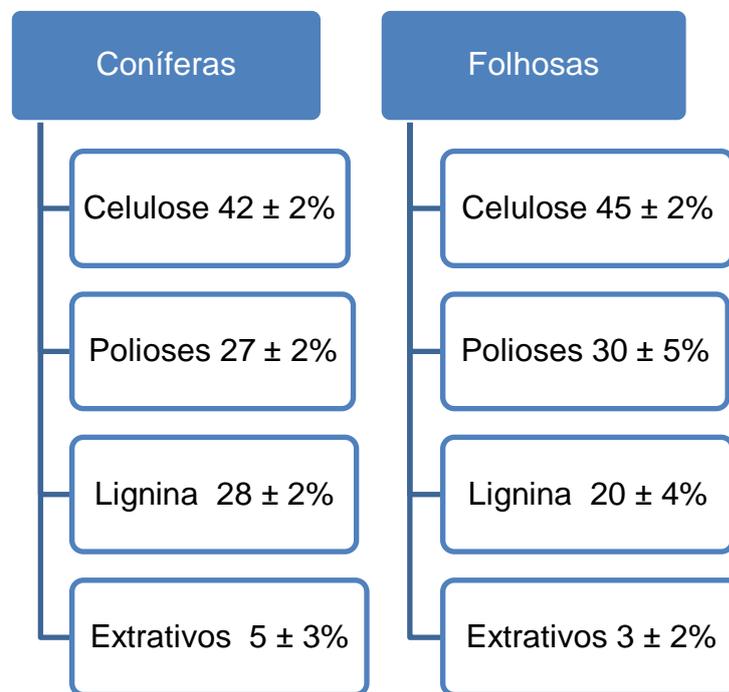


Figura 2. Composição química média de madeiras de coníferas e folhosas.²³

2.1.1. Celulose

A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é o principal componente da parede celular dos vegetais. É um polissacarídeo de cadeia linear composta exclusivamente de monômeros de glicose, que formam cadeias muito estáveis de alta massa molar, a qual é grande o suficiente para ser insolúvel em água, solventes orgânicos, soluções ácidas e alcalinas em temperatura ambiente.²⁸ A sua biossíntese envolve várias etapas, em que a primeira é a produção de glicose pela planta através da fotossíntese, sendo sintetizada a partir do encadeamento enzimático da glicose.²⁹

As longas cadeias da celulose se unem lateralmente por ligações de hidrogênio, entre grupos hidroxilas e originam as micelas, que unidas formam as fibrilas, que dão à celulose uma estrutura ordenada e cristalina, sendo responsável pela estabilidade térmica e baixa reatividade da madeira.²⁵ A Figura 3 ilustra a unidade estrutural da celulose.³

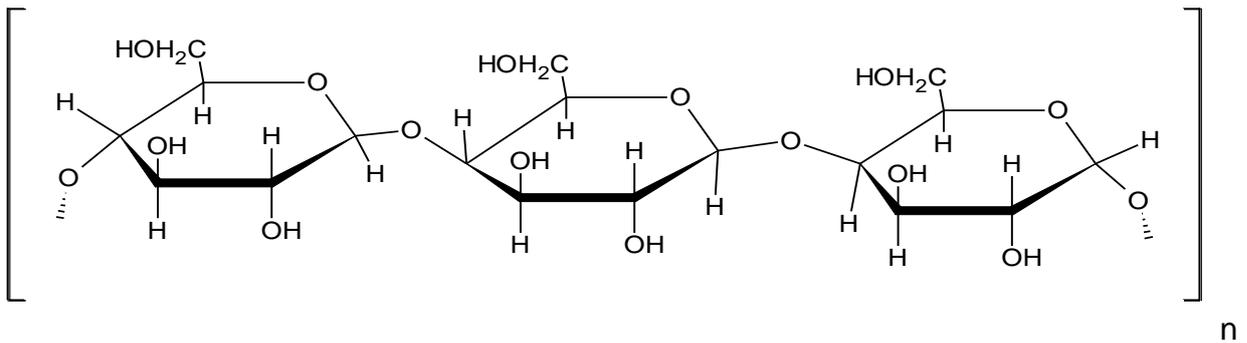


Figura 3. Estrutura química da celulose.

2.1.2. Hemicelulose

O termo hemicelulose refere-se a um grupo de polissacarídeos de cadeia ramificada, que atuam como agentes de ligação entre a celulose e a lignina nas paredes das plantas. Isoladas das madeiras, as hemiceluloses apresentam-se como misturas complexas de polissacarídeos, sendo os mais importantes as glucoxilanas, arabinoglucoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas e galactoglucomananas (Figura 4).^{3,30,31}

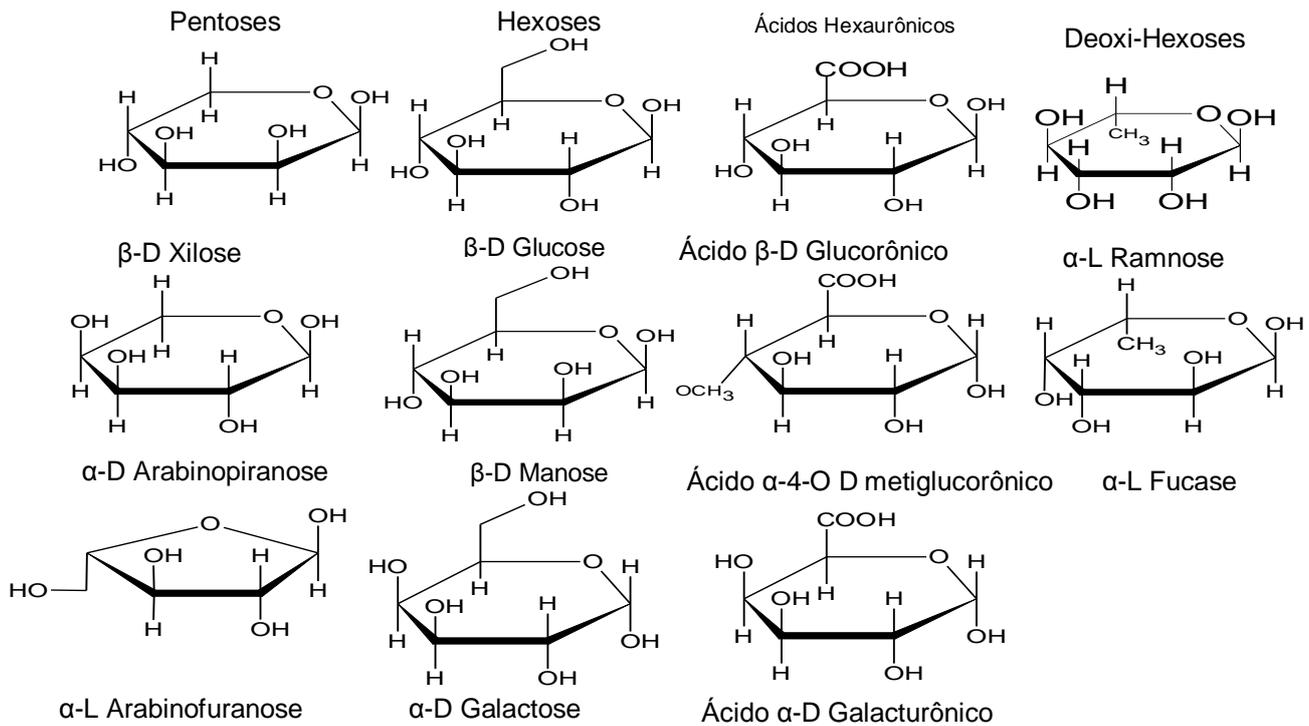


Figura 4. Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses.³²

Portanto, o termo hemicelulose não designa um composto químico, mas sim uma classe de componentes poliméricos presentes em vegetais fibrosos. O teor e a proporção dos diferentes componentes encontrados nas hemiceluloses da madeira variam com a espécie e, provavelmente, também de árvore para árvore.³¹

2.1.3. Holocelulose

Holocelulose é o termo utilizado para designar o conjunto da celulose e das hemiceluloses em plantas ou células vegetais.^{3,27}

2.1.4. Lignina

Lignina é um polímero natural formado por macromoléculas de estrutura complexa constituída por um sistema aromático composto de unidades de fenilpropano. Ligninas são amorfas, altamente complexas, ligadas quimicamente às hemiceluloses, e, em alguns casos, formam um complexo lignina-carboidrato que é resistente à hidrólise.²⁷ É considerada o segundo componente de maior importância da parede celular³³, com uma contribuição de 20 % a 35 % da biomassa vegetal, sendo derivada da polimerização de três monômeros arilpropanóides: os alcoóis coniferílico ou guaiacil, sinapílico ou sirigil e o p-cumarílico ou p-hidrofênica (Figura 5).³⁴

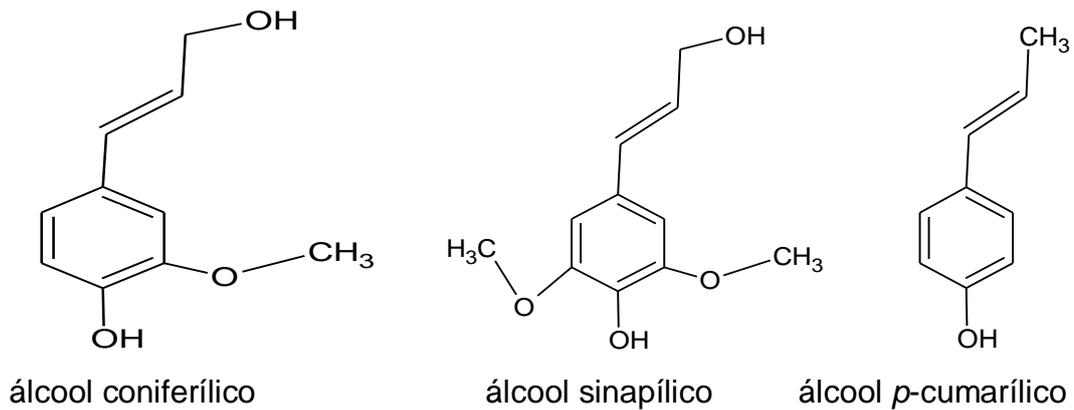


Figura 5. Monômeros formadores da estrutura da lignina.³⁴

Existem diversas maneiras de tratamento e isolamento da lignina. Baseado na suscetibilidade à hidrólise, a lignina pode ser classificada em:³⁵

-Lignina não core: consiste de compostos fenólicos de baixo peso molecular, liberados da parede celular por hidrólise, que é composta por ácidos p-hidroxicinâmico éster-ligados.

- Lignina core: consiste de monômeros arilpropanóides da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação. Eles são compostos de unidades p-hidrofênica, guaiacil e sirigil, em proporções diferentes, de acordo com sua origem. Pode-se então classificar as ligninas segundo a presença dessas unidades

A lignina é obtida da madeira como resíduo sólido e está presente nas plantas vasculares que desenvolvem tecidos especializados em transporte de soluções aquosas e suporte mecânico.²³

2.1.5 Extrativos

Os extrativos representam um grande número de componentes químicos presentes na madeira que podem ser extraídos com o uso de solventes polares e apolares. São representados por vários compostos como: alguns sais, açúcares e polissacarídeos (solúveis em água); ácidos ou ésteres graxos; alcoóis de cadeia longa, ceras, resinas e compostos fenólicos e glicosídeos (solúveis em solventes orgânicos).^{23,31}

2.2 ASPECTOS ANATÔMICOS

Do ponto de vista anatômico, para se conhecer a estrutura da madeira, torna-se fundamental o exame de três planos convencionais de corte: o plano longitudinal radial é a direção paralela aos raios e perpendicular aos anéis de crescimento (Figura 6 a), o plano longitudinal tangencial que é a direção tangencial aos anéis de crescimento ou perpendicular aos raios (Figura 6 b) e o plano transversal, que é exposto quando se realiza um corte perpendicular ao eixo do tronco (Figura 6 c). Os três sentidos se diferem interferindo de forma acentuada em suas propriedades.^{2,24,26}

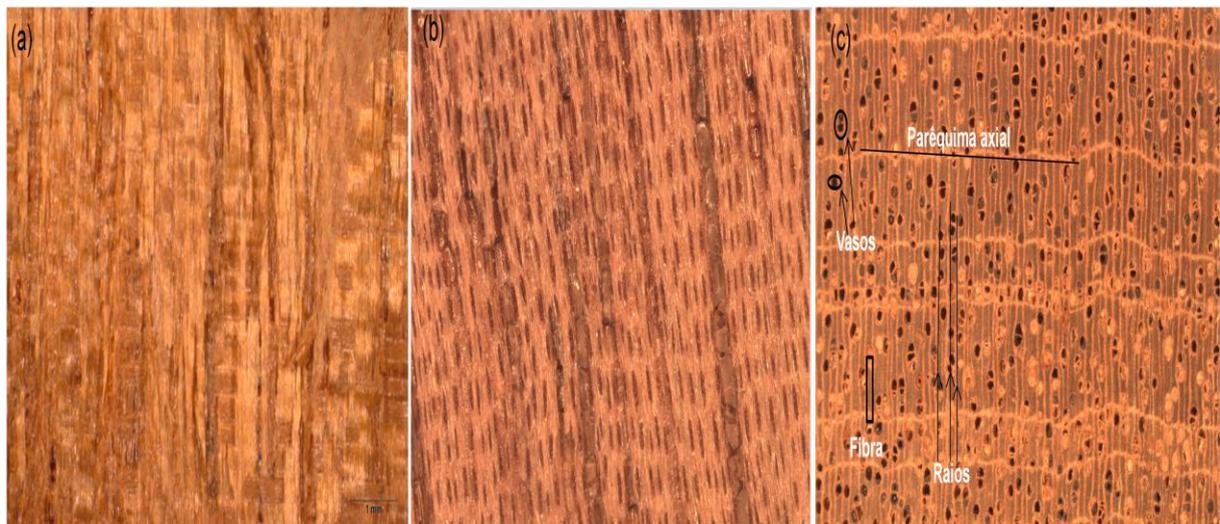


Figura 6. Foto da madeira de *Swietenia macrophylla* King. As imagens ilustram as diferenças existentes nos três planos de orientação: (a) longitudinal radial, (b) longitudinal tangencial e (c) transversal.

A madeira é constituída por um agrupamento de células que possuem formas alongadas e são orientadas na direção longitudinal do tronco, mas também ocorrem posicionadas transversalmente e com formatos diferentes. Essas variações ocorrem devido às diferentes funções elas desempenham. De uma forma geral, são encontrados nas madeiras os seguintes tipos celulares: traqueídeos, elementos de vaso, fibras e o parênquima axial.² Em termos estruturais, as madeiras de coníferas são relativamente simples, sendo compostas quase que totalmente por um único tipo de células denominadas traqueídeos que são células alongadas, fechadas e pontiagudas e raios.³²

As madeiras de folhosas, por sua vez, são estruturalmente mais complexas e apresentam maior diversidade de padrões de organização celular. A Figura 6 ilustra a espécie *Swietenia macrophylla* King, que pertence às folhosas. Quatro tipos

básicos de células são encontrados nesta categoria: aquelas que compõem os elementos de vaso, as fibras, o parênquima axial e as células do raio (que constituem o parênquima radial). A maior parte da superfície transversal (Figura 6 c) é formada por elementos de vasos e fibras. Os vasos aparecem nos cortes transversais como poros e as fibras formam a parte mais escura da superfície com paredes espessas, o que lhes conferem elevada massa específica. O parênquima é formado por células de paredes mais finas que os vasos e fibras e geralmente composto apenas de parede primária. O parênquima é dividido em axial orientado no sentido do eixo do caule e radial (raios) no sentido casca-medula.^{2,24,26}

2.3 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS PARA A ANÁLISE DE MADEIRA

2.3.1 Espectroscopia Raman de imagem

As técnicas espectroscópicas são de grande interesse para aplicações em diversas áreas, devido as características como versatilidade, simplicidade operacional, necessidade de mínimo ou nenhum preparo de amostra, não produzir resíduos químicos, sendo uma técnica não destrutiva.

A espectroscopia Raman é uma técnica consolidada para investigação da parede celular em tecido vegetal, sendo que o espectro Raman fornece informações da sua estrutura e composição química, gerando bandas específicas. Contudo, devido às limitações desta técnica, no que se refere à baixa sensibilidade e a interferência de fundo (“*background*”) ocasionada pela fluorescência gerada pelos grupos funcionais presentes nos constituintes da parede celular, houveram avanços que levaram à incorporação de microscópios, a fim de fornecer a informação espacial com alta resolução e demonstrar a distribuição dos constituintes a nível microscópico.^{4,9,36,37} O espectrômetro Raman acoplado a um microscópio pode ser dispersivo ou baseado em transformada de Fourier (FT, do inglês *Fourier Transform*) sendo que o primeiro emprega um laser na região do visível e o segundo na região do infravermelho próximo.

A espectroscopia Raman de imagem foi utilizada por Agarwal⁴, que investigou a ultraestrutura e a composição da parede celular da espécie *Picea mariana*

(espécie norte-americana da família das coníferas). Os resultados obtidos com as imagens indicaram que a nível microscópico, as concentrações de lignina e celulose variaram dentro e entre regiões morfológicas distintas e foi verificado que a organização macromolecular da parede celular desta espécie é bastante complexa.

Schmidt et al.³⁷ aplicaram a espectroscopia Raman de imagem à espécie *Arabidopsis thaliana*, considerada pelos autores como uma importante fonte de geração de biomassa lignocelulósica. O estudo forneceu informações sobre a distribuição espacial de celulose e lignina em uma seção transversal e os resultados contribuíram para a compreensão da organização molecular, sendo que o conhecimento desta organização é uma importante ferramenta para melhoramentos genéticos desta espécie.

Sun et al.⁹ utilizaram a espectroscopia Raman de imagem para o estudo específico da distribuição de celulose e lignina na parede celular da espécie *E. globulus*, sendo esta, uma importante matéria prima utilizada como biomassa para geração de energia. O estudo demonstrou bandas características destes componentes e foram gerados mapas de distribuição com o auxílio do software do equipamento, a partir de lâminas da seção transversal com 50 µm de espessura. Os mapas proporcionaram a visualização da distribuição espacial de celulose e lignina. Os autores consideraram que a técnica pode ajudar a compreender os mecanismos moleculares e otimizar os processos químicos e enzimáticos que ocorrem na parede celular das plantas.

Zhang et al.³⁶ realizaram um estudo para identificação automática dos espectros dos componentes presentes na parede celular da espécie *Populus nigra* L. por espectroscopia Raman e imagem. Com esta pesquisa, os autores avaliaram a distribuição da celulose, hemicelulose e lignina nas camadas da parede celular através da atribuição de bandas das ligações químicas presentes nestes componentes. A análise de componentes principais e de *clusters* foram utilizadas como ferramentas matemáticas para classificação dos grupos espectrais de regiões distintas da parede celular: Os resultados obtidos proporcionaram identificar os espectros Raman da parede celular em diferentes regiões, e através do conjunto de dados de imagem foi possível obter novos conhecimentos sobre a morfologia e constituição química da espécie.

2.3.2 Espectroscopia no infravermelho próximo e imagem hiperespectral

Para a aplicação da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS, do inglês *Near Infrared Spectroscopy*) em amostras sólidas como a madeira, podem ser utilizados diferentes tipos de instrumentos, tais quais os espectrofotômetros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR, do inglês *Fourier Transform Infrared*) e infravermelho próximo (FT-NIR, do inglês *Fourier Transform Near Infrared*) que proporcionam melhor relação sinal/ruído e limite de detecção, alta resolução e reprodutibilidade do comprimento de onda, velocidade superior na obtenção do espectro e maior aproveitamento da energia radiante.³⁸⁻⁴² Sua principal desvantagem está relacionada ao baixo limite de detecção de componentes minoritários, que são na ordem de 0,1 a 0,5 % em massa, dependendo dos grupos funcionais presentes na amostra, os quais determinam as intensidades das bandas de absorção.⁶

A NIRS tem se destacado na determinação de propriedades físicas e mecânicas⁴³⁻⁵⁰ e composição química da madeira.^{12-14,51,52} Também encontra-se na literatura, uma revisão sobre as diferentes aplicações da NIRS e a atribuição de bandas de absorção dos principais componentes.^{6,53} Trabalhos com aplicação da NIRS e imagem em madeira para determinação da composição química e sua distribuição ainda são escassos, todavia, a combinação desta técnica com quimiometria tem possibilitado a evolução deste tipo de estudo.^{54,55}

Um estudo com a utilização da NIRS e imagem hiperespectral foi realizado por Thumm et al.⁵⁵, que fizeram o mapeamento bidimensional da composição química na face transversal de discos da espécie *Pinus radiata*. Para o estudo, foi utilizado um espectrógrafo acoplado a uma câmera de imagem a fim de se obter os espectros NIRS e imagens hiperespectrais. Foram utilizados discos com diâmetros na faixa de 15 a 30 cm. Os espectros NIRS obtidos foram processados usando o método de mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) para prever a distribuição e a variação de lignina, galactose e glicose. Foram obtidos erros de predição entre 0,84 % a 0,87 % para os compostos avaliados. Os autores consideraram que o sistema de imagem NIRS é um meio rápido e eficaz em termos de custos, que pode ser aplicado para a determinação da composição química e

para o mapeamento ao longo de discos de madeira e concluíram que os mapas resultantes da composição química indicam claramente, em alta resolução espacial, a extensão da heterogeneidade que ocorre em toras de madeira.

As propriedades físicas da madeira foram estudadas por Mora et al.⁵⁶, que utilizaram a NIRS e imagem hiperespectral para estimar a densidade básica (DB) e o teor de umidade (TU) da espécie *Pinus taeda* L., analisando 125 discos na face transversal. As imagens hiperespectrais foram obtidas com o auxílio de uma câmera e o espectrômetro NIRS era acoplado a uma sonda especial. Para o estudo, foram utilizados discos com diâmetros na faixa de 15 a 30 cm. Os espectros NIRS obtidos foram processados usando o método de mínimos quadrados parciais para prever os valores de DB e TU diretamente nos discos de madeira. Com a aquisição das imagens, os autores observaram a baixa qualidade dos espectros obtidos a partir da câmera e consideraram que, com a utilização de uma câmera com melhor resolução poderia se obter melhores resultados. Os valores encontrados para DB e TU com aplicação da HIS-NIRS foram de 430,7 kg.m⁻³ e 55,1 %, respectivamente, que foram comparados com os valores de referência, de 427,9 kg.m⁻³ e 55,4 % para DB e TU, respectivamente. Os autores concluíram que o sistema pode ser automatizado e flexível, podendo ser aplicado em discos de vários tamanhos e em qualquer uma das extremidades.

2.4 IDENTIFICAÇÃO E DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE MADEIRA

O processo de identificação de espécies florestais produtoras de madeira pode ser realizado a partir da avaliação visual, porém, tal identificação depende do conhecimento das características anatômicas de cada espécie e também, a sua associação com outras características, tais como cor, textura, brilho.²⁴

A importância da identificação está relacionada à estrutura da madeira, que é uma característica indispensável para a utilização racional, visto que, existem restrições quanto à exploração, comercialização e exportação de algumas espécies. A exploração e comércio ilegais da madeira e seus produtos ocasionam problemas ecológicos e econômicos para países produtores e consumidores, resultando na necessidade de uma maior fiscalização.

A implementação de restrições quanto à exploração no comércio internacional e preservação ambiental está descrita na Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e da Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES, do inglês *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) firmada em Washington em 3 de março de 1973. A CITES representa um dos acordos ambientais mais importantes para preservação das espécies ameaçadas, e atualmente engloba 180 países. Ela regulamenta a exportação, importação e reexportação de animais e plantas, suas partes e derivados, através de um sistema de emissão de licenças e certificados que são expedidos se atendidos os requisitos da Convenção, sendo que o Brasil aderiu à Convenção em 1975.⁵⁷

Uma importante espécie que foi incluída no Apêndice II da CITES em 15 de novembro de 2003 foi a *Swietenia macrophylla*, popularmente conhecida como “mogno”, que trata-se de uma espécie que possui características de coloração, beleza, estabilidade e durabilidade que lhe confere um alto valor comercial.⁵⁷ Contudo, o controle da exploração desta espécie está condicionada à sua identificação anatômica, requisitando o exame macroscópico e microscópico por profissionais que detenham o conhecimento nesta área. Outro aspecto que vale destacar é a variedade de espécies que possuem semelhanças entre si, tais quais, as pertencentes ao gênero *Cedrella* spp, popularmente conhecidas como “cedro”, tendo propriedades físicas e mecânicas bastante semelhantes. A *Cedrela odorata* L. foi adicionada no Apêndice III da CITES em março de 2004.^{58,59} Portanto, a semelhança na aparência visual de espécies florestais dificulta a identificação para fins de fiscalização. Outro aspecto importante está relacionado à variedade de nomes populares, que mudam de acordo com a região. Esta variabilidade de nomenclatura e sua distribuição está listado na Tabela 1.^{15,60-62}

Tabela 1. Descrição da espécie, família e nomes usuais de cinco madeiras com caracteres similares. ^{15,60-62}

Espécie	Família	Nomes Usuais
<i>Cedrela odorata</i> L.	Meliaceae	Capiúva, cedreiro, cedreiro, cedrilho, cedrinho, cedro, cedro-amargo, cedro-amargoso, cedro-aromático, cedro-batata, cedro-bordado, cedro-branco, cedro-bravo, cedro-cheiroso (BA), cedro-de-mato-grosso, cedro-do-amazonas, cedro-do-brejo, cedro-do-paraguai, cedro-fêmea (BA), cedro-manso, cedro-mogno, cedro-pardo, cedro-rosa (RJ, SP), cedro-vermelho (PA, BA)
<i>Erisma uncinatum</i> Warm.	Vochysiaceae	Cambará, cambará-rosa, cedrilho, cedrinho, coariúba, jabuti, jabuti-da-terra-firme, libra, mandioqueira-cachimbo-de-jabuti, pé-de-jabuti, quariba, quariúba, quaruba-de-flor-roxa, quaruba-vermelha, quarubarana, quarubatinga, verga.
<i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden	Myrtaceae	Eucalipto
<i>Micropholis melinoniana</i> Pierre	Sapotaceae	Curupixá, Pau-de-sapo (AM)
<i>Swietenia macrophylla</i> King.	Meliaceae	Acaju, aguano, araputanga, caoba, cedro, cedro-aguano, cedro-mogno, cedrorana (PA), mara, mara-vermelho, mogno, mogno-aroeira, mogno-branco, mogno-brasileiro, mogno-cinza, mogno-claro, mogno-de-marabá, mogno-do-rio-Jurupari (AM), mogno-escuro, mogno-rosa, mogno-róseo, mogno-vermelho (MT, TO, GO).

2.4.1 Técnicas aplicadas à identificação e discriminação de espécies de madeira

2.4.1.1 Espectroscopia no infravermelho próximo

Mediante as dificuldades para a identificação de espécies de madeira, o desenvolvimento e aplicação de técnicas instrumentais que possibilitem a realização de análises rápidas e não destrutivas e que possam ser aplicadas em amostras sólidas são alternativas que podem tornar a identificação mais eficiente. Dentre as técnicas utilizadas a NIRS tem se destacado por possuir estas características.

Pastore et al.¹⁵ utilizaram NIRS e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) na discriminação de um total de 132 amostras de madeira em forma de pó de quatro espécies, a andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), o cedro (*Cedrela odorata* L.), o curupixá (*Micropholis melinoniana* Pierre) e o mogno (*Swietenia macrophylla* King). Os autores obtiveram 100 % de acerto de separação entre as espécies.

Braga et al.¹⁶ realizaram um estudo com NIRS e PLS-DA com o objetivo de discriminar andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), cedro (*Cedrela odorata* L.), curupixá (*Micropholis melinoniana* Pierre) e mogno (*Swietenia macrophylla* King). Foram utilizados 111 blocos de madeira de cada espécie e os autores obtiveram 100 % de acerto de separação entre as espécies.

Horikawa et al.⁶³ aplicaram a NIRS e PLS-DA para separação de *Pinus densiflora* e *Pinus thunbergii* em pó. Foram utilizados cerne e alburno de amostras com histórico arqueológico e os autores obtiveram em média 50 % de acerto de separação e concluíram que o método proposto não é eficaz para tal finalidade, devido a influência dos efeitos do envelhecimento sobre as características das amostras, incluindo a quantidade de água absorvida e à variabilidade dos componentes químicos.⁶³

2.4.1.2 Fluorescência

A técnica de fluorescência molecular também é empregada para a identificação de espécies de madeira, cuja aplicação pode ser realizada com a

utilização de lâmpadas com radiação ultravioleta (UV) e câmaras escuras, na qual a análise é feita de forma visual ou com a utilização de equipamentos mais sofisticados, como os espectrofluorímetros.^{19,20}

São reportados na literatura, trabalhos que utilizaram lâmpadas UV, como o trabalho de Teixeira et al.²⁰ que avaliaram a fluorescência de 23 espécies tropicais de madeira. Foram confeccionados corpos de prova de cada espécie e estes foram lixadas e expostos à radiação UV com comprimento de onda de 365 nm em uma câmara escura. A fluorescência observada variou entre amarelo, violeta e verde com diferentes tonalidades entre as diferentes espécies e também não fluorescentes. Os autores destacam que o método foi eficiente para auxiliar na diferenciação entre espécies que apresentam ou não fluorescência.

Avella et al.⁶⁴ realizaram um estudo com 10.160 espécies de madeira provenientes da Xiloteca de Tervuren na Bélgica. Foi analisada a fluorescência destas espécies conforme o procedimento descrito pelo comitê da Associação Internacional de Anatomistas de Madeira (IAWA, do inglês *International Association of Wood Anatomists*).⁶⁵ Os autores concluíram que 1237 espécies eram nitidamente fluorescentes, 2272 possuíam fluorescência de baixa intensidade e 6651 espécies foram consideradas como não fluorescentes.

Guzmán et al.⁶⁶ analisaram 579 amostras de madeira do México pertencentes a 92 gêneros e 40 famílias. A análise de fluorescência seguiu os padrões da IAWA.⁶⁵ Neste estudo, foram analisadas diferentes faces de uma mesma amostra (face transversal e faces longitudinais) e as amostras foram classificadas como fluorescentes e não fluorescentes. A fluorescência variou principalmente entre tons de azul e verde e mais raramente amarelo e laranja. Os autores concluíram que a fluorescência pode ajudar a resolver problemas relacionados à discriminação de madeiras com aparência similar e que a maioria dos laboratórios de anatomia utilizam esta técnica, mas os resultados são raramente publicados.

2.4.1.3 Imagem digitais

A utilização de imagens digitais como técnica para a identificação de espécies florestais tem sido explorada com o desenvolvimento de bancos de dados de imagens que se baseiam em parâmetros como textura e cor, e utilizando algoritmos de classificação.⁶⁷⁻⁷⁰

Khoury et al.⁶⁷ realizaram um estudo que aplicou a análise discriminante linear e quadrática e imagens digitais para discriminar defeitos em tábuas de eucalipto, utilizando histogramas de cores das imagens retiradas em 492 blocos contendo 12 tipos de defeitos. Os autores obtiveram erros globais de classificação entre 6 % e 50 % e concluíram que o método é adequado para discriminar defeitos em tábuas de eucalipto. Os autores avaliaram que, apesar de terem obtido erros globais de classificação satisfatórios, outros tipos de classificação e a inclusão de outros parâmetros poderiam ser considerados, como classificadores não paramétricos e a posição do defeito nas tábuas de eucalipto.

Zhao et al.⁶⁸ propuseram a identificação das espécies *Abies nephrolepis*, *Picea koraiensis*, *Pinus koraiensis*, *Picea jezoensis* e *Fraxinus mandshurica*, fundamentando-se em duas características macroscópicas, a cor e a textura e utilizando o procedimento de fusão de imagens multissensor. Tal procedimento permitiu combinar os caracteres de textura, de cor e dados espectrais, gerando um método superior àqueles que usam apenas um dos caracteres. Os autores obtiveram taxas de acerto de classificação de 95 %, 91 %, 89 %, 93 % e 90 % para *Abies nephrolepis*, *Picea koraiensis*, *Pinus koraiensis*, *Picea jezoensis*, *Fraxinus mandshurica*, respectivamente.

Wooten et al.⁶⁹ realizaram a discriminação de aparas de madeira e cascas do gênero *Quercus* spp, *Pinus* spp. e *Ulmus* spp. que são utilizadas para produção de bioenergia, com o objetivo de otimizar a separação deste tipo de material. Foi desenvolvido um algoritmo genérico de identificação para ser aplicado na captura de imagem, no qual a textura, intensidade de cores da madeira foram os parâmetros utilizados para efetuar a diferenciação. O modelo foi capaz de diferenciar aparas de cascas com 98,3 % de acerto de classificação para os três diferentes gêneros de madeira.

Yusof et al.⁷⁰ propuseram um estudo utilizando um algoritmo genético denominado Kernel (K-GA, do inglês *Kernel-Genetic Algorithm*), com a combinação de análise discriminante, aplicado ao reconhecimento automático de imagens e tendo como base a textura da madeira. Os conjuntos de dados das imagens foram adquiridos a partir de 52 espécies e os autores obtiveram uma porcentagem de classificação correta entre 90 % a 100 %. Os autores concluíram que a utilização do algoritmo genético com a seleção dos caracteres não lineares da madeira auxiliou na formação do banco de dados utilizando um menor espaço da memória do computador e as análises foram realizadas com maior precisão e em tempo real.

CAPÍTULO 3
Fundamentação Teórica

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, em que a radiação pode ser absorvida, transmitida ou espalhada.⁷¹ Quando ocorre o espalhamento, a interação da molécula com o fóton não provoca mudanças nos níveis de energia vibracional e/ou rotacional da molécula, fazendo com que a frequência da radiação incidente e da espalhada sejam as mesmas, ou seja, a troca de energia (E) é igual a zero, de modo que a frequência da luz espalhada (E_0) é a mesma que a da luz incidente ($E=E_0$). Este processo também é conhecido como espalhamento Rayleigh ou espalhamento elástico.⁷² No entanto, uma pequena fração da radiação pode ser espalhada inelasticamente, ou seja, com energia diferente da incidida. Quando a energia espalhada é menor que a incidida, o espalhamento é chamado de Raman Stokes e quando a energia é maior, denomina-se espalhamento Raman anti-Stokes.^{73,74} A Figura 7 ilustra o esquema do espalhamento Rayleigh e espalhamento Raman.⁷²

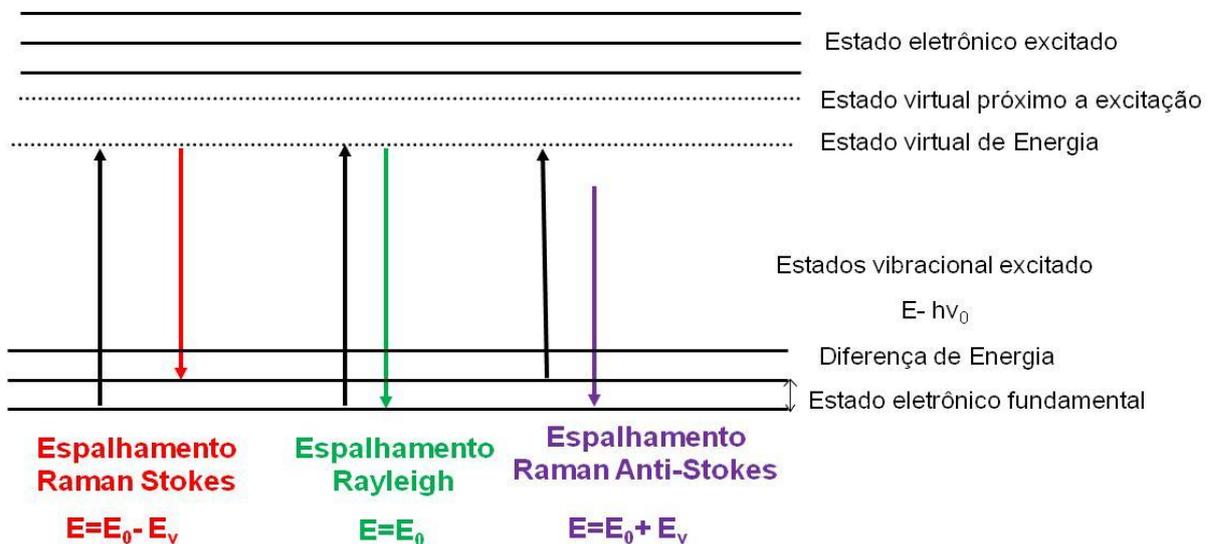


Figura 7. Mecanismos de espalhamentos Rayleigh e Raman Stokes e Anti-Stokes (Adaptado da referência 72).

No espalhamento Raman Stokes, a molécula no estado fundamental sofre colisão com o fóton de energia e essa interação faz com que ela obtenha energia a partir do fóton, em seguida, a frequência da luz dispersa será menor do que a da luz

incidente ($E = E_0 - E_v$). 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 de energia é cedida ao fóton, que é espalhado com energia igual a $E = E_0 + E_v$. A diferença de energia entre o fóton incidente e o espalhado determina o deslocamento Raman, para o qual esta diferença de energia relativa das transições de níveis vibracionais moleculares ocorre normalmente entre 100 e 400 cm^{-1} .^{1,72}

Realizando a comparação entre as linhas Stokes e anti-Stokes (Figura 7), observa-se uma simetria entre elas em relação à linha Rayleigh, estando do lado de frequências mais baixas as linhas Stokes e do lado de frequências mais altas as linhas anti-Stokes. As linhas anti-Stokes são menos intensas que suas correspondentes Stokes, fato que está ligado à probabilidade do fenómeno ocorrer, já que a população dos estados excitados segue a distribuição de Boltzmann. Portanto, as linhas Stokes de um espectro são normalmente usadas para análises, sendo a parte anti-Stokes do espectro descartada.^{1,75}

A Figura 8 ilustra esta comparação, tomando como exemplo um espectro obtido por espectroscopia de espalhamento Raman para o tetracloreto de carbono (CCl_4). Algumas bandas aparecem em frequências mais baixas e outras com frequências mais altas que a da radiação incidente. As diferenças entre as frequências e os deslocamentos de energia correspondem às frequências vibracionais do CCl_4 . Tanto acima quanto abaixo da frequência incidente observa-se os mesmos modos vibracionais, entretanto, a parte do espectro vibracional no lado de maior energia da linha de excitação é menos intenso (porque, uma vez em equilíbrio térmico, há menos moléculas nos estados de energia excitados – condição necessária para observação do espalhamento associado ao modo anti-Stokes).⁷⁶

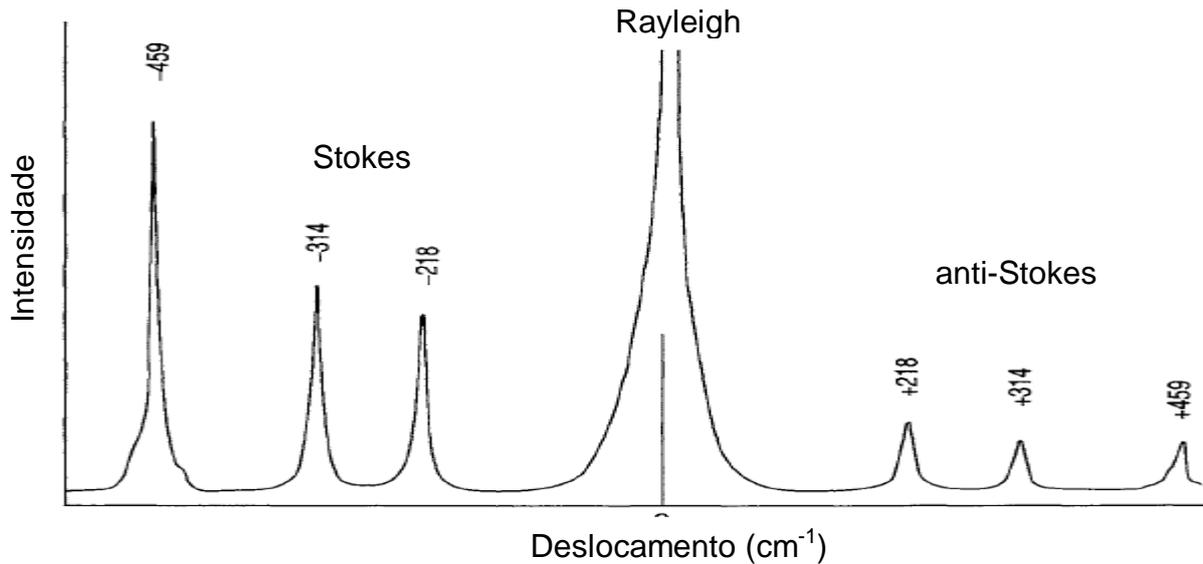


Figura 8. Espectro Raman do CCl₄. As linhas Stokes e as linhas anti-Stokes são imagens modificadas uma da outra, refletidas por meio da frequência de excitação. Uma linha anti-Stokes tem intensidade menor que a linha de Stokes correspondentes (Adaptado da referência 76).

A radiação espalhada produz uma oscilação no dipolo induzido da molécula. Este dipolo resulta em uma alteração da polarizabilidade da molécula, ou seja, na capacidade de deformação da nuvem eletrônica da molécula a partir de um campo eletromagnético. As ligações (ou interações) químicas que sofrem mudanças na sua polarizabilidade são tidas como regiões ativas no espectro Raman.⁷¹

O espectrômetro Raman é composto por laser como fonte de excitação do espalhamento Raman, um monocromador, suporte de amostras e um detector. O tipo de detector e a ótica utilizada no equipamento dependem do tipo de laser empregado. Os fatores que afetam a análise incluem elevada relação sinal-ruído, instabilidade do instrumento e resolução. Duas configurações são adotadas para a composição do equipamento, sendo o espectrômetro Raman dispersivo e com transformada de Fourier, denominado FT-Raman (FT, do inglês *Fourier transform*). A diferença entre eles consiste na fonte de laser e no caminho pelo qual a dispersão Raman é detectada e analisada.^{71,72}

As fontes de excitação que podem ser utilizadas na espectroscopia Raman englobam lasers na região do ultravioleta e do infravermelho próximo. Os lasers na região do ultravioleta e visível (UV-Visível) geram espalhamento Raman, porém, devido à baixa energia gerada para promoção da excitação eletrônica da molécula,

há a produção de fluorescência de fundo, sendo esta, uma das principais restrições da espectroscopia Raman.³⁸

Devido às restrições que esta técnica apresenta, foram desenvolvidos avanços tecnológicos na instrumentação, com destaque para o uso de lasers de diodo mais estáveis e detectores de dispositivo de carga acoplada (CCD, do inglês *Charge Coupled Device*) que são extremamente sensíveis à radiação. Outro avanço importante é referente ao acoplamento do espectrômetro Raman ao microscópio, que deu origem a espectroscopia Raman de imagem, combinando a técnica espectroscópica com a aquisição de imagens para fornecer informações detalhadas sobre a composição da amostra e a distribuição de seus constituintes.⁷²

3.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A espectroscopia no infravermelho (IR, do inglês *Infrared Spectroscopy*) está fundamentada no fenômeno de absorção de radiação eletromagnética. Esta região espectral é dividida em três partes, denominadas de infravermelho próximo (NIRS, do inglês *Near Infrared Spectroscopy*), médio (MIR, do inglês *Mid Infrared*) e distante (FIR, do inglês *Far Infrared*), sendo os limites aproximados para cada região apresentados na Tabela 2.³⁸

Tabela 2. Limites aproximados para cada região espectral do infravermelho.³⁸

Região	Intervalo de número de onda (ν) - (cm^{-1})	Região em comprimento de onda (λ) - (μm)
Próximo (NIR)	12800 a 4000	0,78 a 2,5
Médio (MIR)	4000 a 200	2,5 a 50
Distante (FIR)	200 a 10	50 a 1000

Para absorver radiação infravermelha, a molécula precisa sofrer uma variação no momento de dipolo como consequência do seu movimento vibracional ou rotacional. Isto ocorre devido a esta radiação não possuir energia suficiente para promover transições eletrônicas e a sua absorção ser restrita a moléculas com pequenas diferenças de energia entre vários estados vibracionais e rotacionais. Somente com a variação no momento de dipolo o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e gerar variações na amplitude de um de

seus movimentos. Moléculas homonucleares, como O₂, N₂, etc., serão inativas na espectroscopia de absorção no IR devido à ausência de momento de dipolo em suas ligações químicas. Em contrapartida, moléculas cujas ligações químicas são formadas por átomos de diferentes eletronegatividades, em que ocorre a formação de dipolos durante a vibração em virtude das distribuições heterogênea da carga ao longo das ligações químicas, absorverão a radiação.³⁸

As posições relativas dos átomos em uma molécula variam continuamente como consequência de inúmeros tipos de vibrações e rotações em torno das ligações da molécula. As vibrações podem ser de dois tipos: estiramentos e deformações angulares. Uma vibração de estiramento envolve uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. Os modos vibracionais de uma molécula podem ser classificados em deformação axial (ou de estiramento) – movimento rítmico da distância interatômica ao longo do eixo de ligação de forma simétrica ou assimétrica – e deformação angular (ou dobramento) – variação rítmica do ângulo entre duas ligações apresentada de maneira simétrica e assimétrica, em ambas as situações dentro e fora do plano.^{38,39,41,42,77}

Os modos vibracionais que são ativos no infravermelho ocorrem devido à existência de uma alteração rítmica no momento de dipolo durante o movimento, sendo este determinado pela diferença de carga e pela distância entre os centros de carga.^{1,38,42} Como resultado, o campo elétrico oscilante da radiação interage com o campo elétrico alternado produzido pela mudança de momento de dipolo da molécula e modifica a amplitude do movimento. Quando a frequência da radiação é igual à da vibração natural da molécula, ocorre absorção e variação na amplitude de vibração molecular.³⁸

A observação de espectros no infravermelho demonstra que cada tipo de ligação tem sua própria frequência de vibração. Dois tipos idênticos de ligações em dois diferentes compostos não possuem frequências vibracionais (ou espectros no infravermelho) exatamente idênticos. Portanto, o espectro no infravermelho pode ser equiparado como uma impressão digital para moléculas de mesma forma.³⁹

Considerando que as vibrações entre dois átomos ocorrem de maneira isolada em uma molécula, o modelo do oscilador harmônico pode ser utilizado para

representar a interação entre a radiação e a matéria na região do infravermelho. Neste modelo, as vibrações dos átomos nas ligações químicas são descritas de acordo com a lei de Hooke, ou seja, os movimentos dos átomos nas ligações químicas são associados ao movimento (harmônico) de dois corpos unidos por uma mola. Contudo, a solução final do modelo do oscilador harmônico aplicado a vibrações moleculares não deve considerar a descrição contínua da energia baseada na mecânica clássica, e sim energias de vibrações moleculares definidas em níveis quantizados, ou seja, o conceito do oscilador harmônico tem que ser transferido às equações de onda definidas pela mecânica quântica. O resultado são níveis de energia vibracionais das ligações químicas presentes em uma molécula, conforme a definição apresentada pela Equação 1.^{38,40}

$$E(v) = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu \quad \text{Equação 1}$$

em que $E(v)$ é a energia no número quântico vibracional, h é a constante de Planck e ν é a frequência de vibração dos átomos interligados.

A Figura 9 mostra o comportamento da energia vibracional em função da distância interatômica no oscilador anarmônico.⁴⁰ A energia envolvida na transição do nível 1 para o nível 2 ou do nível 2 para o 3 deveria ser idêntica à da transição de 0 para 1, e a teoria quântica indica que as únicas transições que poderiam ocorrer seriam aquelas em que o número quântico vibracional sofre alteração de uma unidade. Segundo a teoria quântica, portanto, somente transições fundamentais poderiam existir, sendo esta restrição denominada regra de seleção ($\Delta E_v = \pm 1$). Uma vez que os níveis vibracionais são igualmente espaçados, apenas um pico de absorção deveria ser observado para uma certa vibração molecular.^{38,40}

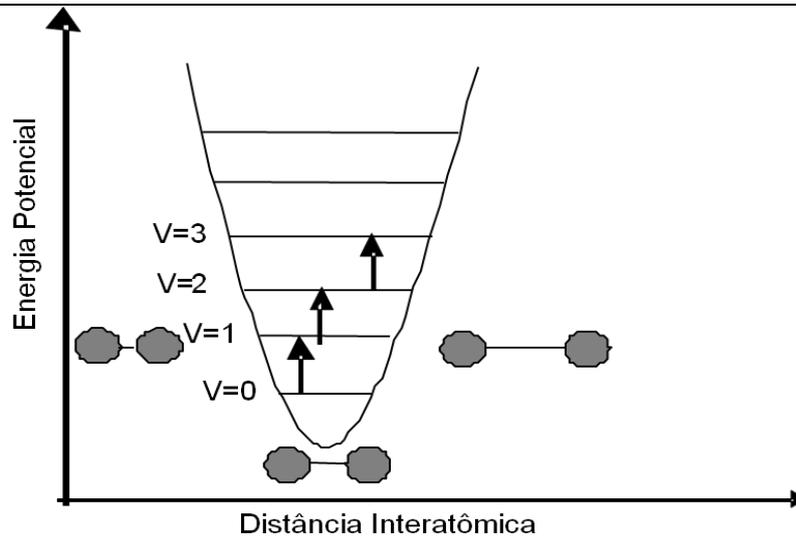


Figura 9. Diagrama de energia de vibração em função da distância interatômica para o oscilador harmônico em uma molécula diatômica (Adaptado das referências 38 e 40).

O oscilador harmônico representa o modelo teórico mais simples para o cálculo de frequências fundamentais de moléculas diatômicas. Contudo, esse modelo fornece apenas uma média, ou a frequência central de transições de estados vibracionais e rotacionais de ligações diatômicas. Em moléculas poliatômicas, os elétrons sofrem influência de grupos vizinhos, influenciando o estiramento, o comprimento e o ângulo de ligação e, portanto, a frequência das vibrações das ligações químicas. Na prática, o modelo do oscilador harmônico possui muitas limitações, o que resultou no desenvolvimento de um novo modelo, o oscilador anarmônico, representado na Figura 10.^{38,40}

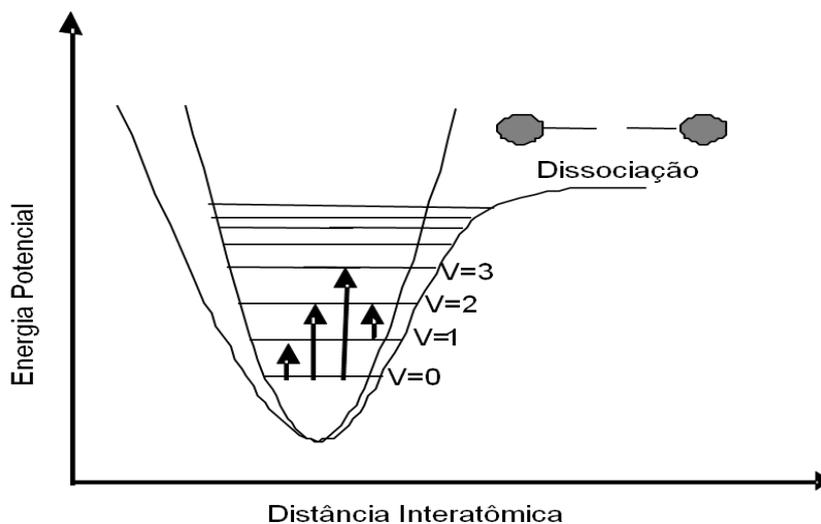


Figura 10. Diagrama de energia de vibração em função da distância interatômica para o oscilador anarmônico em uma molécula diatômica (Adaptado das referências 38 e 40)

A análise do diagrama da Figura 10 mostra que o oscilador anarmônico não considera o igual espaçamento das energias entre os níveis vibracionais, ocorrendo uma maior aproximação entre os níveis nos estados vibracionais excitados das moléculas. Com resultado, ocorrem transições do tipo sobretons (do inglês, *overtone*) com $\Delta E_v = \pm 2$ ou ± 3 .^{38,78}

Comparando o diagrama de energia para um oscilador harmônico e anarmônico de uma molécula diatômica (Figuras 9 e 10, respectivamente), em ambos os casos a energia potencial varia em função da distância entre as massas dos dois átomos ligados. A partir desta observação para os dois modelos, pode-se concluir que o modelo harmônico é imperfeito. Dois dos principais e mais simples efeitos que podem servir como exemplo das limitações do modelo harmônico são: a medida que dois átomos se aproximam, a repulsão coulombiana entre os dois núcleos produz uma força que age na mesma direção da força de restauração da ligação, assim, espera-se que a energia potencial aumente mais rapidamente do que o observado no modelo do oscilador harmônico. Na situação oposta, em que a distância entre os átomos aumenta, há um decréscimo na força de restauração, e, portanto, da energia potencial, sendo observado quando a distância interatômica se aproxima daquela em que ocorre a quebra da ligação.^{38,40}

As equações de onda da mecânica quântica, considerando o oscilador anarmônico, permitem a obtenção de curvas de energia potencial mais consistentes para a estimativa de frequências para as vibrações moleculares, porém, a grande complexidade matemática destas equações impede sua aplicação em rotina. Qualitativamente, as curvas possuem uma forma anarmônica, que se diferencia do comportamento harmônico em alguns aspectos, dependendo da natureza da ligação e dos átomos envolvidos. Porém, as curvas harmônicas e anarmônicas são semelhantes para energias potenciais pequenas e com isso o sucesso dos métodos de aproximação descritos é grande.^{38,39,42}

A região do infravermelho próximo situa-se entre a região do infravermelho médio e a região do visível, correspondente ao intervalo de número de onda de 4.000 cm^{-1} a 12.800 cm^{-1} .^{38,39} A maioria das bandas de absorção nessa região resultam de sobretons e combinações de vibrações fundamentais, que ocorrem com intensidade de transição cerca de 10 a 1000 vezes menor que as observadas para

transição fundamental no MIR. Devido a este fato, ocorrem baixas absorvidades molares e baixos limites de detecção. No entanto, a radiação NIR penetra na amostra com maior profundidade, o que acarreta a minimização de efeitos de impurezas e propicia uma análise mais representativa.^{38,79}

Na região do NIR, os sinais observados são essencialmente transições nas quais as diferenças de massa são mais pronunciadas, portanto, abrangendo principalmente ligações químicas contendo átomos de hidrogênio, com ligações do tipo X-H, em que X representa átomos de oxigênio, nitrogênio, carbono de grupos aromáticos e também grupos funcionais importantes como grupos carbonila, ligações carbono-oxigênio, carbono-nitrogênio, carbono-hidrogênio, entre outros que sofrem estiramento.^{38,40,79}

3.3 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

A fluorescência molecular é definida como a emissão de luz a partir do estado excitado de uma molécula. A excitação ocorre com a absorção de energia na forma de radiação eletromagnética, e no processo de relaxamento para o estado fundamental, é liberado o excesso de energia absorvida na forma de fótons, conforme exposto na Figura 11.^{38,41}

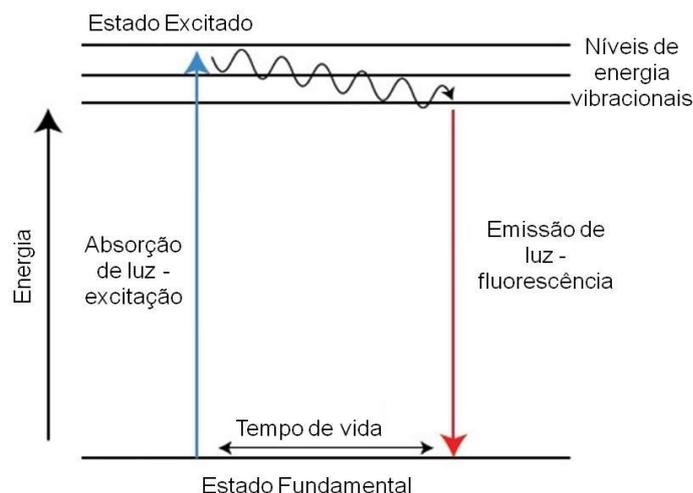


Figura 11. Diagrama de energia para fluorescência.

A fluorescência e a fosforescência se assemelham quanto à forma de excitação da molécula que é feita por absorção de fótons de uma fonte externa de

radiação. Porém, elas são diferentes pelo fato das transições eletrônicas responsáveis pela fluorescência não envolver mudança de spin eletrônico, mas apenas relaxamento vibracional até níveis eletrônicos menos energéticos sem desemparelhar os spins. O emparelhamento de spins caracteriza o estado singleto. Antes da emissão de fluorescência, ocorre a transição de um estado singleto excitado para outro estado singleto excitado menos energético. Como consequência, a emissão de fluorescência se manifesta em um período de tempo menor que 10^{-5} s, cessando, quase que instantaneamente, quando a fonte de excitação é desligada. Em contraste, na fosforescência ocorre uma mudança de spin, antes da emissão da radiação, com desemparelhando de elétrons. O sistema passa de um estado singleto excitado para um estado tripleto excitado (que é mais estável e menos energético). Isto faz com que a emissão de radiação se mantenha por um período de tempo maior, geralmente vários segundos, mesmo após o término da excitação.^{38,80}

Os métodos luminescentes apresentam vantagens quando comparados com outros métodos espectroscópicos de absorção, porque possuem elevada sensibilidade, possibilidade de trabalhar em altas faixas lineares de concentração e limites de detecção superiores aos encontrados na espectrometria de absorção.³⁸

3.4 ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM

A espectroscopia de imagem consiste na combinação da espectroscopia convencional e a tecnologia de imagem aplicada ao mapeamento de uma região definida. Nesta técnica, seleciona-se a área da amostra a ser analisada a qual é dividida em *pixels*. São então obtidos espectros a cada pixel, gerando um arranjo tridimensional (Figura 12) em que as variáveis x e y representam as coordenadas da área mapeada e uma terceira dimensão contém as variáveis espectrais (λ). O procedimento de medida, em muitos casos, permite obter informações da amostra sem qualquer tratamento, tais como moagem ou dissolução. As vantagens não estão apenas em economia de tempo e custos operacionais, mas no fato das propriedades físicas e químicas da amostra não serem modificadas.⁸¹

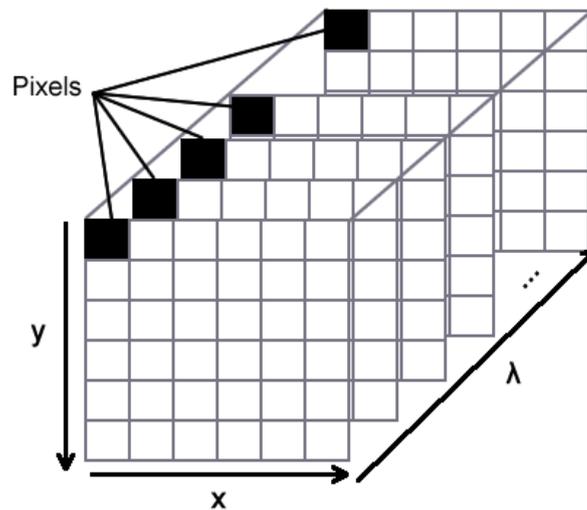


Figura 12. Arranjo tridimensional dos dados gerados em espectroscopia de imagem.

Uma imagem espectral pode ser formada por centenas de milhares de medidas, o que gera uma maior dificuldade no processamento e análise desses dados. Técnicas clássicas tendem a trabalhar com representações reduzidas da imagem, utilizando apenas uma medida por pixel, geralmente a intensidade acumulada, ou o sinal em um comprimento de onda específico. Estas técnicas, embora simples, não trazem as vantagens de se obter toda qualidade e quantidade das informações. Contudo, elas podem ser aplicadas quando um sinal seletivo do analito estiver disponível.^{21,82,83}

Para adquirir informações espaciais e espectrais simultaneamente, deve-se definir a posição espacial para a área a ser mapeada. Os detectores do tipo *focal plane array* (FPA) são compostos por milhares de elementos que formam uma matriz de pixels, o que possibilita obter milhares e espectros por pixel simultaneamente com tempos de aquisição em torno de minutos ou segundos e altas resoluções.^{84,85}

Devido ao elevado volume de dados gerados, as respostas espectrais se encontram correlacionadas, e em muitos casos contendo sinais sobrepostos, então, métodos de análise multivariada são geralmente necessários para a análise de imagens espectrais, sendo comumente aplicados para a identificação dos componentes da amostra e efetiva extração de informações sobre a sua distribuição espacial.^{21,81,83}

3.5 IMAGENS EM ESCALA RGB

Nas imagens digitais convencionais, as cores visíveis são obtidas através da combinação de três componentes de cor distintos, criando um sistema aditivo: um

componente utilizando intensidade da cor vermelha, um componente com a intensidade da cor verde e um componente com a intensidade da cor azul (RGB, do inglês *Red, Green, Blue*).^{21,86}

A imagem é definida como uma função bidimensional $f(x,y)$ na qual x e y são coordenadas planas, e a amplitude de f em qualquer par de coordenadas (x,y) é chamada de intensidade de cor. Elas podem ser classificadas quanto à sua forma de armazenar as informações através da representação numérica dos pixels. No caso de imagens em escala de cinza, existe uma só matriz denominada univariada, com coordenadas (i, j) e a intensidade de cinza que varia de zero (cor preta) a 255 (cor branca). Quanto maior a quantidade de pixels por polegada, maior será a sua resolução, pois cada pixel representa uma intensidade.⁸⁶⁻⁸⁸

Nas imagens RGB (Figura 13), cada pixel contém três valores, que são referentes às cores vermelho, verde e azul. Este tipo de imagem representa um arranjo de matriz do tipo $i \times j \times 3$. Imagens RGB possuem 8 bits para cada cor, com um total de 24 bits. Um byte então pode assumir 256 valores diferentes, variando de 0 a 255. Como resultado final tem-se 16 milhões possibilidades de cores diferentes ($256^3=16.777.216$).^{21,87}

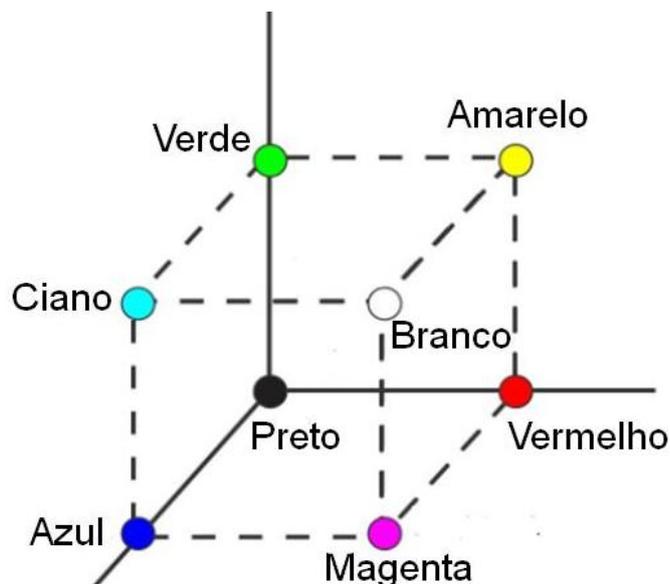


Figura 13. Representação do cubo de cores RGB.

Uma grande quantidade de informações podem estar contidas nas cores de uma imagem, e estas informações adicionais podem ser usadas para simplificar a análise da imagem. Três características são utilizadas para descrever as cores. O matiz, que é determinado pelo comprimento de onda dominante. A saturação, que corresponde à pureza da excitação e depende da quantidade de luz branca misturada com o matiz. Matiz e saturação em conjunto determinam a cromaticidade de uma determinada cor. A intensidade corresponde à luminosidade ou escurecimento relativo da cor, geralmente é medida como a porcentagem de brilho.^{87,88}

3.6 QUIMIOMETRIA

3.6.1 Definição

O termo quimiometria foi utilizado pela primeira vez em 1971 pelo químico Svante Wold.⁸⁹ Existem diversas denominações para a palavra “quimiometria”, dentre as quais pode-se definir como uma área da química que emprega ferramentas matemáticas e estatísticas aplicadas à química para planejar ou otimizar procedimentos experimentais, extrair o máximo de informações relevantes através da análise de dados e obter o conhecimento sobre os sistemas químicos.⁹⁰⁻⁹²

A quimiometria é uma área a ser explorada e em desenvolvimento, pois com a diversidade de instrumentos e técnicas instrumentais aplicados em química, especialmente na química analítica, tem-se a necessidade da utilização de ferramentas matemáticas capazes de interpretar os dados de maneira eficaz e efetiva.

Para estimar a concentração de uma ou mais espécies, a partir de uma série de medidas instrumentais, associando os valores à sua propriedade de interesse correspondente, é necessário construir um modelo de calibração, ou seja, determinar a relação entre propriedades e concentrações.⁹¹⁻⁹⁴

O modelo mais simples de calibração é obtido a partir da correlação entre uma medida, por exemplo, a quantidade de luz absorvida por uma amostra em um único comprimento de onda e sua concentração. Este tipo de calibração é

denominado univariado e os dados gerados são denominados dados de ordem zero. A calibração univariada é o método mais simples aplicado em química e sua desvantagem está em requerer a total seletividade do detector para o analito quando há a presença de interferentes.⁹³⁻⁹⁵

Diferentemente, a calibração multivariada busca estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas organizadas em um vetor, realizadas para cada amostra com uma determinada propriedade ou concentração de um analito. Medidas desta natureza são denominadas como dados de primeira ordem. Métodos cromatográficos e técnicas espectroscópicas são exemplos de instrumentos que realizam várias medidas para uma amostra em uma única leitura. A vantagem na utilização de dados multivariados de primeira ordem está na construção de modelos em que sinais não seletivos podem ser analisados e interferentes podem ser considerados com a utilização de ferramentas matemáticas.^{92,94,96}

Dentre os métodos de calibração multivariada mais utilizados, destaca-se os métodos de regressão linear, tais como regressão linear múltipla (MLR, do inglês *Multiple Linear Regression*), regressão por componentes principais (PCR, do inglês *Principal Components Regression*) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*).⁹²⁻⁹⁵

Quando é possível a aquisição de uma matriz de respostas instrumentais por amostra, emprega-se modelos de calibração multivariada de segunda ordem. Dentre os modelos de calibração de segunda ordem mais utilizados, destaca-se análise de fatores paralelos (PARAFAC, do inglês *Parallel Factor Analysis*)⁹⁷ e resolução multivariada de curvas (MCR, do inglês *Multivariate Curve Resolution*).^{98,99}

3.6.2 Análise de Componentes Principais

Para realizar a análise das respostas obtidas por várias medidas multivariadas em um conjunto de dados, é necessário organizar os dados em uma matriz (\mathbf{X}). A análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Components Analysis*) tem como objetivo principal combinar as variáveis originais da matriz (\mathbf{X}) e as variações presentes, reduzindo dimensionalidade e preservando as informações relevantes da matriz. A PCA permite a interpretação dos resultados devido à determinação das variáveis mais significantes a partir de combinações lineares das variáveis originais, as chamadas Componentes Principais (CP's).⁹⁴

A representação da matemática da PCA é dada pela Equação 2, em que a matriz \mathbf{X} é decomposta em duas matrizes menores.^{100,101}

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} \quad \text{Equação (2)}$$

Em que \mathbf{T} representa a matriz de escores, \mathbf{P}^t a matriz transposta de pesos (*loadings*) e \mathbf{E} a matriz do erro de decomposição.

A PCA reduz as variáveis da matriz \mathbf{X} a um número menor variáveis contendo as informações mais relevantes, que são os escores e pesos. Esses escores são ponderados pelos pesos, que representam a relevância de cada variável. A matriz \mathbf{E} contém resíduos de decomposição, que a princípio devem conter apenas ruído ou comportamento aleatório.¹⁰² A PCA permite a interpretação dos resultados devido à determinação das variáveis mais significantes a partir de combinações lineares das variáveis originais, as chamadas Componentes Principais (CP's). O objetivo da PCA é condensar o máximo possível da variância da matriz \mathbf{X} com o mínimo de CP's. A escolha do número de CP's é uma decisão crucial para a interpretação do modelo e deve levar em conta a quantidade de variância modelada e o conhecimento químico do sistema.^{100,101}

3.6.3 Regressão por mínimos quadrados parciais

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) consiste em um método de calibração multivariada aplicado a dados de primeira ordem com a construção de modelos de regressão. Outro modelo de regressão mais simples e menos aplicado é o de regressão por componentes

principais (PCR, do inglês *Principal Components Regression*). A PCR é baseado na resolução de equações lineares relacionadas à propriedade de interesse, com a finalidade de estimar os coeficientes de regressão, em que a decomposição do conjunto de dados da matriz \mathbf{X} em PCA é feita de forma independente da matriz ou vetor \mathbf{Y} que contém a (as) propriedade (es) de interesse. A propriedade de interesse pode definir a concentração de um ou mais analitos, propriedades físico-químicas, as quais são relacionadas com a composição da amostra. ^{103–105}

A diferença entre PCR e PLS consiste na maneira em que a matriz \mathbf{X} (resposta instrumental) é decomposta e a informação de \mathbf{Y} (propriedade de interesse) é incorporada. Em PCR apenas a matriz \mathbf{X} é decomposta e a regressão é feita baseando-se nos escores de \mathbf{X} e \mathbf{Y} . Por outro lado, em PLS \mathbf{X} e \mathbf{Y} são decompostos conjuntamente, o que modifica a componente principal a fim de maximizar a covariância de \mathbf{X} e \mathbf{Y} . Assim, as componentes principais no modelo PLS são denominadas como variáveis latentes (VL's). As VL's são posicionadas de forma a garantir uma menor dimensão em relação ao espaço original das variáveis e obter uma máxima covariância possível entre a matriz \mathbf{X} e a matriz \mathbf{Y} . ^{103–105}

O modelo PLS é construído a partir da matriz \mathbf{X} do tipo $i \times j$ ($\mathbf{X}_{i \times j}$), em que i linhas representam as amostras e as j colunas representam as variáveis instrumentais (absorbância, intensidade relativa, etc.). \mathbf{Y} é então uma matriz ou vetor (\mathbf{Y}) do tipo $i \times k$ que contém os valores de referência para cada propriedade de interesse (k), conforme representado pelas Equações 3 e 4. ^{103–106}

$$\mathbf{X}_{i \times j} = \mathbf{T}_h \mathbf{P}_h^t + \mathbf{E} \quad \text{Equação (3)}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}_h \mathbf{Q}_h^t + \mathbf{F} \quad \text{Equação (4)}$$

O h representa o número de variáveis latentes do modelo. A matriz \mathbf{P}_h^t e a matriz \mathbf{Q}_h^t são os pesos da matriz $\mathbf{X}_{i \times j}$ e da matriz \mathbf{Y} , respectivamente. A matriz \mathbf{T}_h representa todos os vetores escores. As matrizes \mathbf{E} e \mathbf{F} representam os erros, ou seja, ambas contem a variância não explicada pelo modelo PLS para as matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente.

Para a decomposição do modelo PLS é necessário a utilização de um algoritmo que estime cada parâmetro das Equações 3 e 4. O algoritmo por mínimos quadrados parciais iterativo não linear (NIPALS, do inglês *Non-linear Iterative Partial Least Squares*)^{104,107,108}, e o algoritmo denominado modificação estatisticamente inspirada do PLS (SIMPLS, do inglês *Statistically Inspired Modification of PLS*)¹⁰⁹ são os mais utilizados.

O modelo PLS tem a finalidade de explicar a variância em X e obter simultaneamente a maior correlação possível com Y . Assim, este modelo leva a duas diferenciações, o PLS 1 permite que o vetor y seja modelado individualmente, sendo que para cada propriedade de interesse é calculado um conjunto separado de pesos e VL. No PLS 2 é calculado um único conjunto de pesos e VL para a matriz que contém as propriedades de interesse (Y), as quais são modeladas simultaneamente.^{94,105,107}

3.6.3.1 Pré-processamentos

Antes da construção dos modelos quimiométricos, é necessário realizar a etapa de pré-processamento dos dados. Tal processo visa eliminar informações indesejáveis que não estão relacionadas com as propriedades de interesse da amostra, tais como, remoção de ruído e flutuações de linhas de base. Estas informações podem prejudicar a interpretação e a construção do modelo.^{101,107} Existem muitos pré-processamentos que podem ser empregados, principalmente para dados espectroscópicos, como a primeira e segunda derivada, correção de sinais de espalhamento multiplicativo (MSC, do inglês *Multiplicative Scatter Correction*), e outros que são utilizados de maneira geral, como centrar na média e autoescalamento. Uma breve descrição dos principais pré-processamentos é feita a seguir:^{107,110-112}

➤ Primeira ou segunda derivada em dados espectrais é um procedimento que pode destacar ombros espectrais, bem como minimizar o efeito de inclinações provocadas na linha de base dos espectros, devido à morfologia das partículas. Ao aplicar as operações de derivação aos espectros, as informações contidas ao longo dos diferentes comprimentos de onda são geralmente acentuadas, diminuindo a relação sinal/ruído, portanto, deve-se ter cuidado com a qualidade dos espectros aos

quais se deseja aplicar o cálculo das derivadas. Pode ser realizado o alisamento posterior dos dados a fim de minimizar a amplificação do ruído como etapa anterior à derivação, sendo o algoritmo Savitzky-Golay o mais utilizado para esta finalidade.

➤ Correção de sinais de espalhamento multiplicativo (MSC, do inglês *Multiplicative Scatter Correction*): o objetivo do MSC em dados espectroscópicos é a minimização da interferência relativa ao espalhamento de luz e correção de linha de base dos espectros. Para efeito de cálculo, obtém-se o espectro médio do conjunto de dados para o qual se deseja realizar a correção da linha base. Em seguida, utiliza-se uma regressão linear dos dados originais para calcular os coeficientes angular e linear do gráfico entre o espectro ideal e o espectro que vai ser corrigido. O espectro corrigido é calculado subtraindo cada ponto do espectro pelo valor do coeficiente linear e dividindo este valor pelo coeficiente angular.

➤ Centrar na média: para centrar os dados na média, primeiro é necessário calcular os valores médios das colunas da matriz \mathbf{X} que contém todas as amostras em suas linhas. Esse valor médio encontrado é subtraído de cada amostra em cada variável correspondente. O resultado deste pré-processamento traz apenas uma transposição dos eixos deslocando a origem para o do valor médio, mantendo a estrutura dos dados obtidos.

➤ Autoescalamento: este pré-processamento consiste em subtrair cada valor das colunas matriz \mathbf{X} que contém todas as amostras em suas linhas do valor médio dos sinais das amostras e, posteriormente, dividir o resultado pelo desvio padrão de cada coluna.

3.6.3.2 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares for Discriminant Analysis*) é um método de classificação supervisionado, cujo objetivo é construir um modelo de classificação no qual as amostras são divididas em grupos e tem como pré-requisito a necessidade do conhecimento prévio das classes do conjunto das amostras a serem analisadas.^{104,113} A construção do modelo PLS1-DA é representado pela Figura 14.

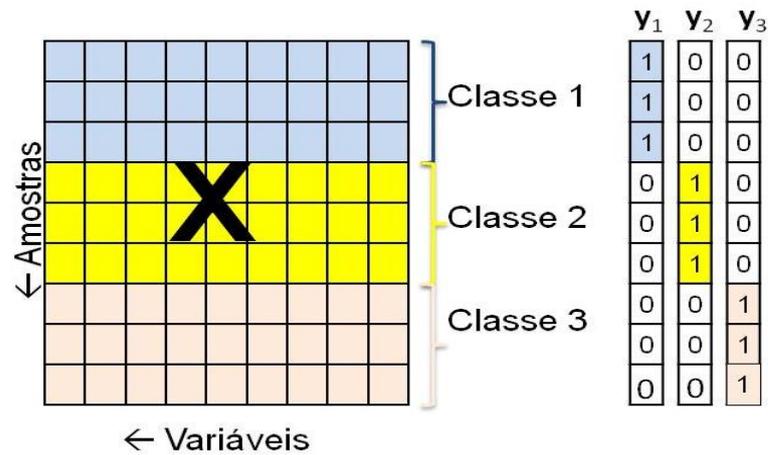


Figura 14. Desenho esquemático do modelo PLS1-DA.¹¹⁴

Para construção do modelo PLS-DA realiza-se uma calibração qualitativa, na qual a propriedade de interesse a ser determinada consiste nas amostras pertencerem ou não a uma determinada classe. Ao vetor \mathbf{y} são atribuídos os valores das classes, sendo o valor 1 referente às amostras que serão discriminadas e o valor 0 é atribuído para as outras classes.^{107,113} Assim, o modelo é construído para cada classe. Conforme representado na Figura 14, devem ser construídos três modelos: o modelo 1 (constituído apenas com \mathbf{X} e y_1) que diferencia a Classe 1 das Classes 2 e 3, o modelo 2 que diferencia a Classe 2 das Classes 1 e 3 e por fim, o modelo 3 que diferencia a Classe 3 das Classes 1 e 2.

Um limite de decisão (*threshold*) deve ser definido, podendo ser fixado de forma casual (como o valor de 0,5, por exemplo) ou calculado conforme a teoria bayesiana. Valores de \mathbf{Y} acima deste limite indicam que a amostra pertence à respectiva classe, enquanto valores abaixo dele indicam que a amostra não pertence à classe, sendo que, para cada classe, é definido um vetor \mathbf{y} .^{115,116}

3.6.3.2.1 Validação cruzada e determinação do número de variáveis latentes

Para estabelecer um modelo PLS é necessário a escolha do número de variáveis latentes (VL's) a partir das amostras de calibração (também denominado como conjunto de treinamento). O número de VL's é determinado através da validação cruzada (CV, do inglês Cross-Validation),^{104,107} que é baseada na avaliação da magnitude dos erros de previsão, utilizando as amostras de calibração sem que elas tenham sido utilizadas na construção do modelo.⁹⁴

Para a realização da CV, deve-se retirar amostras do conjunto de calibração, de tal forma que elas sejam utilizadas para a etapa de avaliação do modelo e as restantes são utilizadas para a construção do modelo, realizando assim, uma rotatividade de todas as amostras, que devem ser usadas nas duas etapas. Os métodos geralmente utilizados para realização da CV são por blocos contínuos (do inglês *contiguous block*), deixar uma amostra de fora (do inglês *leave one out*), subconjuntos aleatórios (do inglês, *random subsets*) e venezianas (do inglês, *venetian blinds*). Para este trabalho, a CV utilizada foi do tipo *leave one out*, em que se retira apenas uma amostra por vez. Esse novo modelo criado é utilizado para prever as propriedades de interesse das amostras removidas, sendo calculado o erro de previsão, que consiste da subtração do valor da propriedade de interesse conhecida pela estimada, utilizando-se diferentes números de VL. Em seguida, é realizado um rodízio das amostras que são retiradas e, após o rodízio completo, com todos os erros de previsão calculados obtém-se uma estimativa da raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV, do inglês *Root Mean Squared Error of Cross-Validation*) para cada variável latente. A Equação 5 expressa a fórmula do RMSECV.^{101,102,104,107}

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \quad \text{Equação (5)}$$

Em que N= número total de amostras de calibração utilizadas, y_i e \hat{y}_i (i -ésima amostra) são os valores de referência e valores estimados das propriedades de interesse, respectivamente.

A escolha do número de VL's para o modelo é realizada a partir da visualização do menor valor de RMSECV ou ainda, quando não ocorrem mudanças significativas no valor de RMSECV.

Outra maneira de visualizar a eficiência do modelo consiste na determinação do erro médio quadrático de calibração (RMSEC, do inglês *Root Mean Squared Error of Calibration*), demonstrado na Equação 6.^{102,107}

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{v}} \quad \text{Equação (6)}$$

Em que o y_i e \hat{y}_i (i -ésima amostra) são os valores de referência e o valor estimado, respectivamente, N = número de amostras de calibração contidas no modelo e ν = número de graus de liberdade.

A verificação do sobreajuste do modelo ocorre quando os valores de RMSECV e RMSEC possuem grandes diferenças entre si, informando que o modelo funciona adequadamente para a previsão de amostras de calibração, o que não ocorre para outras amostras. Concluí-se que as amostras selecionadas para desenvolver o modelo não são suficientemente representativas, o que demonstra um sobreajuste do sistema em estudo, logo, o modelo construído é ineficiente para outras aplicações.

3.6.3.2 Detecção de amostras anômalas

As amostras anômalas, também denominadas pelo seu termo em inglês, *outliers*, são amostras que apresentam um comportamento diferente das demais amostras que compõem o conjunto de dados. Esse comportamento pode ser representado por amostras não representativas ou por algum erro de medida.^{90,107}

Os *outliers* podem estar presentes nos conjuntos de calibração e validação (também denominados como conjunto de treinamento e conjunto teste, respectivamente). No conjunto de treinamento, a presença de *outliers* podem gerar modelos com baixa capacidade de previsão, ou seja, com altos valores de erro, o que prejudica o desenvolvimento do modelo. Por outro lado, a presença de *outliers* no conjunto teste pode influenciar os resultados, indicando que o modelo não é adequado ou possui capacidade inferior à que poderia ser apresentada na ausência destas amostras.^{90,107}

Os diversos métodos sugeridos para identificação de *outliers*,^{107,117-120} de uma forma geral, envolvem a observação dos dados com alta influência (do inglês *leverage*) e resíduos não modelados na matriz \mathbf{X} e no vetor \mathbf{y} , com a utilização de um nível pré-estabelecido de intervalo de confiança

.3.6.4 Figuras de mérito

As figuras de mérito podem ser definidas como parâmetros que caracterizam a eficiência do método analítico e que são aplicadas na etapa de validação analítica. A validação analítica visa assegurar que os resultados obtidos tenham a eficiência requerida nas condições experimentais em que o método será utilizado.^{118,119} As especificações de como essas figuras de mérito devem ser estimadas e os níveis aceitáveis em cada uma dependem da propriedade de interesse determinada ou da área de aplicação, sendo normalmente descritas e regidas por órgãos de fiscalização e controle.¹²¹

As figuras de mérito para modelos de regressão e discriminação são calculadas na etapa de validação externa, que utiliza um conjunto de amostras diferente do utilizado na etapa de calibração. A partir dos resultados obtidos na etapa de validação externa, são calculados os parâmetros que demonstram a eficiência do método proposto. A Tabela 3 traz a descrição dos termos das figuras de mérito.^{115,122-124}

Tabela 3. Descrição dos termos utilizados para cálculo das figuras de mérito.^{115,124}

Fator	Abreviação	Descrição
Falso Positivo	FP	Amostras pertencentes às demais classes (valor de classe 0) classificadas como amostras da classe 1
Falso Negativo	FN	Amostras da classe 1 classificadas como pertencentes à classe 0
Verdadeiro Positivo	VP	Amostras da classe 1 classificadas corretamente como 1
Verdadeiro Negativo	VN	Amostras da classe 0 classificadas corretamente como 0

i. Taxa de falso positivo

A taxa de falso positivo (TFP) é definida como a percentagem baseada na razão entre o número de erros falso positivo (FP) e a soma entre os erros falso

positivo e verdadeiro negativo (VN), sendo descrita pela Equação 7:^{115,124}

$$TFP = \frac{FP}{FP+VN} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

ii. Taxa de falso negativo

A taxa de falso negativo (TFN) é definida pela razão entre o número de erros falso negativo e a soma entre os erros falso negativo e verdadeiro positivo (Equação 8):^{115,124}

$$TFN = \frac{FN}{FN+VP} \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

iii. Taxa de eficiência

A taxa de eficiência (TEF) é definida pela Equação 9:^{115,124}

$$TFE = 100 - (TFP + TVN) \quad \text{Equação (9)}$$

iv. Taxa de especificidade

A taxa de especificidade ou seletividade (TSP) é definida pela razão entre o número de verdadeiros negativo e a soma entre o número de verdadeiro negativo e os erros falso positivo (Equação 10):^{115,124}

$$TSP = \frac{VN}{VN+FP} \times 100 \quad \text{Equação (10)}$$

v. Taxa de sensibilidade

A taxa de sensibilidade (TST) é definida pela razão entre o número de verdadeiros positivo e a soma dos erros falso negativo e verdadeiro positivo, de acordo com a Equação 11:^{115,124}

$$TST = \frac{VP}{FN+VP} \times 100 \quad \text{Equação (11)}$$

vi. Erro médio de estimativa

Expressa o grau de concordância entre o valor estimado ou medido e o valor tido como verdadeiro ou de referência. Em calibração multivariada, o erro médio pode ser estimado através da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão

(RMSEP, do inglês *Root Mean Squares Error of Prediction*), conforme demonstrado na Equação 12.^{118,119}

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_p} (y_i - \hat{y}_i)^2}{N_p}} \quad \text{Equação (12)}$$

Em que $y_i - \hat{y}_i$ (i -ésima amostra) são os valores de referência e valores estimados das propriedades de interesse, respectivamente, do conjunto de validação e $N_p =$ número de amostras do conjunto de validação.

3.6.5 Resolução multivariada de curvas

O método de resolução multivariada de curvas (MCR, do inglês *Multivariate Curve Resolution*) foi desenvolvido pelo Professor Romá Tauler em 1993,¹²⁵ sendo definido como um método de processamento de sinais capaz de recuperar informações quando aplicado em um conjunto de dados contendo mistura de sinais. De forma genérica, este método busca decompor uma matriz **D** referente à uma resposta instrumental, em um produto de duas outras matrizes, **C** e **S^T**, que contêm informações relacionadas à intensidade ou concentração relativa e sobre o espectro puro de cada componente/constituente, respectivamente. Essa decomposição pode ser representada matematicamente pela Equação 13, em que cada elemento da matriz **D** corresponde ao produto interno entre o vetor linha da matriz **C** e um vetor coluna **S^T**; **E** é a matriz de resíduos que contém a parte não modelada.^{99,126,127}

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad \text{Equação (13)}$$

O objetivo do método é a decomposição da matriz de dados **D** em perfis puros associados à variação de cada contribuinte representados pelas matrizes **C** e **S^T**, respectivamente. Em outras palavras, com a aplicação do MCR é possível estimar os valores de concentração relativa e os espectros puros dos componentes de interesse em uma amostra.^{99,126,127}

3.6.5.1 Resolução Multivariada de Curvas por Mínimos Quadrados Alternantes

Para a resolução do MCR, emprega-se um processo iterativo utilizando o algoritmo de mínimos quadrados alternantes (ALS, do inglês *Alternating Least-*

Squares). O método MCR-ALS busca encontrar de forma interativa os perfis de concentrações individuais das espécies que melhor explicam a variância dos dados observados, com o mínimo de erro possível. Esta recuperação é baseada na ideia de que a matriz de dados é bilinear, ou seja, que ela pode ser decomposta no produto de duas matrizes.^{99,126,128}

Para que o método MCR-ALS possa ser aplicado, os dados devem possuir uma relação linear com a concentração. Outra condição que deve ser atendida é a análise de posto (do inglês, *rank*) da matriz. O posto da matriz de dados do analito puro e das misturas devem ser calculados e comparados, assim como da matriz de dados com todas as amostras. O posto da matriz total de espectros deve ser igual ao número de espécies analisadas nas misturas. Este é o número correspondente ao número de linhas e colunas linearmente independentes, ou seja, o número de vetores que não podem ser escritos como uma combinação linear dos outros.^{98,129–}

¹³¹ O número de componentes presentes na matriz podem ser determinados com a estimativa do posto, que é realizada por meio da porcentagem de variância explicada por decomposição em valores singulares (SVD, do inglês *Singular Values Decomposition*)^{128,132} ou PCA^{128,133}. Também é possível ter conhecimento prévio dos componentes presentes na amostra e caso exista esta alternativa, o número de componentes podem ser definidos de acordo com a composição.

O algoritmo ALS calcula as concentrações das matrizes puras \mathbf{C} e \mathbf{S}^T a partir das estimativas iniciais que devem ser fornecidas ao modelo. Quando esta informação não está disponível, pode ser aplicado o método de seleção de variáveis puras, utilizando os métodos de Análise de Fatores Evolucionários (EFA, do inglês *Evolving Factor Analysis*)^{134,135} e métodos baseados na aproximação da variável pura (do inglês, *pure*)^{128,136,137}. As estimativas iniciais obtidas pelo *pure* selecionam as colunas com as variáveis mais puras de acordo com o número de fatores que podem existir na amostra, e este método tem como base o método SIMPLISMA (do inglês, *SIMPLe-to-use InteractiveS Mixture Analysis*),^{138,139}. Este método assume que cada componente de uma mistura tem uma variável com intensidade finita para dado componente e intensidade zero para os demais. O SIMPLISMA utiliza a variância e critérios de similaridade para encontrar as variáveis puras, e faz uma relação máxima entre o desvio padrão e a média.^{137–139}

O algoritmo ALS inicia a otimização do modelo a partir das Equações 14 ou 15, que dependem das estimativas iniciais obtidas para a concentração (C_{init}) e dos perfis espectrais (S_{init}^T) obtidos a partir da escolha do número de componentes.^{98,99,128,130,140}

$$S^T = C_{init}^+ D \quad \text{Equação (14)}$$

$$C = D(S_{init}^T)^+ \quad \text{Equação (15)}$$

O sinal "+" indica a operação de pseudoinversa. O procedimento de otimização repete os dois passos descritos nas Equações 14 e 15, nos quais as estimativas iniciais são substituídas pelos valores estimados na interação anterior do ALS, até que o critério de convergência de minimização da matriz de resíduos (E) seja alcançado ou até o algoritmo atingir o número máximo de interações.^{98,99,128,130,140}

A solução fornecida pelo modelo MCR-ALS deve ser avaliada com critério, a partir da comparação com os espectros puros iniciais e os espectros recuperados, pois tal modelo fornece diferentes soluções a partir de diferentes combinações entre as matrizes C e S , e estas podem não fornecer o resultado esperado referente ao sentido químico. Para dados espectrais, por exemplo, bandas de absorção podem ser omitidas ou estarem presentes em determinadas regiões de uma varredura espectral que não deveriam apresentar tal sinal. Esta situação caracteriza uma falha de convergência do modelo, denominada como ambiguidade rotacional, sendo estas características uma desvantagem do MCR-ALS.^{99,128,130,141}

Todavia, para minimização dos efeitos de ambiguidade rotacional, podem ser impostas ao MCR restrições matemáticas que tendem a diminuir o número de interações e corrigir os erros existentes. As principais restrições utilizadas são ilustradas nas Figuras 15 (a), (b) e (c), respectivamente, e descritas a seguir.^{99,126,128,130,141}

- i) não negatividade da concentração e dos espectros: esta restrição impõe que os valores de concentração (C) e o sinal analítico (S) (espectros, cromatogramas, etc.) tenham apenas valores positivos,
- ii) balanço de massa (do inglês, *closure*): requer que o somatório das concentrações relativas de uma amostra durante o processo de otimização do

modelo seja constante, ou seja, a soma de todas as concentrações prevista será igual a, por exemplo, 100 %.

- iii) unimodalidade: esta restrição é aplicada para que o sinal analítico (cromatograma, sinal voltamétrico, perfis espectrais) apresente um único ponto máximo por perfil.

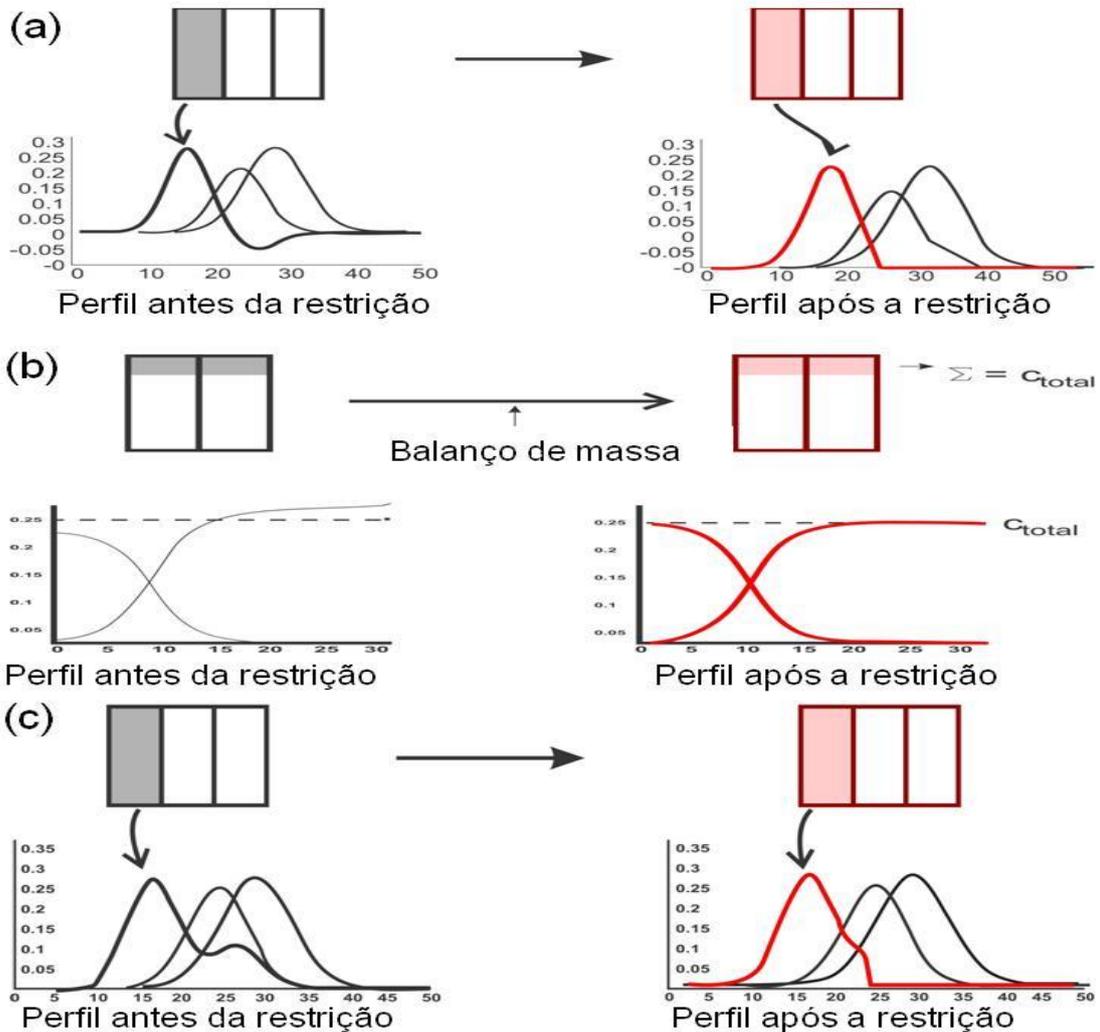


Figura 15. Restrições utilizadas no MCR-ALS (a) não negatividade, (b) balanço de massa e (c) unimodalidade.¹²⁶

A Figura 16 ilustra o MCR-ALS aplicado à decomposição de uma matriz de dados usando MCR-ALS em espectroscopia de imagem. A matriz **S** corresponde aos espectros puros obtidos, a matriz de concentração (**C**) é então desdobrada para recuperar as informações contidas nos pixels. Por fim, são construídos mapas de distribuição de cada componente a partir da matriz de concentração das estimativas iniciais fornecidas ao modelo.

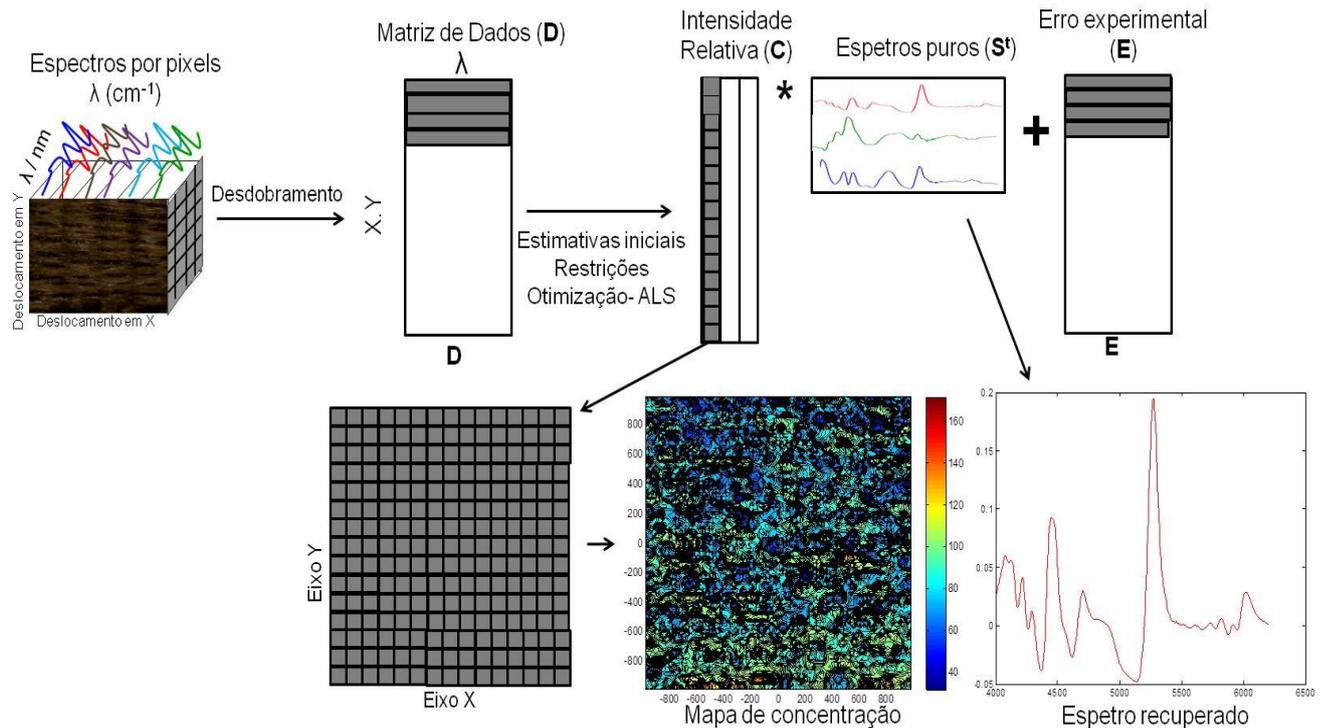


Figura 16. Representação esquemática da aplicação do MCR-ALS aos dados de espectroscopia de imagem.

O MCR pode ser aplicado tanto na análise de mais de uma matriz de dados simultaneamente, quanto de uma única matriz. Quando o MCR é aplicado na decomposição de mais de uma matriz, estas são organizadas de forma adjunta, uma abaixo da outra (no sentido das colunas) ou uma ao lado da outra (no sentido das linhas) dependendo das estimativas iniciais serem os perfis espectrais ou de concentração. Tal procedimento gera uma matriz aumentada, que pode ser aplicado para aquisição de dados em espectroscopia de imagem. ^{21,126}

CAPÍTULO 4

Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

4. ANÁLISE EXPLORATÓRIA DA DISTRIBUIÇÃO DE HOLOCELULOSE E LIGNINA TOTAL EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MADEIRA POR IMAGEM HIPERESPECTRAL E ESPECTROSCOPIA RAMAN

Técnicas analíticas como cromatografia líquida de alta eficiência, gravimetria, extração com solvente, são utilizadas para a determinação de açúcares, lignina insolúvel e solúvel e extrativos, respectivamente. As técnicas analíticas clássicas para a determinação da composição química da madeira têm a característica de demandar longos tempos para a execução, consumir um volume grande de reagentes químicos gerando resíduos e requer a destruição da amostra.^{4,142,143} Além disso, é importante destacar que estas técnicas são incapazes de apresentar informações sobre a composição química da madeira a nível microscópico ou realizar mapeamento em regiões de pequena dimensão.

O emprego de imagem hiperespectral por espectroscopia Raman (HIS-Raman, do inglês *Hyperspectral Image by Raman*) tem se mostrado uma ferramenta eficiente para o estudo da distribuição de celulose e lignina em tecidos de plantas.^{4,9–11,37,143–146} Tal técnica oferece a vantagem de possuir boa seletividade química e fornece informações sobre estrutura molecular e composição da espécie estudada.

Nesse sentido, a aplicação desta tese consistiu na utilização da HIS-Raman e a ferramenta químimétrica MCR-ALS para a realização de um estudo exploratório para determinar a distribuição e caracterização química de holocelulose e lignina total em quatro diferentes espécies de madeira. Para a execução desta etapa experimental, foi necessária a realização da caracterização química destas espécies.

As três espécies florestais escolhidas para a realização deste trabalho foram do gênero *Eucalyptus*, sendo: *E. grandis*, *E. urophylla* e um híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis*.

A motivação da escolha de três espécies diferentes de eucalipto para este estudo foi baseada na sua grande aplicação no setor de papel e celulose, construção civil, diversidade das características e usos que o gênero *Eucalyptus*

apresenta. Além disso, observa-se que esse gênero possui a vantagem de se adaptar facilmente às mais diferentes condições de clima e solo. O eucalipto se faz presente como matéria prima na indústria de papel e celulose e ainda constitui-se como uma importante fonte renovável de geração de energia.

A quarta espécie estudada foi do gênero *Swietenia*, especificadamente a espécie *Swietenia macrophylla* King (mogno), que é uma das madeiras mais valiosas do mundo, apresentando cor, brilho, durabilidade, tratabilidade, resistência física e beleza, de grande interesse principalmente na indústria moveleira.^{15,24,147} Sua ampla exploração levou à considerável redução das populações existentes e fez com que ela fosse considerada como espécie ameaçada de extinção, sendo adicionada ao Apêndice II da CITES em 2003.^{57,148}

4.1 EXPERIMENTAL

4.1.1 Determinação do teor de extrativos, lignina e holocelulose pelos métodos de referência

As espécies florestais estudadas neste trabalho foram obtidas na Xiloteca do Laboratório de Produtos Florestais do Serviço Florestal Brasileiro (LPF/SFB) e as análises de extrativos, lignina e holocelulose foram realizadas no laboratório da Área de Química, Adesivos e Borracha Natural.

4.1.1.1 Teor de extrativos

A metodologia empregada para análise de extrativos seguiu as etapas descritas na norma técnica internacional da associação da indústria de papel e celulose (TAPPI, do inglês *Technical Association of the Pulp and Paper Industry* T204, “*Solvent extractives of wood and pulp*”).¹⁴⁹

Primeiramente, balões de extração foram submetidos à secagem em estufa à temperatura de 115 °C por duas horas e os mesmos foram levados ao dessecador até atingirem temperatura ambiente. Após esta etapa, os balões foram pesados e anotados as massas. As amostras de madeira estudadas foram previamente moídas, peneiradas e secas em estufa a 105 °C até peso constante. Após este

procedimento, pesou-se em balança analítica com precisão de 0,1 mg três amostras autênticas com massa aproximada 2,0 g de cada espécie, e cada uma foi acondicionada em casulos de celulose. Cada casulo contendo suas respectivas massas foram inseridos nas colunas de extração de Soxhlet, separadamente.¹⁴⁹

Os balões de extração foram preenchidos com aproximadamente 210 mL de solução etanol:tolueno (1:2) e logo em seguida foram encaixados em extratores Soxhlet e colocados sobre as placas aquecedoras. Cada extração ocorreu por um período de aproximadamente quatorze horas. Após a extração, os balões foram retirados das colunas e os extratos contidos nestes balões foram submetidos ao processo de secagem por duas horas em estufa a 115 °C. Por fim, os balões foram retirados da estufa, submetidos à estabilização da temperatura em dessecador e pesados em balança analítica com precisão de quatro casas decimais. A determinação do teor de extrativos nas espécies do presente estudo foi realizada em triplicata.

O cálculo do teor de extrativos foi realizado utilizando-se Equação 16.

$$\text{Ex}(\%) = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad \text{Equação 16}$$

Em que,

Ex = teor de extrativos em percentual (%);

m = massa da amostra descontada a umidade (g);

m₁ = massa do balão de extração (g);

m₂ = massa do balão de extração + extratos após secagem a 115°C em estufa por 2 horas (g).

4.1.1.2 Teor de lignina insolúvel, solúvel e total

4.1.1.2.1 Teor de lignina insolúvel

Para determinação do teor de lignina insolúvel foi utilizado a metodologia descrita por Templeton & Ehrman¹⁵⁰ em que o pó das amostras das espécies estudadas foram inicialmente submetidas à limpeza com etanol e, posteriormente, com água quente, além de limpeza inicial com etanol:tolueno. Em seguida, pesou-se

0,3000 g diretamente em tubos de ensaio em triplicata para cada espécie. Adicionou-se 3 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) na concentração de 72 % em cada tubo, misturando-os com o auxílio de um bastão de vidro até homogeneização. Os tubos de ensaio foram levados ao banho-maria a uma temperatura de 30 °C durante 2 horas, repetindo-se a homogeneização das amostras com o auxílio de um bastão de vidro a cada 15 minutos. Decorridas as 2 horas em banho-maria, transferiu-se o conteúdo de cada tubo de ensaio para frascos de vidro individualmente e devidamente identificados. Adicionou-se 84 mL de água deionizada em cada frasco e estes foram tampados com rolhas de borracha e lacrados com anel de alumínio. Em seguida, os frascos foram submetidos a etapa de autoclavagem à temperatura de 121 °C por 1 h. Depois de decorrido o ciclo de autoclavagem, os frascos foram resfriados à temperatura ambiente.

Após o resfriamento, os conteúdos de cada frasco de vidro foram devidamente filtrados a vácuo em cadinhos filtrantes previamente secos e pesados. Ressalta-se que as parcelas líquidas das amostras foram transferidas para kitassatos distintos, para posterior análise da lignina solúvel. A parcela de lignina insolúvel foi lavada do frasco, visando transferir para cadinhos filtrantes (devidamente identificados) qualquer lignina sólida do frasco. Cada cadinho filtrante contendo a lignina insolúvel foi submetido ao processo de secagem em estufa a 105 °C, até a estabilização da massa.

O cálculo do teor de lignina insolúvel foi realizado utilizando-se a Equação 17.

$$L_{ins}(\%) = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad \text{Equação 17}$$

Em que,

L_{ins} = teor de lignina insolúvel em percentual (%);

m = massa da amostra descontada a umidade (g);

m_1 = massa do cadinho filtrante (g);

m_2 = massa do cadinho filtrante + lignina insolúvel livre de extrativos (g).

4.1.1.2.2 Teor de lignina solúvel

O teor de lignina solúvel foi determinado conforme metodologia descrita por Templeton & Ehrman¹⁵¹ a partir do filtrado obtido de cada replicata na análise de

lignina insolúvel. Inicialmente, foi preparado um branco, medindo-se 1 mL de H₂SO₄ na concentração de 4 % diluído com água deionizada em balão volumétrico de 10 mL. O filtrado obtido de cada replicata na análise de lignina insolúvel foi separado em kitassatos distintos, e deste filtrado foi retirado uma alíquota de 0,50 mL com diluição em água destilada em balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se um fator de diluição de 20 vezes. O procedimento de diluição resultou em três repetições de cada amostra das espécies estudadas.

Foi utilizado o espectrofotômetro com detecção no comprimento de onda de 205 nm e cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Inicialmente realizou-se a leitura do branco e procedeu-se com a leitura de cada amostra já devidamente diluída e anotou-se os valores de absorbâncias obtidos para posterior cálculo da lignina solúvel.

A Equação 18 representa o cálculo utilizado para obtenção do valor de lignina solúvel:

$$L_{\text{sol}}(\%) = \frac{A}{110} \times F \times \frac{87}{1000} \times 100 \quad \text{Equação 18}$$

Onde,

L_{sol} = teor de lignina solúvel em percentual (%);

m = massa da amostra descontada a umidade (g);

A = absorbância lida pelo espectrofotômetro;

F = fator de diluição.

4.1.1.2.3 Teor de lignina total

Por fim, o teor de lignina total foi obtido através do somatório entre a lignina insolúvel (L_{ins}) e a solúvel (L_{sol}), sendo calculado através da Equação 19.

$$\text{Lignina}_{\text{total}} = L_{\text{ins}} + L_{\text{sol}} \quad \text{Equação 19}$$

4.1.1.3 Teor de holocelulose

A análise de açúcares de cadeia linear de glicose e dos polissacarídeos xilose, galactose, arabinose e manose é feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de índice de refração (IR) de acordo com os

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

procedimentos descritos por Kaar et al.¹⁵² e Raymond & Ehrman.¹⁵³ A Tabela 4 mostra as condições cromatográficas.¹⁵²⁻¹⁵⁴

Tabela 4. Condições cromatográficas para determinação da glicose, xilose, arabinose, galactose e manose.

Coluna	Marca	Bio-Rad Aminex HPX-87P
	Tamanho	300 mm
	Diâmetro	7,8 mm
	Temperatura	85°C
Pré-Coluna	Marca	Carbo-P Bio-Rad
	Tamanho	30 mm
	Diâmetro	4,6 mm
	Temperatura	85°C
Detector		Índice de Refração
Análise Cromatográfica	Tempo de corrida	30 min
	Volume de injeção	50 µL
	Fase Móvel	Água deionizada filtrada em membrana de 0,2 µm e desgaseificada
	Fluxo	0,6 mL min ⁻¹

As amostras para determinação do teor de holocelulose foram provenientes do filtrado obtido de cada replicata na análise de lignina insolúvel. Foram retiradas alíquotas de 20 mL e transferidas para frascos de polietileno de 30 mL. Realizou-se a neutralização com a adição de 1 g de carbonato de cálcio (CaCO₃), que foi adicionado lentamente com agitação frequente para evitar a formação de espuma. Após a neutralização, os frascos foram centrifugados a 200 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante obtido foi retirado uma alíquota de 5 mL, que foi eluída em coluna de troca iônica preenchida com 1,2 mL de resina da marca Bio-Rex 5[®], com granulometria de 100-200 mesh.

A análise cromatográfica dos açúcares contou com três amostras distintas, sendo cada uma filtrada em duplicata e injetada uma única vez, totalizando seis injeções para cada espécie estudada.

As soluções utilizadas para a construção das curvas analíticas foram preparadas com água destilada e balão volumétrico devidamente calibrado a partir dos reagentes glicose (99,5 %, Sigma-Aldrich), xilose (99,0 %, Sigma-Aldrich), arabinose (99,0 %, Sigma-Aldrich), galactose (99,0 %, Sigma-Aldrich) e manose

(99,5 %, Sigma-Aldrich), com concentrações que variaram entre 0,02 mg L⁻¹ à 3,0 mg L⁻¹, totalizando dez níveis de concentração, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Níveis de concentrações utilizados para construção das curvas de calibração da glicose, xilose, arabinose, galactose e manose.

Ponto da curva de calibração	Concentração (mg L ⁻¹)
1	0,020
2	0,040
3	0,080
4	0,200
5	0,400
6	0,600
7	0,800
8	1,000
9	2,000
10	3,000

4.1.2 Preparo das lâminas para análise por espectroscopia Raman de imagem

Os corpos de prova das quatro espécies foram orientados na direção transversal, sendo que o estudo foi aplicado nesta superfície. Assim, realizou-se cinco cortes com o auxílio de um micrótomo, com dimensões de 1,0 cm x 0,5 cm x 20 µm de comprimento, largura e espessura para cada espécie (Figura 17 a).

O segundo procedimento realizado foi submeter todos os cortes à extração sequencial utilizando acetona:água (9:1), tolueno: etanol (2:1) e metanol por 30 minutos, em cada solvente, totalizando 90 minutos de extração, para a remoção dos extrativos. Ressalta-se que este processo foi realizado separadamente com cada corte de cada espécie estudada (Figura 17 b). Após o processo de extração, os cortes foram acondicionados e identificados em vidros de relógio, e submetidos ao processo de secagem à temperatura ambiente (Figura 17 c) por 24 hs. Finalizado o procedimento de secagem, transferiu-se, separadamente, cada corte para lâminas de vidro usados em microscopia e estas foram identificadas (Figura 17 d). Após esta etapa, foi selecionado um corte para cada espécie para ser submetido à análise por espectroscopia Raman, totalizando uma varredura espectral por espécie.

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

O equipamento utilizado para obtenção dos espectros foi o espectrômetro dispersivo Raman In Via Renishaw (Figura 17 e) equipado com detector do tipo dispositivo de carga acoplada (CCD, do inglês *Charge Coupled Device*), e um microscópio Leica, com uma objetiva de 20x, usada para focar o laser na amostra. Os espectros foram obtidos no modo “*Streamline*”, laser com potência de 100 %, excitação em 785 nm, resolução espectral de 6 cm^{-1} e tempos de aquisição em torno de 15 minutos para cada varredura, em cada espécie.

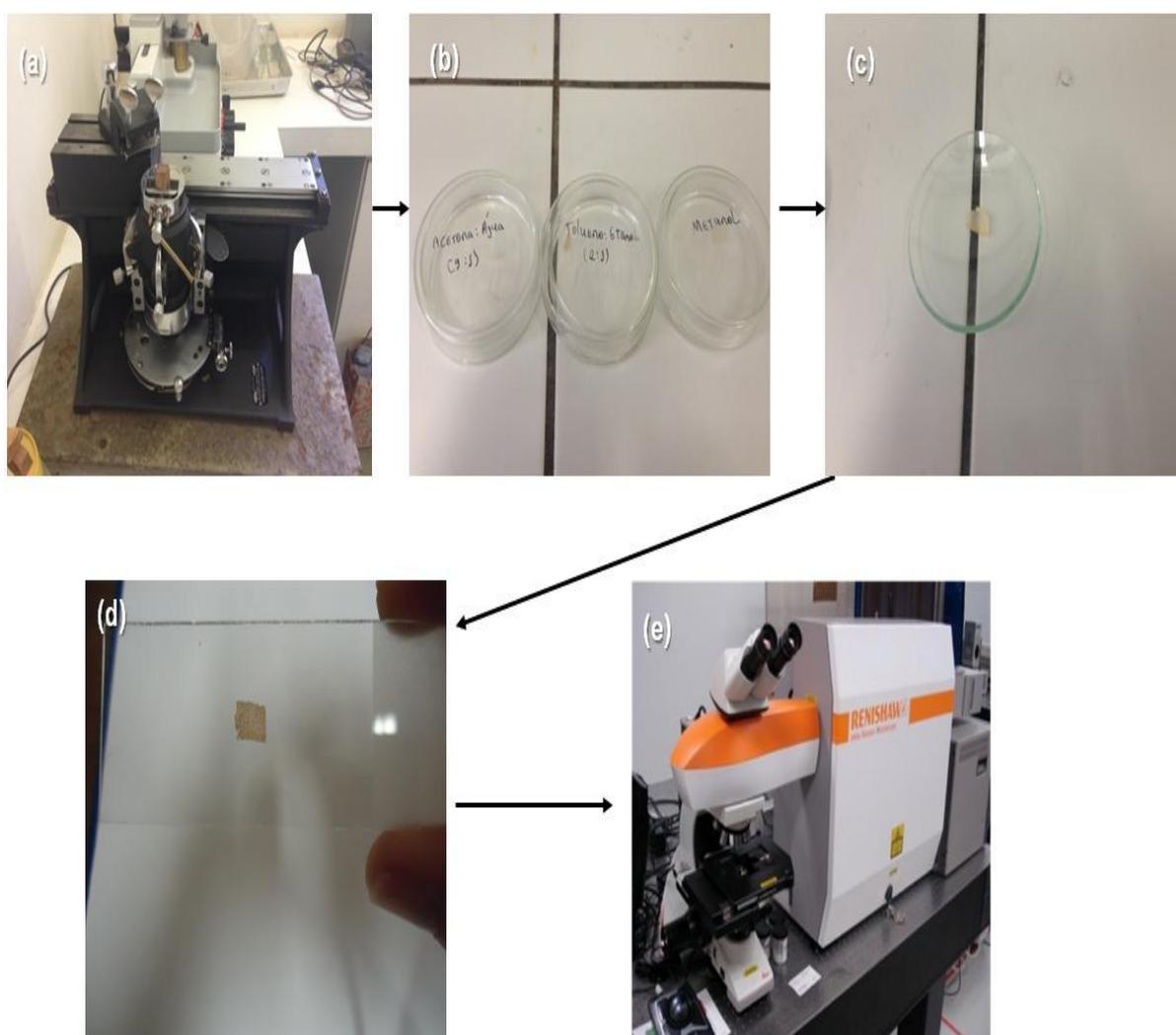


Figura 17. Procedimento realizado no preparo das lâminas para análise de espectroscopia Raman, (a) cortes micrométricos no plano transversal, (b) processo de extração, (c) secagem, (d) lâmina para microscopia e (e) equipamento Raman In Via Renishaw utilizado para obtenção dos espectros.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, os resultados estão divididos em duas partes. Inicialmente, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos das análises pelos métodos de referência dos componentes químicos: extrativos, lignina e holocelulose. Na segunda parte serão apresentados e discutidos os resultados obtidos com a aplicação da HIS-Raman.

4.2.1 Teor de extrativos

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos na análise de extrativos para as espécies florestais estudadas. As médias dos teores de extrativos obtidos foram de 3,2 %, 7,8 %, 7,9 % e 5,7 % para *E. grandis*, híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, *E. urophylla* e *S. macrophylla* King, respectivamente. É possível observar que o teor de extrativos apresentou uma variação significativa entre as espécies estudadas. Essa variação pode ser explicada pelo fato dos extrativos consistirem de uma diversidade de compostos químicos presentes na madeira e seu teor varia entre espécies, idade, condições de crescimento e também dentro da árvore entre alburno e cerne.²⁷ Outra consideração que deve ser feita é com relação aos diferentes solventes e misturas que podem ser utilizados na análise e diferentes tempos de extração.¹⁵⁵ Portanto, os resultados apresentados na Tabela 6 foram considerados como dentro do esperado para estas espécies. Além disso, cabe destacar que os métodos empregados para as análises clássicas desta tese são validados e aplicados em rotina no Laboratório de Produtos Florestais do Serviço Florestal Brasileiro.

Tabela 6. Teor de extrativos

Replicata	Teor de extrativos (%)			
	<i>E. grandis</i>	Híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>S. macrophylla</i> King
1	3,1	8,0	7,9	5,5
2	3,2	7,7	7,8	5,8
3	3,2	7,8	8,0	5,9
Média	3,2	7,8	7,9	5,7
Desvio padrão	0,06	0,17	0,10	0,20

4.2.2 Teor de lignina insolúvel, solúvel e total

São apresentados na Tabela 7 os valores encontrados de lignina insolúvel, lignina solúvel e lignina total nas espécies abordadas neste estudo, sendo que os valores médios do teor de lignina total foram 28,6 %, 28,7 %, 24,7 % e 26,5 % para *E. grandis*, híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, *E. urophylla* e *S. macrophylla* King, respectivamente. Assim como no caso do teor de extrativos, pode-se observar variações entre os teores de lignina obtidos entre as espécies estudadas, sendo que essas diferenças também foram consideradas dentro do esperado para estas espécies.

Tabela 7. Teor de lignina insolúvel, lignina solúvel e lignina total

Teor de Lignina Insolúvel (%)				
Replicata	<i>E. grandis</i>	Híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>S. macrophylla</i> King
1	27,9	26,9	21,1	27,2
2	25,3	24,4	22,7	24,9
3	25,5	24,8	23,3	21,1
Média	26,2	25,4	22,4	24,4
Desvio padrão	1,49	1,31	1,11	3,11
Teor de Lignina Solúvel (%)				
Replicata	<i>E. grandis</i>	Híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>S. macrophylla</i> King
1	2,3	3,4	2,3	2,0
2	2,4	3,4	2,4	2,0
3	2,5	3,2	2,2	2,2
Média	2,4	3,3	2,3	2,1
Desvio padrão	0,11	0,14	0,13	0,10
Teor de Lignina Total (%)				
	<i>E. grandis</i>	Híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>S. macrophylla</i> King
	28,6	28,7	24,7	26,5
Desvio padrão total	1,50	1,33	1,13	3,12

4.2.3 Teor de holocelulose

A maioria dos estudos encontrados na literatura utiliza a metodologia de determinação de holocelulose por diferença, subtraindo de 100,0 % os teores percentuais de lignina total e cinzas livres de extrativos, denominado como método semi-quantitativo. Santana e Okino¹⁵⁴ estudaram a composição química de 36 espécies da Floresta Amazônica Brasileira e descreveram que o método semi-quantitativo de determinação de holocelulose sempre apresenta valores de lignina residual, podendo elevar ou diminuir o teor de holocelulose, e também sugerem a utilização da análise cromatográfica para esta determinação. Os teores de holocelulose (que representa a associação da celulose com as hemiceluloses) obtidos neste estudo são apresentados na Tabela 8, em que as médias encontradas foram 58,9 %, 57,3 %, 55,6 % e 57,3 % para *E. grandis*, híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, *E. urophylla* e *S. macrophylla* King, respectivamente.

Tabela 8. Teor de holocelulose obtido pela análise cromatográfica.

Replicata	Teor de holocelulose (%)			
	<i>E. grandis</i>	Híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>S. macrophylla</i> King
1	60,5	59,5	57,7	57,5
	58,6	56,4	55,3	56,6
2	59,1	58,2	54,6	57,2
	59,3	58,0	55,1	57,0
3	58,0	55,2	55,4	57,6
	58,0	56,2	55,3	57,6
Média	58,9	57,3	55,6	57,3
Desvio Padrão	1,10	1,58	1,12	0,44

A categoria das madeiras folhosas, a qual pertencem as espécies estudadas, caracteriza-se por apresentar fibras mais curtas, menor teor de lignina e maior teor de holoceulose, sendo esta tendência observada nos resultados obtidos.^{31,156} Os teores de holocelulose, lignina e extrativos em madeira descritos na literatura apresentam uma variabilidade entre as diferentes espécies e dentro de uma mesma espécie. Além disso, é sugerido na literatura que estes parâmetros sejam correlacionados com a densidade básica, com o aumento da idade e na amostragem

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

quanto à posição do disco ao longo do tronco da árvore.^{31,154,157-159} Novamente, os teores estimados foram considerados concordantes com os teores de holoceulose esperados para estas espécies.

4.2.4 Identificação das estruturas anatômicas

Foi selecionada a região central em cada lâmina que comportava a amostra para realização do mapeamento. A Figura 18 representa as fotos obtidas no espectrômetro dispersivo Raman In Via Renishaw com o aumento de 20 vezes para (a) *E. urophylla*, (b) híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis* e (c) *S. macrophylla* King, nas quais é possível visualizar a área de varredura. Ressalta-se que, por falha de análise dos dados, não foi obtida a foto do *E. grandis*, por isso a mesma não foi apresentada neste trabalho.

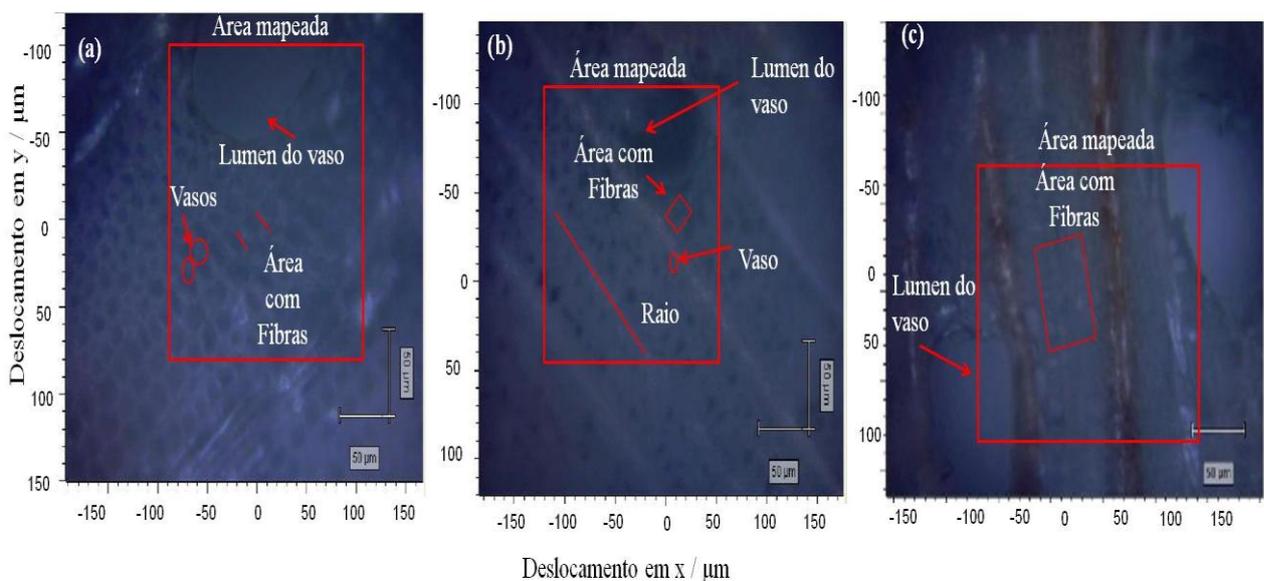


Figura 18. Fotos obtidas no espectrômetro dispersivo Raman In Via Renishaw com o aumento de 20 vezes no plano transversal (a) *S. macrophylla* King, (b) híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis* e (c) *E. urophylla*.

As estruturas observadas na Figura 18 evidenciam alguns componentes anatômicos que podem ser visualizados no plano transversal, sendo os vasos (ou poros) que representam pequenos orifícios, as fibras, que formam a parte mais escura e os raios que aparecem como linhas estendidas.²⁴ Os cálculos e a construção das imagens foram efetuados em ambiente Matlab (versão 7.12 R2011a) e as rotinas para a execução do MCR-ALS foram realizadas com o MCR toolbox.¹⁶⁰ Os resultados são apresentados nas próximas seções.

4.2.5 Pré-processamento dos dados iniciais

Para a análise da área de varredura espectral ilustradas nas Figuras 18 (a), (b), (c) e (d), foi selecionada uma área de 4 mm² e resolução espectral de 6 cm⁻¹. O espectro em cada pixel foi obtido com 1 segundo de exposição na região de número de onda de 723 a 1817 cm⁻¹, obtendo-se um total de 3162, 2856, 2530 e 2499 espectros para o híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, *E. grandis*, *E. urophylla* e *S. macrophylla* King, sendo os espectros iniciais apresentados nas Figuras 19 (a), (b), (c) e (d) e nas Figuras 20 (a), (b), (c) e (d) são ilustrados os dados espectrais após a aplicação do filtro, respectivamente.

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

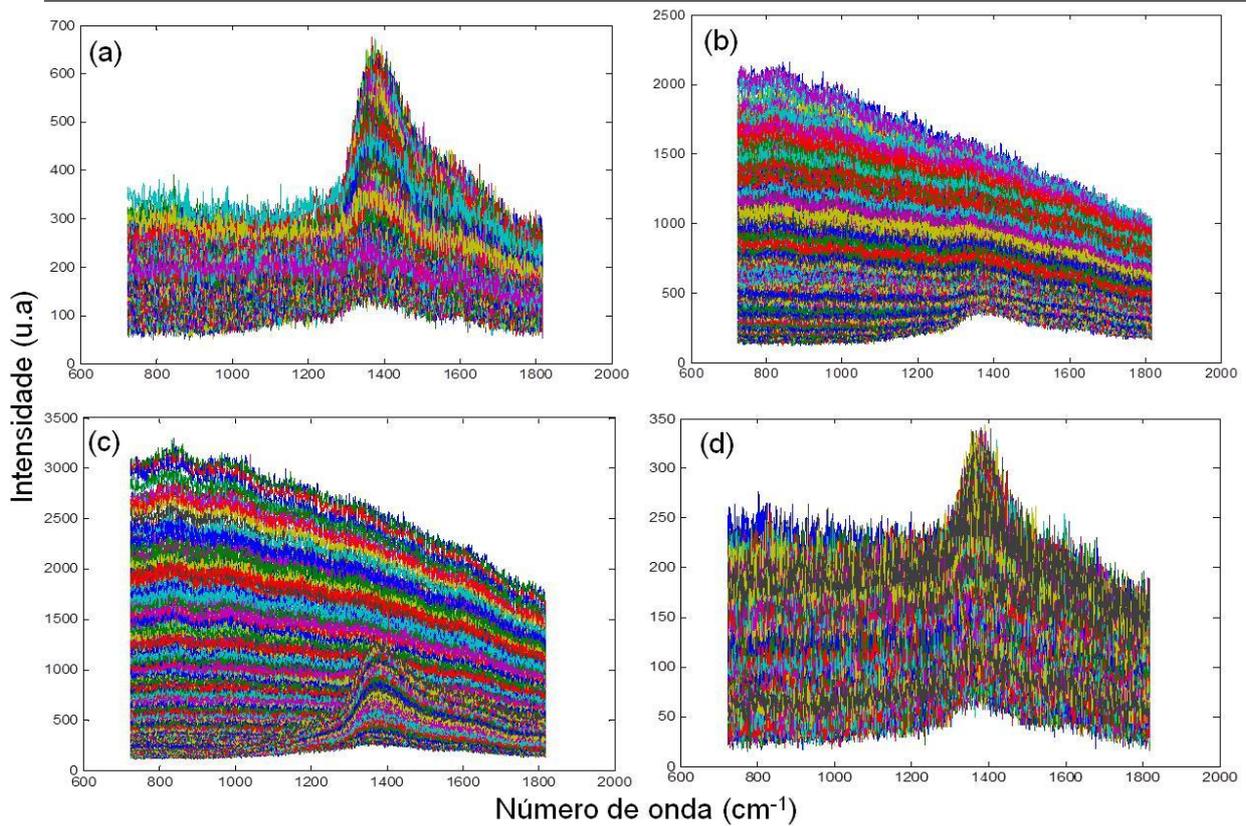


Figura 19. Espectros Raman iniciais (a) híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, (b) *E. grandis*, (c) *E. urophylla* e (d) *S. macrophylla* King.

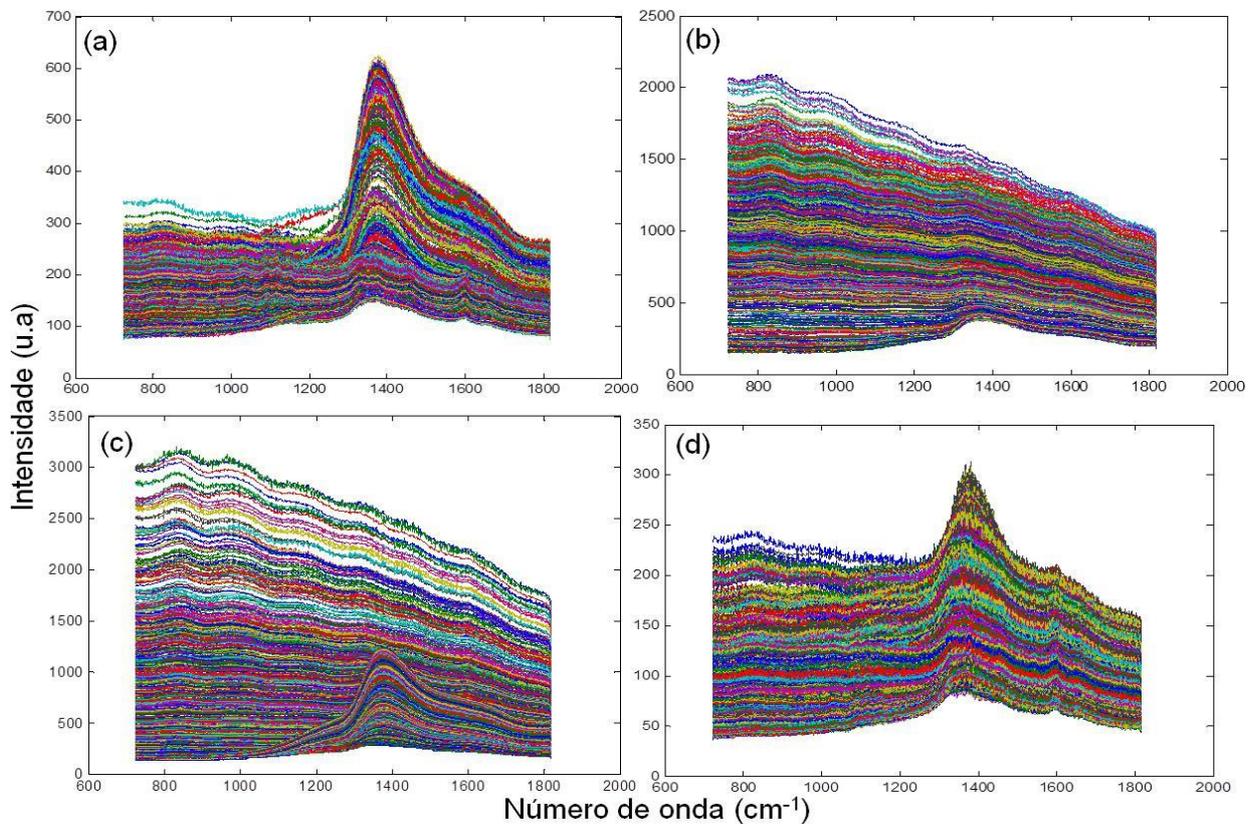


Figura 20. Espectros Raman após a aplicação do filtro (a) híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, (b) *E. grandis*, (c) *E. urophylla* e (d) *S. macrophylla* King.

Observa-se nas Figuras 19 (a, b, c e d) a presença de ruído espectral intenso e flutuações na linha de base, sendo que as origens destes fenômenos estão associadas ao modo *Streamline* de aquisição dos dados e à presença de fluorescência da amostra. O modo *Streamline* sincroniza o sinal no detector e produz uma grande quantidade de espectros a cada ponto da amostra, obtendo-se uma varredura rápida, com tempo de aproximadamente 15 minutos. Porém, devido ao menor tempo de exposição e a potência do laser ser dividida, a presença do ruído espectral foi intensificada. É importante destacar que tal efeito pode ser minimizado com a utilização de um tempo maior de exposição da amostra ao feixe de laser para que o efeito do espalhamento Raman se intensifique e se sobressaia ao ruído. Contudo, devido a limitações de tempo, esse modo de aquisição não foi utilizado. Na tentativa de reduzir o ruído presente nos dados, antes da análise por resolução multivariada de curvas (MCR), foi aplicado um filtro (Figuras 20 a, b, c, d) baseado na análise de componentes principais (PCA) utilizando 7 componentes, sendo que acima de 7, para todas as espécies, os pesos da PCA apresentavam apenas o ruído. Ressalta-se que o filtro aplicado é componente do software do equipamento utilizado.

A PCA é comumente aplicada com o objetivo de alcançar o conjunto de variáveis que contenha todas as informações com dimensionalidade reduzida, proporcionando uma interpretação simplificada. No caso da aplicação de PCA aos dados iniciais, o método procurou modelar toda a informação sistemática, com combinações lineares dos espectros obtidos, descartando informações irrelevantes de forma que apenas a parte mais relevante seja considerada e explicada com máximo possível da variância e com o mínimo de componentes principais.^{107,161,162}

A aplicação do filtro objetivou eliminar os efeitos indesejáveis, tais como o ruído proveniente do detector. Além disso, os detectores CCD são altamente sensíveis e vulneráveis aos raios cósmicos que atingem a Terra, que são interpretados como sinal e denominados como *spikes*. Os *spikes* são representados como linhas pontiagudas de emissão e são gerados devido à passagem de partículas de alta energia através do detector. Estes são totalmente aleatórios e geralmente afetam apenas um pixel de cada vez.¹⁶²⁻¹⁶⁴ Os raios cósmicos foram eliminados a partir do filtro do próprio equipamento.

Após a aplicação do filtro foi possível visualizar nas Figuras 20 (a, b, c, d) que houve a minimização do ruído e ligeira estabilização da linha de base, com consequente melhoria da qualidade dos espectros.

4.2.6 Análise dos dados por MCR-ALS utilizando o espectro completo

Conforme ilustrado na Figura 12, os dados obtidos por espectroscopia de imagem encontram-se na forma de um arranjo tridimensional, no qual x e y são as dimensões espaciais e a terceira dimensão corresponde aos números de onda dos espectros. Para aplicação das ferramentas quimiométricas em imagens espectrais é necessário o desdobramento para a construção de uma matriz de dados, que contenha duas dimensões: o número de espectros por número de onda (cm^{-1}), sendo que esta etapa foi realizada após a correção de *spikes* e aplicação do filtro por PCA.

A matriz de dados completa foi composta por (espectros x variáveis): 3162 x 1015, 2856 x 1015, 2530 x 1015 e 2499 x 1015, para o híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, *E. grandis*, *E. urophylla* e *S. macrophylla* King, respectivamente.

Para utilização do MCR-ALS, a primeira etapa é realizada a partir do conhecimento dos constituintes da amostra, cuja finalidade é estimar o número de componentes a fim de utilizar esta informação na execução do algoritmo ALS e gerar as estimativas iniciais. Neste estudo, o primeiro teste utilizado para a seleção do número apropriado de componentes presentes na matriz, ou seja, a estimativa do posto da matriz foi por meio da porcentagem de variância explicada por decomposição em valores singulares (SVD), sendo escolhidos quatro componentes. Tal escolha foi motivada a partir da observação dos maiores valores singulares de cada componente, pois a partir do quinto, este valor explicava apenas o ruído espectral.

Para a determinação das estimativas iniciais, foi adotada a rotina “*pure*”, que é baseada no algoritmo ALS e que tenta encontrar o espectro mais puro de cada componente na matriz.^{140,141,165,166} Destaca-se que o MCR aplicado à análise de imagens busca espectros linearmente independentes e não espectros de

substâncias puras, portanto, tudo o que estiver homogêneo na análise por imagens irá gerar somente um espectro e será identificado como sendo somente uma substância ou componente, ainda que esse espectro seja resultante da mistura de dois ou mais espectros de substâncias presentes na madeira. Não obstante, a expressão “espectro puro” não se refere a um componente puro, mas sim, a soma de componentes que tenham concentrações constantes em determinadas regiões da imagem. A Figura 21 ilustra as etapas realizadas.

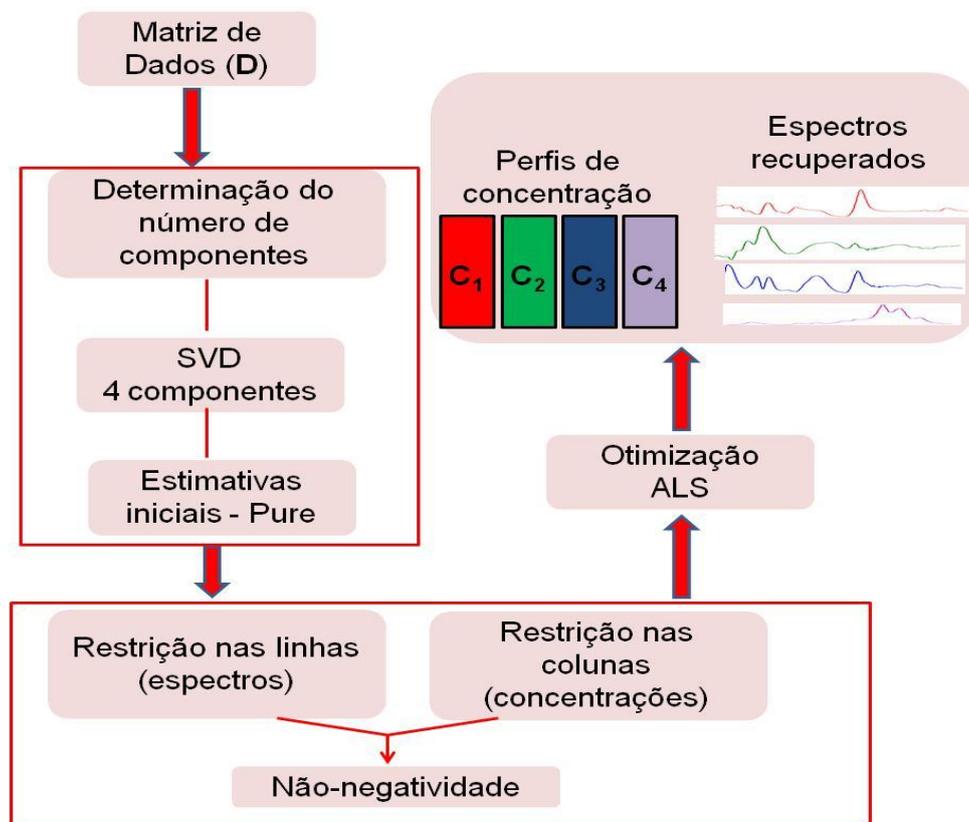


Figura 21. Etapas para a realização da análise por MCR-ALS com espectro completo.

Por meio do algoritmo ALS foram recuperados os quatro espectros puros, e a restrição utilizada foi a não negatividade da concentração e dos espectros. Ressalta-se que, devido ao fato dos espectros terem sido utilizados sem a aplicação de qualquer pré-processamento, a restrição de não negatividade foi usada tanto do perfil espectral como do perfil de concentração. A Figura 22 representa o perfil dos quatro espectros recuperados para o híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*.

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

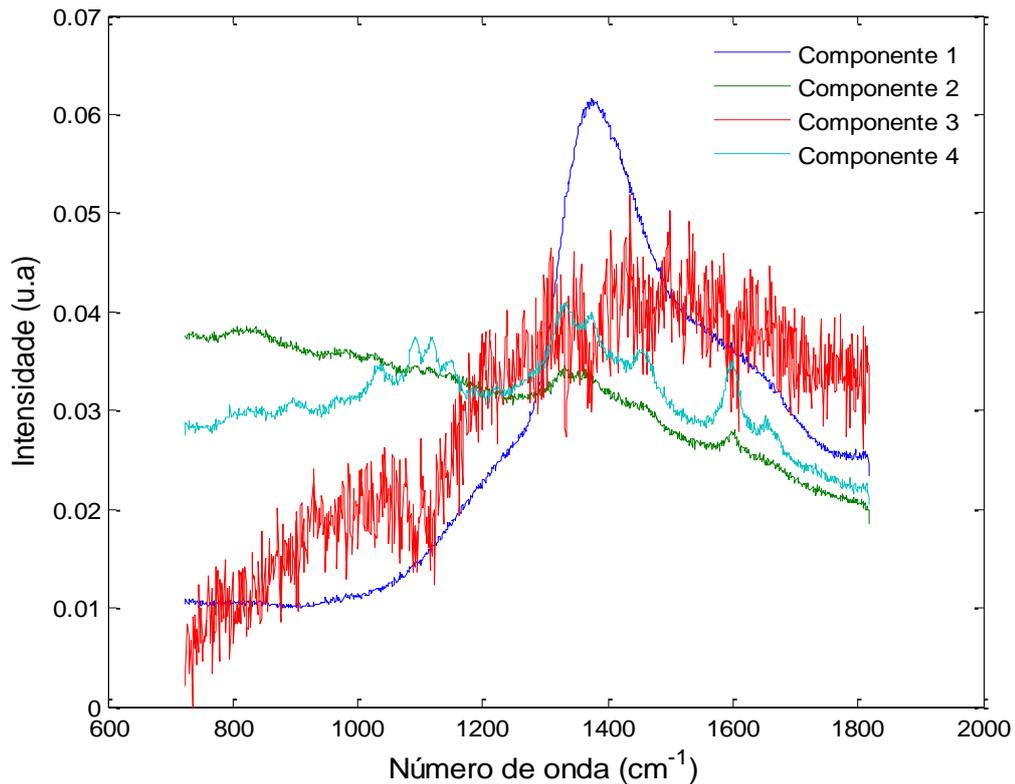


Figura 22. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS para a matriz de dados espectrais, demonstrando os quatro espectros do híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*.

A partir da análise da Figura 22 é possível observar que o Componente 1 apresenta intensidades que se distinguem dos demais componentes e este sinal foi atribuído ao espectro da lâmina de vidro que serviu como suporte aos cortes micrométricos das espécies estudadas.

O Componente 2 foi identificado como a lignina devido ao espectro obtido apresentar bandas em 1600 cm^{-1} e 1330 cm^{-1} (Figura 23). A banda em 1600 cm^{-1} é atribuída ao estiramento simétrico dos anéis aromáticos presentes nos monômeros formadores da lignina e representa um sinal comumente usado para sua caracterização em espectroscopia Raman.^{9,146,167-171} A banda em 1330 cm^{-1} é correspondente a vibrações das ligações Aril-OH ou Aril-O-CH₃, sendo que estas ligações também se fazem presentes nestes monômeros.^{7,9,171,172}

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

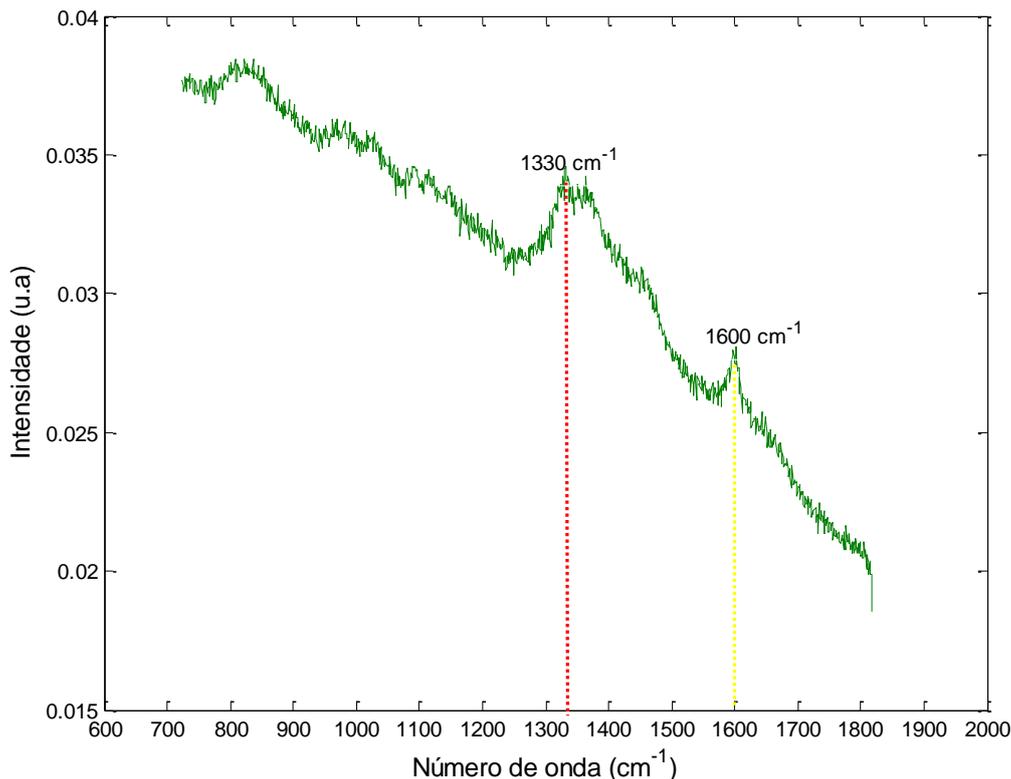


Figura 23. Perfil do espectro recuperado pelo MCR-ALS da lignina referente ao híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, apresentado como Componente 2 na Figura 22.

O Componente 3 foi identificado como interferência de fundo (*background*), relacionado à presença dos extrativos que são responsáveis pela fluorescência da amostra (Figura 24). Foi realizado o procedimento para tentar promover a remoção dos extrativos nos cortes micrométricos das espécies florestais estudadas com a utilização de uma extração sequencial com solvente⁴ utilizando acetona: água (9:1), tolueno: etanol (2:1) e metanol por 30 minutos em cada solvente. A estratégia de remoção com solvente se justifica por estes compostos conterem estruturas aromáticas que também poderiam contribuir com bandas de absorção em números de onda por volta de 1600 cm^{-1} , que é a banda atribuída à lignina⁴, o que poderia levar à sobreposição do sinal nesta região. Além disso, procurou-se minimizar o efeito de fluorescência que estes componentes apresentam nos espectros Raman quando excitados em comprimentos de onda mais curtos, principalmente na região do visível.^{11,167,173-175}

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

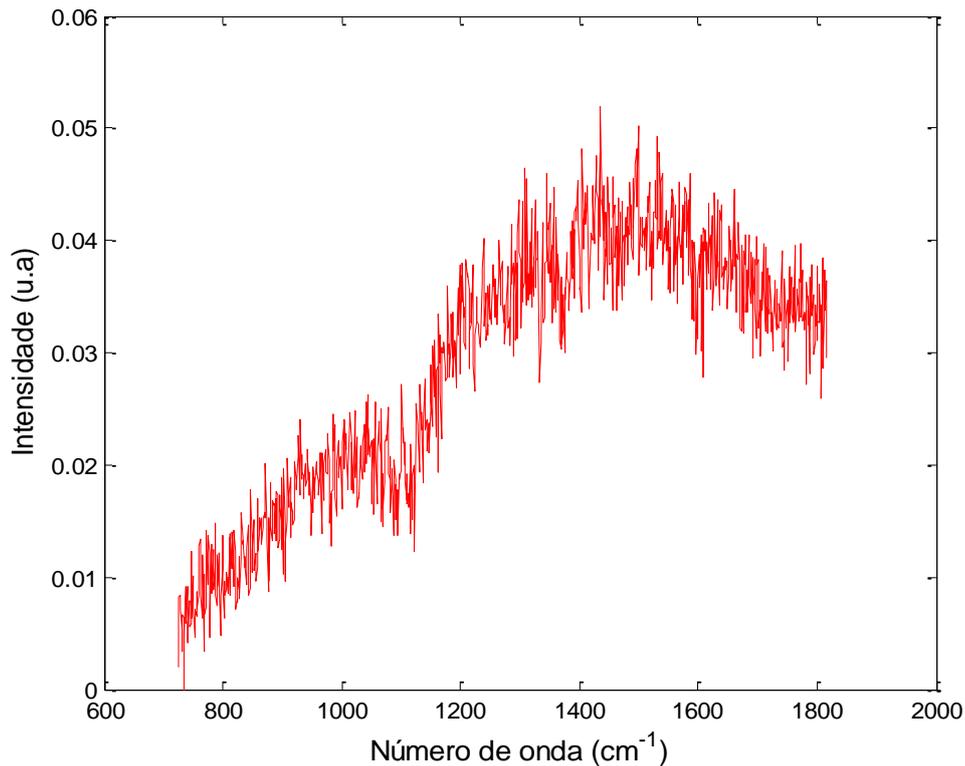


Figura 24. Perfil do espectro recuperado pelo MCR-ALS da interferência de fundo (*background*) referente ao híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, apresentado como Componente 3 na Figura 22.

Por fim, o Componente 4 foi caracterizado como celulose e também foram identificadas bandas referentes à hemicelulose. Ressalta-se que no espectro Raman, as bandas de celulose e hemicelulose encontram-se sobrepostas devido à semelhança estrutural existente entre estes dois compostos.

O espectro Raman ilustrado na Figura 25 apresentou bandas em 1098 cm^{-1} e 1123 cm^{-1} (estiramento das ligações C-C e C-O presentes na celulose e na hemicelulose, respectivamente), 1150 cm^{-1} (flexão das ligações H-C-H da celulose), 1378 cm^{-1} (flexão das ligações H-C-O e H-O-C da celulose) e em 1460 cm^{-1} (flexão das ligações H-C-H e H-O-C).^{4,9-11,36,142,145,167,168,173}

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

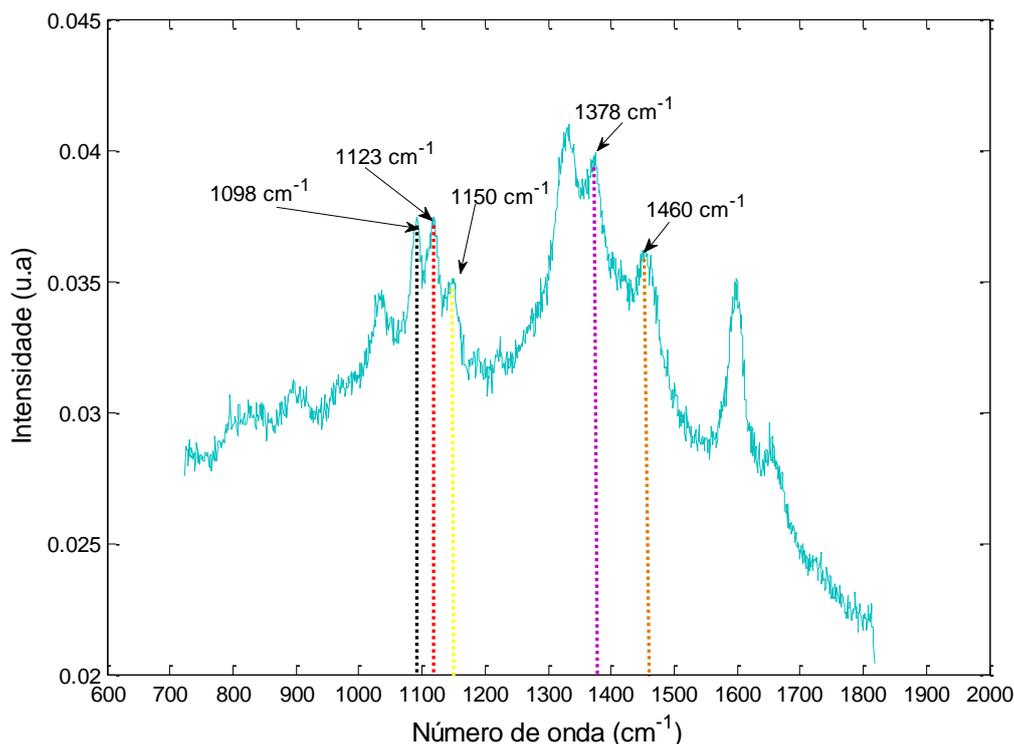


Figura 25. Perfil do espectro recuperado pelo MCR-ALS da celulose e hemicelulose referente ao híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, apresentado como Componente 4 na Figura 22.

O procedimento de análise dos dados por MCR pela rotina “*pure*” foi aplicado à matriz de dados espectrais da espécie *S. macrophylla* King, sendo que os espectros recuperados apresentaram aspecto semelhante aos obtidos para o híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, conforme demonstrado nas Figuras 26 (a, b, c, d), que ilustram os quatro espectros recuperados, referentes à lignina, à interferência de fundo (*background*) e à celulose e hemicelulose, respectivamente.

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

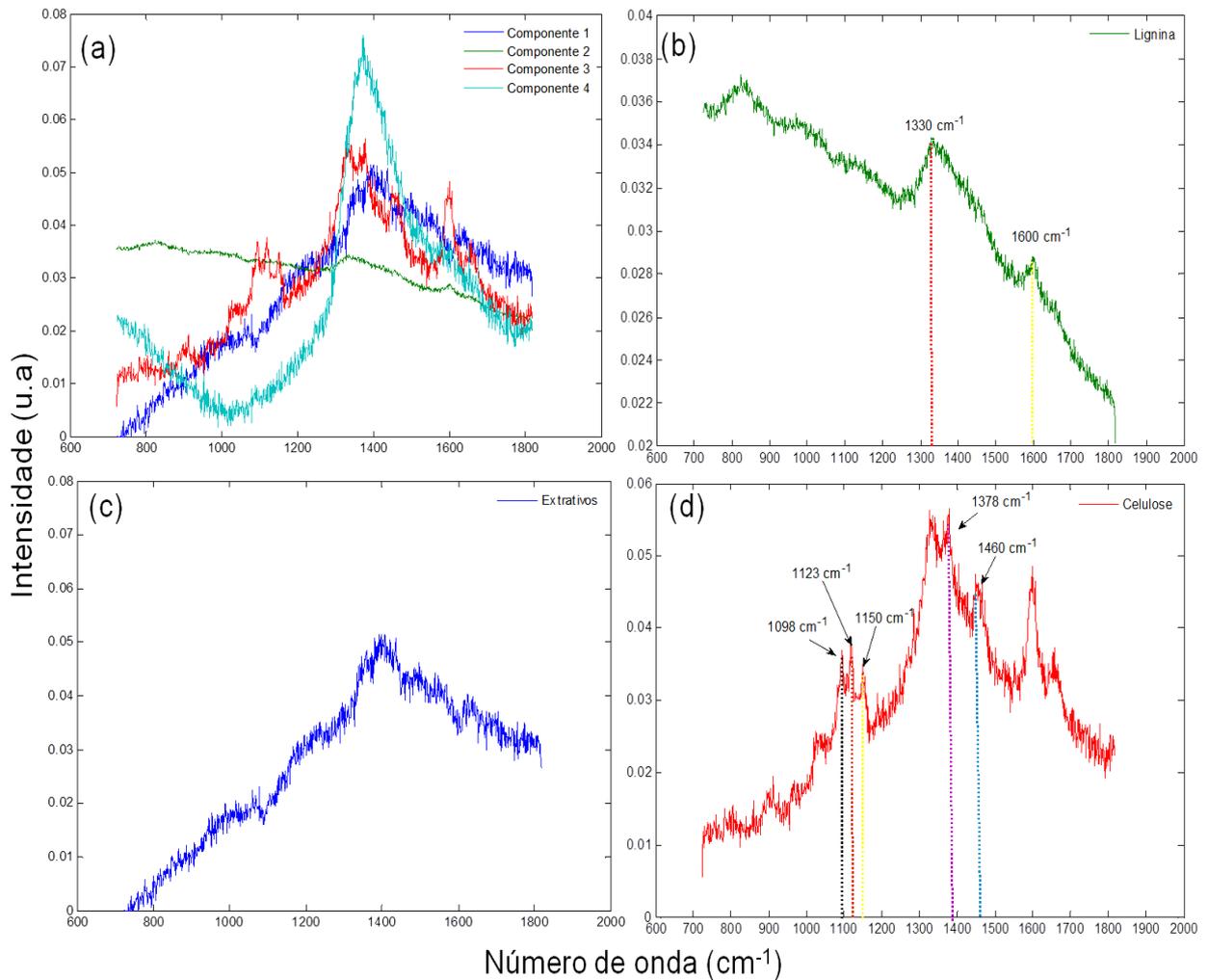


Figura 26. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS para *S. macrophylla* King. (a) quatro espectros, (b) lignina, (c) interferência de fundo (*background*) e (d) celulose e hemicelulose.

Para o *E. grandis* e o *E. urophylla* foi aplicado o mesmo procedimento, porém, comparativamente às duas espécies descritas anteriormente, não foram identificados de forma clara e nítida as bandas específicas relacionadas à celulose, à hemicelulose e à lignina.

As Figuras 27 e 28 (a, b, c, d) ilustram o perfil dos quatro espectros recuperados pelo MCR-ALS, e os espectros referentes à lignina, à interferência de fundo e à celulose e hemicelulose para o *E. grandis* e o *E. urophylla*, respectivamente. Uma possível explicação para este resultado pode ser atribuída à fluorescência apresentada por estas espécies, o que não permitiu a obtenção de espectros Raman com sinais característicos.

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

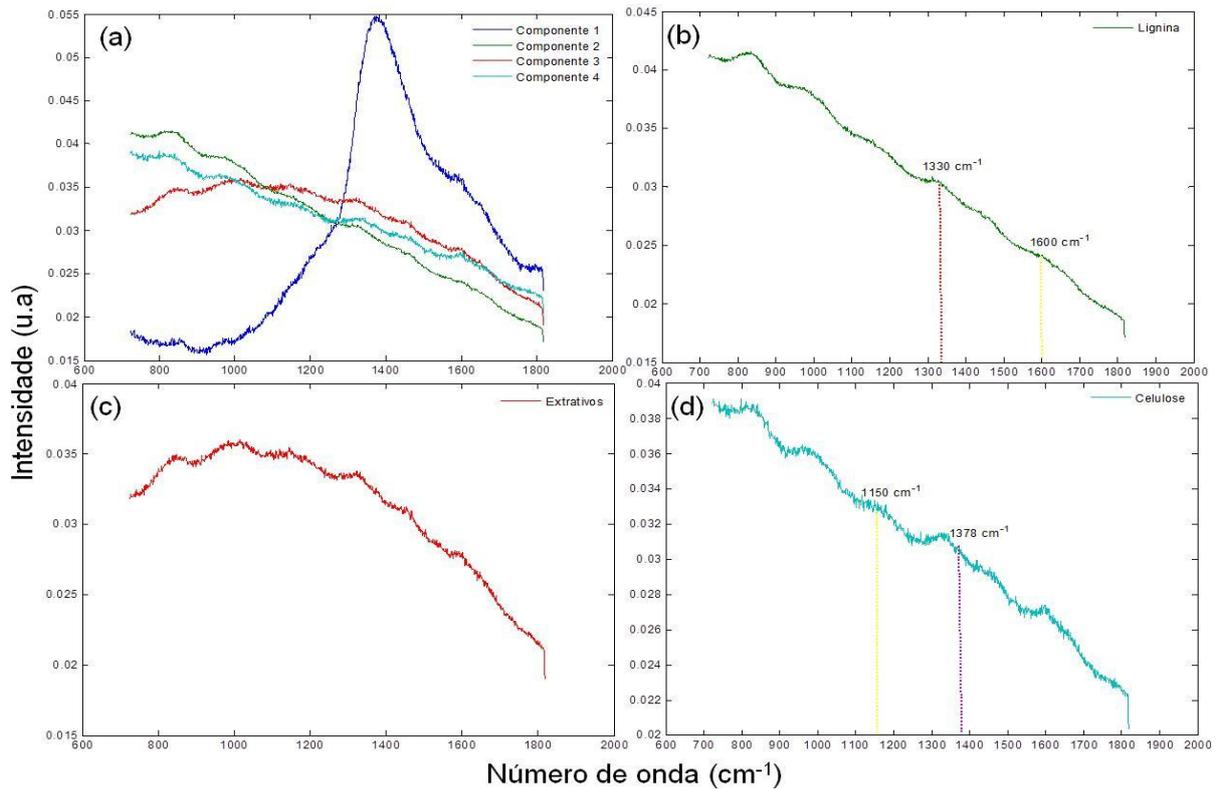


Figura 27. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS para o *E. grandis* (a) quatro espectros, (b) lignina, (c) interferência de fundo (*background*) e (d) celulose e hemicelulose.

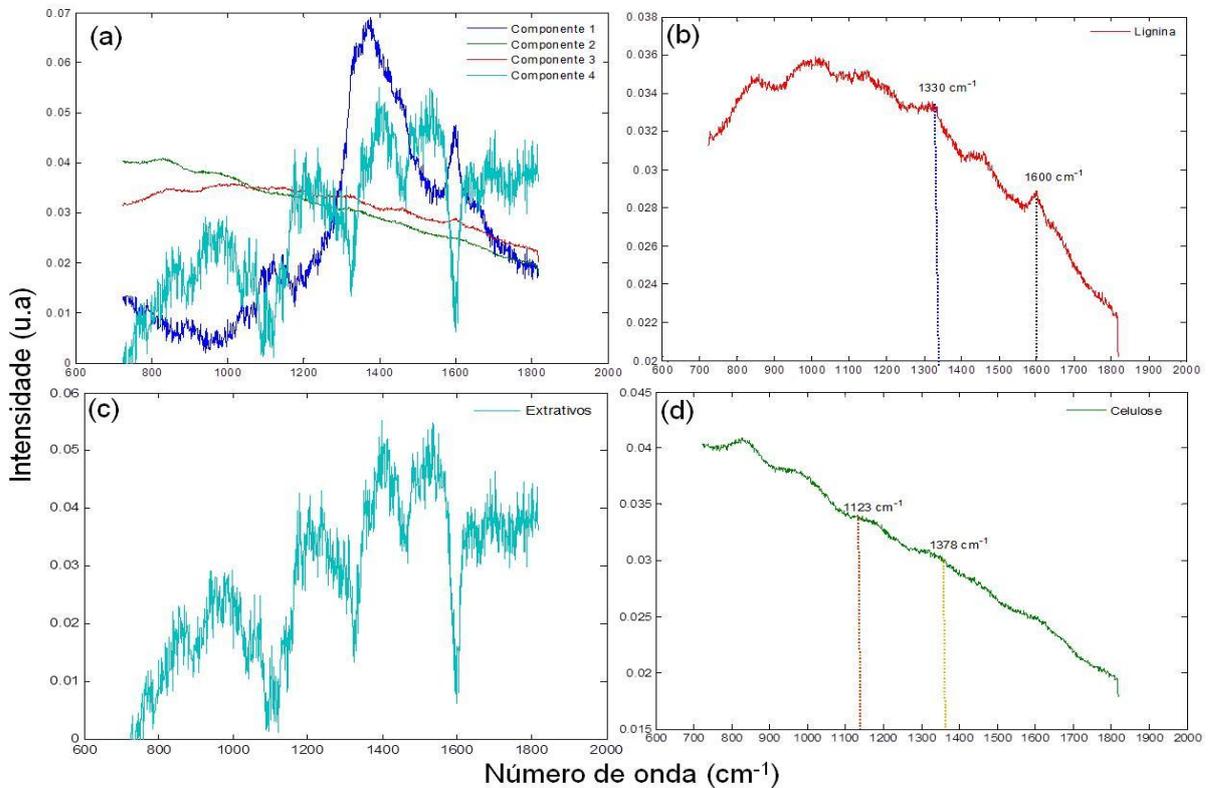


Figura 28. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS para o *E. urophylla* (a) quatro espectros, (b) lignina, (c) interferência de fundo (*background*) e (d) celulose e hemicelulose.

Ressalta-se que o conjunto de dados espectrais obtidos para todas as espécies estudadas apresentou flutuações na linha de base e alta intensidade de ruído. Os espectros recuperados das espécies *E. grandis*. e *E. urophylla* podem ter sido influenciados por estas variações, as quais produziram uma interferência espectral que resultou na deformação das bandas de interesse relativas à celulose, à hemicelulose e à lignina, limitando assim, o desempenho do método aplicado.

4.2.7 Análise dos dados por MCR-ALS com seleção de regiões espectrais

Com o objetivo de melhorar os resultados obtidos por MRC-ALS com espectro completo, tentou-se executar o MCR selecionando regiões espectrais, porém, sem perder informações. Esta seleção tem como finalidade conduzir os resultados de concentrações dos componentes de interesse aos mais próximos dos esperados na etapa de construção dos mapas de concentração. Desta forma, selecionou-se a região espectral em que foram observadas as bandas específicas que permitiram a identificação da celulose, hemicelulose e lignina.

Foram testados vários intervalos espectrais e a região selecionada foi de 1203 a 860 cm^{-1} (301 variáveis) para a matriz de dados da celulose e 1817 a 1544 cm^{-1} (275 variáveis) para a matriz de dados da lignina. Esta seleção foi realizada na matriz de dados completa, para cada espécie, separadamente.

A partir do conhecimento obtido na análise por MRC-ALS com espectro completo, na qual identificou-se os principais compostos existentes, a etapa seguinte consistiu na construção da matriz de dados que representasse as estimativas iniciais. Para análise da celulose e hemicelulose, as estimativas iniciais constaram de uma matriz que continha o espectro medido no reagente padrão de celulose (99,5 %, Sigma-Aldrich), o espectro recuperado referente ao *background* e à interferência da lâmina de vidro, os quais foram obtidos na análise por MCR-ALS com a utilização do espectro completo. A escolha do número de componentes presentes na matriz (estimativa do posto da matriz) foi feita manualmente como 3 componentes e a restrição utilizada foi a não negatividade nos perfis de concentração e espectral, conforme ilustrado na Figura 29.

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

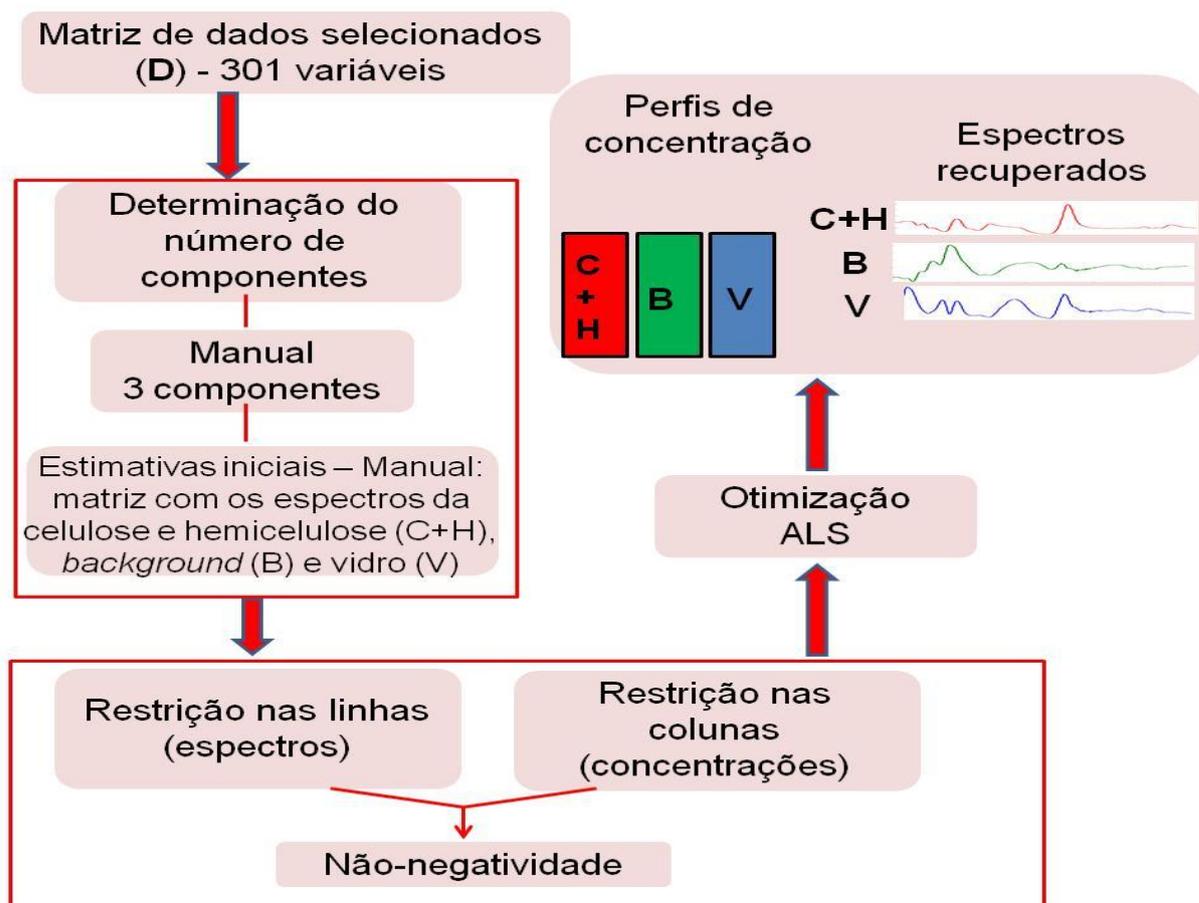


Figura 29. Etapas para a realização da análise por MCR-ALS com seleção de região espectral para determinação da celulose e hemicelulose.

Para a determinação da lignina, não foi obtido o espectro a partir do reagente padrão devido à intensa fluorescência apresentada. Então, a estratégia utilizada para a representação das estimativas iniciais aplicada na seleção de região espectral foi construir uma matriz com dois componentes: o espectro recuperado referente à interferência de fundo (*background*) e o espectro recuperado referente à lignina, obtidos na análise por MCR-ALS com espectro completo. A restrição utilizada foi a não negatividade nos perfis de concentração e espectral (Figura 30).

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

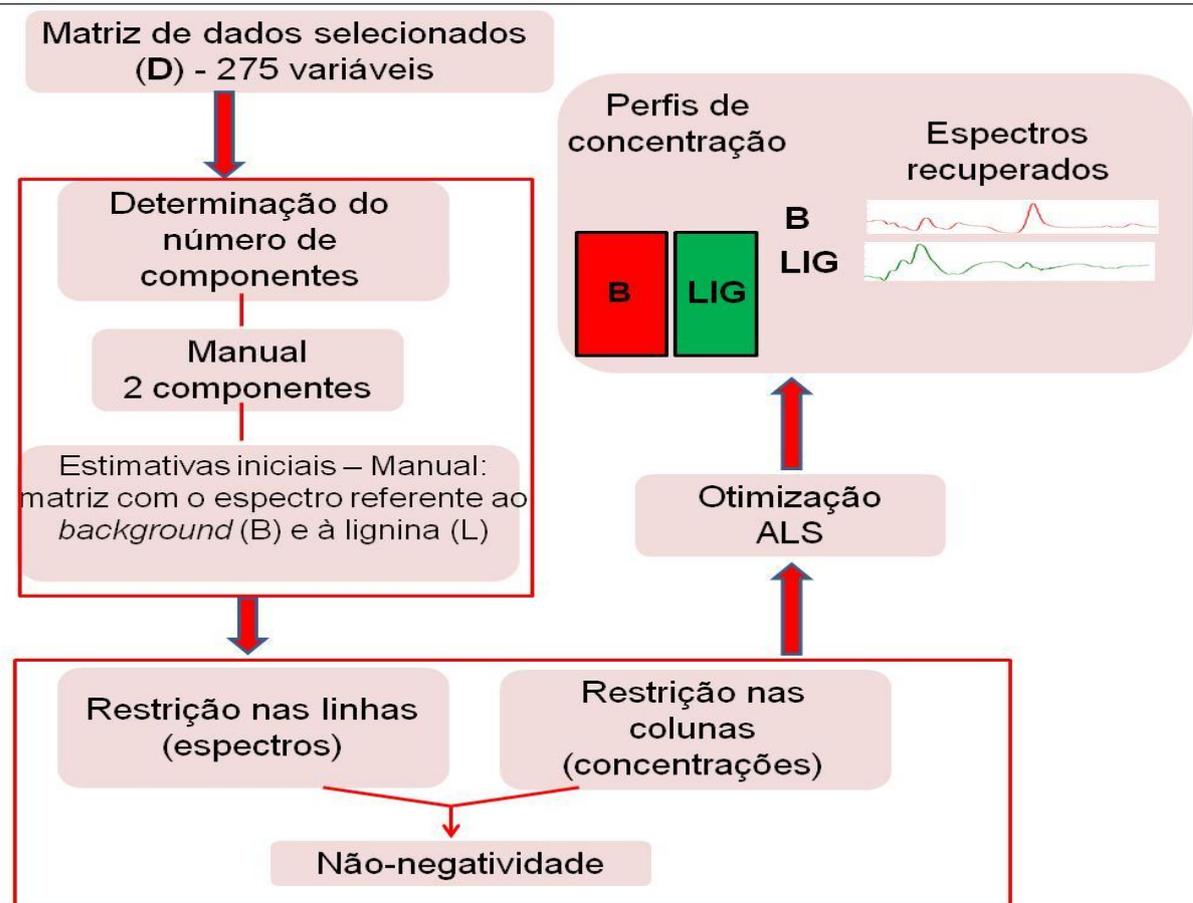


Figura 30. Etapas para a realização da análise por MCR-ALS com seleção de região espectral para determinação de lignina.

Ressalta-se que as etapas descritas nas Figuras 29 e 30 com seleção da região espectral foi realizada para o híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, *S. macrophylla* King, *E.grandis* e *E.urophylla* individualmente, a fim adquirir as estimativas das intensidades dos espectros em cada pixel para os compostos presentes, ou seja, identificar a celulose, hemicelulose e lignina.

A Figura 31 (a) ilustra a sobreposição do espectro padrão da celulose com espectro recuperado deste componente obtido pelo MCR-ALS com seleção de região espectral para o híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*. É possível observar a semelhança entre os mesmos, com a sobreposição das bandas típicas referentes à celulose e hemicelulose, conforme já discutido na seção anterior. A Figura 31 (b) mostra o espectro recuperado para a lignina, que não consta o espectro do padrão, contudo, foi possível identificar uma banda intensa na região do número de onda de 1600 cm^{-1} típica da lignina.⁴

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

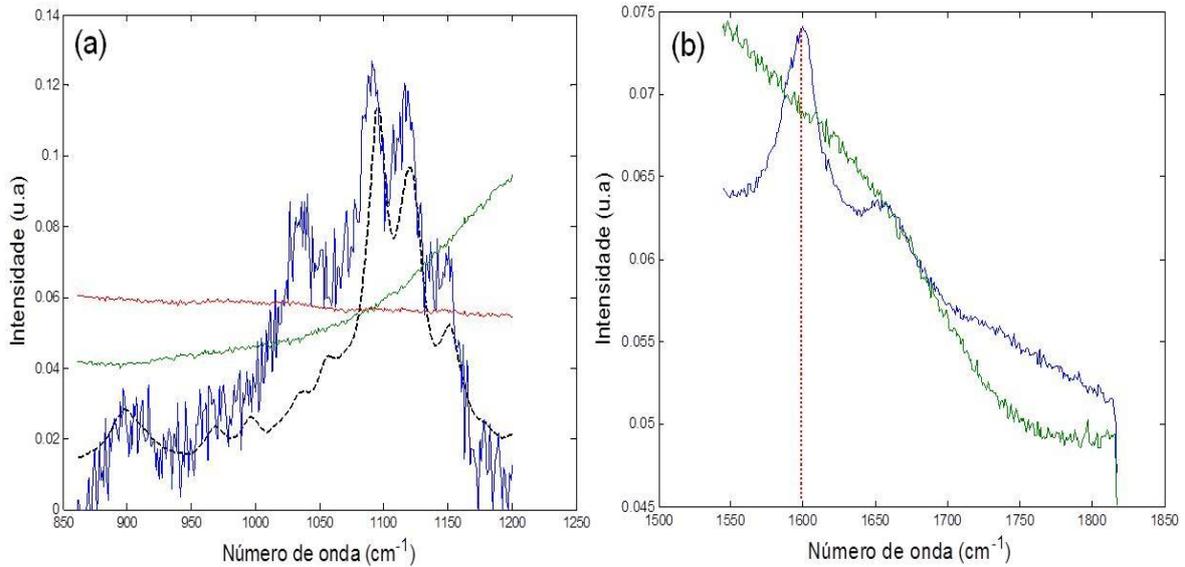


Figura 31. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS do híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis* com seleção da região espectral (a) (----) padrão de celulose (sobreposição), (—) celulose e hemicelulose, (—) interferência de fundo, (—) interferência do vidro; (b) (—) lignina e (—) interferência de fundo.

De forma análoga, foi aplicada a mesma rotina de seleção de região espectral nas demais espécies estudadas. Para a espécie *S. macrophylla* King, os perfis espectrais obtidos também apresentaram bandas referentes aos compostos de interesse, conforme apresentado na Figura 32 (a) que ilustra a sobreposição do espectro padrão da celulose com espectro recuperado obtido pelo MCR-ALS e (b) que mostra o espectro recuperado para a lignina.

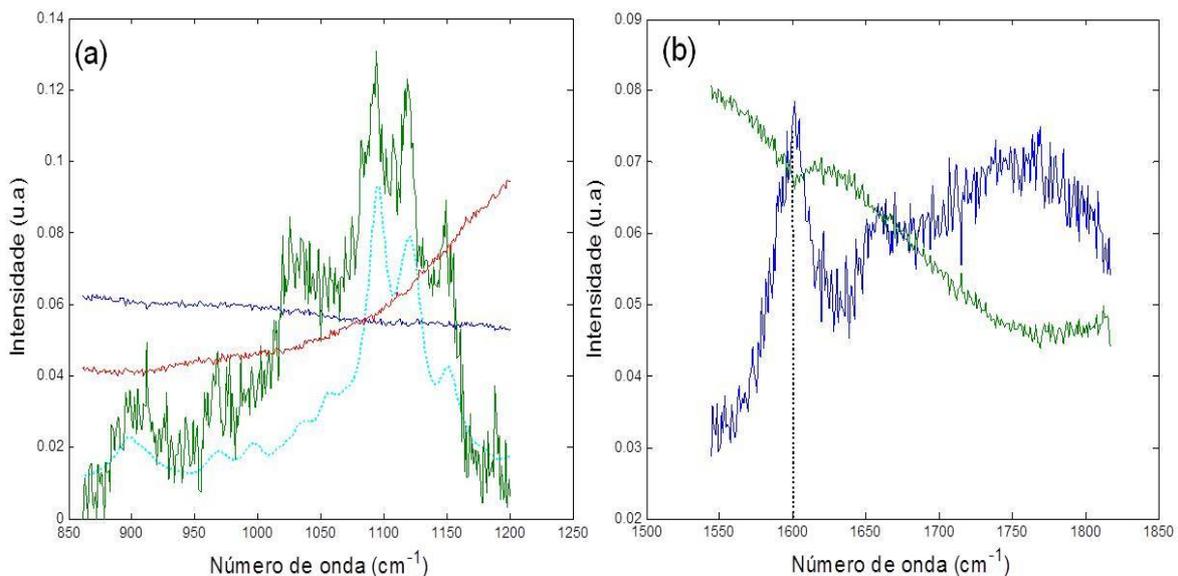


Figura 32. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS para *S. macrophylla* King com seleção da região espectral (a) (----) padrão de celulose (sobreposição), (—) celulose e hemicelulose, (—) interferência de fundo, (—) interferência do vidro; (b) (—) lignina e (—) interferência de fundo.

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

Para o *E. grandis* e *E. urophylla* os espectros recuperados são apresentados nas Figuras 33 (a e b) e Figuras 34 (a e b), respectivamente.

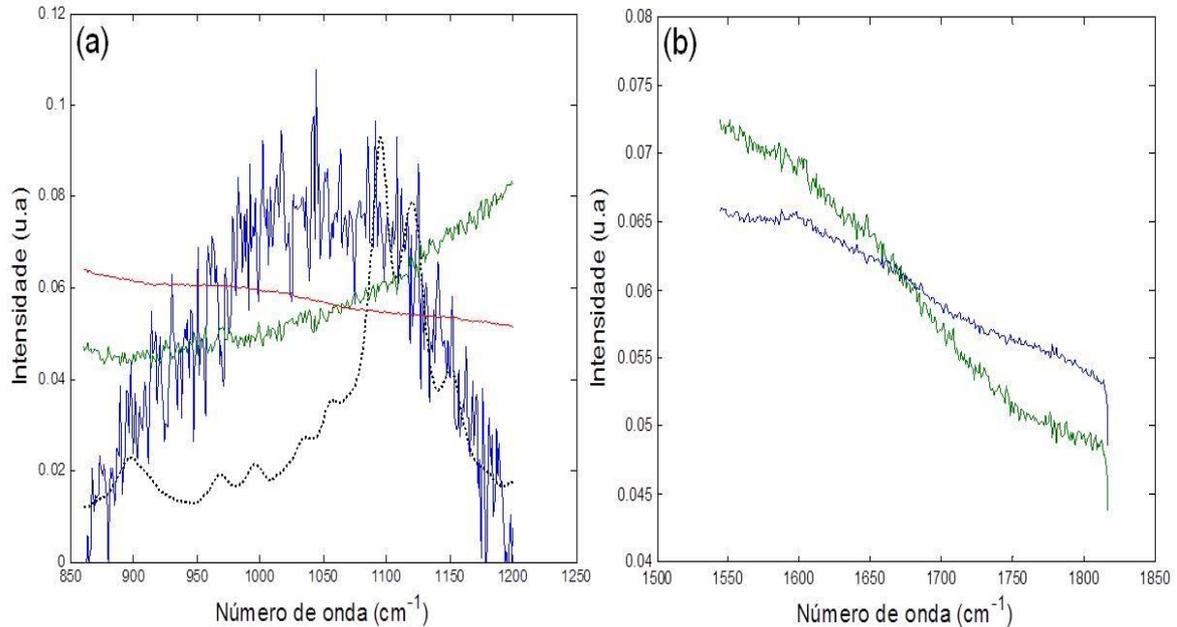


Figura 33. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS do *E. grandis* com seleção da região espectral (a) (-----) padrão de celulose (sobreposição), (—) celulose e hemicelulose, (—) interferência de fundo, (—) interferência do vidro; (b) (—) lignina e (—) interferência de fundo.

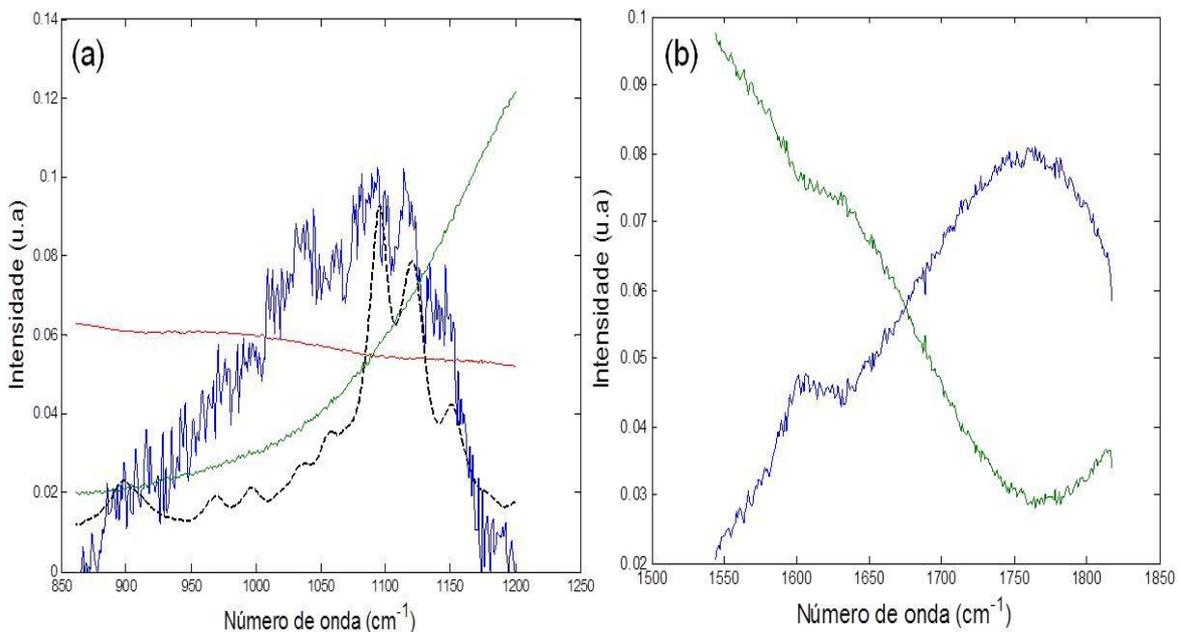


Figura 34. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS do *E. urophylla* com seleção da região espectral (a) (-----) padrão de celulose (sobreposição), (—) celulose e hemicelulose, (—) interferência de fundo, (—) interferência do vidro; (b) (—) lignina e (—) interferência de fundo.

Para o *E. grandis* e *E. urophylla*, os espectros recuperados da lignina e da celulose e hemicelulose apresentaram maiores flutuações na linha de base e alta intensidade de ruído, o que impossibilitou a visualização das bandas que caracterizam estes compostos. Já para a lignina, a banda em 1600 cm^{-1} também não foi obtida de forma satisfatória. Estas variações prejudicaram o desempenho do método MCR-ALS para estas duas espécies.

4.2.8 Estimativas das concentrações de holocelulose e lignina total por MCR-ALS

Após a análise por MCR-ALS e identificação das bandas referentes à holocelulose e lignina total, foram construídos os mapas de concentração destes elementos para cada espécie estudada. Estes mapas representam a distribuição destes componentes na área da varredura espectral.

A obtenção das estimativas das concentrações em cada pixel (y_i), foi realizada a partir da relação direta entre a média da concentração de holocelulose ($\bar{y}_{holocell}$) e lignina total (\bar{y}_{ligtot}), obtidas pelo método de referência e a intensidade relativa média estimada para cada composto pelo MCR-ALS com seleção da região espectral (média da intensidade relativa de todos os pixels do mapa de concentração de cada constituinte). Por exemplo, para a intensidade relativa da holocelulose em um determinado pixel aqui denominado como i ($I_{holocell,i}$) a concentração é obtida pela seguinte equação:

$$y_{holocell,i} = (I_{holocell,i} * \bar{y}_{holocell}) / \bar{I}_{holocell} \quad \text{Equação 20}$$

Em que:

$\bar{y}_{holocell}$ = média de holocelulose obtida pelo método de referência (%),

$I_{holocell,i}$ = intensidade relativa de holocelulose no pixel i (u.a),

$\bar{I}_{holocell}$ = intensidade relativa média de holocelulose (u.a).

Ressalta-se que o mesmo procedimento foi aplicado para todos os pixels, ou seja, para todo o conjunto espectral. Semelhantemente, para a lignina total, tem-se:

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

$$y_{ligtot,i} = (I_{ligtot,i} * \bar{y}_{ligtot}) / \bar{I}_{ligtot} \quad \text{Equação 21}$$

\bar{y}_{ligtot} = média de lignina total obtida pelo método de referência (%),

$I_{ligtot,i}$ = intensidade relativa de holocelulose no pixel i (u.a),

\bar{I}_{ligtot} = intensidade relativa média de lignina total (u.a).

Inicialmente, é apresentado na Figura 35 (a), o mapa de intensidade referente à lâmina de vidro para o híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*. A partir da comparação deste mapa com a foto da área de varredura espectral (Figura 18 b), observa-se que o ruído espectral (correspondente a toda área em azul) se distingue da intensidade do lume do vaso (apresentado em vermelho). O lume do vaso refere-se ao espaço não preenchido, ou seja, corresponde à lâmina de vidro, sendo esse o principal resultado que permitiu a sua identificação. Para a *S. macrophylla* e *E.urophylla* (Figuras 35 (b) e (c), respectivamente), os mapas são análogos ao descrito para o híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*. Ressalta-se a semelhança das imagens de cada espécie com suas respectivas fotos demonstradas nas Figuras 18 (a e c).

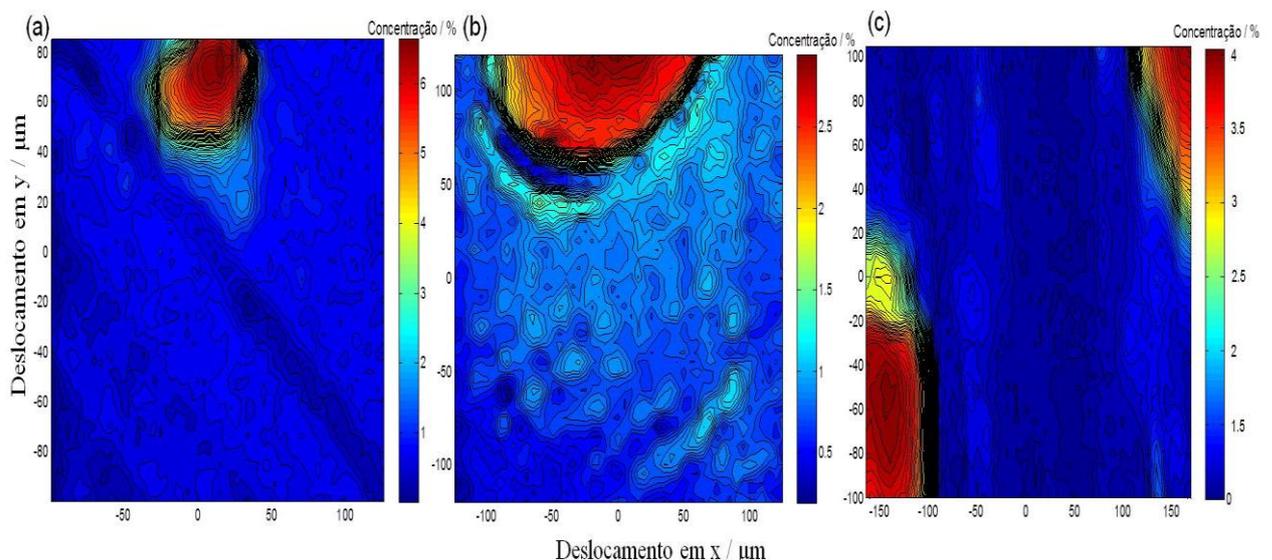


Figura 35. Mapa de intensidade relativa atribuído à lâmina de vidro (a) híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, (b) *S. macrophylla* King e (c) *E. urophylla*.

Os mapas de concentração e os histogramas da holocelulose e da lignina total para o híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis* são apresentados nas Figuras

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

36 (a, b, c, d), nas quais a unidade encontra-se em percentual, uma vez que a concentração média determinada pelo método de referência permite obter a estimativa da concentração em cada pixel, conforme descrito nas Equações 20 e 21, respectivamente. Ressalta-se que os mapas de concentração do híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis* e para *S. macrophylla* King foram construídos a partir da análise por MCR-ALS com seleção da região espectral.

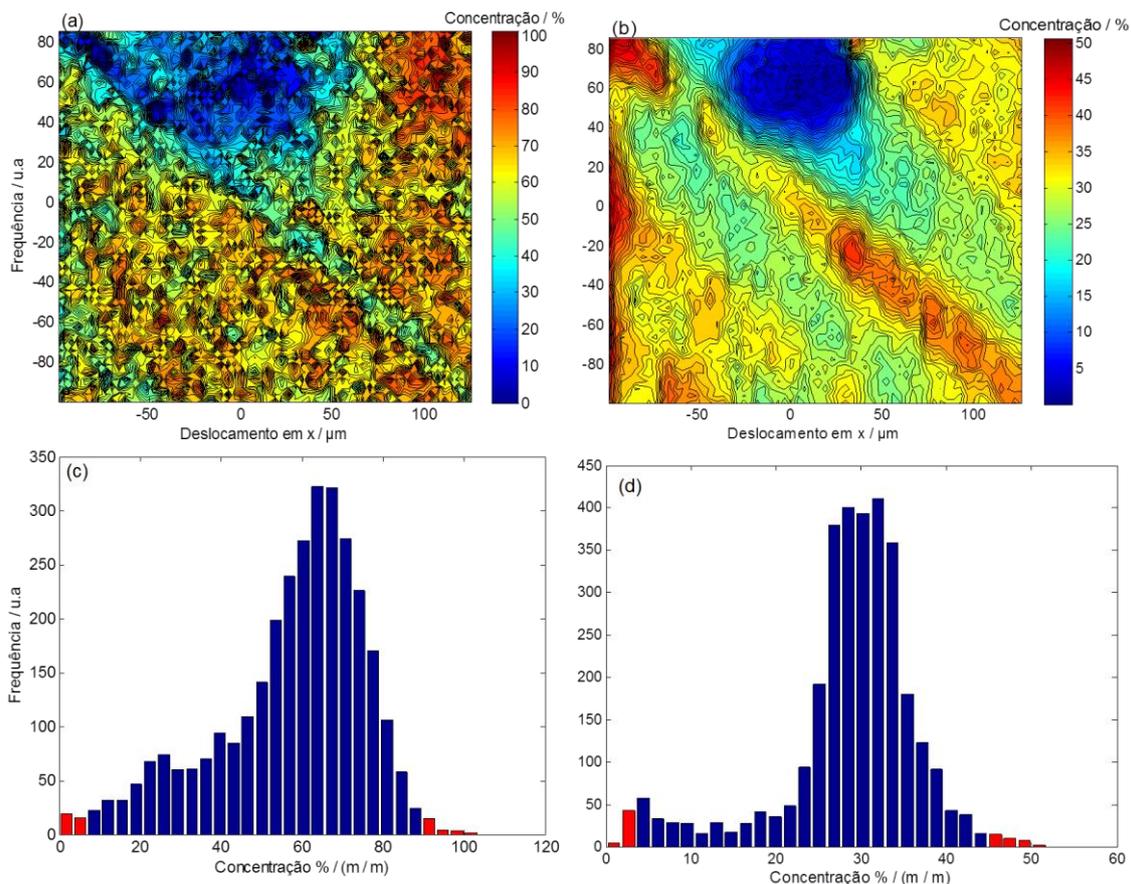


Figura 36. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis* (a, c) holocelulose, (b, d) lignina total. As barras vermelhas representam 1,0 % dos percentis de distribuição

O mapa de concentração e o histograma para a holocelulose (Figuras 36 a e c) apresentam concentrações que variaram entre 9 % a 100 %, estando a holocelulose distribuída por toda a área mapeada, com exceção do lume do vaso. Considerando o erro experimental, referente à análise por MCR-ALS, as concentrações acima de 100 % são observados em um pequeno número de pixels e valores de concentração com 0 % foram observados no lume do vaso. A exclusão do percentil de 1,0 % do lado direito do histograma (Figura 36 c), mostram que poucos pixels apresentam valores estimados com concentrações acima de 100%.

Da mesma forma, com a exclusão dos percentis do lado esquerdo indicou que apenas 1,0 % dos valores possuem concentrações em torno de 0 %. Quando excluídos os percentis de ambos os lados da distribuição, que correspondem a um intervalo de confiança de 98 %, a faixa de concentração para holocelulose foi de 9 % a 88 %.

Para a lignina total, foram observados valores que variaram entre 0,1 % a 51,0 % na área mapeada (Figura 36 d). Com a exclusão dos percentis, os valores variaram entre 5 % a 44 % na maioria dos pixels. Esta faixa pode ser considerada satisfatória, devido aos fatores observados nos espectros estimados para holocelulose e a lignina, como ruído espectral intenso e também a sobreposição de bandas referentes à celulose e hemicelulose. Outro ponto a ser considerado é a interferência de fundo (*background*), que pode ter influenciado para elevar o valor dos compostos estudados.

Para a área mapeada, observa-se a distribuição da holocelulose com maiores concentrações nas fibras e nos vasos (poros), enquanto que, para a lignina total, as maiores concentrações são observadas nos raios e nas fibras. Esta distribuição corrobora com as estruturas anatômicas, pois as fibras correspondem ao tecido de preenchimento e sustentação, sendo formadas pela deposição de celulose, componentes fibrilares, lignina, hemicelulose. Nos raios é comum haver o acúmulo de substâncias como amido e peptídeos. Os vasos são células cilíndricas, dispostas umas sobre as outras, formando longos tubos, por onde circula a água com os nutrientes. O lume do vaso é a denominação dada ao espaço interno dos elementos anatômicos.²⁴ No lume do vaso não foram obtidos pontos com intensidade de sinal da concentração em ambos os mapas de distribuição, o que é um resultado consistente com o esperado neste estudo, uma vez que, na área de varredura espectral obtida para o híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, o lume consiste de espaço vazio, ou seja, corresponde à lâmina de vidro.

As Figuras 37 (a, b, c, d) trazem os mapas de concentração e os histogramas da holocelulose e da lignina total para *S. macrophylla* King.

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

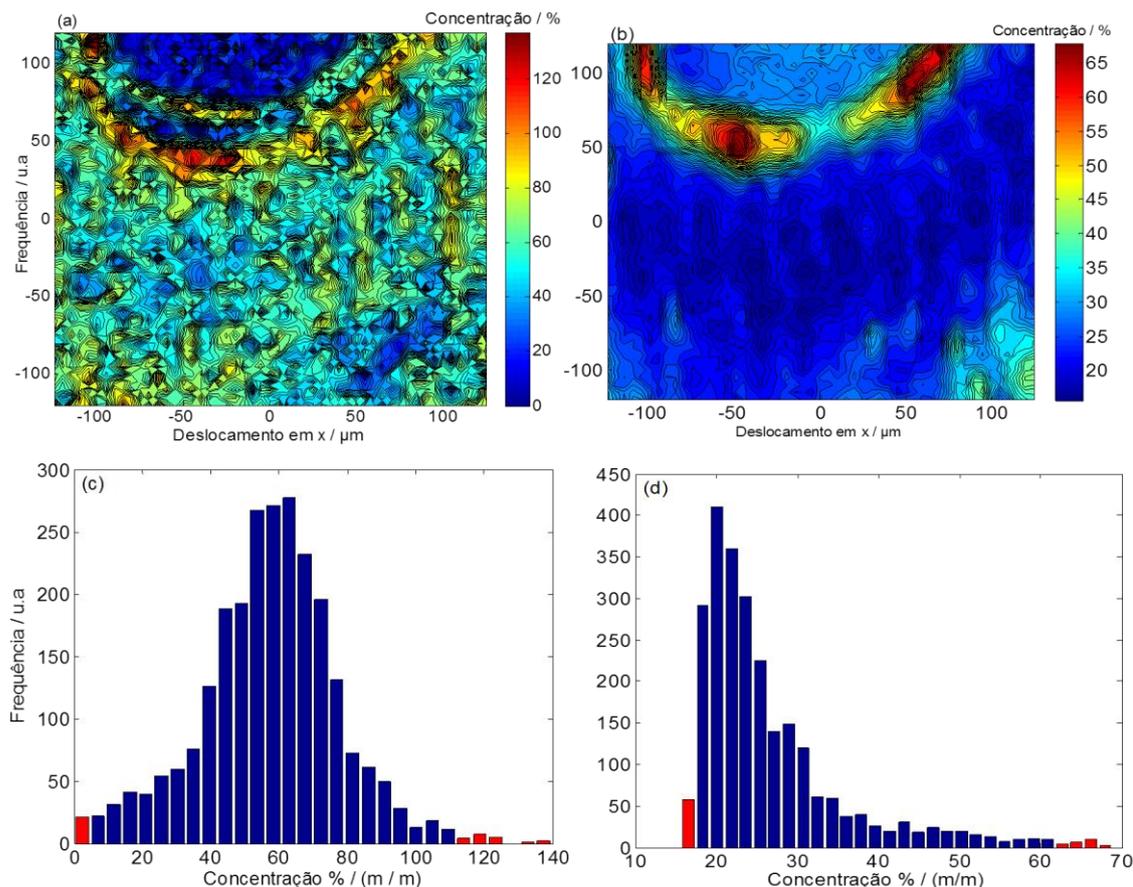


Figura 37. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para *S. macrophylla* King (a, c) holocelulose, (b, d) lignina total. As barras vermelhas representam 1,0 % dos percentis de distribuição

A área de varredura contemplou as estruturas anatômicas das fibras, raio e lume do vaso. No mapa de distribuição da holocelulose (Figura 37 a) são observados teores entre 20 % e acima de 100 %. Para a lignina, o valor mínimo foi de 16 % e o máximo de 69 % (Figura 37 b). Com a exclusão dos percentis de cada lado dos histogramas (98 % de intervalo de confiança), as faixas de concentração foram de 7 % a 109 % e 18 % a 59 % para a holocelulose e lignina total, respectivamente. Na região mapeada, a maioria dos pixels apresentaram concentrações entre 40 % a 80 % para holocelulose e 20 % a 30 % para lignina total nas fibras e nos vasos.

Com relação ao *E. grandis* e *E. urophylla*, esperava-se obter mapas de concentrações próximos aos obtidos com o híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis*, por se tratar de espécies de eucalipto e por contemplarem estruturas anatômicas semelhantes. Contudo, destaca-se que, devido às interferências espectrais identificadas nos espectros recuperados com seleção de variáveis da holocelulose e da lignina total, para estas duas espécies os mapas de

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

distribuição da concentração apresentaram o sinal destes componentes com maiores variações e menores intensidades, ou ainda, observou-se a sobreposição dos sinais. Então, construíram-se as imagens a partir dos espectros recuperados obtidos na análise com o espectro completo. Os mapas de concentração com os respectivos histogramas para o *E. grandis* e *E. urophylla* são apresentados nas Figuras 38 e 39, respectivamente.

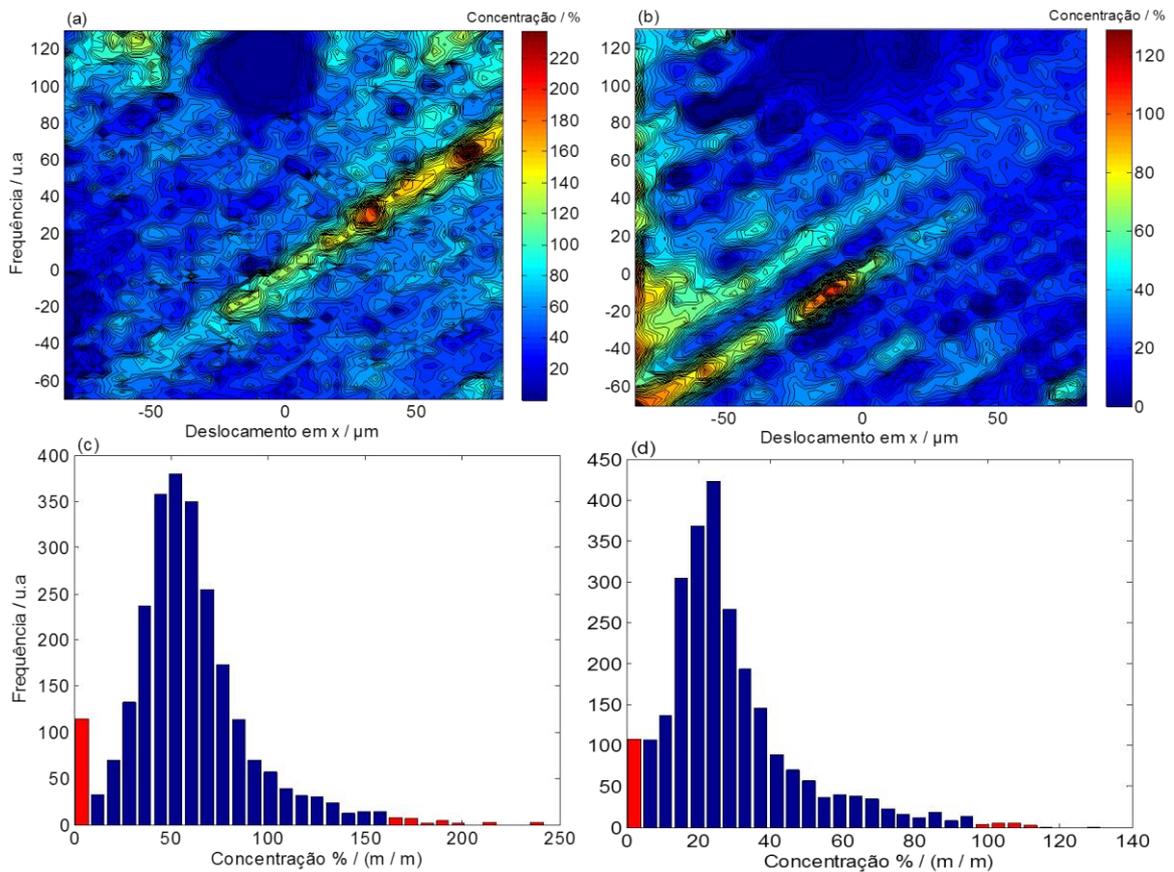


Figura 38. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o *E. grandis* (a, c) holocelulose, (b, d) lignina total. As barras vermelhas representam 1,0 % dos percentis de distribuição.

Na Figura 38, referente ao *E. grandis*, a área de varredura possui as estruturas anatômicas fibra, raio e lume do vaso. No mapa de distribuição da holocelulose (Figura 38 a) foi possível observar que os teores variaram entre 0 % no lume do vaso e acima de 100 % em alguns pixels. Para a lignina total (Figura 38 b) também houve a ocorrência de teores acima de 100,0 %. Contudo, com a exclusão dos percentis de cada lado dos histogramas, a variação do teor foi entre 12,0 % a 157 % e 7 % a 85 % para a holocelulose e lignina total, respectivamente. Observa-

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

se teores entre 40 % a 80 % e entre 20 % e 40 % nas fibras e nos raios para a holocelulose e a lignina total, respectivamente, na maioria dos pixels.

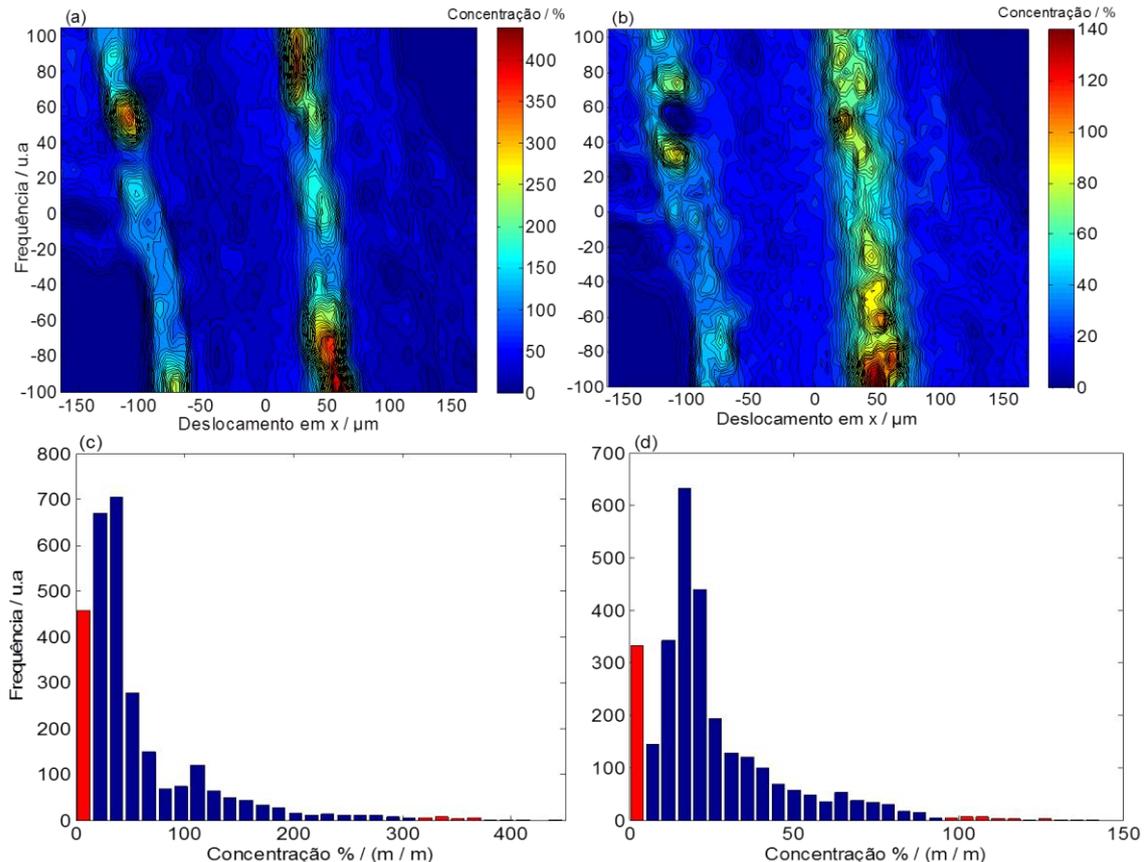


Figura 39. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o *E. urophylla* (a, c) holocelulose, (b, d) lignina total. As barras vermelhas representam 1,0 % dos percentis de distribuição.

A distribuição do teor de holocelulose (Figura 39 a) para o *E. urophylla* foi de 0 % (lume do vaso), com pontos acima de 100,0 %, em analogia com o teor de lignina total (Figura 39 b). A partir da exclusão dos percentis, os teores de holocelulose e lignina total variaram entre 22 % a 321 % e 7 % a 93 %, respectivamente. Ressalta-se que as maiores variações no teor encontram-se apenas em alguns pixels localizados na região das fibras. Na maior parte da varredura espectral, os pixels apresentaram as concentrações entre 50 % a 100 % e 20 % a 60 % para holocelulose e lignina total, respectivamente, localizados nas fibras.

As informações obtidas nos mapas de concentração retratam a heterogeneidade da distribuição dos componentes químicos estudados, característico da madeira, que é um material heterogêneo e que possui diferentes

4. Análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total em diferentes espécies de madeira por imagem hiperespectral e espectroscopia Raman

tipos de estruturas anatômicas adaptadas a desempenharem funções específicas e sua composição é variável.

Considerando a discussão anterior das análises dos espectros recuperados obtidos para as quatro madeiras estudadas com a utilização da ferramenta quimiométrica MCR-ALS e a rotina “*pure*”, é possível demonstrar que os resultados para holocelulose e lignina total apresentam flutuações nos valores de concentração, acerca dos valores médios obtidos, conforme ilustrado na Tabela 9.

Tabela 9. Mínimo, máximo e desvio padrão do teor de holocelulose e lignina obtidos nos histogramas do *E.grandis*, híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis*, *E. urophylla* e *S. macrophylla* King, com intervalo de 98 % de confiança.

Valores para a holocelulose (%)				
	<i>E. grandis</i>	Híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>S. macrophylla</i> King
mínimo	12,1	8,6	22,4	7,0
máximo	157,5	87,9	321,3	109,4
desvio padrão	45,5	24,4	92,7	31,6
Valores para a lignina (%)				
	<i>E. grandis</i>	Híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.camaldulensis</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>S. macrophylla</i> King
mínimo	6,6	4,6	7,2	18,3
máximo	85,6	44,0	93,0	59,1
desvio padrão	24,7	12,2	26,9	12,5

Observa-se que para *S. macrophylla* King e o híbrido de *E.urophylla* x *E.camaldulensis* foram obtidos valores médios com intervalos de variação realistas, tendo em vista que eles não extrapolaram significativamente os limites de 0 % a 100 %. Contudo, para o *E. grandis* e *E. urophylla* observou-se valores de porcentagem significativamente acima de 100 %, indicando uma falta de exatidão dos resultados, que pode ser explicada pelo fato do método de aquisição espectral apresentar elevado ruído e grandes flutuações na linha de base. A presença da interferência de fundo relativa aos extrativos é um fator que também deve ser levado em consideração. Realizou-se o procedimento de remoção destes com extração com solvente, todavia, tal procedimento pode não ter sido efetivo para a remoção total e valores residuais foram quantificados. Outro aspecto que vale destacar é a variabilidade das regiões anatômicas contempladas na varredura espectral, pois

numa determinada estrutura podem ser detectadas maiores concentrações de holocelulose e lignina total e, em outras, pode ocorrer o inverso.

4.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

A HIS - Raman em conjunto com MCR-ALS foram utilizadas com sucesso para investigar a distribuição de holocelulose e lignina total em três espécies diferentes de madeira, *E. grandis*, *E. urophylla* e *S. macrophylla* King e um híbrido de *E.urophylla x E.camaldulensis*. Os espectros Raman recuperados pelo MCR-ALS apresentaram sinais característicos da celulose, hemicelulose e lignina, permitindo a identificação destes compostos.

A construção de mapas de concentração possibilitou estimar a distribuição de holocelulose e lignina total na área mapeada, em que os valores máximos e mínimos para a holocelulose foram 12,1 % a 157,5 %; 8,6 % a 87,9 %; 22,4 % a 321,3 % e 7,0 % a 109,0 %; e lignina total foram 6,6 % a 85,6 %; 4,6 % a 44,0 %; 7,2 % a 93,0 % e 18,3 % a 59,1 % para o híbrido de *E.urophylla x E.camaldulensis*, *E. grandis*, *E. urophylla* e *S. macrophylla* King, respectivamente. Os mapas de concentração indicaram que as percentagens de holocelulose e lignina total têm boa concordância quando comparados com os valores obtidos pelo método de referência. Contudo, as variações obtidas acerca dos valores médios esperados foram atribuídas às interferências encontradas no conjunto de dados espectral, como ruído intenso e flutuações na linha de base, como também, a interferência de fundo, sendo esses efeitos muito mais pronunciados para as espécies *E. urophylla* e *E. grandis*.

Os mapas de concentração mostraram que holocelulose e a lignina variam entre as regiões anatômicas distintas e concordam com as funções das estruturas contempladas na área mapeada. Para a realização da análise exploratória da distribuição de holocelulose e lignina total, ficou evidente que a utilização da HIS-Raman é uma técnica viável e que pode trazer informações importantes para a caracterização química das espécies. Apesar do elevado custo de aquisição e manutenção do espectrômetro Raman de imagem, deve-se destacar que a importância do método proposto está em permitir a caracterização química em diferentes espécies florestais, com um curto intervalo de tempo e com o mínimo preparo de amostra para esse propósito.

CAPÍTULO 5

Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

5. IMAGEM HIPERESPECTRAL NIRS E MCR-ALS APLICADOS AO MAPEAMENTO QUÍMICO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MADEIRA

A técnica de imagem hiperespectral por espectroscopia na região do infravermelho próximo (HIS-NIRS, do inglês *Hyperspectral Image by Near Infrared Spectroscopy*) caracteriza-se como uma extensão da técnica convencionalmente aplicada. A HIS-NIRS fornece informações da distribuição espacial dos componentes químicos presentes na área mapeada e a aplicação em análise de madeira está diretamente relacionada com a capacidade de fornecer informações sobre os principais constituintes da amostra, com destaque para a holocelulose, lignina e extrativos. Devido à complexidade e a heterogeneidade da madeira, bandas de combinação geralmente encontram-se sobrepostas e são de difícil atribuição e identificação. Para solucionar esta limitação, a combinação da HIS-NIRS e a quimiometria podem permitir a extração das informações químicas presentes nos dados.

Diante do exposto, a segunda aplicação desta tese consistiu da utilização da HIS-NIRS e a ferramenta quimiométrica MCR-ALS para o estudo da distribuição de holocelulose, lignina total e extrativos nas espécies *E. grandis*, *E. urophylla*, *S. macrophylla* King e um híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis*, sendo estudados os planos: transversal que é a representação do corte perpendicular ao eixo do tronco da madeira, longitudinal radial que é exposto por meio de um corte paralelo aos raios e longitudinal tangencial que representa um corte tangenciando os anéis de crescimento ou perpendicular aos raios.

5.1 EXPERIMENTAL

5.1.1 Preparo dos corpos de prova para a aplicação da HIS-NIRS

Foram confeccionados dez corpos de prova com as dimensões de 1,0 cm x 1,5 cm x 0,5 cm (comprimento x largura x espessura, representado na Figura 40) e, com o auxílio de uma lâmina, realizou-se o acabamento das amostras para a obtenção de uma superfície lisa nos planos tangencial, transversal e radial.

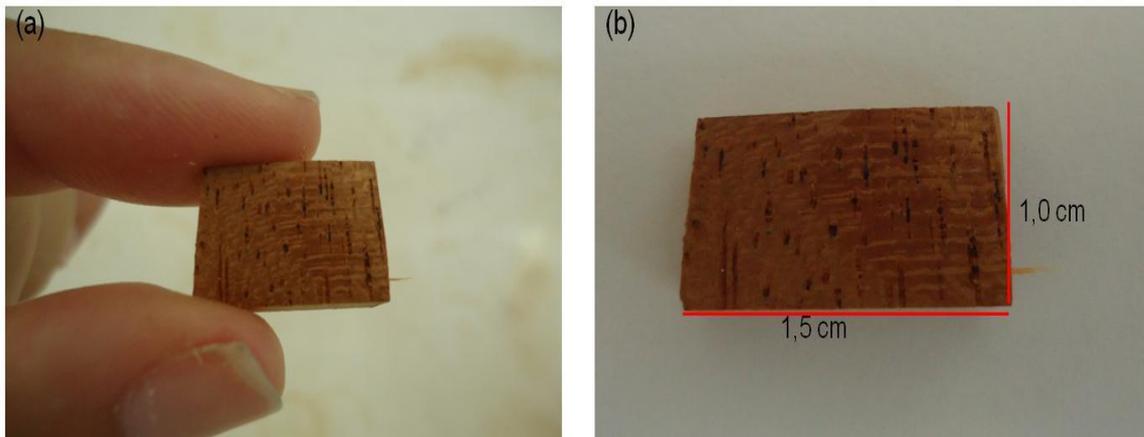


Figura 40. Ilustração dos corpos de prova (a) corte com lâmina, (b) corpo de prova com as dimensões 1,0 cm x 1,5 cm x 0,5 cm (comprimento x largura x espessura).

Após a confecção dos corpos de provas, foram selecionadas as amostras que não apresentavam imperfeições. Portanto, para a realização da varredura espectral, foi analisado um corpo de prova em cada plano (tangencial, transversal e radial), totalizando doze corpos de provas.

Os espectros NIRS das amostras foram obtidos com a utilização do espectrofotômetro modelo Spotlight 400 N acoplado ao sistema de imagem da marca PerkinElmer® (Figura 41). Antes de realizar as medidas espectroscópicas, fez-se necessária a medida do “branco”, incidindo-se radiação sobre uma peça metálica de ouro polido, que representa reflectância próxima de 100 %. Os dados espectrais obtidos no modo de reflectância foram convertidos posteriormente para $\log(1/R)$.

Cada corpo de prova foi fixado com uma fita dupla face em uma lâmina de microscopia e devidamente identificado, para posterior posicionamento no equipamento.



Figura 41. Spotligh 400 N acoplado ao sistema de imagem da marca PerkinElmer, (1) compartimento da óptica do microscópio, (2) posicionador de amostra, (3) espectrofotômetro NIRS e (4) controlador de posição.¹⁷⁶

Após o posicionamento da lâmina que continha a amostra no equipamento, os espectros foram obtidos em uma área de varredura da amostra com 4 mm^2 , tamanho do pixel de $25 \text{ }\mu\text{m}$, 32 varreduras por pixels na faixa espectral de 7800 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 8 cm^{-1} . O total de espectros obtidos por amostra foi 6400 espectros. O tempo de análise individual para obtenção dos espectros NIRS foi de 75 minutos para cada plano.

Além das análises das amostras, realizou-se a varredura espectral dos padrões de celulose e de lignina (marca: Sigma-Aldrich). Neste procedimento foi utilizado um porta amostra, no qual adicionou-se, separadamente uma pequena quantidade dos padrões, e este foi posicionado no equipamento. A área de varredura da celulose e da lignina foi de $0,25 \text{ mm}^2$ e tamanho do pixel de $50 \text{ }\mu\text{m}$. Foi realizada uma varredura na faixa espectral de 7800 a 4000 cm^{-1} , com a resolução de 8 cm^{-1} , no qual obteve-se um total de 100 espectros da celulose e 100 espectros da lignina, separadamente. O tempo de análise individual para obtenção dos espectros dos padrões de celulose e lignina foi de 15 minutos, individualmente.

5.1.2 Estimativas das concentrações

Para esta aplicação, foram utilizados os dados obtidos na caracterização química descritos nas etapas anteriores. A obtenção das estimativas das concentrações em cada pixel para holocelulose e lignina total foi realizada a partir da relação direta entre a média da concentração de holocelulose e lignina total, representada pelas Equações 20 e 21, respectivamente. O mesmo procedimento foi aplicado para todos os pixels, ou seja, para todo o conjunto espectral.

Neste estudo, também foi avaliado a distribuição dos extrativos, que foi dada por:

$$y_{extra,i} = (I_{extra,i} * \bar{y}_{extra}) / \bar{I}_{extra} \quad \text{Equação 22}$$

\bar{y}_{extra} = média dos extrativos obtido pelo método de referência (%),

$I_{extra,i}$ = intensidade relativa dos extrativos no pixel i (u.a),

\bar{I}_{extra} = intensidade relativa média dos extrativos (u.a).

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Identificação das estruturas anatômicas

As fotos da área de varredura espectral, nos planos tangencial, transversal e radial com um aumento de 10 x para as quatro espécies estudadas são apresentadas nas Figuras 42, 43 e 44, respectivamente.

No plano tangencial (Figura 42) é possível observar pequenos orifícios que representam o “topo dos raios” e também as linhas vasculares e a área com fibras.

5. Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

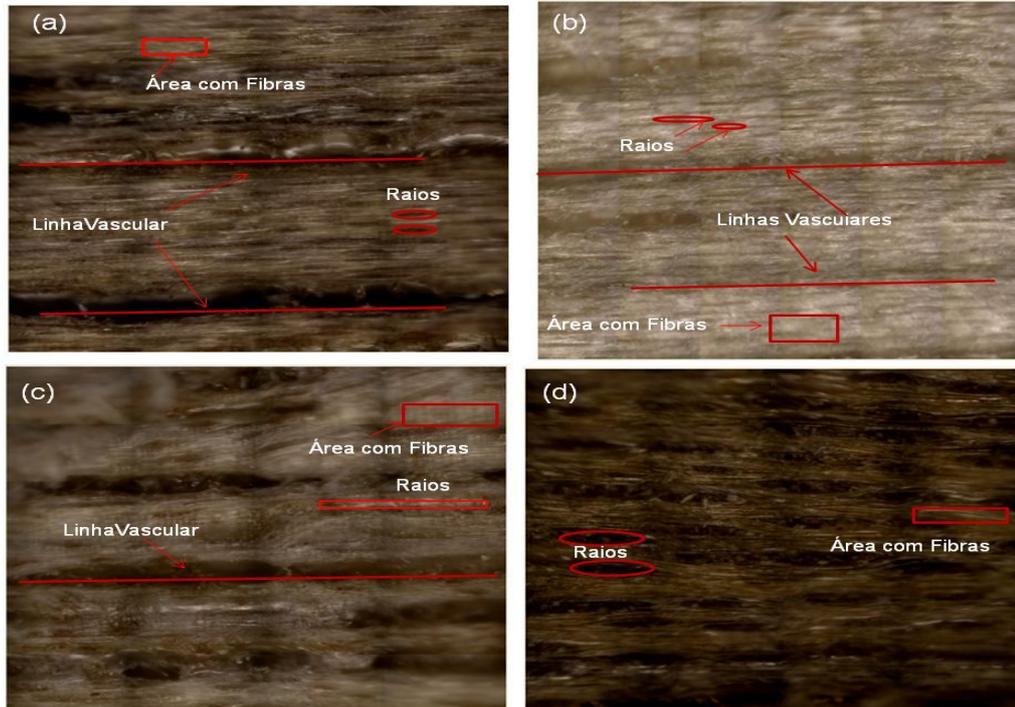


Figura 42. Fotos do plano tangencial das espécies (a) *E. grandis*, (b) híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis*, (c) *E. urophylla* e (d) *S. macrophylla* King.

No plano transversal (Figura 43), os vasos são visíveis como orifícios denominados poros, a parte mais escura representa a área com fibras e os raios aparecem como linhas estendidas.

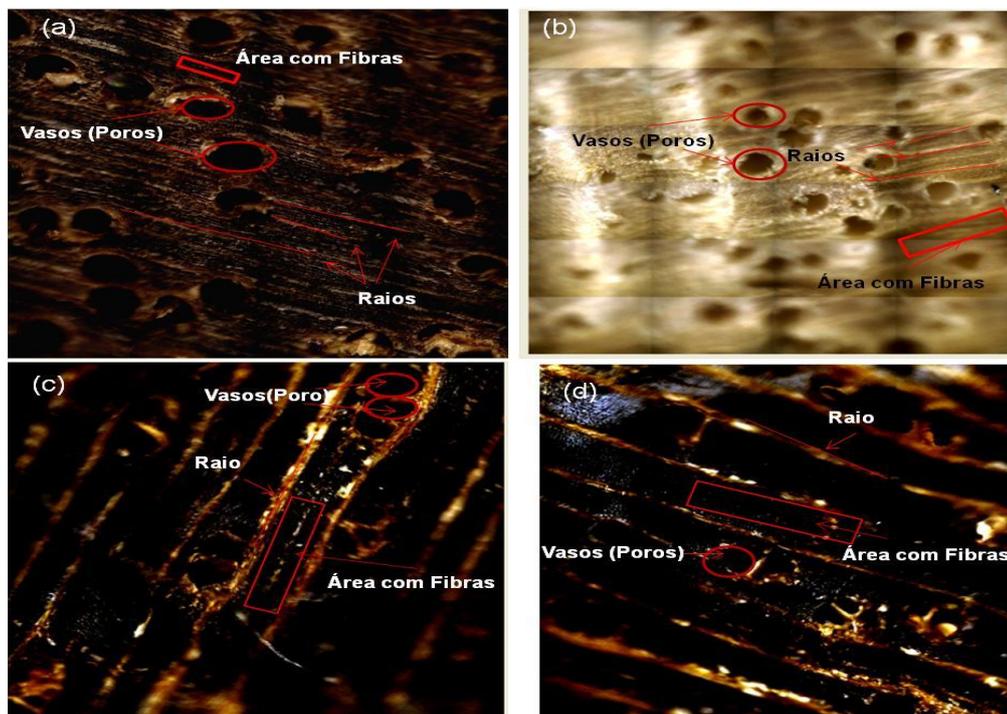


Figura 43. Fotos do plano transversal das espécies (a) *E. grandis*, (b) híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis*, (c) *E. urophylla* e (d) *S. macrophylla* King.

No plano radial (Figura 44) os raios são vistos no seu comprimento e ainda é possível observar a área com fibras e linhas vasculares.

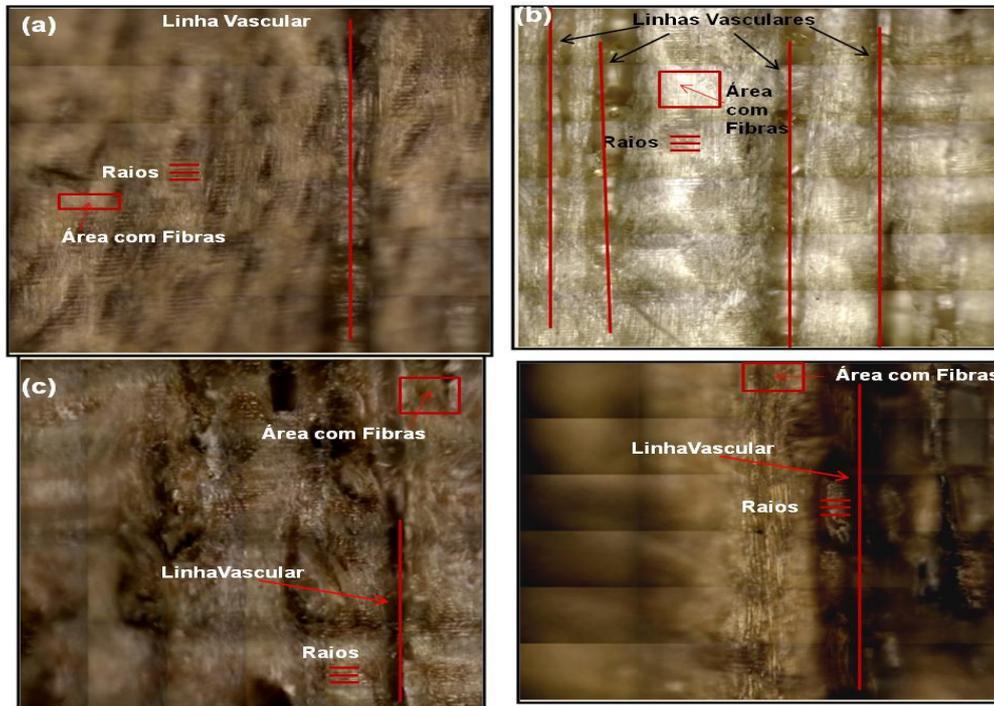


Figura 44. Fotos do plano radial das espécies (a) *E. grandis*, (b) híbrido de *E. urophylla* x *E.camaldulensis*, (c) *E. urophylla* e (d) *S. macrophylla* King.

É importante destacar que as fotos apresentadas nas Figuras 42, 43 e 44 foram obtidas diretamente nos corpos de prova. Contudo, não foi possível obter amostras perfeitamente planas, resultando em algumas irregularidades das superfícies, gerando imagens sem foco.

5.2.2 Pré-processamento dos dados iniciais

Antes da realização da análise por MCR-ALS, os dados espectrais iniciais foram pré-processados com a aplicação da primeira derivada pelo método de Savitzky-Golay, com janela de 15 pontos e polinômio de segunda ordem, na faixa espectral de 7800 a 4000 cm^{-1} , com a finalidade de reduzir fontes de variação, como o ruído e efeitos de deslocamento de linha de base. As Figuras 45 (a) e (b) apresentam os 6400 espectros obtidos para o híbrido de *E. urophylla* x *E.camaldulensis* no plano radial antes do pré-processamento e depois de aplicar a primeira derivada, respectivamente. Os dados espectrais das demais espécies nos

três planos analisadas tiveram aspecto semelhante ao apresentado na Figura 45, e não serão aqui apresentados.

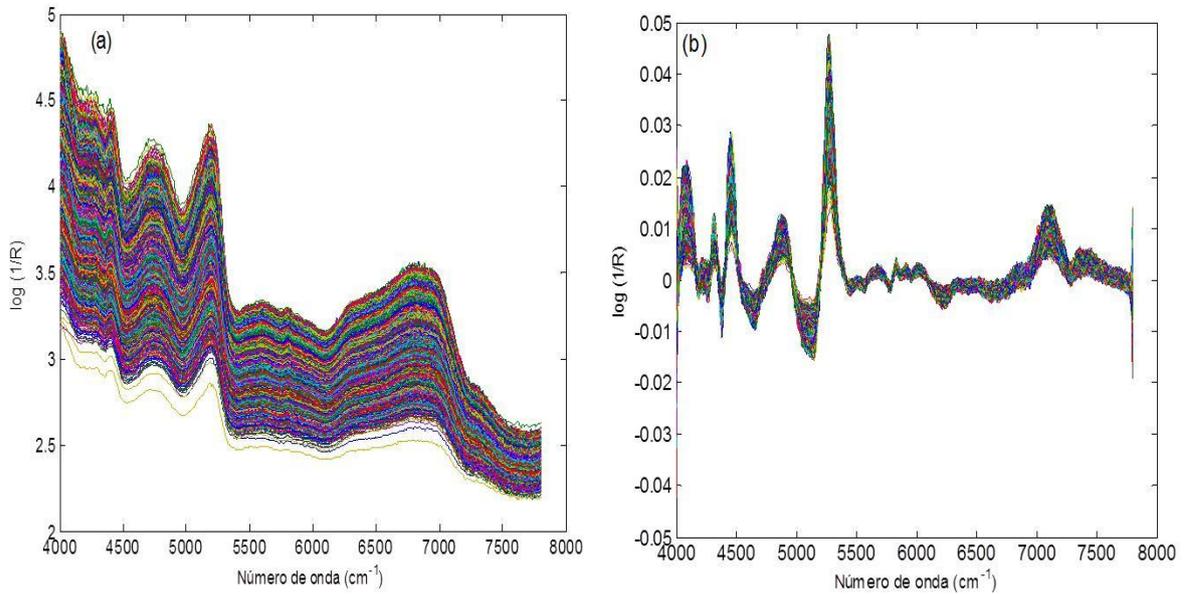


Figura 45. Espectros NIRS do híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis* no plano radial (a) antes da aplicação do pré-processamento, (b) após a aplicação da primeira derivada.

O mesmo procedimento foi realizado para os 100 espectros obtidos com o padrão da celulose (Figuras 46 a e b) e para o padrão de lignina (Figuras 47 a e b), respectivamente.

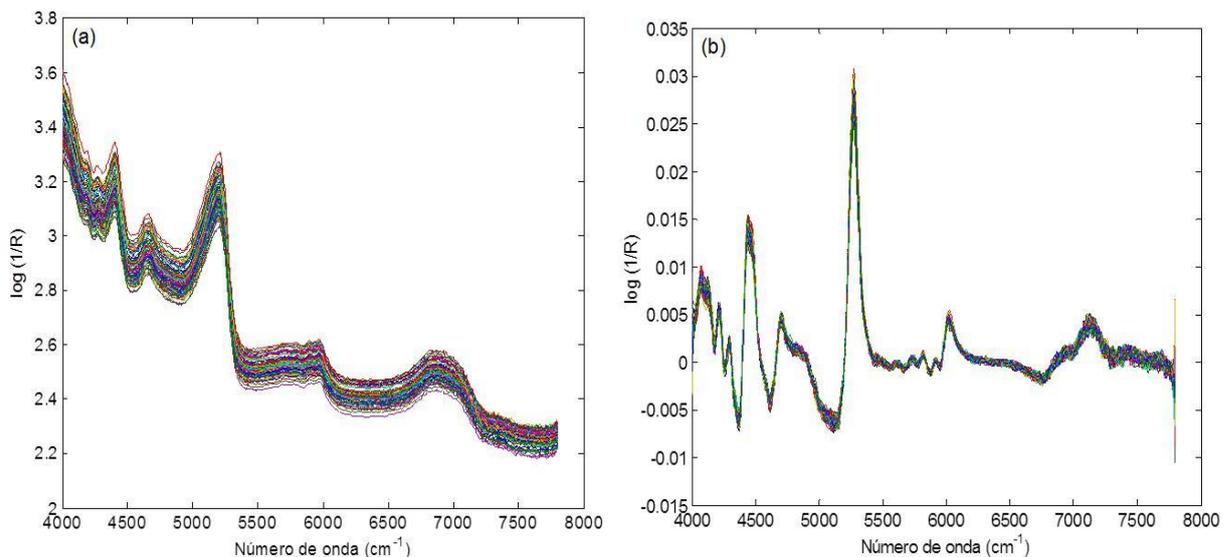


Figura 46. Espectros NIRS do padrão de celulose (a) antes da aplicação do pré-processamento, (b) após a aplicação da primeira derivada.

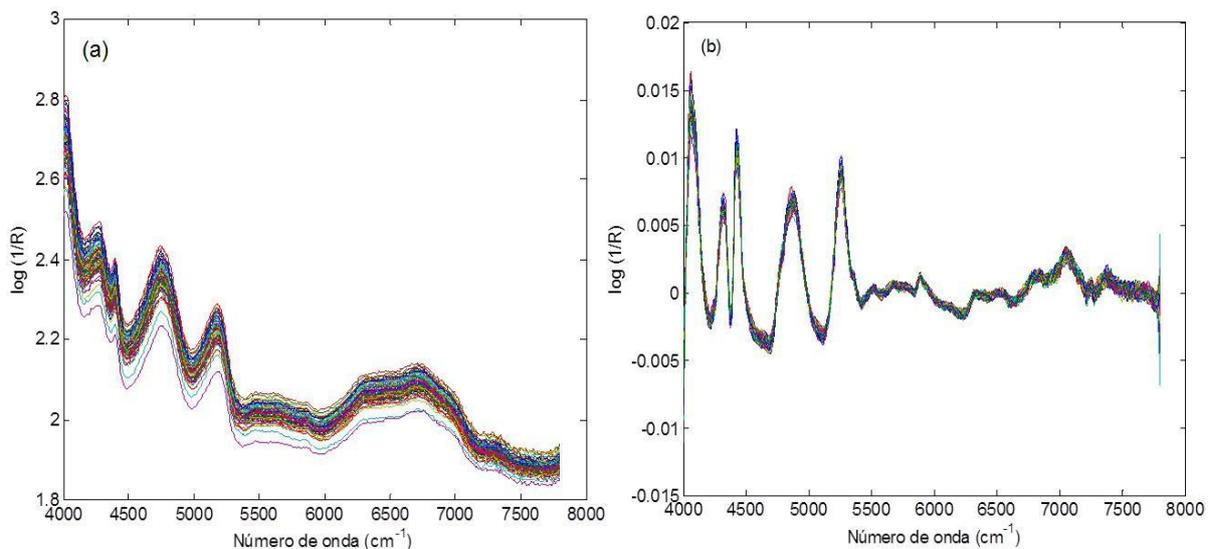


Figura 47. Espectros NIRS do padrão de lignina (a) antes da aplicação do pré-processamento, (b) após a aplicação da primeira derivada.

A observação das Figuras 45, 46 e 47 demonstra que a aplicação da primeira derivada aos dados iniciais corrige os efeitos aditivos e o deslocamento da linha de base. A aplicação deste pré-processamento permitiu uma melhor diferenciação dos espectros dos componentes na faixa espectral de 4000 cm^{-1} a 6000 cm^{-1} , o que colaborou com a identificação das bandas específicas da celulose, hemicelulose, lignina e extrativos.

5.2.3 Análise dos dados por MCR-ALS com seleção da região espectral

A partir da visualização dos dados espectrais pré-processados, a faixa espectral selecionada para análise por MCR-ALS foi entre 4000 cm^{-1} a 6000 cm^{-1} (551 variáveis). Conforme observado nas Figuras 45, 46 e 47, os espectros NIRS para o híbrido de *E. urophylla* x *E.camaldulensis*, padrão de celulose e lignina, respectivamente, apresentam bandas semelhantes em regiões relativamente próximas. Tal fato poderia limitar a convergência do modelo, devido à presença de vários constituintes na madeira e de bandas sobrepostas. Para solucionar o problema de ambiguidade rotacional, foi adotada a estratégia da matriz aumentada. O procedimento foi realizado a partir da inserção dos 100 espectros pré-processados de celulose e de lignina à matriz de dados dos espectros da espécie em questão, resultando numa matriz com total de 6600 espectros, conforme ilustrado na Figura 48. Ressalta-se que este procedimento foi realizado para todas

as espécies estudadas e teve a finalidade de utilizar a matriz aumentada para auxiliar na recuperação dos espectros e na obtenção dos mapas de concentração, diminuindo a ambiguidade rotacional, consequentemente, possibilitando obter estimativas mais confiáveis.

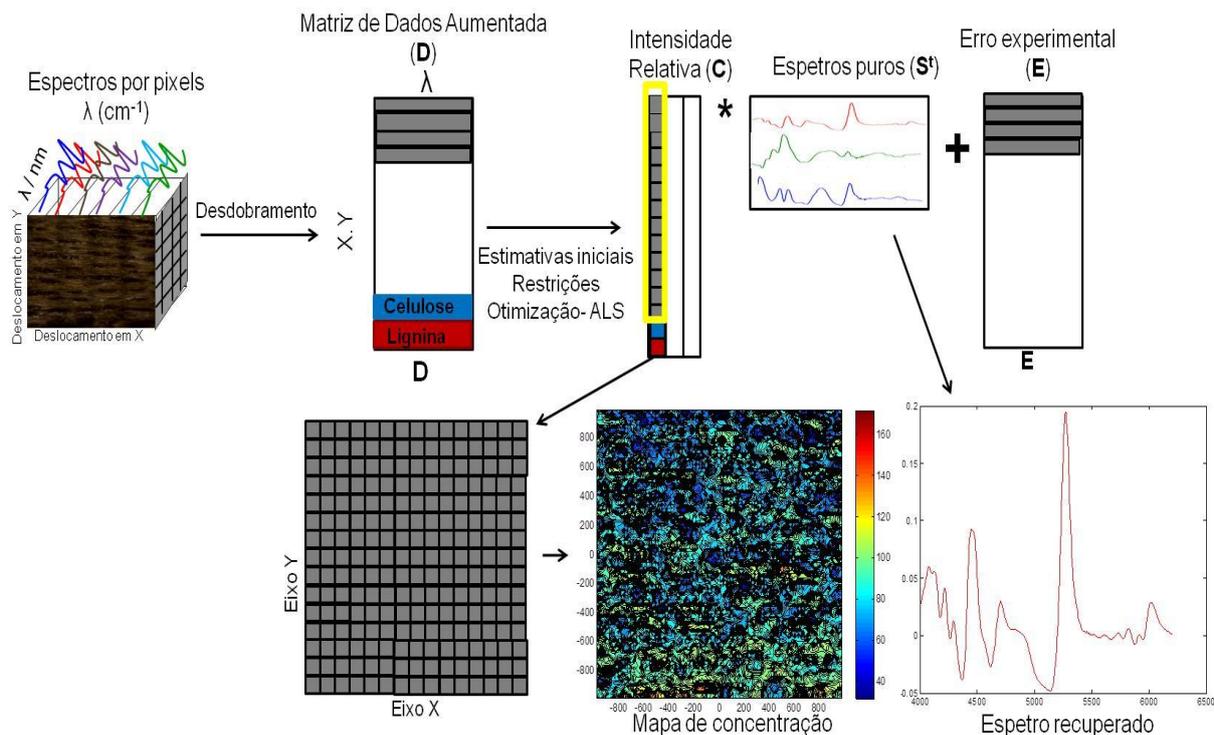


Figura 48. Representação esquemática do MCR-ALS aplicado aos dados de espectroscopia de imagem com matriz aumentada, na qual a cor cinza corresponde aos 6400 espectros das espécies estudadas, a cor azul e a cor vermelha representam os 100 espectros de celulose e lignina, respectivamente, adicionados à matriz.

Para este estudo, a seleção do número apropriado de componentes presentes na matriz, ou seja, a estimativa do posto da matriz foi feita por meio da porcentagem de variância explicada por decomposição em valores singulares (SVD), sendo escolhidos três componentes. Tal escolha foi motivada pela presença dos três principais componentes da madeira, ou seja, visou-se obter as estimativas referentes à holocelulose, lignina e extrativos. Para determinação das estimativas iniciais, foi adotada a rotina “*pure*”.

A otimização do modelo pelo algoritmo ALS ocorreu com a utilização da restrição de não negatividade apenas no perfil da concentração, porque as

derivadas dos espectros (Figuras 45 b, 46 b e 47 b) possuem sinais positivos e negativos, e a aplicação desta restrição no perfil espectral impediria a convergência do modelo.

Também foi utilizada a restrição de igualdade no perfil de concentração (do inglês *equality for concentration profiles*), que apresenta seletividade e informações de posto local sobre a concentração dos diferentes componentes. Esta restrição é utilizada quando se tem conhecimento prévio dos componentes presentes ou ausentes na amostra e o algoritmo ALS fornece a estimativa final dos espectros puros correspondentes e suas possíveis adaptações a pequenas mudanças espectrais em comparação com espectros de referência, o que permite a flexibilidade para a otimização do algoritmo ALS.^{130,141,177,178} A Figura 49 apresenta o fluxograma das etapas envolvidas na análise por MCR para a matriz aumentada.

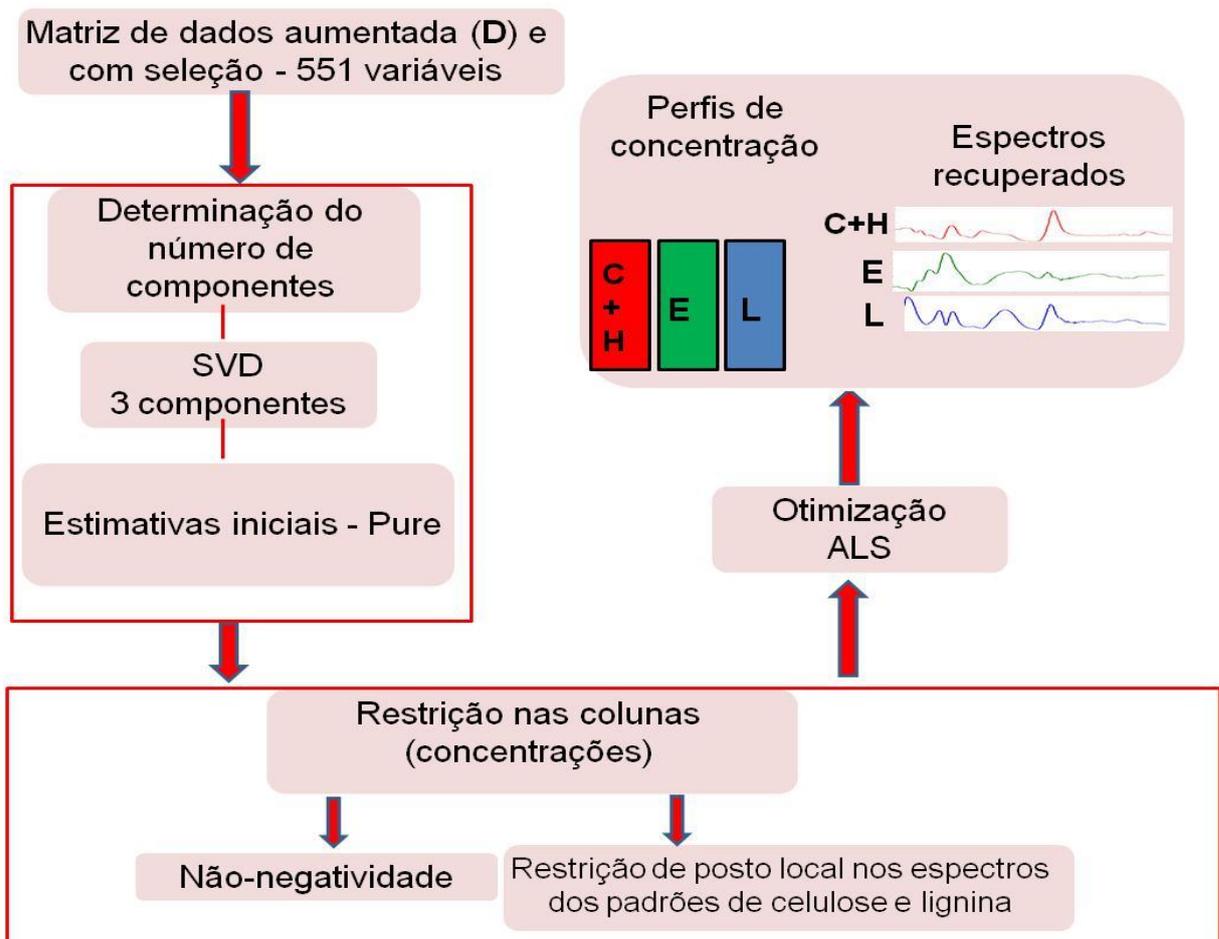


Figura 49. Etapas para a realização da análise por MCR-ALS com seleção de região espectral e matriz aumentada.

5. Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

Por meio do algoritmo ALS foram recuperados os espectros, referentes aos principais componentes presentes. Primeiramente, na Figura 50 são apresentados os perfis espectrais nos três planos com a identificação de bandas relativas à celulose e à hemicelulose, conforme tabelas de atribuições publicadas em trabalhos já descritos na literatura.^{6,14,179-181}

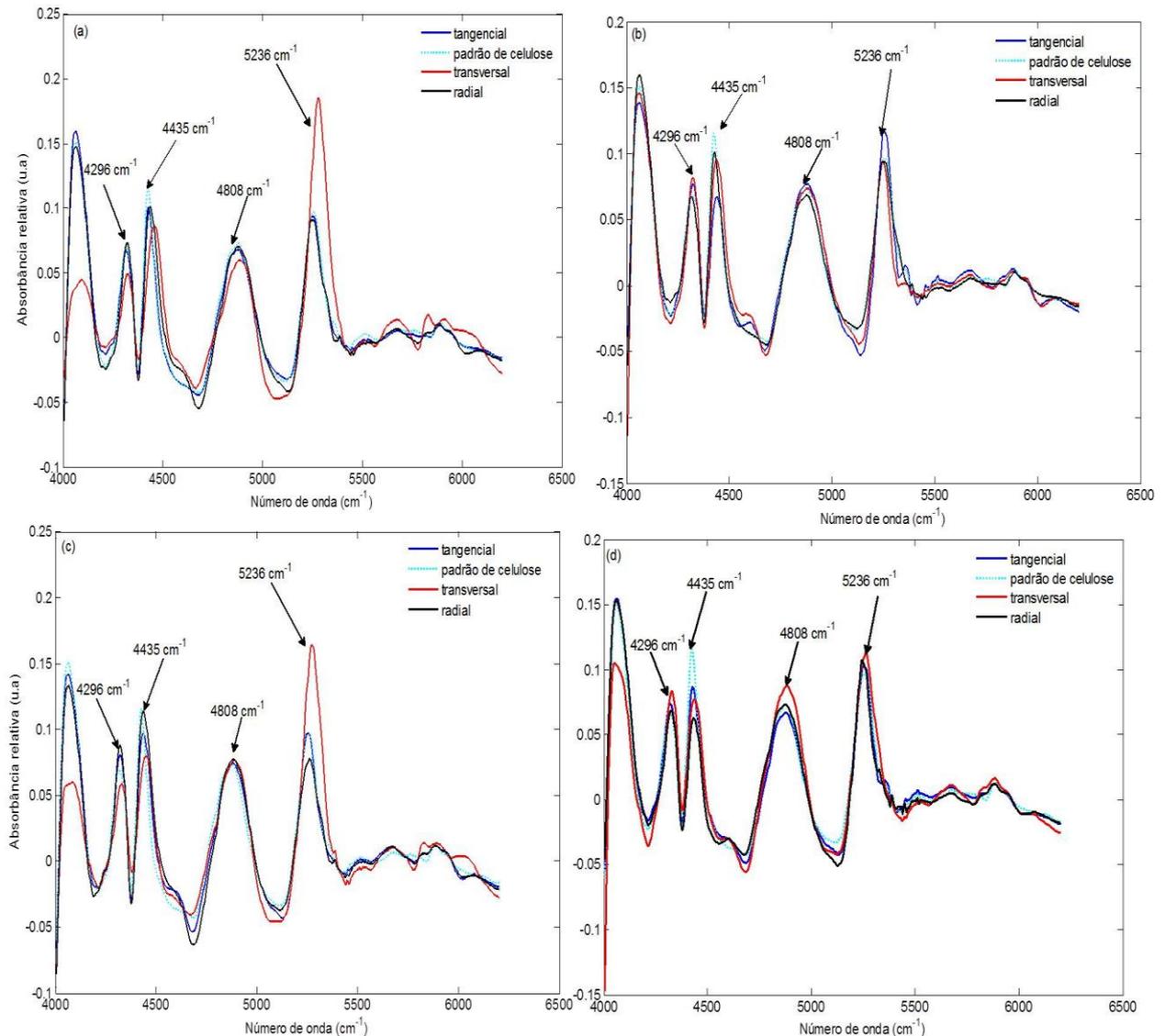


Figura 50. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS da celulose e hemicelulose (a) *E. grandis*, (b) híbrido de *E. urophylla* x *E.camaldulensis*, (c) *E.urophylla*, (d) *S. macrophylla* King, (---) padrão de celulose, (—) tangencial, (—) transversal e (—) radial.

Os espectros recuperados (Figuras 50 a, b, c, d) apresentam um perfil semelhante nos planos tangencial, transversal e radial e a Tabela 10 traz a descrição das bandas de combinação observadas na Figura 50.

Tabela 10. Descrição das bandas observadas na Figura 50.

Localização da banda (cm ⁻¹)	Componente	Descrição
4296	Hemicelulose	Bandas de combinação de estiramento e de deformação das ligações C-H. ⁶
4435	Região com a ocorrência da sobreposição das bandas dos principais componentes presentes na madeira	Bandas de combinação de estiramento das ligações O-H e C-O. ⁶
4808	Celulose	Bandas de combinação de estiramento das ligações O-H e C-H. ^{6,14}
5236	Hemicelulose	Bandas de combinação de estiramento das ligações C=O. ⁶

Com relação à lignina, os espectros recuperados são apresentados na Figura 51, na qual também foi possível observar bandas semelhantes nos três planos estudados e Tabela 11 traz a descrição das bandas de combinação.

5. Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

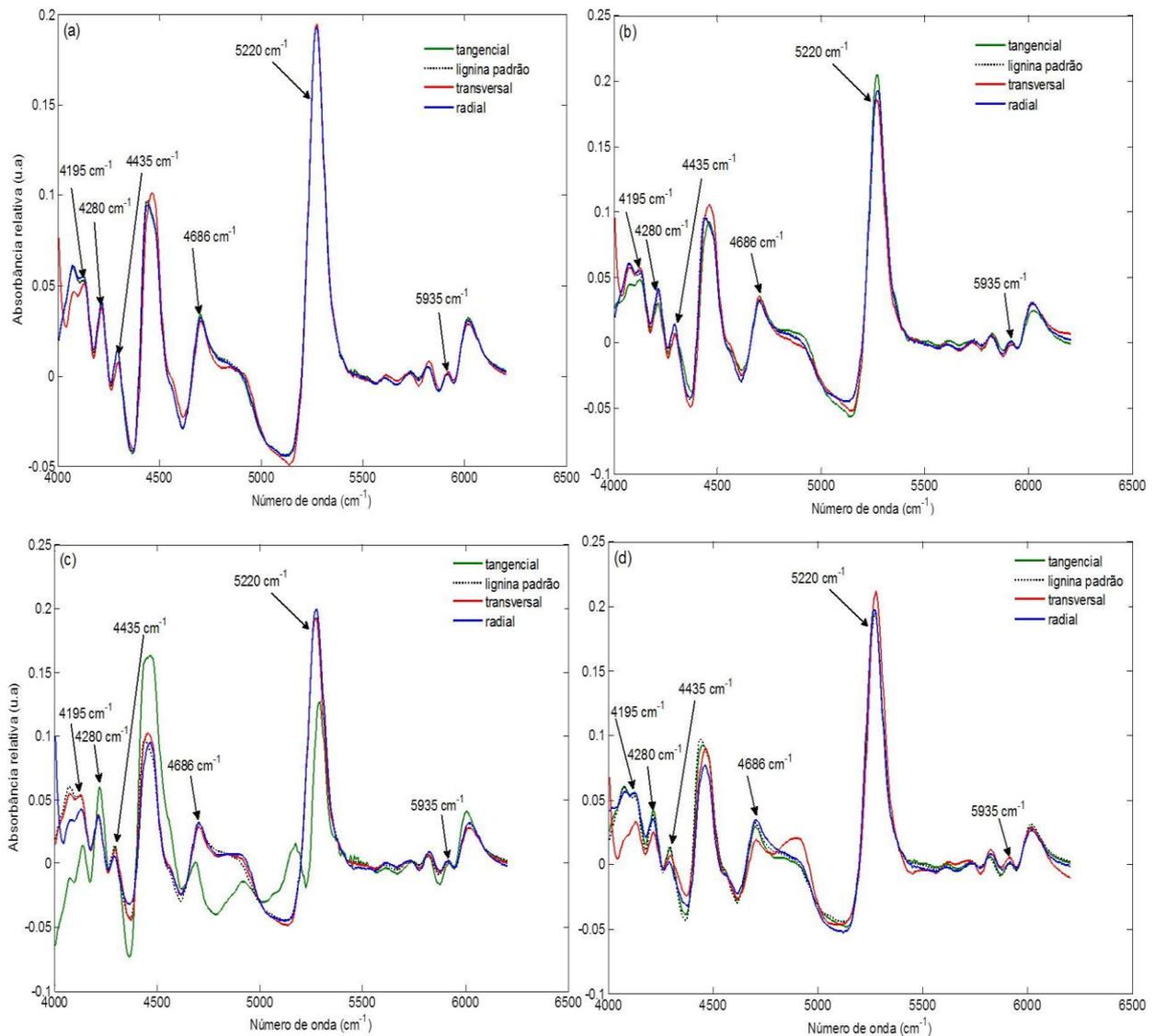


Figura 51. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS da lignina (a) *E. grandis*, (b) híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis*, (c) *E. urophylla*, (d) *S. macrophylla* King, (----) lignina padrão, (—) tangencial, (—) transversal e (—) radial.

Tabela 11. Descrição das bandas observadas na Figura 51.

Localização da banda (cm ⁻¹)	Componente	Descrição
4195	Lignina	Banda de combinação de estiramento das ligações C-H, C-O e O-H presente nos alcoóis primários. ^{6,14}
4280	Lignina	Banda de combinação da ligação C-H e deformação da ligação C-H ₂ . ^{6,14}
4435	Região com a ocorrência da sobreposição das bandas dos principais componentes presentes na madeira	Banda de combinação de estiramento das ligações O-H e C-H. ^{6,14}
4696	Lignina e extrativos	Banda de combinação de deformação das ligações C-H e C=C. ⁶
5220	Água	Banda de combinação de estiramento assimétrico e deformação da ligação O-H. ^{6,14,180,181}
5935	Lignina extrativos	Banda de combinação de vibração do grupo carbonila, acetil carbonila e banda de estiramento do primeiro sobretom correlacionado ao esqueleto aromático da lignina. ^{6,14,179}

Por fim, para a identificação dos extrativos, os espectros recuperados (Figuras 52 a, b, c, d) também apresentaram bandas intensas na faixa espectral entre 4000 cm⁻¹ a 6000 cm⁻¹ nos planos tangencial, transversal e radial (Tabela 12).

5. Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

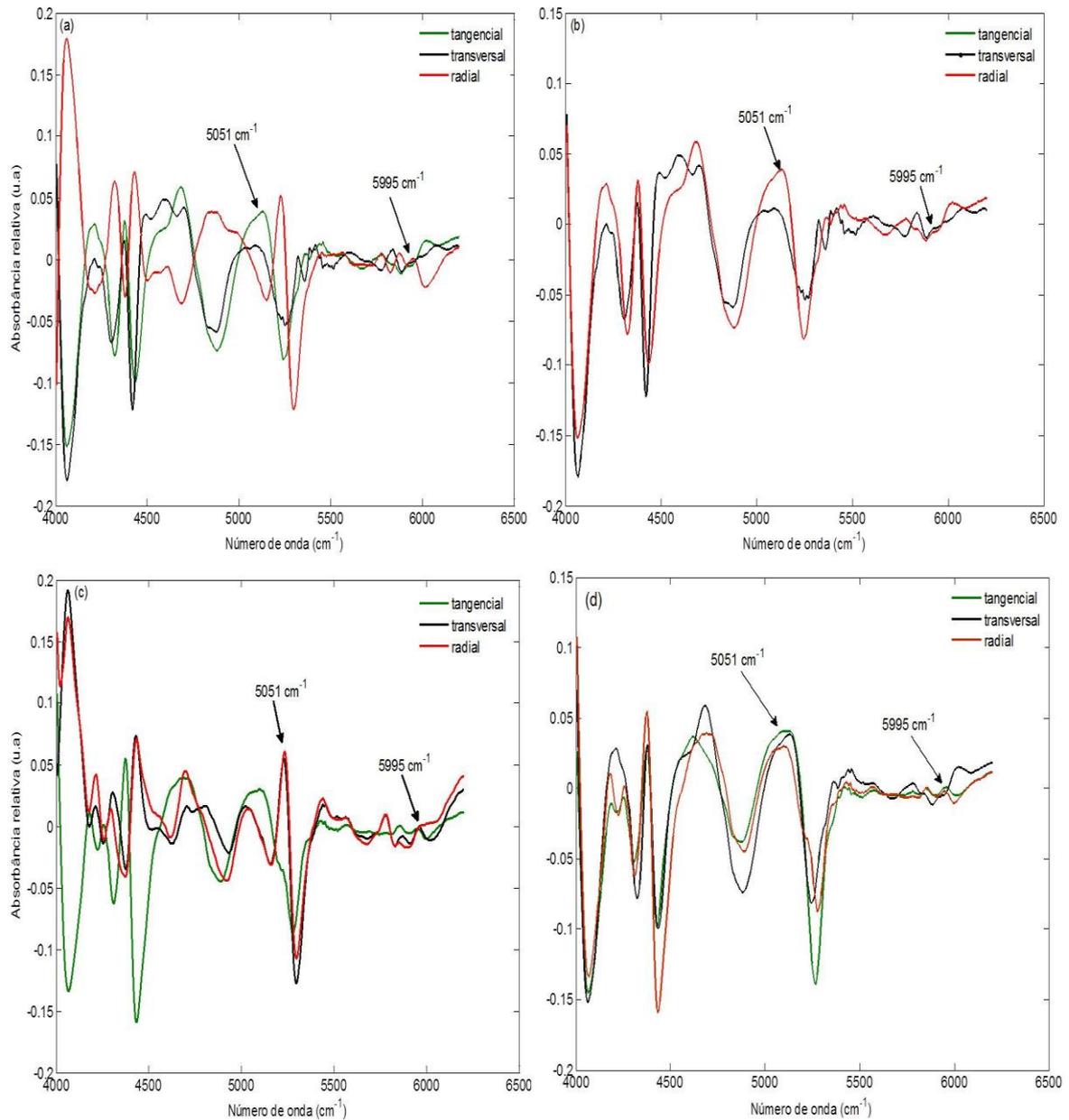


Figura 52. Perfil dos espectros recuperados pelo MCR-ALS dos extrativos (a) *E. grandis*, (b) híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis*, (c) *E. urophylla*, (d) *S. macrophylla* King, (---) lignina padrão, (—) tangencial, (—) transversal e (—) radial.

Tabela 12. Descrição das bandas observadas na Figura 52.

Localização da banda (cm ⁻¹)	Componente	Descrição
5051	Água	Banda de combinação de deformação e estiramento das ligações O-H. ^{6,14,180,181}
5995	Extrativos	Primeiro sobretom da banda de estiramento da ligação C-H presente em aromáticos. ^{6,14,179}

Observa-se nas Figuras 52 (a, b, c, d) que existe uma variação nos espectros recuperados pelo MCR-ALS. Justifica-se esta diferença devido aos extrativos compreenderem uma ampla classe de compostos químicos e sua quantidade e composição é variável entre diferentes espécies de madeira e também dentro das diferentes partes da árvore.

Conforme demonstrado, os espectros recuperados apresentam inúmeras bandas que permitiram a identificação dos principais componentes, sendo ricos em informações. Contudo, observa-se que a faixa espectral avaliada apresenta bandas muitas vezes sobrepostas, podendo ter ocorrido a mistura dos componentes que não puderam ser resolvidos pelo MCR-ALS.

5.2.4 Estimativas das concentrações de holocelulose, lignina total e extrativos por MCR-ALS

5.2.4.1 *E.grandis* nos planos tangencial, transversal e radial.

Depois de realizada a identificação das bandas específicas de celulose, hemicelulose, lignina e extrativos, procedeu-se com a obtenção das estimativas das concentrações em cada pixel, que foi realizada a partir da relação direta entre a média da concentração de holocelulose (celulose + hemicelulose), lignina total e extrativos, obtida pelo método de referência (descrito nas seções anteriores) e a intensidade relativa média estimada para cada composto pelo MCR-ALS com seleção da região espectral (média da intensidade relativa de todos os pixels do mapa de concentração de cada constituinte).

5. Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

A Figura 53 ilustra os mapas de distribuição das concentrações obtidas pelo método MCR-ALS e os histogramas do *E. grandis* no plano tangencial para (a-d) holocelulose, (b-e) lignina e (c-f) extrativos, respectivamente. Foi possível visualizar linhas vasculares e as fibras em toda a extensão da área de varredura e os raios são observados como pequenos pontos na direção perpendicular.

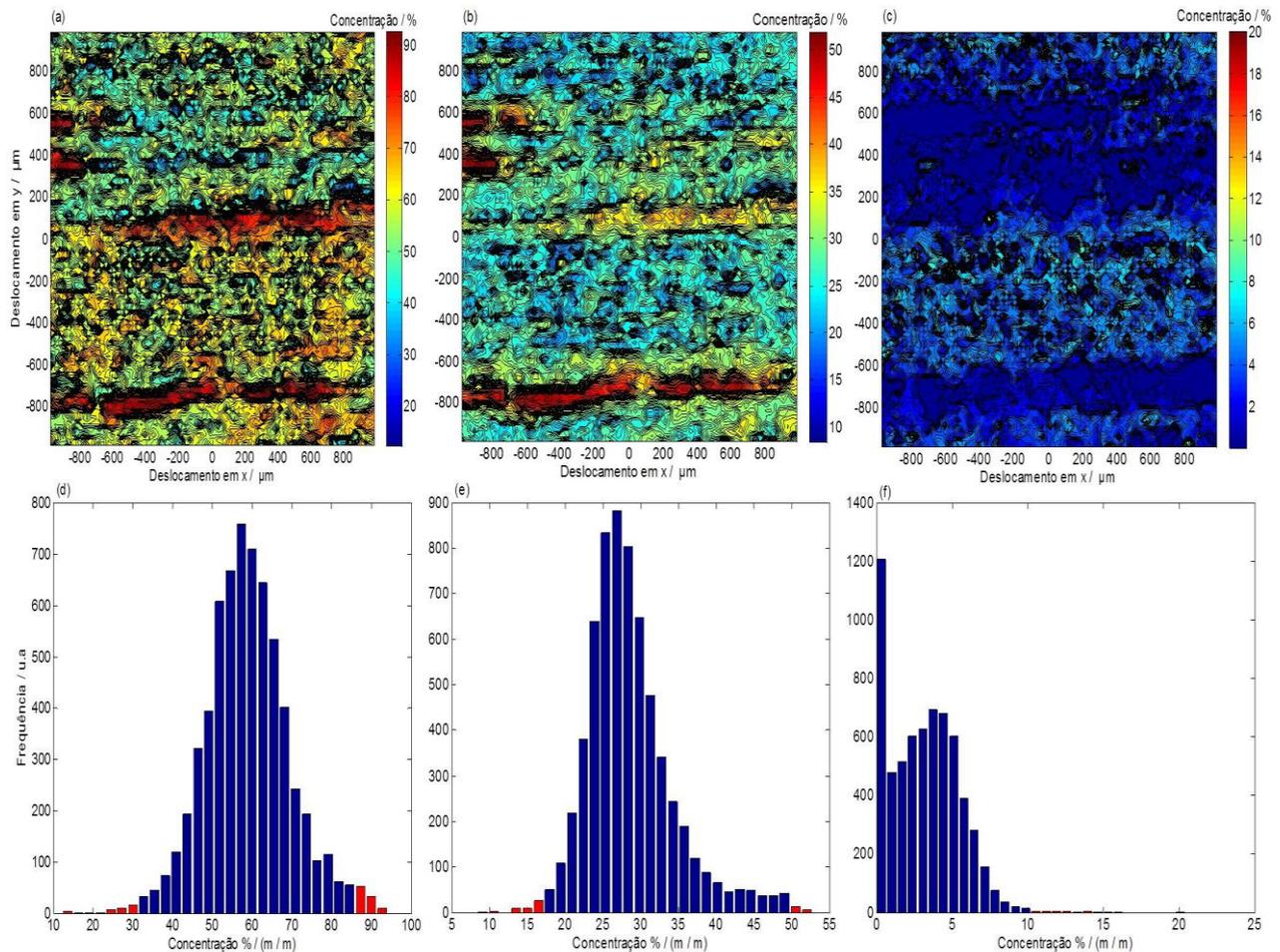


Figura 53. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o *E. grandis* no plano tangencial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.

As Figuras 53 (a e d) representam o mapa de distribuição para a holocelulose e seu respectivo histograma. As porcentagens variaram entre 12 % a 94 %, sendo observados nas linhas vasculares os pixels com maiores valores de concentração. Com a exclusão do percentil de 0,5 % do lado direito do histograma (Figura 53 d), poucos pixels apresentam valores estimados com concentrações em torno de 94 %. Da mesma forma, com a exclusão dos percentis do lado esquerdo, apenas 0,5 % dos valores possuem concentrações em torno de 12 %. Quando excluídos os percentis de ambos os lados da distribuição, os quais correspondem a um intervalo de confiança de 99,0 %, a faixa de concentração para a holocelulose foi de 33 % a 87 %, o que indica que este componente encontra-se distribuído por toda a região mapeada. A exclusão dos percentis também foi realizada para a lignina e para os extrativos (Figuras 53 e, f), que tiveram faixas de concentrações entre 18 % a 49 % e 0,5 % a 9,9 %, respectivamente, na maioria dos pixels. Analogamente à holocelulose, estes componentes apresentaram as maiores concentrações nas linhas vasculares, que são estruturas anatômicas visualizadas no seu comprimento longitudinal.²⁴

A mesma análise foi realizada para os planos transversal e radial, em que a Figuras 54 (a, b, c) e Figuras 55 (a, b, c) representam os mapas de concentração e (d,e, f) os histogramas para a holocelulose, lignina e extrativos, respectivamente.

5. Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

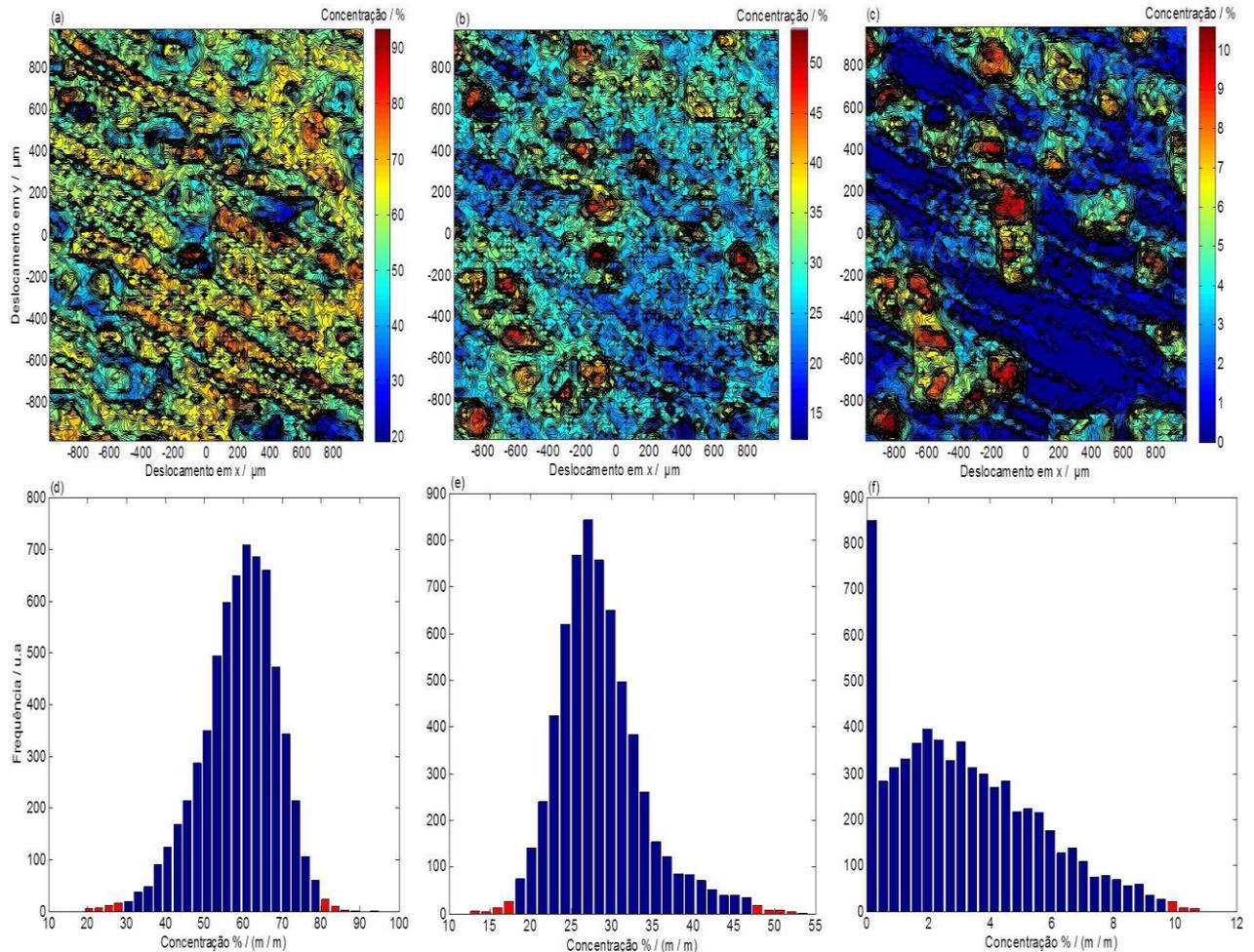


Figura 54. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o *E. grandis* no plano transversal (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.

O plano transversal é a direção que proporciona uma maior visibilidade dos elementos anatômicos da madeira e nos mapas de concentração obtidos foi possível identificar os vasos (poros), as fibras e os raios como linhas estendidas. Os vasos são conjuntos (normalmente axiais) de células sobrepostas, formando uma estrutura tubiforme contínua, de comprimento indeterminado, que tem por função a condução ascendente de líquidos na árvore, e podem encontrar-se vazios ou preenchidos por substâncias, inclusive celulose, lignina e extrativos.^{2,24} As maiores concentrações de holocelulose, lignina total e extrativos foram observadas nos vasos, o que corrobora com as afirmativas apresentadas. Após a exclusão dos percentis de 0,5 % de cada lado nos histogramas, foram obtidas as variações de 30 % a 78,5 %, 19 % a 46,5 % e 0,2 % a 9,6 % para holocelulose, lignina e extrativos, respectivamente. Com relação à distribuição de holocelulose, observa-se a sua presença em toda a região mapeada, com concentração entre 50 % a 70 % nas fibras e nos raios. Da mesma

5. Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

forma, a lignina e os extrativos apresentaram teores entre 20 % a 35 % e de 2 % a 6 %. Estas observações estabelecem uma concordância com as estruturas anatômicas, pois as fibras são definidas como tecido de sustentação e são formadas pela deposição de lignina e outras substâncias como a celulose e componentes fibrilares e os raios têm a função de reserva de alimentos.²⁴

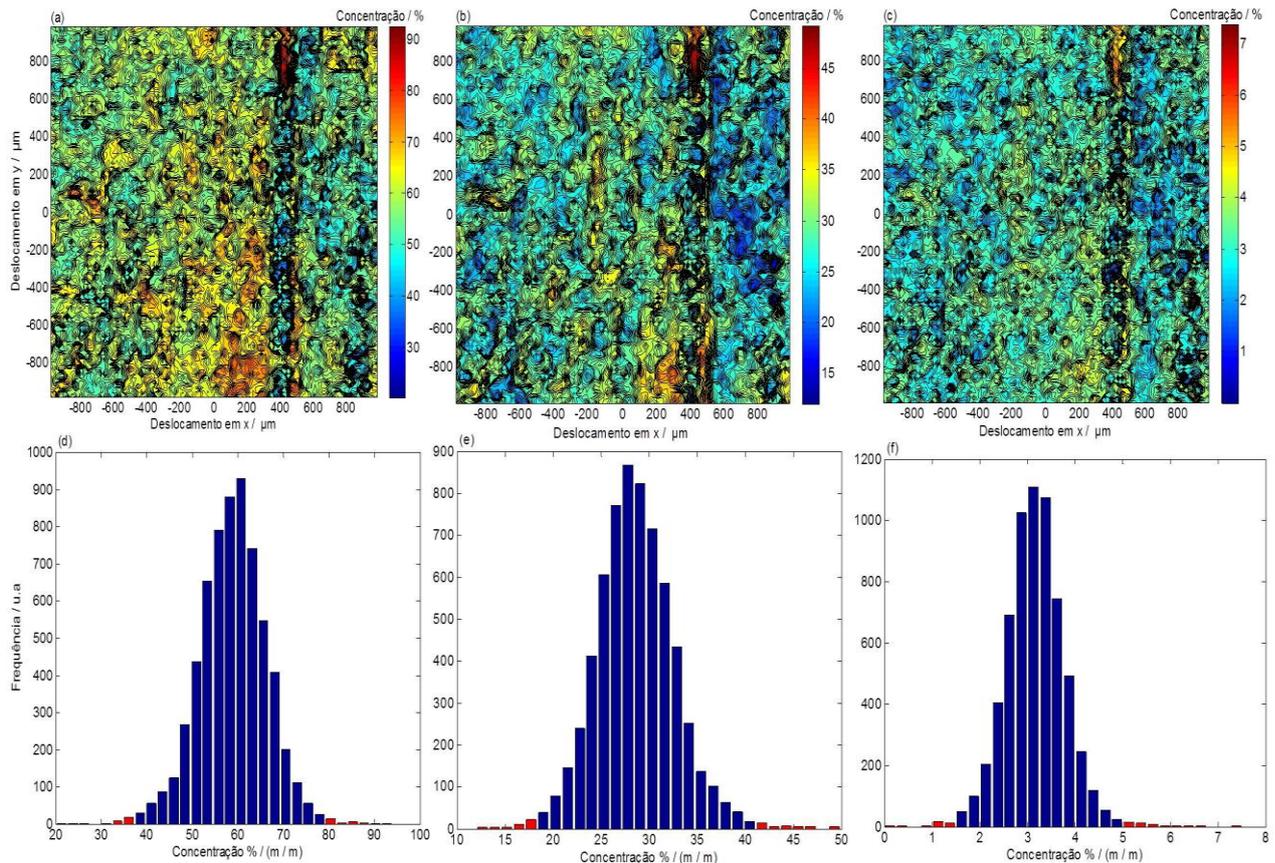


Figura 55. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o *E. grandis* no plano radial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.

No plano radial (Figura 55), a área de varredura contemplou as estruturas anatômicas dos raios (no sentido do comprimento), as fibras e linhas vasculares. Foram observados alguns pixels com valores superiores a 90 %, 45 % e 7 % para holocelulose, lignina total e extrativos, respectivamente. Contudo, após a exclusão dos percentis de cada lado dos histogramas, os valores de concentração variaram

entre 38 % a 78 %, 19 % a 40,5 % e 1,7 % a 4,9 % para um intervalo confiança de 99 %, respectivamente.

5.2.4.2 Híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis* nos planos tangencial, transversal e radial.

Foram realizados os mesmos procedimentos para a construção das imagens para o híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis* nas nos três planos estudados, bem como, para o *E. urophylla* e para o *S. macrophylla* King, que serão apresentados nas seções 5.2.4.3 e 5.2.4.4. A Figura 56 ilustra os mapas de distribuição das concentrações obtidos pelo método MCR-ALS e os histogramas do híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis* no plano tangencial para (a, d) holocelulose, (b, e) lignina e (c, f) extrativos, respectivamente.

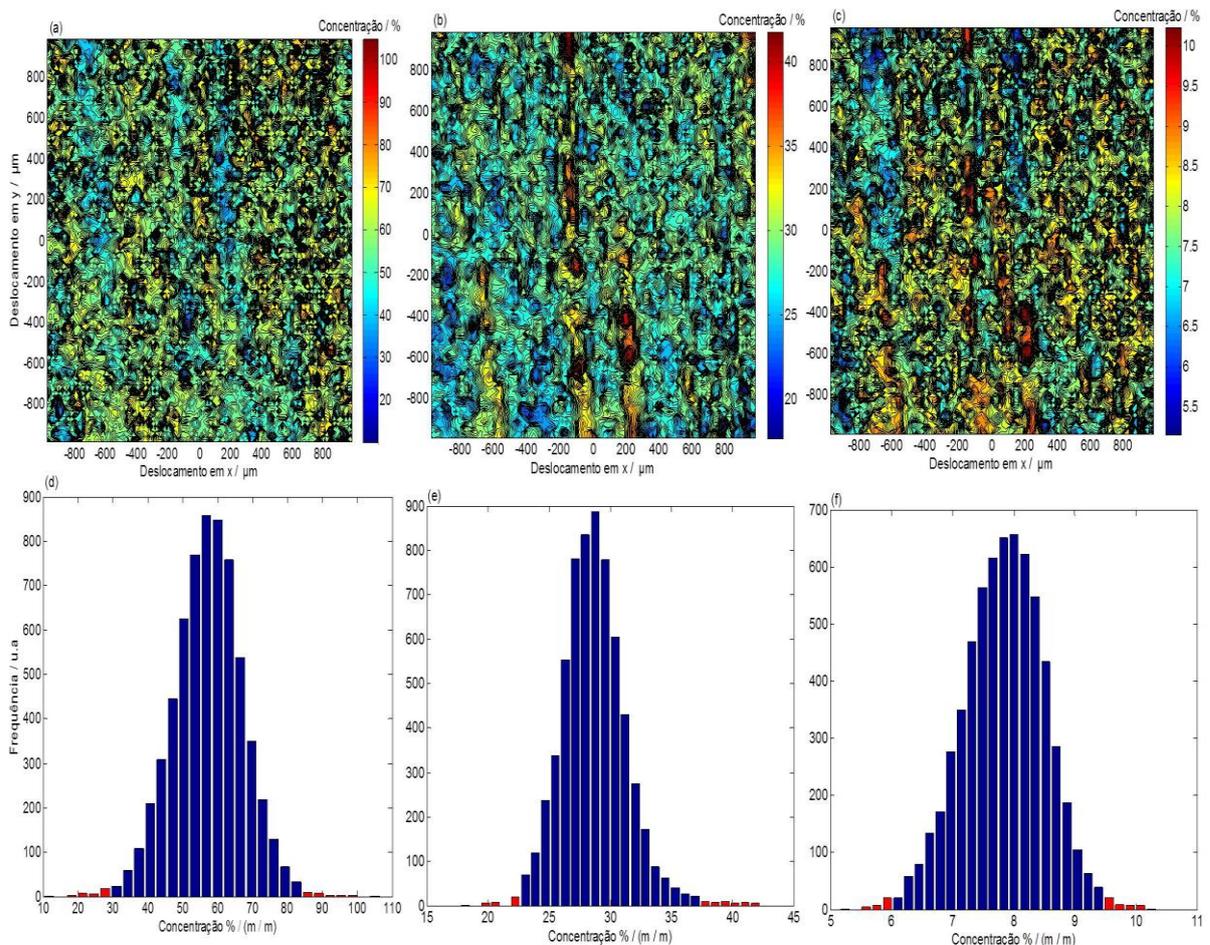


Figura 56. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis* no plano tangencial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.

O mapa de concentração para holocelulose e o histograma (Figuras 56 a, d) apresentam valores entre 20 % e superiores a 100 % localizados na linha vascular. No entanto, valores acima de 100 % são observados apenas em alguns pixels e com a exclusão dos percentis de 0,5 % de cada lado, esta variação passa a ser de 31 % a 89 % para a holocelulose. Aspecto similar é visualizado no mapa de concentração e histograma para a lignina total (Figuras 57 b, e) e extrativos (Figuras 57 c, f) em que houve a variação (após a exclusão dos percentis de 0,5 % de cada lado) de 23 % a 36 % e 6,3 % a 9,2% para a lignina total e extrativos, respectivamente. Para os planos transversal e radial, os mapas de concentração e histogramas são apresentados nas Figuras 57 (a, b, c, d, e, f) e 58 (a, b, c, d, e, f), respectivamente.

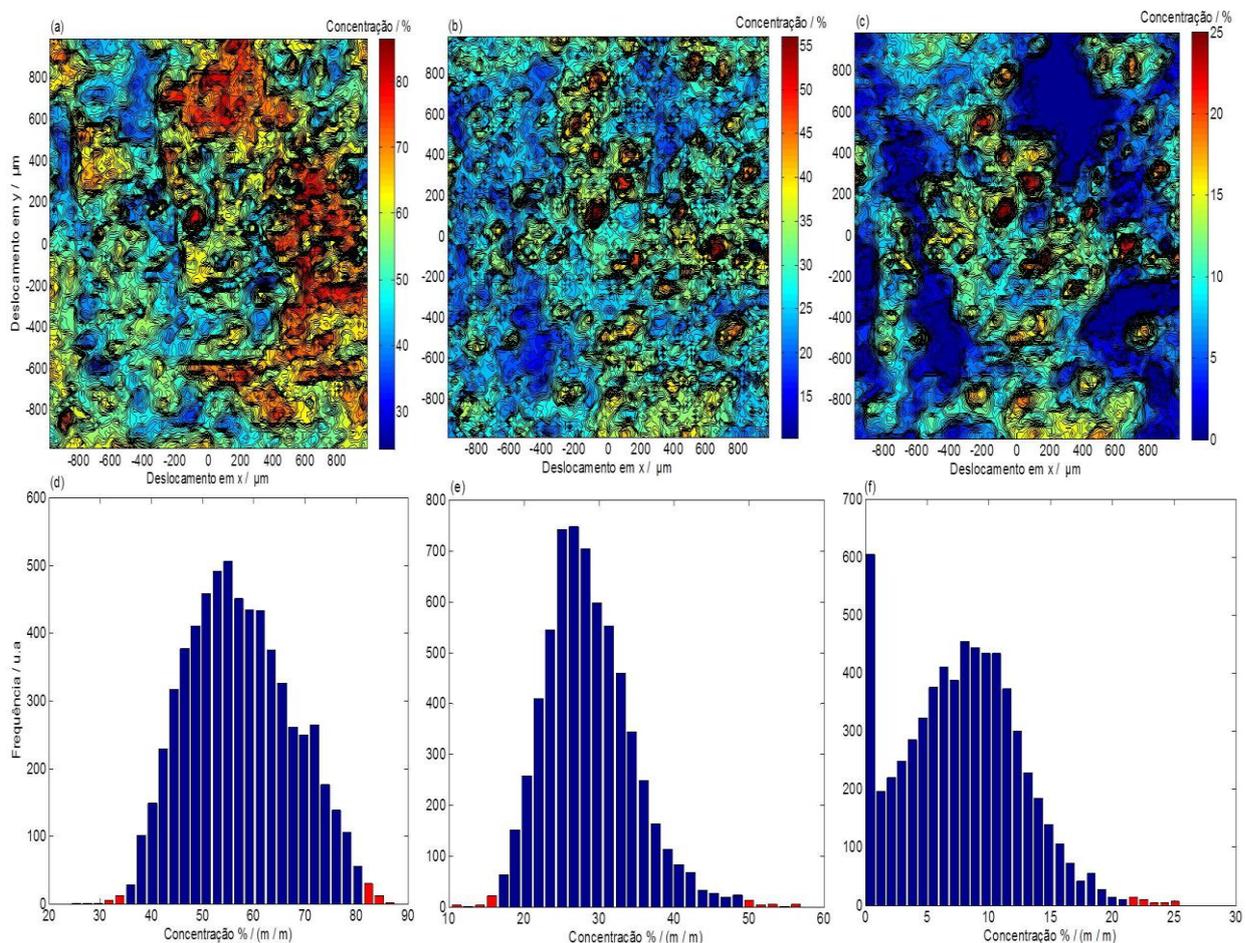


Figura 57. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis* no plano transversal (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.

5. Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

No plano transversal, os pixels que apresentaram os maiores valores de concentração para os componentes estudados estão localizados nos vasos (poros). Nas fibras e nos raios tem-se a distribuição em toda área mapeada destes componentes, com variações após a exclusão dos percentis de 0,5 % de cada lado entre 38 % a 80 %, 17 % a 47 % e 0,5 a 21 % para holocelulose, lignina total e extrativos, respectivamente.

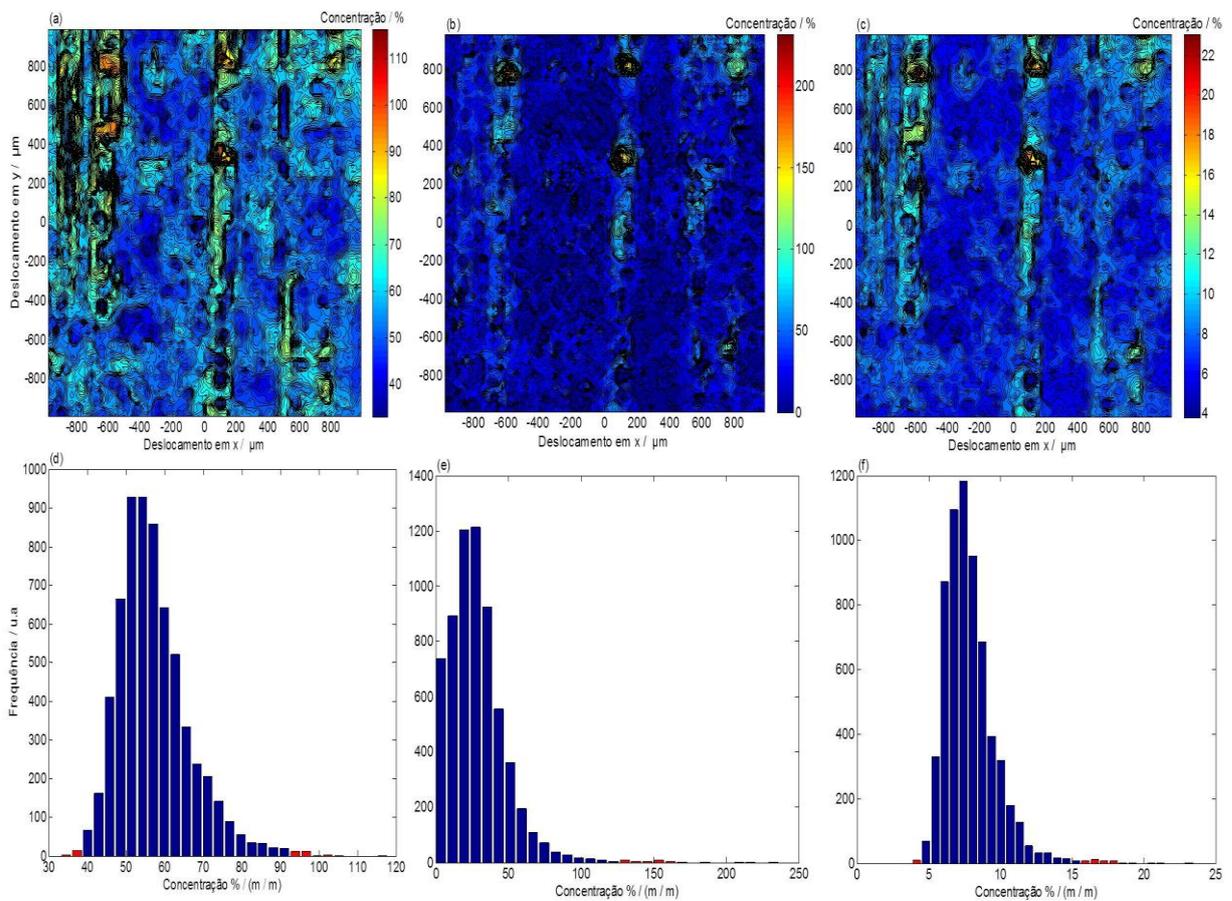


Figura 58. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis* no plano radial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.

No plano radial, foram observados pixels nas linhas vasculares com valores acima de 100 % para holocelulose e lignina total e acima de 20 % para os extrativos. Tendo em vista que este plano apresentou as maiores variações em torno dos valores quando comparada com os planos tangencial e radial, sugere-se a observação da foto da Figura 44 (b), que demonstra a área de varredura espectral. Na linha vascular, onde estão localizados os pixels com valores acima de 100 %. Tal fato pode ter ocorrido devido ao desvio do foco, causando um erro experimental.

Ainda com a exclusão dos percentis (0,5 % de cada lado), a variação do teor para a holocelulose, lignina total e extrativos foi de 40 % a 88 %, 4 % a 122 % e 4,8 % a 15 %, respectivamente.

5.2.4.3 *E.urophylla* nos planos tangencial, transversal e radial.

Os mapas de concentração e os histogramas do *E. urophylla* no plano tangencial para a holocelulose, lignina total e extrativos são apresentados nas Figuras 59 (a, d), (b, e) e (c, f), respectivamente. Observa-se que as linhas vasculares foram as estruturas que apresentaram pixels com maiores valores de concentração, com 90 %, 40 % e 25 % para a holocelulose, lignina total e extrativos, respectivamente.

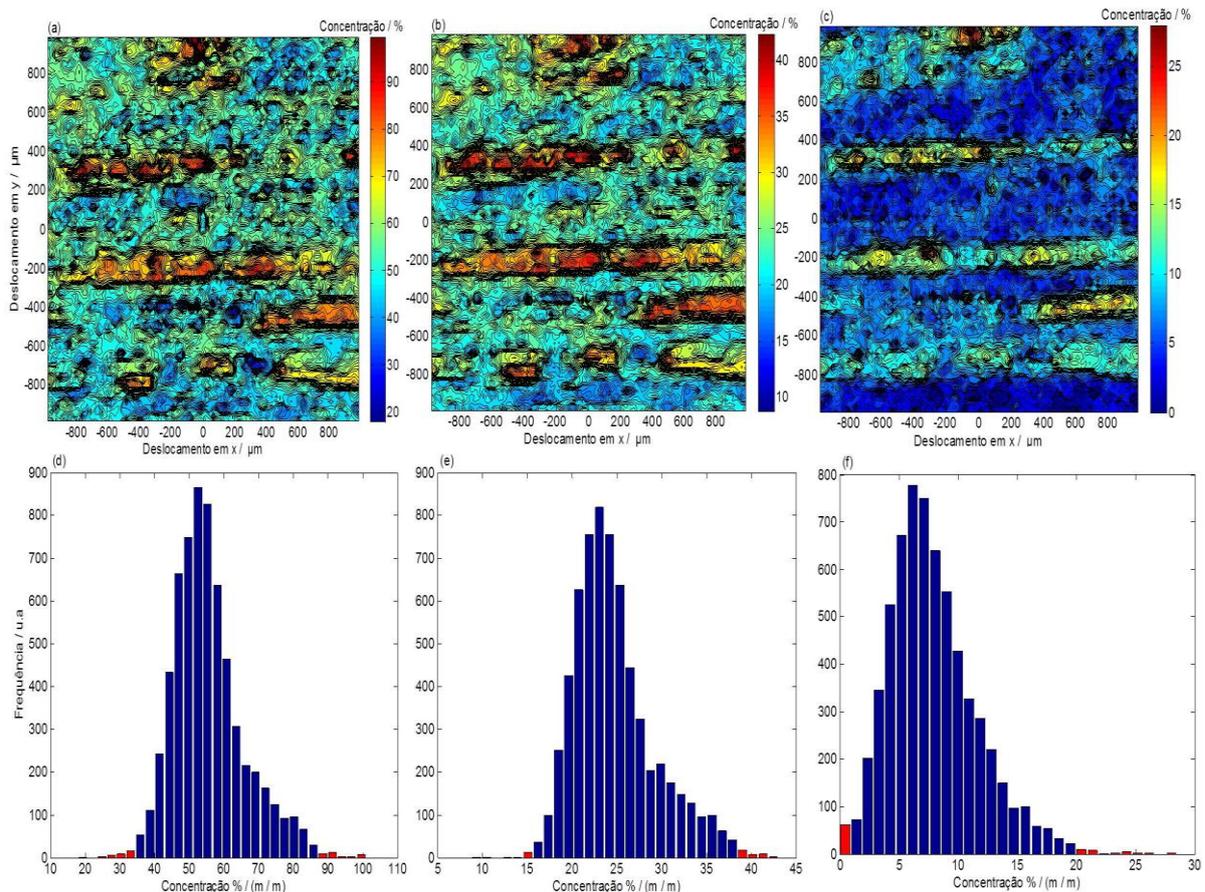


Figura 59. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o *E. urophylla* no plano tangencial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.

5. Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

Para os três componentes estudados, observa-se a distribuição em toda a área mapeada, que contempla as fibras e os raios. Com a exclusão dos percentis (0,5 % de cada lado) na maioria dos pixels a variação do teor foi de 36 % a 85 %, 16 % a 38 % e 1,4 % a 19,5 % para holocelulose, lignina total e extrativos, respectivamente.

Nos planos transversal e radial os mapas de concentração e histogramas são ilustrados nas Figuras 60 (a, b, c, d, e, f) e 61 (a, b, c, d, e, f), respectivamente.

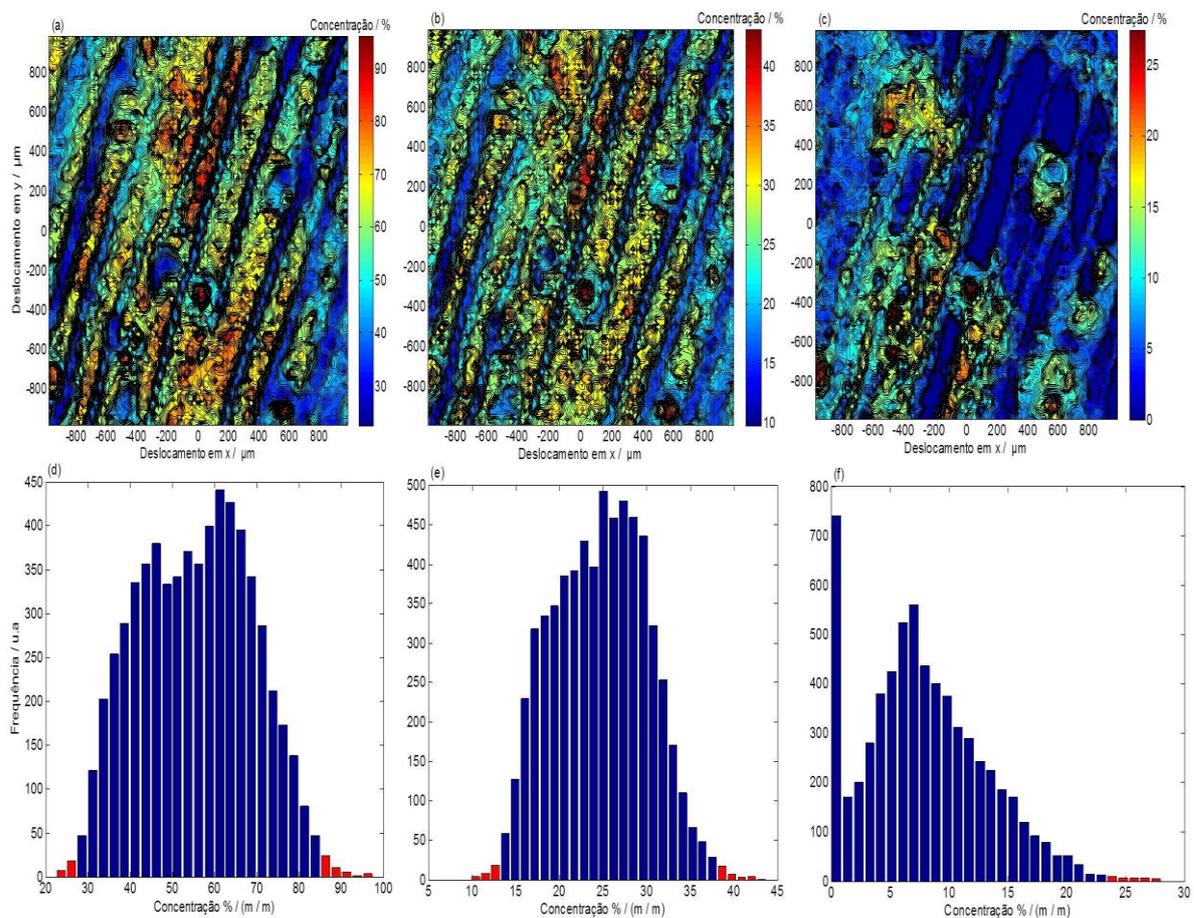


Figura 60. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o *E. urophylla* no plano transversal (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.

No plano transversal, os pixels que apresentaram os maiores valores de concentração estão localizados nos vasos (poros) e nas fibras. Após a exclusão dos percentis (0,5 % de cada lado), os valores encontrados foram 26 % a 84 %, 14 % a 37,5 % e 0,5 % a 23 % para holocelulose, lignina total e extrativos, respectivamente. Observa-se a distribuição por toda a área mapeada

5. Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

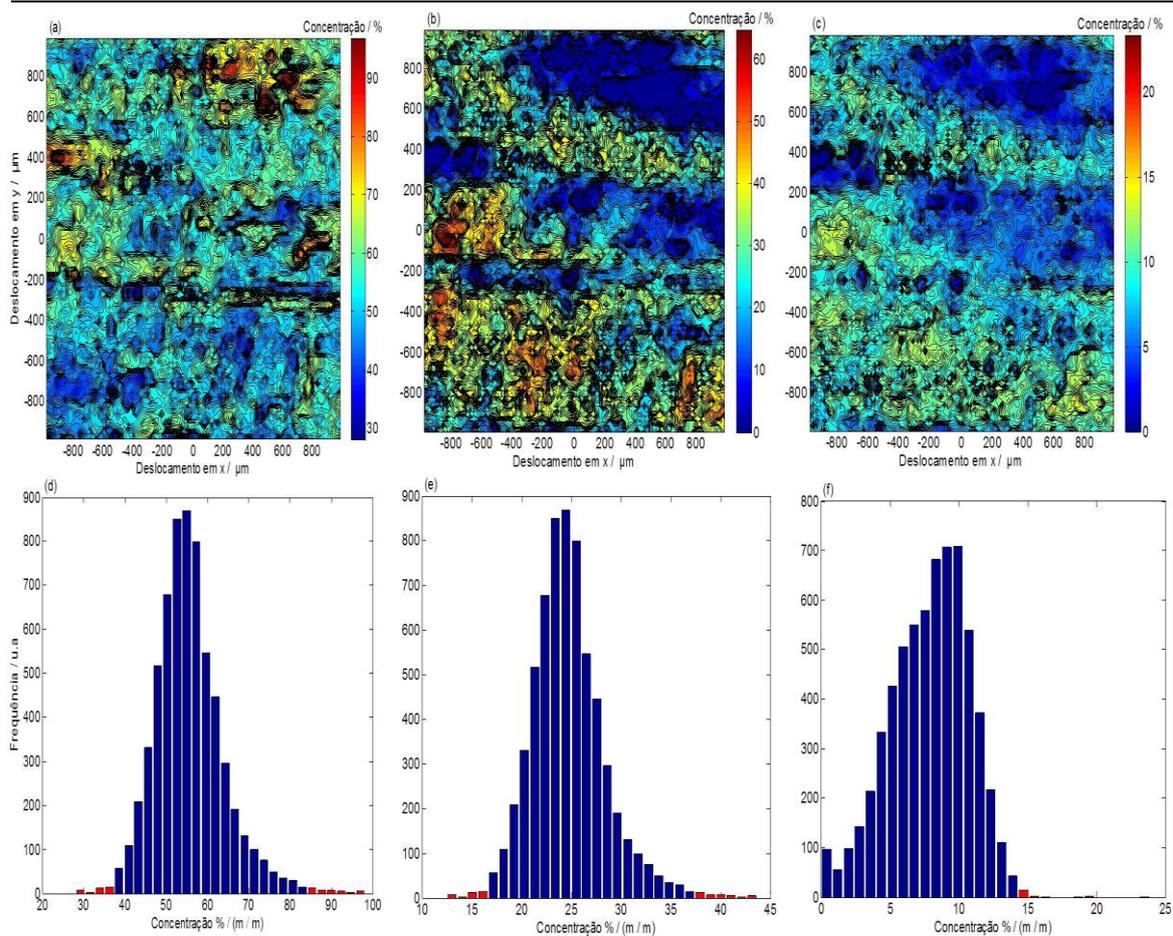


Figura 61. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para o *E. urophylla* no plano radial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.

No plano radial, a holocelulose apresentou pixels com valores de 90 % nas linhas vasculares, 60 % para a lignina total e 20 % para os extrativos localizados nas fibras. Após a exclusão dos percentis (0,5 % de cada lado), a variação foi de 38,6 % a 83 %, 17 % a 37 % e 0,5 % a 14 % para a holocelulose, lignina total e extrativos, respectivamente, sendo que houve a distribuição em toda área mapeada.

5.2.4.4 *S. macrophylla* King nos planos tangencial, transversal e radial.

Os mapas de concentração e os histogramas da holocelulose, lignina total e extrativos para *S. macrophylla* King no plano tangencial são apresentados na Figura 62.

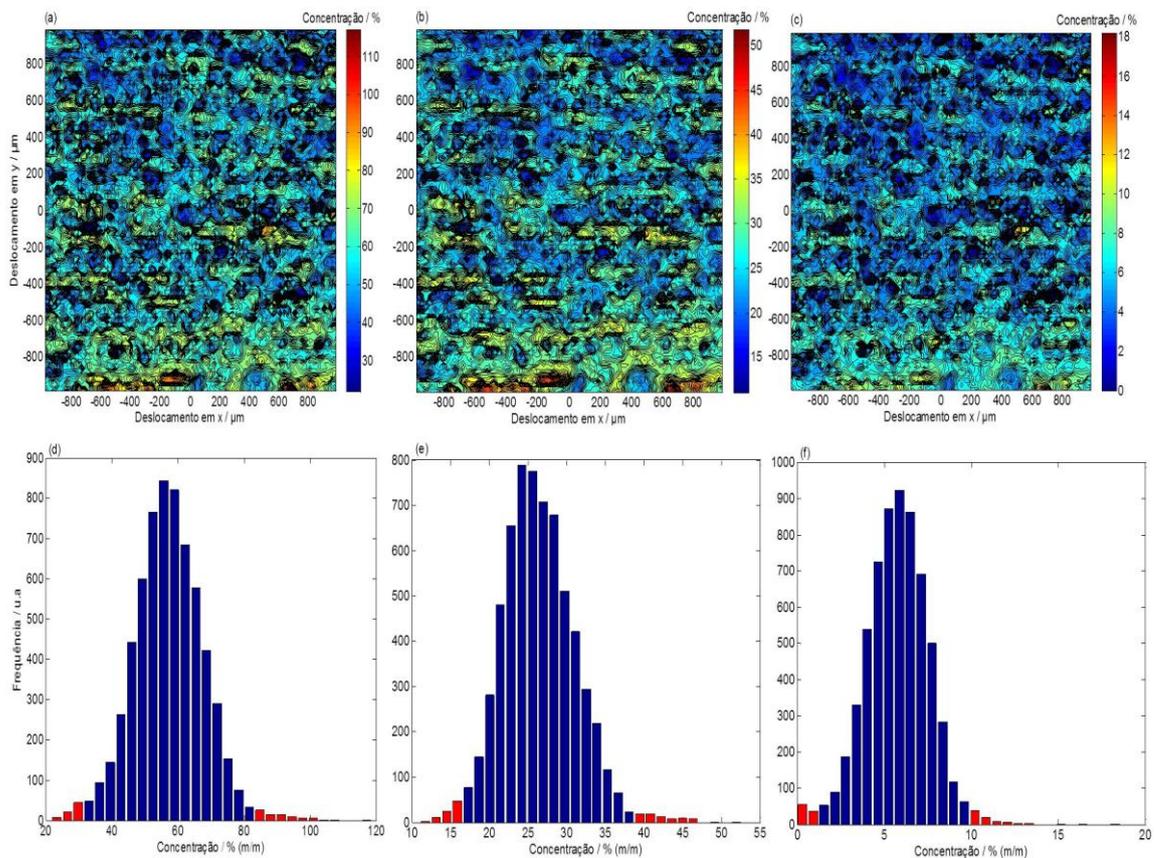


Figura 62. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para *S. macrophylla* King no plano tangencial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.

O mapa de concentração e o histograma para a holocelulose (Figuras 62 a, d) tiveram variações entre 30 % a 110 %. No entanto, as concentrações com valores acima de 100 % foram observadas apenas em um pequeno número de pixels. Para a lignina e os extrativos, obtiveram-se valores entre 15 % a 50 % e 2 % a 18 %, respectivamente, distribuídos nas fibras e nos raios. Com a exclusão do percentil de 0,5 % em ambos os lados dos histogramas de distribuição (intervalo de confiança de 99 %), as variações dos teores foram de 30 % a 88 %, 16 % a 40 % e 1 a 11 % para holocelulose, lignina total e extrativos, respectivamente. Considerando-se a

5. Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

distribuição na área mapeada, pode-se observar as concentrações mais elevadas nas fibras para a holocelulose, lignina total e extrativos. Para o plano transversal e radial, os mapas de concentrações e histogramas são apresentados nas Figuras 63 (a, b, c, d, e, f) e 64 (a, b, c, d, e, f).

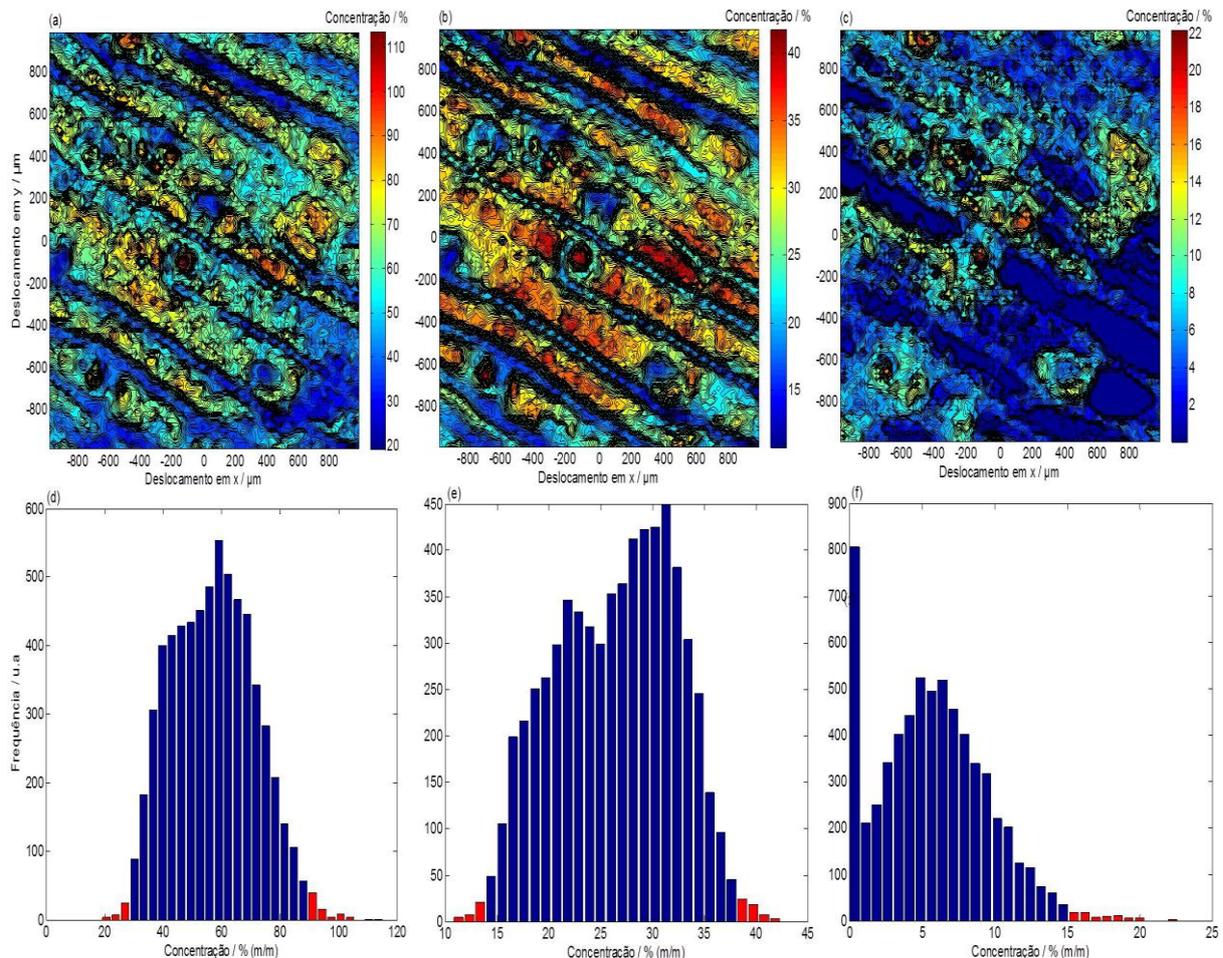


Figura 63. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para *S. macrophylla* King no plano transversal (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.

No plano transversal, as maiores concentrações foram observadas nos vasos (poros) para a holocelulose, lignina total e extrativos. Após a exclusão dos percentis (0,5 % de cada lado), os resultados variaram entre 30 % a 91 %, 14 % a 38 % e 1 % a 16 % para a holocelulose, lignina total e extrativos, respectivamente, na maioria dos pixels.

5. Imagem hiperespectral NIRS e MCR-ALS aplicados ao mapeamento químico de diferentes espécies de madeira

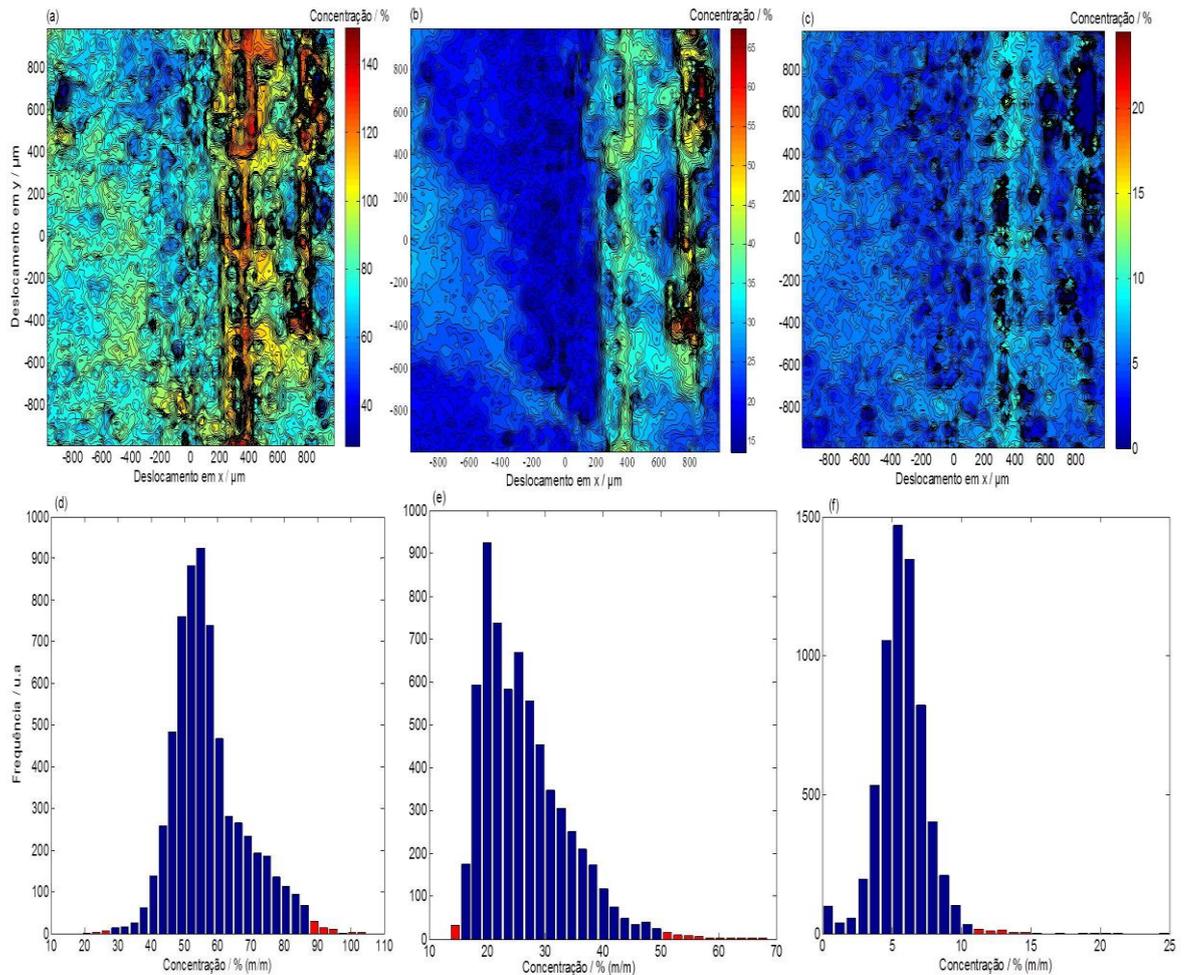


Figura 64. Mapas de distribuição da concentração e histogramas para *S. macrophylla* King no plano radial (a, d) holocelulose, (b, e) lignina total e (c, f) extrativos, respectivamente. As barras vermelhas representam 0,5 % dos percentis de distribuição.

No plano radial, foram observadas as maiores concentrações na linha vascular, em que a holocelulose teve valores superiores a 100 %, enquanto que nas outras regiões as concentrações variaram entre 40 % e cerca de 100 %. A lignina apresentou porcentagens entre 15 % a 45 % nas fibras e nos raios. Para os extrativos, as concentrações variaram entre 0 % a 10 % na maior parte da área mapeada. Após a exclusão dos percentis de 0,5 % de cada lado do histograma, as porcentagens com 99 % de intervalo de confiança foram de 32 % a 88 %, 16 % a 53 % e 1 % a 12 % para holocelulose, lignina e extrativos, respectivamente.

5.2.5 Valores máximos, mínimos e desvio padrão da holocelulose, lignina total e extrativos nos planos tangencial, transversal e radial

As variações acerca dos teores médios de holocelulose, lignina total e extrativos que resultam da análise dos histogramas dos mapas de concentração são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores mínimos, máximos e desvios padrão dos teores de holocelulose, lignina total e extrativos obtidos a partir dos histogramas do *E. grandis*, híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis*, *E. urophylla* e *S. macrophylla* King para um intervalo de 99 % de confiança.

		Valores para a holocelulose (%)			
		<i>E.grandis</i>	híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i>	<i>E.urophylla</i>	<i>S. macrophylla</i> King
Tangencial	mínimo	32,7	31,0	36,0	29,9
	máximo	87,3	89,0	85,2	88,0
	desvio padrão	16,9	18,1	15,6	19,2
Transversal	mínimo	30,5	35,9	26,2	30,2
	máximo	78,5	80,2	83,9	91,2
	desvio padrão	15,0	13,7	17,7	18,9
Radial	mínimo	38,6	40,1	38,5	32,1
	máximo	78	88,2	83	89,1
	desvio padrão	12,4	15,1	13,8	17,7
		Valores para a lignina total (%)			
		<i>E.grandis</i>	híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i>	<i>E.urophylla</i>	<i>S. macrophylla</i> King
Tangencial	mínimo	18,0	23,1	16,2	15,9
	máximo	49,1	36,1	37,9	40,1
	desvio padrão	9,6	4,12	6,8	7,8
Transversal	mínimo	18,9	17,3	13,8	14,3
	máximo	46,5	46,9	37,5	38,1
	desvio padrão	8,6	9,2	7,3	7,4
Radial	mínimo	18,9	4	17,1	16,3
	máximo	40,5	122,3	36,9	52,9
	desvio padrão	8,2	37,6	6,2	11,4

Tabela 13 (continuação)

		Valores para extrativos (%)			
		<i>E.grandis</i>	híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i>	<i>E.urophylla</i>	<i>S. macrophylla</i> King
Tangencial	mínimo	0,4	6,3	1,4	1,0
	máximo	9,9	9,2	19,5	10,9
	desvio padrão	3,0	1,0	5,6	3,1
Transversal	mínimo	0,2	0,5	0,5	1,1
	máximo	9,6	20,9	22,9	16,2
	desvio padrão	2,9	6,3	6,9	4,7
Radial	mínimo	1,7	4,8	0,5	1,2
	máximo	4,9	15,2	13,9	12,1
	desvio padrão	1,1	3,3	4,3	3,5

Observa-se na Tabela 13 que os valores das concentrações com um intervalo de 99 % de confiança apresentam as variações entre os três planos, em que os valores mínimos e máximos foram de 29,9 % a 89,0 %, 26,2 % a 91,2 % e 32,1 % a 89,1 % para a holocelulose; 15,9 % a 49,1 %, 13,8 % a 46,9 % e 4,0 % a 122,3 % para a lignina total; 0,4 % a 19,5 %, 0,2 % a 22,9 % e 0,5 % a 15,2 % para os extrativos nos planos tangencial, transversal e radial, respectivamente.

Comparando-se os valores obtidos com a utilização da HIS-NIRS-MCR-ALS, houve uma variação acerca dos valores médios obtidos pelos métodos de referência, em que estes variaram entre 55,6 % a 58,9 %; 24,7 % a 28,7 %; 3,2 % a 7,9 % para a holocelulose, lignina total e extrativos, respectivamente. Contudo, com a utilização da HIS-NIRS-MCR-ALS avaliou-se as concentrações pixel a pixel, o que justifica esta variação. A HIS-NIR-MCRC-ALS difere-se da análise pelos métodos de referência, aos quais forneceram uma estimativa global. Além disso, os planos tangencial, transversal e radial contemplaram diferentes estruturas anatômicas, em que a distribuição de holocelulose, lignina total e extrativos encontram-se distribuídas de formas distintas.

No plano radial para o híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis* foi observado uma variação no valor da lignina total entre 4 % a 122,3 %. Tal fato pode ser atribuído à falta de ajuste do foco, o que pode ter contribuído para a dispersão do valor da lignina total neste plano.

5.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

A HIS - NIRS em conjunto com ferramentas quimiométricas foi utilizada de forma eficaz para investigar a distribuição de holocelulose, lignina total e extrativos em três espécies diferentes de madeira: *E. grandis*, *E. urophylla*, *S. macrophylla* King, e um híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis*, em três diferentes planos. A aplicação do MCR-ALS com matriz aumentada, a partir da utilização dos espectros de referência permitiu a recuperação dos sinais para holocelulose, lignina e extrativos que apresentaram bandas específicas destes componentes, em concordância com diversos estudos encontrados na literatura. Além disso, os perfis espectrais obtidos por HIS-NIRS-MCR-ALS apresentaram concordância entre os espectros estimados e de referência, indicando uma deconvolução bem sucedida pelo MCR-ALS.

Os mapas de concentração obtidos pelo MCR-ALS possibilitaram estimar a distribuição de holocelulose, lignina total e extrativos na área de varredura espectral de cada espécie e nos três planos estudados. Os histogramas com o intervalo de confiança de 99 % indicaram que as percentagens mínimas e máximas variaram entre 26,2 % a 91,2 %; 4 % a 122 %; 0,2 % a 22,9% para holocelulose, lignina total e extrativos, respectivamente, sendo que também foram observadas variações das concentrações nos planos tangencial, transversal e radial.

Conclui-se que resultados possuem boa concordância com os valores obtidos pelo método de referência. As variações obtidas acerca dos valores médios esperados são atribuídas à elevada sobreposição de bandas dos componentes estudados, que dificulta a resolução pelo MCR-ALS, e também pela falta de ajuste do foco do equipamento na aquisição das imagens na área de varredura espectral.

CAPÍTULO 6

Discriminação de cinco madeiras similares por fluorescência e imagens digitais

6. DISCRIMINAÇÃO DE CINCO MADEIRAS SIMILARES POR FLUORESCÊNCIA E IMAGENS DIGITAIS

A identificação de espécies florestais está relacionada ao conhecimento das suas características, a fim de destinar sua melhor utilização. Além disso, órgãos ambientais realizam a identificação como ato fiscalizador, para inibir a exploração ilegal e indiscriminada de espécies ameaçadas de extinção, e também daquelas que são proibidas à comercialização ou que têm exploração restrita. Dentre as espécies enquadradas neste perfil, destaca-se as espécies *Swietenia macrophylla* King e *Cedrela odorata* L., que estão listadas nos Apêndice II e III da CITES, respectivamente.^{57,59}

Com relação aos métodos de identificação de espécies florestais, a anatomia de madeira é o método mais utilizado. Contudo, devido à grande dificuldade de se ter profissionais treinados para realizar essa identificação, surge a necessidade do desenvolvimento de metodologias alternativas que não envolvam o aspecto anatômico e sim, uma medida direta de outra propriedade, como por exemplo, a utilização da fluorescência molecular ou espectroscopia no infravermelho próximo. A fluorescência molecular de madeiras pode ser observada por um método simples, com o uso de câmaras escuras empregando lâmpadas UV, sendo, neste caso, a fluorescência avaliada visualmente, ou seja, é julgada através da interpretação de cores, que variam de tonalidade, ou até mesmo sem a percepção de uma determinada cor. Ressalta-se que a medida de fluorescência varia de espécie para espécie e também de acordo com a área amostrada, assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias para melhor avaliação deste parâmetro.

Neste contexto, o uso de imagens digitais permite avaliar as diferentes respostas obtidas nas medidas de fluorescência de madeira, pois ocorre a diferenciação adequada das cores e de suas intensidades, proporcionando uma alternativa instrumental frente ao uso de espectrofluorímetros. Diante do exposto, a terceira aplicação desta tese consistiu na realização da medida de fluorescência emitida por cinco espécies de madeira com caracteres similares, *Erismia uncinatum* Warm.(cedrinho), *Cedrela odorata* (cedro), *Micropholis melinoniana* (curupixá), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King (mogno) com o uso

de imagens digitais para a formação de histogramas de cores a fim de realizar a discriminação destas espécies através da utilização de modelos PLS1-DA.

6.1 EXPERIMENTAL

6.1.1 Obtenção e preparo dos corpos de prova

As espécies utilizadas foram selecionadas de acordo com estudos anteriores realizados pela equipe de trabalho do LPF/SFB e Instituto de Química da Universidade de Brasília (IQ/UnB).^{15,16} As amostras de *Erisma uncinatum* Warm. E *Swietenia macrophylla* King foram identificadas e cedidas pelo LPF/SFB, em que cada uma corresponde a uma árvore diferente, de áreas de exploração florestal autorizadas. Além disso, a quantidade de *Swietenia macrophylla* King incluiu amostras legais do LPF advindas de tábuas apreendidas no estado do Mato Grosso e adquirida no comércio local de Brasília - DF.

Quanto às amostras de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, *Cedrela odorata* e *Micropholis melinoniana*, as mesmas foram doadas pelas empresas Juruá Florestal, MadeiFlora Empreendimentos Florestais Ind. e Com., Alternativa Comércio de Madeiras LTDA, Madeireira Alvorada Brasília LTDA, J B Madeiras ME, que disponibilizaram bases de troncos e peças distintas destas espécies, respectivamente.

A partir das amostras obtidas, foram confeccionados corpos de prova com medidas de 2x2x2 cm (comprimento x largura x espessura), sendo 110 corpos de prova de *Cedrela odorata*, 97 de *Erisma uncinatum* Warm., 114 de *Micropholis melinoniana*, 94 de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e 100 de *Swietenia macrophylla* King. O plano transversal de todos os corpos de prova das cinco espécies foram lixados com lixas grã 400, 800 e 1200, respectivamente, para a obtenção de uma superfície lisa, sem imperfeições, a fim de que as imagens fossem tiradas neste plano.

6.1.2 Montagem da câmara com a lâmpada ultravioleta e microscópio para obtenção das imagens

A câmara utilizada neste estudo foi desenvolvida com base nas recomendações do comitê da Associação Internacional de Anatomistas de Madeira (IAWA, do inglês *International Association of Wood Anatomists*)⁶⁵ e também no modelo de câmara utilizada no LPF/SFB para estudo de fluorescência de madeiras. Para a confecção da câmara escura, foi utilizada uma caixa de madeira pintada na cor preta onde foram instaladas duas lâmpadas de luz ultravioleta (Marca Philips Actinic-BL, TL-D 15W). Foi adaptado um suporte móvel para posicionamento dos corpos de prova e juntamente ao suporte foi colocado uma chapa fotográfica a fim de eliminar o reflexo proveniente do fundo da câmara. As Figuras 65 (a, b, c, d) ilustram os componentes utilizados para a montagem.

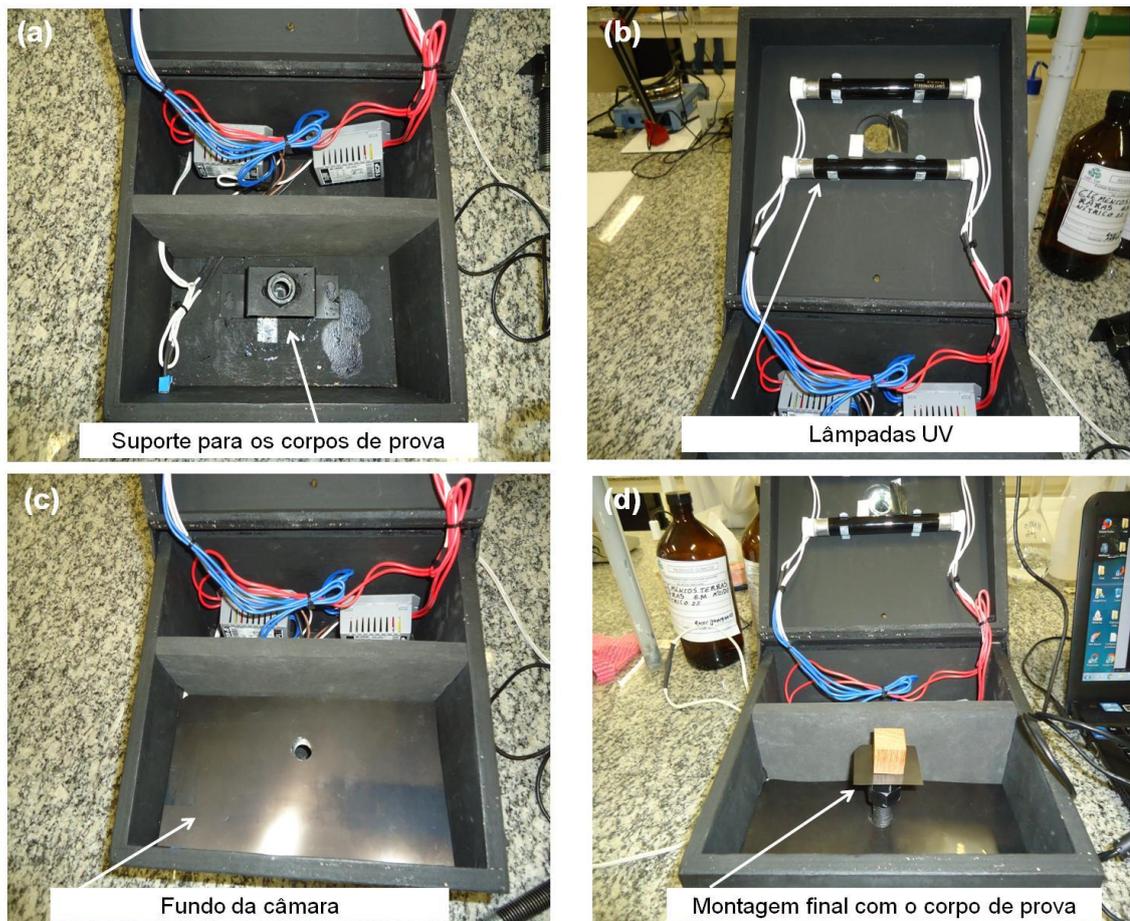


Figura 65. Montagem da câmara para obtenção das imagens (a) suporte para os corpos de prova, (b) lâmpadas fluorescentes instaladas na parte superior, (c) fundo da câmara com a chapa fotográfica para eliminar o reflexo e (d) montagem final com destaque para a parte interna e posicionamento do corpo de prova.

A emissão de luz das lâmpadas UV instaladas na câmara foi avaliada a partir do espectro da mesma, a partir da observação da banda de emissão máxima no comprimento de onda em 368 nm (Figura 66).

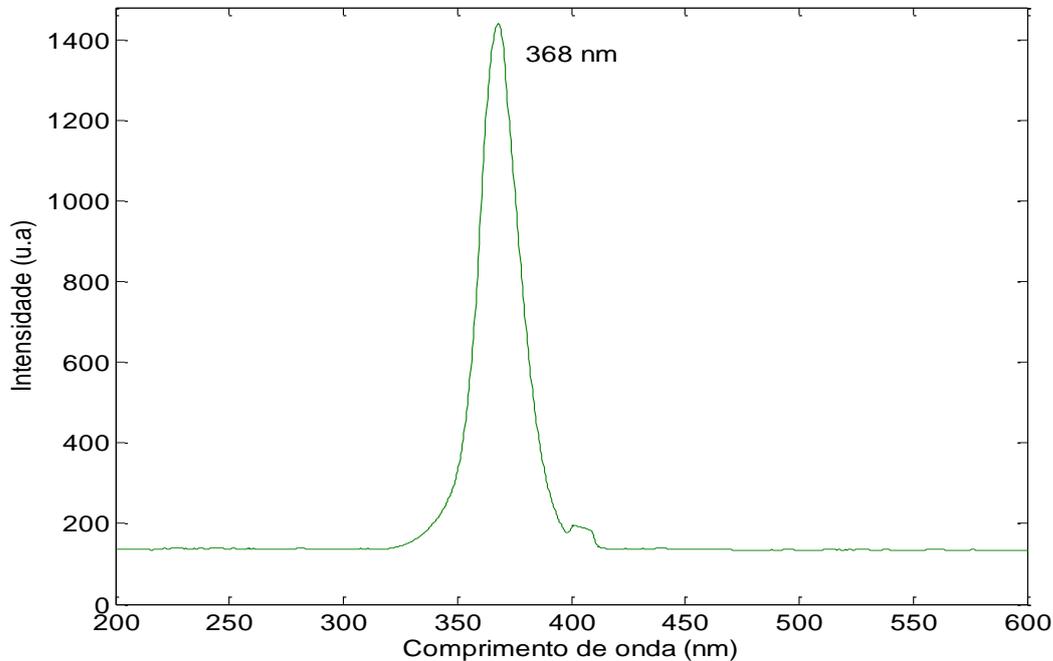


Figura 66. Espectro da lâmpada UV com máximo de absorção em 368 nm.

Para aquisição das imagens dos corpos de prova foi utilizado um microscópio digital posicionado dentro da câmara (apresentada na Figura 67), com resolução de 5 megapixels e zoom óptico de 400 vezes (Figuras 67 a e b). Utilizou-se como filtro, uma lente proveniente de um óculos de proteção (Figura 67 c). Antes da sua instalação, foi avaliado o espectro de emissão deste filtro, sendo observado que o mesmo bloqueou toda a radiação abaixo de 340 nm, que consistia de uma região de comprimento de onda que não era de interesse para medida de fluorescência.

As imagens foram obtidas com o auxílio de um notebook, com intensidade de 24 bits num sistema RGB (16,8 milhões de cores) e resolução de 300 dpi (pixels por polegadas) e estes parâmetros foram fixos para obtenção de todas as imagens no formato “.jpg” (Figura 67 d)

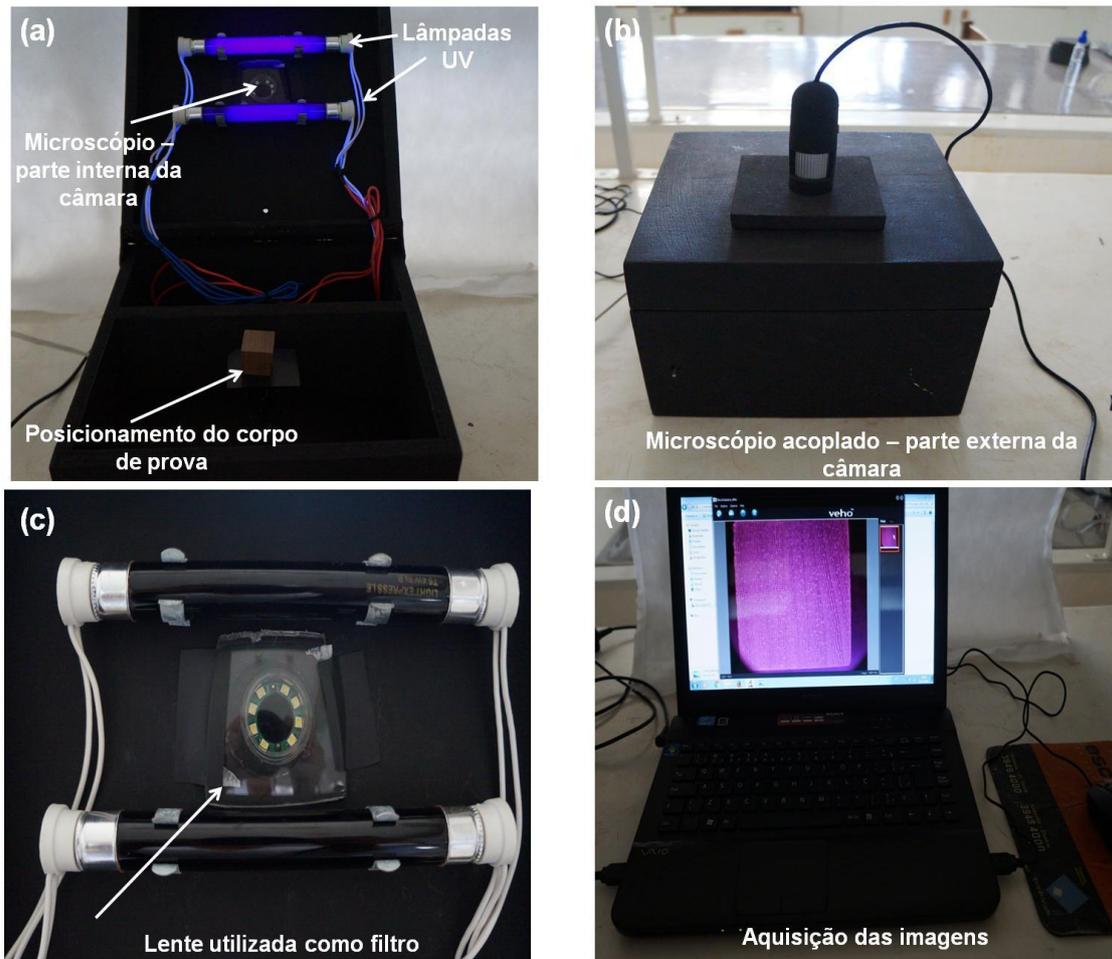


Figura 67. (a) Aspecto interno da câmara com destaque para o microscópio, posicionamento do corpo de prova e as lâmpadas UV, (b) aspecto interno da câmara, (c) lente utilizada como filtro e (d) aquisição das imagens.

As configurações utilizadas para captura das imagens foram obtidas a partir do programa MicroCapture_400x. Os parâmetros foram definidos de forma empírica, a fim de alcançar uma padronização do balanço das cores RGB. A Figura 68 ilustra as propriedades do balanço das propriedades de brilho, contraste, saturação, nitidez, gama, proporção de branco, composição de luz de fundo e ganho. Nesta etapa, estes valores foram fixados a partir da exposição à luz UV de um pedaço de papel com as cores verde, amarelo, rosa e vermelho, em que observou-se a diferenciação destas cores. A finalidade desta etapa foi fixar a mesma escala para todas as propriedades para obtenção das imagens dos corpos de prova.



Figura 68. Configurações utilizadas para padronização das imagens.

A aquisição das imagens foi realizada com o posicionamento dos corpos de prova no suporte (Figura 67 a), focalizadas na face transversal, e as estruturas anatômicas visualizadas nesta face foram colocadas no mesmo sentido para todas as amostras. Foi obtida uma imagem por corpo de prova distinto, totalizando 110, 97, 114, 94 e 100 imagens para *Erismia uncinatum* Warm. (cedrinho), *Cedrela odorata* (cedro), *Micropholis melinoniana* (curupixá), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King (mogno), respectivamente. Para cada imagem, foi selecionada uma área de 750 x 800 pixels, que representa a parte central do corpo de prova. A área selecionada foi posteriormente decomposta em histogramas (Figura 69) que foram utilizados para a construção dos modelos PLS1-DA.

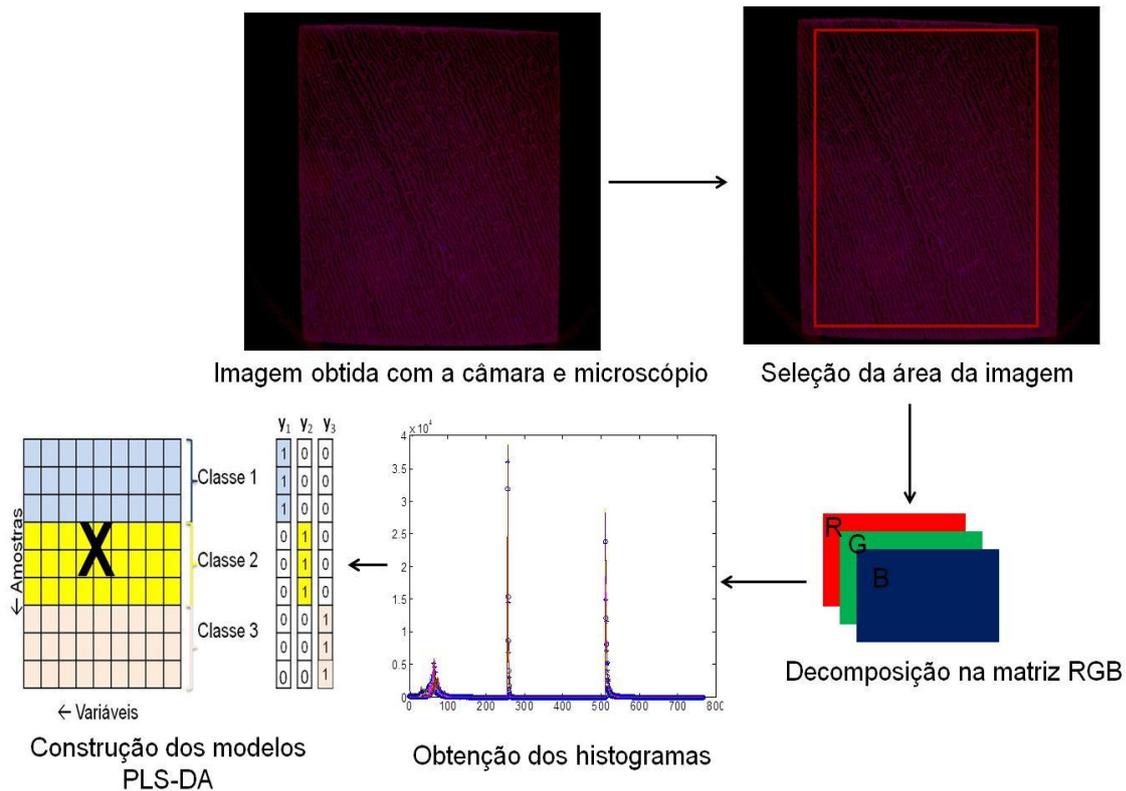


Figura 69. Etapas realizadas para decomposição das imagens e construção dos modelos PLS1-DA.

6.1.3 Análise dos dados e etapas para construção dos modelos de discriminação

Para a análise das imagens, utilizou-se o software MATLAB versão 7.12 (R2011b) e para a construção dos modelos PLS1-DA utilizou-se o pacote PLS Toolbox versão 6.5.

Foram desenvolvidos cinco modelos, cada um tendo a finalidade de discriminar uma espécie em relação às outras. Para a construção dos modelos de discriminação, as matrizes de dados obtidas a partir dos histogramas de cores de cada imagem, que foram ordenadas em blocos e a escolha das amostras para o conjunto de treinamento e o conjunto teste foi feita de forma sequencial, o que se repetia ao longo da matriz de dados. Desta forma, aproximadamente dois terços das amostras foram selecionadas para compor o conjunto de treinamento e um terço das amostras para compor o conjunto teste. A Tabela 14 traz o número de amostras utilizadas.

Tabela 14. Quantidade de amostras utilizadas nos conjuntos de treinamento e teste para a construção dos modelos PLS1-DA

Espécie	Número total de amostras	Número de amostras do conjunto de treinamento	Número de amostras do conjunto teste
<i>Cedrela odorata</i>	110	70	40
<i>Erismia uncinatum</i> Warm.	97	60	37
<i>Micropholis melinoniana</i>	114	74	40
<i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden	94	60	34
<i>Swietenia macrophylla</i> King	100	60	40

A primeira etapa realizada para a construção do modelo PLS1-DA consistiu na atribuição dos valores de classe de referência ao conjunto de treinamento, ou seja, o valor 1 foi atribuído à classe que se deseja discriminar e o valor 0 às demais classes. Na etapa seguinte, realizou-se a regressão da matriz de dados X de treinamento, que corresponde aos histogramas de cores das imagens, e do vetor y de cada classe, sendo obtidos um modelo para cada espécie estudada.

Para a otimização do conjunto de treinamento, o pré-processamento utilizado foi centrar na média, sendo este aplicado em todos os modelos construídos, permitindo obter uma melhor separação entre as classes 0 e 1.

O número de VL foi selecionado a partir da visualização do menor valor de RMSECV das amostras do conjunto de treinamento, obtido pela validação cruzada pelo método “deixar uma amostra de fora” (do inglês *leave one out*). Cabe destacar que nessa aplicação o método de validação cruzada por *venetian blinds* seria o mais apropriado pelo número de amostras disponível. Contudo a comparação dos resultados desses dois métodos para essa aplicação não apresentou diferença significativa. Além disso, para a aplicação do PLS1-DA é comum utilizar o erro de classificação de validação cruzada (CVCE, do inglês *Cross-Validation Classification Error*) para a escolha das VL's. Entretanto, devido aos critérios de exclusão de *outliers* adotados nesta tese, utilizou-se os valores de RMSECV para a escolha das VL's.

A última etapa realizada no conjunto de treinamento consistiu da detecção e exclusão de amostras anômalas (do inglês, *outliers*) que consistem em amostras com alta influência e altos valores de resíduos não modelados na matriz de dados X , ou seja, neste estudo, correspondem aos histogramas de cores que apresentaram um alto valor de erro da estimativa do valor de classe.

A detecção e exclusão de *outliers* foi realizada a partir da rotina desenvolvida no trabalho de Martins¹²⁴ que foi baseada em trabalhos descritos na literatura.¹¹⁷⁻¹¹⁹. Primeiramente, o conjunto de treinamento construído é submetido à exclusão e este modelo é reconstruído após a exclusão dos *outliers*. O modelo reconstruído é submetido a uma segunda etapa de exclusão. Neste ponto, se o número de outliers excluídos for igual ao identificado na etapa anterior, não é realizada a próxima exclusão, e tem-se o modelo final. Caso contrário, o segundo modelo é submetido a uma terceira etapa de exclusão e este último modelo é dito modelo final. A Figura 70 ilustra as etapas envolvidas para a construção dos modelos do conjunto de treinamento e detecção de *outliers*.

A eficiência de previsão dos modelos de discriminação construídos conforme a Figura 70 foi avaliada na etapa de validação, que contou com um terço das amostras de cada espécie (Tabela 14). Nesta etapa, os *outliers* do conjunto teste foram excluídos com a aplicação da mesma rotina utilizada no conjunto de treinamento, contudo, no conjunto teste, os *outliers* são excluídos apenas uma vez, ou seja, o modelo é construído, os *outliers* são detectados e excluídos, e por fim, o modelo é reconstruído e denominado como modelo final.

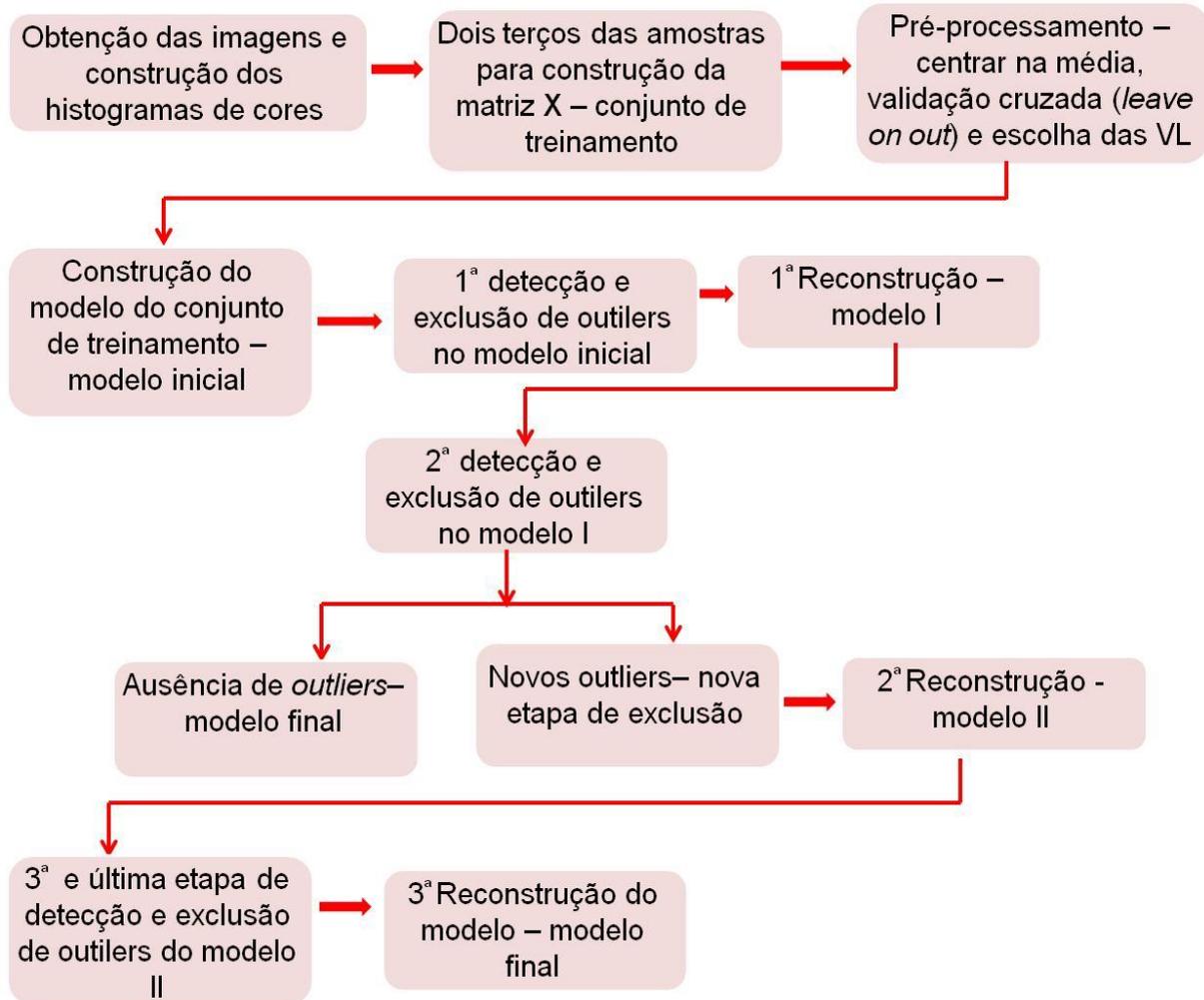


Figura 70. Etapas realizadas para construção do conjunto de treinamento e detecção de *outliers*.

6.1.4 Avaliação da repetitividade e precisão intermediária

A repetitividade, também denominada como “concordância” do método, foi avaliada através da obtenção de seis imagens idênticas de três corpos de provas distintos das espécies estudadas, ou seja, três amostras autênticas e seis repetições das imagens. Estas medidas foram realizadas nas mesmas condições já descritas nas etapas anteriores e num curto intervalo de tempo. As imagens obtidas foram decompostas em histogramas de cores e inseridas no conjunto teste, para o qual também foi realizada a etapa de exclusão de *outliers*.

A precisão intermediária ou “acordância” foi avaliada através da obtenção de uma imagem de dez corpos de provas distintos de cada espécie estudada. Estas imagens foram adquiridas por dois analistas em dias diferentes. As análises das

imagens foram realizadas conforme etapas já descritas nas seções anteriores e os histogramas de cores foram inseridos no conjunto teste.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 Construção dos modelos de discriminação para *Cedrela odorata*, *Erismia uncinatum* Warm., *Micropholis melinoniana*, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King

A partir das imagens dos corpos de prova, foram obtidos os histogramas para cada espécie estudada, que são ilustrados na Figura 71.

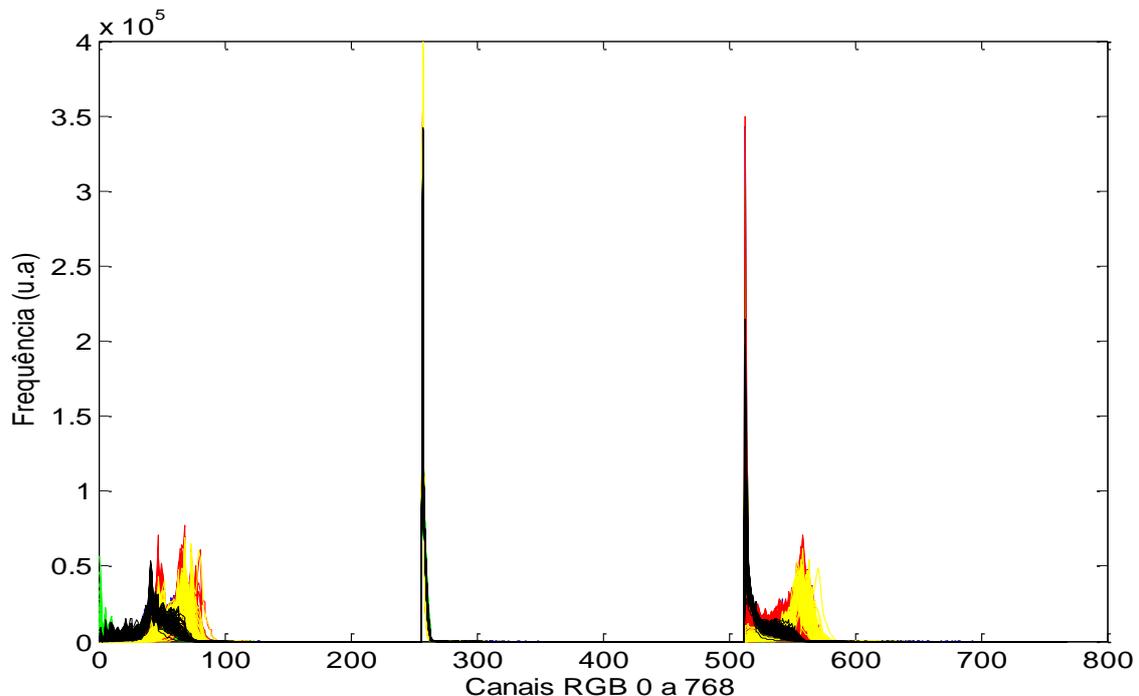


Figura 71. Ilustração dos histogramas para as espécies *Cedrela odorata* (cedro), *Erismia uncinatum* Warm.(cedrinho), *Micropholis melinoniana* (curupixá), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King (mogno)

A Figura 71 demonstra que existe uma semelhança entre os histogramas de cores das espécies *Cedrela odorata* (cedro), *Erismia uncinatum* Warm.(cedrinho), *Micropholis melinoniana* (curupixá), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King (mogno), o que justifica a utilização da análise multivariada dos dados a fim de realizar a discriminação.

A construção dos modelos e a detecção de *outliers* para o conjunto de treinamento foi realizada a partir das etapas ilustradas na Figura 70, que contou com os parâmetros que são descritos na Tabela 15. Destaca-se a importância da detecção e exclusão dos *outliers* no conjunto de treinamento. Estes são referentes ao número de histogramas que apresentaram alta influência e altos resíduos dentro do limite de 99,9 % de confiança, e foram excluídos deste conjunto.

Tabela 15. Parâmetros de discriminação do conjunto de treinamento para as cinco espécies estudadas.

	<i>Cedrela odorata</i>	<i>Erisma uncinatum</i> Warm	<i>Micropholis melinoniana</i>	<i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden	<i>Swietenia macrophylla</i> King
Nº de VL	10	8	8	8	6
Nº de <i>outliers</i> do conjunto de treinamento	8	5	4	3	6
RMSEC	0,19	0,11	0,12	0,14	0,14
RMSECV	0,20	0,13	0,12	0,15	0,15
LD	0,45	0,39	0,39	0,33	0,32

VL: variável latente, RMSEC: Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração, RMSECV: raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada, LD: limite de discriminação.

Os valores de RMSEC e RMSECV demonstram uma proximidade entre si, ou seja, os valores dos erros médios obtidos para as amostras que foram utilizadas na etapa de calibração não apresentam diferenças significativas. Entretanto, os valores de RMSEC e RMSECV são parâmetros globais que incorporam tanto erros sistemáticos quanto aleatórios. Sendo assim, outros indicadores utilizados para avaliar a exatidão foram obtidos através das figuras de mérito^{115,122-124}, que serão apresentadas a seguir.

A próxima etapa consistiu na constatação da eficiência da discriminação dos modelos construídos, o que foi feito através das amostras do conjunto teste para cada espécie (segundo critérios já descritos na Tabela 14). Os gráficos de valores previstos apresentados na Figura 72 representam cada modelo, após a exclusão de *outliers* do conjunto de treinamento e teste.

6. Discriminação de cinco madeiras similares por fluorescência e imagens digitais

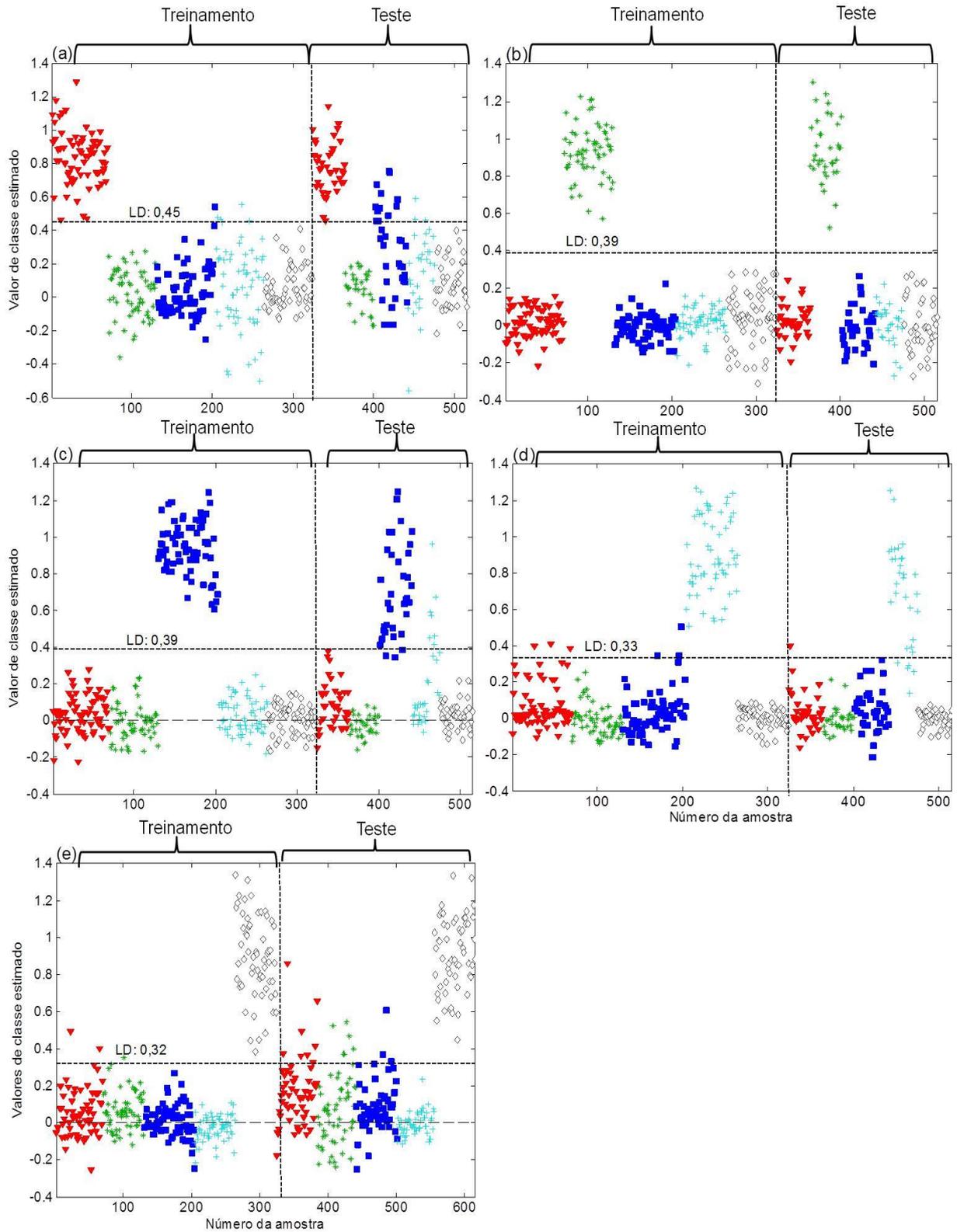


Figura 72. Resultados para os conjuntos de treinamento e teste para a discriminação de: (a) ▼ *Cedrela odorata* (cedro) em relação às outras espécies, (b) * *Erisma uncinatum* Warm (cedrinho) em relação às outras espécies, (c) ■ *Micropholis melinoniana* (curupixá) em relação às outras espécies, (d) + *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (eucalipto) em relação às outras espécies e (e) ◇ *Swietenia macrophylla* King (mogno) em relação às outras espécies, (—) limite de discriminação LD.

O LD (*threshold*) tem a função de fornecer um valor que delimita a separação das classes e permite a melhor separação, sendo que as amostras com valores acima do LD são ditas como pertencentes à classe da espécie a ser discriminada e amostras abaixo do LD são classificadas como as demais espécies do modelo. O LD (*threshold*) entre os conjuntos de treinamento e teste foi estabelecido através da teoria bayesiana, conforme descrito na seção 3.6.3.2.

As Figuras 72 (a, b, c, d, e) apresentam os valores previstos das amostras para os modelos construídos. A partir da análise dos gráficos, é possível observar que a *Cedrela odorata*, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King (Figuras 72 a, d, e) apresentaram erros de classificação nos conjuntos de treinamento e teste. Para *Micropholis melinoniana* (Figura 72 c) apresentou erros de classificação apenas no conjunto teste, enquanto para a espécie *Erismia uncinatum* Warm (Figura 72 b) não foram observados erros de classificação.

As figuras de mérito apresentadas na Tabela 16 corroboram com as afirmativas referentes aos erros de classificação obtidos nos modelos das espécies *Cedrela odorata* (cedro), *Micropholis melinoniana* (curupixá), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (eucalipto) e *Swietenia macrophylla* King (mogno). É importante destacar que o número de *outliers* do conjunto teste apresentado na Tabela 16 está distribuído em todas as classes, e não apenas na classe discriminada.

Tabela 16. Erros médios, *outliers* e figuras de mérito do conjunto teste.

Erro médio, <i>outliers</i> e figuras de mérito	Espécies				
	<i>Cedrela odorata</i>	<i>Erismia uncinatum Warm</i>	<i>Micropholis melinoniana</i>	<i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden	<i>Swietenia macrophylla King</i>
RMSEP	0,26	0,13	0,24	0,19	0,18
Nº de <i>outliers</i> do conjunto teste	14	5	8	7	3
Número de FP	16	0	7	1	6
Número de FN	0	0	4	5	0
Número de VP	40	36	34	27	40
Número de VN	121	150	138	151	142
Taxa de Falso Positivo (%)	11,7	0	4,8	0,7	4,0
Taxa de Falso Negativo (%)	0	0	10,5	15,6	0

Tabela 16. Continuação

Especificidade	0,88	1	0,95	0,99	0,96
Seletividade	1	1	0,89	0,84	1
Taxa de Eficiência (%)	88,3	100	85,7	83,7	95,9

RMSEP: raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão, FP: falso positivo, FN: falso negativo, VP: verdadeiro positivo, VN: verdadeiro negativo.

As figuras de mérito possibilitaram avaliar a capacidade de previsão do modelo, atestando a qualidade da previsão. Os modelos para *Cedrela odorata* (cedro), *Micropholis melinoniana* (curupixá), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (eucalipto) e *Swietenia macrophylla* King (mogno) apresentaram taxas de eficiência de classificação de 88,3 %, 85,7 %, 83,7 % e 95,9 %, respectivamente, enquanto o *Erismia uncinatum* Warm (cedrinho) teve 100 % de classificação correta das amostras.

Foram realizados testes no plano tangencial, contudo, não foram obtidos modelos que possibilitassem a separação eficiente entre as classes. Na tentativa de melhorar a eficiência dos modelos de regressão, foi realizado a seleção de variáveis com a aplicação do algoritmo de seleção de preditores ordenados (OPS, do inglês *ordered predictors selection*)¹⁸², porém, não foram obtidos resultados satisfatórios com a aplicação do algoritmo OPS. Portanto, estes resultados não serão apresentados nesta tese.

6.2.2 Repetitividade e precisão intermediária dos modelos de discriminação

A repetitividade ou concordância (Tabela 17) foi avaliada através dos valores de classe preditos pertencentes à classe 1. Esta etapa teve como objetivo representar se há concordância entre os resultados das leituras de modo sucessivo.

Tabela 17. Valor de classe para a avaliação da repetitividade.

Espécie	Valor médio da classe
<i>Cedrela odorata</i>	0,78
<i>Erismia uncinatum</i> Warm	0,93
<i>Micropholis melinoniana</i>	0,78
<i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden	0,59
<i>Swietenia macrophylla</i> King	0,91

A Tabela 17 demonstra que os valores médios de classe preditos variaram entre as espécies, o que corrobora com as afirmativas já apresentadas sobre os erros de classificação obtidos nos modelos. Constata-se que para a espécie *Erisma uncinatum* Warm (cedrinho) e *Swietenia macrophylla* King (mogno) foram obtidos valores de classe de 0,93 e 0,91, respectivamente, sendo que estas duas espécies foram as que obtiveram o valor mais próximo de 1. Em contrapartida, as espécies *Cedrela odorata* (cedro) e *Micropholis melinoniana* (curupixá) tiveram valores médios de classe de 0,78 e *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden com 0,59, sendo que estas espécies foram as que mais se distanciaram dos valores preditos pertencentes à classe 1.

Foram observadas variações dos resultados obtidos para avaliação da precisão intermediária (Tabela 18) quando comparadas com as figuras de mérito obtidas na construção dos modelos (apresentadas na Tabela 16).

Tabela 18. Figuras de mérito para a avaliação da precisão intermediária.

Figuras de Mérito	Espécies				
	<i>Cedrela odorata</i>	<i>Erisma uncinatum</i> Warm	<i>Micropholis melinoniana</i>	<i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden	<i>Swietenia macrophylla</i> King
Taxa de Falso Positivo (%)	12,6	0	4,5	1,8	7,4
Taxa de Falso Negativo (%)	5	1,89	10,34	9,61	0
Especificidade	0,87	1	0,96	0,98	0,93
Seletividade	0,95	0,98	0,90	0,90	1
Taxa de Eficiência (%)	82,4	98,1	85,1	88,6	92,6
Média dos valores de classe 1	0,73	0,9	0,69	0,69	0,93
Média dos valores de classe 0	0,34	0,42	0,27	0,14	0,25

As taxas de eficiência observadas na Tabela 18 foram de 82,4 %, 98,1 %, 85,1%; 88,6 % e 92,6 % para *Cedrela odorata*, *Erisma uncinatum* Warm, *Micropholis melinoniana*, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King, respectivamente, em que não foram observadas grandes variações entre as taxas

de eficiência quando comparadas com as obtidas na Tabela 16, que foram de 88,3 %, 100 %, 85,7 %, 83,7 % e 95,9 %, para estas espécies, respectivamente.

Destaca-se os valores obtidos das médias das amostras pertencentes à classe 1 e à classe 0, para as quais novamente são retratadas as tendências observadas na construção dos modelos de discriminação. Contudo, considera-se que o método é preciso ou robusto à variação entre analistas, devido às figuras de mérito calculadas (Tabela 18) apresentarem coerência entre as avaliações aqui apresentadas.

6.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

Com a aplicação da medida de fluorescência através da utilização de lâmpada UV, câmara escura e imagem digital, foi possível obter os histogramas de cores de cinco espécies de madeira, *Cedrela odorata* (cedro), *Erismia uncinatum* Warm.(cedrinho), *Micropholis melinoniana* (curupixá), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King (mogno). A conversão das imagens em histogramas de cores e a construção dos modelos de discriminação com a utilização da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS1-DA) possibilitou construir os modelos e avaliar a discriminação destas espécies.

Os modelos obtidos apresentaram eficiência de classificação de 88,32 %, 85,65 %, 83,72 % e 95,95 % para *Cedrela odorata* (cedro), *Micropholis melinoniana* (curupixá), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King (mogno), respectivamente, enquanto a *Erismia uncinatum* Warm. (cedrinho) teve 100 % de classificação correta das amostras. Foram observados poucos erros de classificação no conjunto de treinamento e conjunto teste, sendo que estes erros foram atribuídos à eventual variação das imagens.

Foi avaliada a precisão do método através da medida da repetitividade e da precisão intermediária. Os valores de classe e as figuras de mérito, respectivamente, demonstraram que a metodologia empregada não apresentou grandes variações nestes parâmetros, o que leva a concluir que esta técnica possui robustez para discriminação das espécies de madeira aqui estudadas, no que diz respeito à variação entre diferentes analistas e à variação temporal.

O presente estudo realizado com a aplicação de fluorescência molecular em conjunto com PLS1-DA demonstrou-se promissor para a discriminação, sob condições laboratoriais controladas. Contudo, para aplicação deste método em campo, ainda faz-se necessário a avaliação da influência de fatores externos que podem ocasionar mudanças na medida da fluorescência, como variações de temperatura e umidade. Entretanto, mesmo com os erros de classificação observados, os resultados foram satisfatórios, o que caracteriza a utilização da fluorescência e imagens digitais como uma técnica promissora para este fim.

7. CONCLUSÕES GERAIS

As técnicas de imagem hiperespectral Raman (HIS-Raman) e NIRS (HIS-NIRS), respectivamente, combinadas à resolução multivariada de curvas (MCR-ALS) trouxeram como resultados o mapeamento dos principais constituintes químicos presentes na madeira de *E. grandis*, *E. urophylla* e um híbrido de *E. urophylla* x *E. camaldulensis* e *Swietenia macrophylla* King (mogno). A HIS-Raman-MCR-ALS mostrou que as concentrações de holocelulose e lignina total variaram em diferentes regiões anatômicas no plano transversal, sendo que os resultados foram avaliados a partir da construção de mapas de concentrações e histogramas. A análise exploratória desta distribuição proporcionou quantificar os constituintes químicos e os resultados apresentados foram coerentes com as análises globais obtidas pelos métodos de referência.

A HIS-NIRS-MCR-ALS também proporcionou a construção de mapas de concentrações e histogramas de holocelulose, lignina total e dos extrativos. As análises em nos planos tangencial, transversal e radial revelaram estruturas anatômicas com concentrações de seus constituintes coerentes com as funções que estas estruturas desempenham na madeira. Portanto, a utilização da HIS-Raman-MCR-ALS e HIS-NIRS-MCR-ALS, resultaram na obtenção de informações acerca das distribuições espaciais em diferentes planos e estruturas anatômicas dos constituintes presentes nas espécies florestais estudadas obtidos de forma direta, concluindo-se que o desenvolvimento desta metodologia proporcionou realizar com sucesso a caracterização química.

Ao realizar uma comparação entre HIS-Raman e HIS-NIRS, algumas características de ambas as técnicas devem ser levadas em consideração. A HIS-Raman forneceu sinais dos componentes específicos em madeira, como a celulose, hemicelulose e lignina, com menor sobreposição de sinais quando comparados com a HIS-NIRS. Tal vantagem possibilitou a atribuição dos grupos químicos, mesmo sem possuir o espectro inicial de todos os componentes para fins de comparação. Além disso, amostras biológicas como a madeira não apresentaram sinal de espalhamento Raman referente à água e, portanto, esse componente não interfere

na análise. Todavia, a técnica apresentou a desvantagem da alta interferência da fluorescência proveniente dos extrativos presentes na madeira, o que resultou na impossibilidade de avaliação destes componentes. Outra desvantagem detectada foi o ruído intenso proveniente do método de aquisição espectral.

A HIS-NIRS tem a característica de ser eficaz para a aplicação em análise de madeira, em que os sobretons e bandas de combinação observadas na região do infravermelho próximo estão presentes nas moléculas dos constituintes da madeira, como celulose, hemicelulose, lignina e extrativos, o que remete à aquisição de espectros típicos destes constituintes. Os espectros obtidos neste estudo apresentaram baixo ruído espectral e linha de base sem flutuações significativas. A desvantagem da técnica está na elevada sobreposição das bandas, que apresentam bandas de combinação em regiões muito próximas e também, da intensidade da banda relativa à ligação O-H presente na molécula de água. Contudo, a HIS-NIRS se mostrou uma técnica eficiente para caracterizar a composição química da madeira utilizando MCR-ALS.

A última aplicação desta tese foi direcionada ao estudo de imagens digitais combinada à técnica de fluorescência molecular e análise por PLS1-DA para discriminação das espécies de madeira com caracteres similares. As eficiências de classificação obtidas foram de 88,32 %, 85,65 %, 83,72 % e 95,95 % para as espécies *Cedrela odorata* (cedro), *Micropholis melinoniana* (curupixá), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Swietenia macrophylla* King (mogno) respectivamente, enquanto a *Erismia uncinatum* Warm. (cedrinho) teve 100 % de classificação correta das amostras.

Portanto, a utilização de imagens digitais e fluorescência para a discriminação destas espécies de madeira demonstrou ser uma técnica promissora, frente às técnicas já descritas na literatura, como a NIRS. A fluorescência molecular pode ser mais amplamente explorada com o uso de diferentes instrumentos de aquisição de imagens e ferramentas quimiométricas aplicadas para a análise dos dados.

Por fim, almeja-se que a presente tese possa trazer novas perspectivas frente à utilização da espectroscopia de imagem e quimiometria como técnicas analíticas aplicadas a materiais complexos, tais quais a madeira, com o intuito de maximizar de forma direta a caracterização química dos mais diversos tipos de materiais. A análise de imagens digitais e fluorescência aplicada à madeira é um campo a ser explorado e traz a vantagem da utilização de instrumentos de baixo custo para aquisição de imagens, quando comparados aos custos relacionados à um espectrofluorímetro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ O. Sala. *Fundamentos de Espectroscopia Raman E No Infravermelho*. Ed. Unesp, São Paulo, **1996**. p 276.
- ² H.G. Richter, L.M. Burger. *Anatomia da madeira*. Editora Nobel, São Paulo, **1991**, 154p.
- ³ D. Fengel, G. Wegener. *Wood: chemistry ultrastructure reactions*. Walter de Gruyter, Berlin and New York, **1984**, 613 p.
- ⁴ U.P. Agarwal. *Raman imaging to investigate ultrastructure and composition of plant cell walls: distribution of lignin and cellulose in black spruce wood (Picea mariana)*. *Planta*. **2006**, 224, 1141–1153..
- ⁵ C.L Evans, X. S. Xie. *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine*. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, 1, 883–909.
- ⁶ M. Schwanninger, J.C. Rodrigues, K. Fackler. *A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components*. *J. Near Infrared Spectrosc.* **2011**, 19, 287–308.
- ⁷ U.P. Agarwal, R.S. Reiner, A.K. Pandey, S.A. Ralph, K.C. Hirth, R.H. Atalla. *Raman spectra of lignin model compounds*. *Appita*. **2005**, 1, 1–9.
- ⁸ A.D. Czaja, A.B. Kudryavtsev, J.W. Schopf. *New method for the microscopic, nondestructive acquisition of ultraviolet resonance Raman spectra from plant cell walls*. *Appl. Spectrosc.* **2006**, 60, 352–355.
- ⁹ L. Sun, B. Simmons, S. Singh. *Understanding tissue specific compositions of bioenergy feedstocks through hyperspectral Raman imaging*. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 108, 286–295.
- ¹⁰ N. Gierlinger, L. Sapei, O. Paris. *Insights into the chemical composition of Equisetum hyemale by high resolution Raman imaging*. *Planta*, **2008**, 227, 969–980.
- ¹¹ N. Gierlinger, T. Keplinger, M. Harrington. *Imaging of plant cell walls by confocal Raman microscopy*. *Nat. Protoc.* **2012**, 7, 1694–1708.
- ¹² S. Kelley, T. Rials, R. Snell, L. Groom, A. Sluiter. *Use of near infrared spectroscopy to measure the chemical and mechanical properties of solid wood*. *Wood Sci. Technol.* **2004**, 38, 257–276.
- ¹³ P.D. Jones, L.R. Schimleck, G.F. Peter, R.F. Daniels, A. Clark. *Nondestructive estimation of wood chemical composition of sections of radial wood strips by diffuse reflectance near infrared spectroscopy*. *Wood Sci. Technol.* **2006**, 40, 709–720.
- ¹⁴ H. Baillères, F. Davrieux, F. Ham-pichavant. *Near infrared analysis as a tool for rapid screening of some major wood characteristics in a eucalyptus breeding program*. *Ann. For. Sci.* **2002**, 59, 479–490.
- ¹⁵ T.C.M. Pastore, J.W.B. Braga, V.T.R. Coradin, W.L.E. Magalhães, E.Y.A. Okino,

- J.A.A. Camargos, G.I.B. de Muniz, O.A. Bressan, F. Davrieux *Near infrared spectroscopy (NIRS) as a potential tool for monitoring trade of similar woods: Discrimination of true mahogany, cedar, andiroba, and curupixá*. *Holzforschung*. **2011**, 65, 73–80.
- ¹⁶ J.W.B. Braga, T.C.M. Pastore, V.T.R. Coradin, J.A.A. Camargos, A.R. da Silva. *The use of near infrared spectroscopy to identify solid wood specimens of Swietenia macrophylla (CITES Appendix II)*. *IAWA J.* **2011**, 32, 285–296.
- ¹⁷ K.K. Pandey, N.K. Upreti, V.V. Srinivasan. *A fluorescence spectroscopic study on wood*. *Wood Sci. Technol.* **1998**, 32, 309–315.
- ¹⁸ S.T. Sum. D. L. Singleton, G. Paraskevopoulos, R. S. Irwin, R. J. Barbour, R. Sutcliffe. *Laser-excited fluorescence spectra of eastern SPF wood species. An optical technique for identification?* *Wood Sci. Technol.* **1991**, 25, 405–413.
- ¹⁹ E.M. Oliveira, J.W.B. Braga, A.F. Costa. *Discriminação de madeiras similares por fluorescência molecular e mínimos quadrados parciais*. *Quim. Nova*. **2015**, 38, 1176–1180.
- ²⁰ J.G. Teixeira, B. Roque, U. de Oliveira, J.V. de Figueiredo. *Emissão de fluorescência do cerne de espécies tropicais*. *Ciência da Madeira (Braz. J. Wood Sci.)* **2012**, 3, 11–21.
- ²¹ J.M. Prats-Montalbán, A. de Juan, A. Ferrer. *Multivariate image analysis: A review with applications*. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2011**, 107, 1–23.
- ²² C.Duchesne, J.J. Liu, J.F. MacGregor. *Multivariate image analysis in the process industries: A review*. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2012**, 117, 116–128.
- ²³ U. Klock, G.I.B. Muniz, J.A. Hernandez, A.S. Andrade. *Química da madeira*. 3^a ed, Curitiba: Universidade Federal do Paraná, **2005**. 86p.
- ²⁴ V.T.R. Coradin, J.A.A. Camargos. *A estrutura anatômica da madeira e princípios para sua identificação*. Laboratório de Produtos Florestais (LPF), Brasília. **2002**, 28p.
- ²⁵ A.L. Gonzaga. *Madeira: uso e conservação*. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico (IPHAN)/MONUMENTA. Brasília, **2006**, 243p.
- ²⁶ A. Costa. *Coletânea de anatomia da madeira*. **2015**. Disponível em: <http://www.joinville.udesc.br/sbs/professores/arlindo/materiais/APOSTILANATOMIA_1.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2014.
- ²⁷ R.M. Rowell. *Handbook of wood chemistry and wood composites*. Boca Raton: CRC Press, New York, **2005**.
- ²⁸ R.T. Morrison, R.N. Boyd. *Química Orgânica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 15ed., **2009**, 1510p.
- ²⁹ A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox. *Princípios de Bioquímica*. 6^a ed Porto Alegre: Artmed, **2014**, 1328p.
- ³⁰ G.W. Huber, S. Iborra, A. Corma. *Synthesis of transportation fuels from biomass: Chemistry, catalysts, and engineering*. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 4044–4098.

- ³¹ S.A.L. de Moraes, E.A.do Nascimento, D.C. de Melo. *Análise da madeira de Pinus oocarpa parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis*. Rev. Árvore. **2005**, 29, 461–470.
- ³² D. Fengel, G. Wegener. *Chemistry - Ultrastructure - Reactions*. 2ª ed. Walter de Gruyter. Berlin. **1989**, 613p
- ³³ L.C.A. Barbosa, C.R.A. Maltha, V.L. Silva, J.L.Colodette. *Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI-CG/EM)*. Quim.Nova. **2008**, 31, 2035–2041.
- ³⁴ C.W. Dence, S.Y. Lins. *Methods in Lignin Chemistry*. Springer Verlag: Berlin, **1992**.
- ³⁵ E.O.S. Saliba, N.M. Rodriguez, S.A.L. Moraes, D.P. Veloso. *Ligninas – Métodos de Obtenção e Caracterização Química*. Ciência Rural. **2001**, 31, 917–928.
- ³⁶ X. Zhang, Z. Ji, X. Zhou, J-F. Ma, Y-H. Hu, F. Xu. *Method for Automatically Identifying Spectra of Different Wood Cell Wall Layers in Raman Imaging Data Set*. Anal. Chem. **2015**, 87, 1344–1350.
- ³⁷ M. Schmidt, A.M. Schwartzberg, A. Carroll, A. Chaibang, P.D. Adams, P.J. Schuck. *Raman imaging of cell wall polymers in Arabidopsis thaliana*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **2010**, 395, 521–523.
- ³⁸ F.J. Holler, D.A. Skoog, S.R. Crouch. *Princípios de Análise Instrumental*. 6ª ed. Bookman, Porto Alegre, **2009**, 1056p.
- ³⁹ D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S.Kriz, J.R. Vyvyan. *Introdução à espectroscopia*. Editora Cengage Learning, tradução da 4ª ed., **2010**, 716p.
- ⁴⁰ C. Pasquini. *Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications*. J. Braz. Chem. Soc. **2003**, 14, 198–219.
- ⁴¹ D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch. *Fundamentos de Química Analítica*. Editora Thomson, tradução da 8ª ed., **2006**, 1030p.
- ⁴² R.M. Silverstein, F.X. Webster. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. LTC Livros Técnicos e Científicos, 6ªed., Rio de Janeiro, **2000**, 460p.
- ⁴³ P.D. Jones, L.R. Schimleck, R.F. Daniels, A. Clark, R.C. Purnell. *Comparison of Pinus taeda L. whole-tree wood property calibrations using diffuse reflectance near infrared spectra obtained using a variety of sampling options*. Wood Sci. Technol. **2008**, 42, 385–400.
- ⁴⁴ P. Hoffmeyer, J. Pedersen. *Evaluation of density and strength of Norway spruce wood by near infrared reflectance spectroscopy*. Holz als Roh- und Werkst. **1995**, 53, 165–170.
- ⁴⁵ V. Kothiyal, A. Raturi. *Estimating mechanical properties and specific gravity for five-years-old Eucalyptus tereticornis having broad moisture content range by NIR spectroscopy*. Holzforschung. **2011**, 65, 757–762.

- ⁴⁶ P.D. Jones, L.R. Schimleck, G.F. Peter, R.F. Daniels, A. Clark. *Nondestructive estimation of Pinus taeda L. wood properties for samples from a wide range of sites in Georgia*. Can. J. For. Res. **2005**, 35, 85–92.
- ⁴⁷ L.R. Schimleck, C. Espey, C.R. Mora, R. Evans, A. Taylor, G. Muniz. *Characterization of the wood quality of pernambuco (Caesalpinia echinata Lam) by measurements of density, extractives content, microfibril angle, stiffness, color, and NIR spectroscopy*. Holzforschung. **2009**, 63, 457–463.
- ⁴⁸ L.R.Schimleck, R. Evans. *Estimation of air-dry density of increment cores by near infrared spectroscopy*. Appita J. **2003**, 56, 312–317.
- ⁴⁹ L.R. Schimleck, R. Evans, J. Ilic. *Application of near infrared spectroscopy to a diverse range of species demonstrating wide density and stiffness variation*. IAWA J. **2001**, 22, 415–429.
- ⁵⁰ B.K. Via, C.L. So, T.F. Shupe, M. Stine, L.H. Groom. *Ability of near infrared spectroscopy to monitor air-dry density distribution and variation of wood*. Wood Fiber Sci. **2005**, 37, 394–402.
- ⁵¹ T.J. Toivanen, R. Alén. *Variations in the chemical composition within pine (Pinus sylvestris) trunks determined by diffuse reflectance infrared spectroscopy and chemometrics*. Cellulose. **2006**, 13, 53–61.
- ⁵² E. Pecoraro, B. Pizzo, A. Alves, N. Macchioni, J.C. Rodrigues. *Measuring the chemical composition of waterlogged decayed wood by near infrared spectroscopy*. Microchem. J. **2015**, 122, 176–188.
- ⁵³ S. Tsuchikawa, H. Kobori. *A review of recent application of near infrared spectroscopy to wood science and technology*. J. Wood Sci. **2015**, 61, 213–220.
- ⁵⁴ G. Bonifazi, L. Calienno, G. Capobianco, A. L. Monaco, C. Pelosi, R. Picchio, S. Serranti. *Modeling color and chemical changes on normal and red heart beech wood by reflectance spectrophotometry, Fourier Transform Infrared spectroscopy and hyperspectral imaging*. Polym. Degrad. Stab. **2015**, 113, 10–21.
- ⁵⁵ M. Riddell, J. Harrington, B. Nanayakkara, R. Meder, A. Thumm. *Near infrared hyperspectral imaging applied to mapping chemical composition in wood samples*. J. Near Infrared Spectrosc. **2010**, 18, 507-515.
- ⁵⁶ C.R. Mora, L.R. Schimleck, S.C. Yoon, C.N. Thai. *Determination of basic density and moisture content of loblolly pine wood disks using a near infrared hyperspectral imaging system*. J. Near Infrared Spectrosc. **2011**, 19, 401–409.
- ⁵⁷ J. Grogan, P. Barreto. *Big-leaf mahogany on CITES Appendix II: Big challenge, big opportunity*. Conserv. Biol. **2005**, 19, 973.
- ⁵⁸ F. Bygrave, P. Bygrave. *Growing Australian Red Cedar and other Meliaceae species in plantation*. Barton: Rirdc, **2005**. Disponível em: <http://findarticles.com/p/articles/mi_7252/is_2_69/ai_n31677_196/>. Acesso em 10 set 2015.
- ⁵⁹ I. Tomaselli, S.R. Hirakuri. *Converting mahogany*. ITTO Tropical forest update.

2008, 18, 12.

- ⁶⁰ J.A.A. Camargos, V.T.R. Coradin, C.M. Czanerski, D. Oliveira, I. Meguerditchian. *Catálogo de árvores do Brasil*. 2^a ed. Ibama, Brasília, **2001**. 896p.
- ⁶¹ V.T.R. Coradin, J.A.A. Camargos, L.F. Marques, E.R. da Silva Jr. *Madeiras similares ao mogno (Swietenia macrophylla King.): Chave ilustrada para identificação anatômica em campo*. 2^a ed. Serviço Florestal Brasileiro/LPF, Brasília, **2009**. 28p.
- ⁶² M.H. Souza, M.M Magliano, J.A.A. Camargos, M.R. Souza. *Madeiras tropicais brasileiras = Brazilian tropical Woods*. IBAMA/LPF: Brasília. **1997**.
- ⁶³ Y. Horikawa, S. Mizuno-Tazuru, J. Sugiyama. *Near-infrared spectroscopy as a potential method for identification of anatomically similar Japanese diploxylons*. J. Wood Sci. **2015**, 61, 251–261.
- ⁶⁴ T. Avella, R. Dechamps, M. Bastin. *Fluorescence study of 10610 woody species from the Tervuren (Tw) collection, Belgium*. IAWA Bull. **1988**, 9, 346–352.
- ⁶⁵ E.A. Wheeler, P. Baas, P.E. Gasson. *IAWA list of microscopic features for hardwood identification*. IAWA Bull. **1989**, 10, 219–332.
- ⁶⁶ J.A. Guzmán, H.G. Richter, A.R. Rodríguez, F.J. Talavera. *Wood fluorescence of commercial timbers marketed in Mexico*. IAWA J. **2008**, 29, 311–322.
- ⁶⁷ J.K. Khoury Junior, F.A. C. Pinto, N.T. dos Santos, R.M.D Lúcia, E.E. Maeda. *Análise discriminante paramétrica para reconhecimento de defeitos em tábuas de eucalipto utilizando imagens digitais*. Rev. Árvore. **2005**, 29, 299–309..
- ⁶⁸ P. Zhao, G. Dou, G-S. Chen. *Wood species identification using improved active shape model*. Opt. - Int. J. Light Electron Opt. **2014**, 125, 5212–5217.
- ⁶⁹ J.R. Wooten, S.D.F. To, C. Igathinathane, L.O. Pordesimo. *Discrimination of bark from wood chips through texture analysis by image processing*. Comput. Electron. Agric. **2011**, 79, 13–19.
- ⁷⁰ R. Yusof, M. Khalid, A.S. Anis. *Application of kernel-genetic algorithm as nonlinear feature selection in tropical wood species recognition system*. Comput. Electron. Agric. **2013**, 93, 68–77.
- ⁷¹ P.J. Larkin. *IR and Raman Spectroscopy - Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier USA, **2011**.
- ⁷² R.S. Das, Y.K. Agrawal. *Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications*. Vib. Spectrosc. **2011**, 57, 163–176.
- ⁷³ C.V. Singh. *C.V Raman and the discovery of the Raman effect*. Phys. perspect. **2002**, 4, 399–420.
- ⁷⁴ L. Opilik, T. Schmid, R. Zenobi. *Modern Raman Imaging: Vibrational Spectroscopy on the Micrometer and Nanometer Scales*. Annu. Rev. Anal. Chem. **2013**, 6, 379–398.

- ⁷⁵ O. Sala. *I₂. Uma molécula didática*. Quim. Nova. **2008**, 31, 914–920.
- ⁷⁶ K. Nakamoto. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry*. New York, John Wiley & Sons, 6^a ed., **2009**, 427p.
- ⁷⁷ L.C.A. Barbosa. *Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos*. Editora UFV, 1^aed. Viçosa. **2007**, 189p.
- ⁷⁸ J.J. Workman Jr. *Interpretative spectroscopy for near Infrared*. Appl. Spectrosc. Rev. **1996**, 31, 251–320.
- ⁷⁹ H.H. Willard, L.L. Merritt Jr., J.A. Dean, F.A. Settle Jr. *Instrumental Methods of analysis*. Wadsworth: Belmont. CA. **1988**.
- ⁸⁰ D.C. Harris. *Análise Química Quantitativa*. Editora LTC, 6^a ed. Rio de Janeiro. **2005**, 862p.
- ⁸¹ A. de Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault, M. Maeder. *Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combination for global and local sample analysis*. TrAC Trends Anal. Chem. **2004**, 23, 70–79.
- ⁸² J. Huang, H. Wium, K.B. Qvist, K.H. Esbensen. *Recent Applications of Chemical Imaging to Pharmaceutical Process Monitoring and Quality Control*. Chemom. Intell. Lab. Syst. **2003**, 66, 141–158.
- ⁸³ P. Geladi, H.F. Grahn. *Multivariate image analysis*. Chichester: Wiley, **1996**.
- ⁸⁴ J.M. Amigo. *Practical issues of hyperspectral imaging analysis of solid dosage forms*. Anal. Bioanal. Chem. **2010**, 398, 93–109.
- ⁸⁵ K.L.A. Chan, S.G. Kazarian. *New opportunities in micro- and macro-attenuated total reflection infrared spectroscopic imaging: spatial resolution and sampling versatility*. Appl. Spectrosc. **2003**, 57, 381–389.
- ⁸⁶ F. Lindgren, P. Geladi. *Multivariate spectrometric image analysis An illustrative study with two constructed examples of metal ions in solution*. Chemom. Intell. Lab. Syst. **1992**, 14, 397–412.
- ⁸⁷ W.K. Pratt. *Digital Image Processing*. John Wiley & Sons, INC.: New York, **2001**.
- ⁸⁸ R.C. Gonzalez, R.E. Woods, S.L. Eddings. *Digital Image Processing Using Matlab*, 2^aed. Gatesmark Publishing: United States of America, **2009**.
- ⁸⁹ R.G. Brereton. *The evolution of chemometrics*. Anal. Methods. **2013**, 5, 3785–3789.
- ⁹⁰ D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Part A*. Elsevier Science B.V. Amsterdam, **1997**.
- ⁹¹ M.M. Sena, R.J. Poppi, R.T.S. Frighetto, P.J. Valarini. *Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos*. Quim. Nova. **2000**, 23, 547–556.

- ⁹² A.M. de Souza, R.J. Poppi. *Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I*. Quim. Nova. **2012**, 35, 223–229.
- ⁹³ B.B. Neto, I.S. Scarminio, R.E. Bruns. *25 anos de quimiometria no Brasil*. Quim. Nova. **2006**, 29, 1401–1406.
- ⁹⁴ M.M.C. Ferreira, A.M. Antunes, M.S. Melgo, P.L.O. Volpe. *Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial*. Quim. Nova. **1999**, 22, 724–731.
- ⁹⁵ K.S. Booksh, B.R. Kowalski. *Theory of Analytical Chemistry*. Anal. Chem. **1994**, 66, 782–791.
- ⁹⁶ R. Bro. *Multivariate calibration What is in chemometrics for the analytical chemist?* Anal. Chim. Acta. **2003**, 500, 185–194.
- ⁹⁷ R. Bro. *PARAFAC. Tutorial and applications*. Chemom. Intell. Lab. Syst. **1997**, 38, 149–171.
- ⁹⁸ R. Tauler, A. Smilde, B. Kowalski. *Selectivity, local rank, three way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution*. J. Chemom. **1995**, 9, 31–58.
- ⁹⁹ R. Tauler. *Multivariate curve resolution applied to second order data*. Chemom. Intell. Lab. Syst. **1995**, 30, 133–146.
- ¹⁰⁰ P. Geladi. *Chemometrics in Spectroscopy. Part 1. Classical Chemometrics*. Spectrochim. Spectrosc. **2003**, 58, 767–782.
- ¹⁰¹ E.V.A.Thomas. *Primer on Multivariate Calibration*. Anal. Chem. **1994**, 66, 795–804.
- ¹⁰² R.G. Brereton. *Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry*. Analyst. **2000**, 125, 2125–2154.
- ¹⁰³ N. Kettaneh, A. Berglund, S. Wold. *PCA and PLS with very large data sets*. Comput. Stat. Data Anal. **2005**, 48, 69–85.
- ¹⁰⁴ S. Wold, M. Sjöström, L. Eriksson. *PLS-regression: a basic tool of chemometrics*. Chemom. Intell. Lab. Syst. **2001**, 58, 109–130.
- ¹⁰⁵ P. Geladi, B.R. Kowalski. *Partial Least-Squares Regression: A tutorial*. Anal. Chim. Acta. **1986**, 185, 1–17.
- ¹⁰⁶ J. Trygg, S. Wold. *PLS regression on wavelet compressed NIR spectra*. Chemom. Intell. Lab. Syst. **1998**, 42, 209–220.
- ¹⁰⁷ T. Næs, T. Isaksson, T. Fearn, T. Davies. *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. NIR Publications, Chichester, **2004**, 344 p.
- ¹⁰⁸ U.G. Indahl. *The geometry of PLS1 explained properly: 10 key notes on mathematical properties of and some alternative algorithmic approaches to PLS1 modelling*. J. Chemom. **2014**, 28, 168–180.

- ¹⁰⁹ S. de Jong. *SIMPLS: an alternative approach to partial least squares regression*. Chemom. Intell. Lab. Syst. **1993**, 18, 251–263.
- ¹¹⁰ A. Rinnan, F. van den Berg, S.B. Engelsen. *Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra*. TrAC Trends Anal. Chem. **2009**, 28, 1201–1222.
- ¹¹¹ E.V. Thomas, D.M. Haaland. *Comparison of multivariate calibration methods for quantitative spectral analysis*. Anal. Chem. **1990**, 62, 1091–1099.
- ¹¹² P. Geladi, D. MacDougall, H. Martens. *Linearization and Scatter-Correction for Near-Infrared Reflectance Spectra of Meat*. Appl. Spectrosc. **1985**, 39, 491–500.
- ¹¹³ M. Barker, W. Rayen. *Partial least squares for discrimination*. J. Chemom. **2003**, 7, 166–173.
- ¹¹⁴ M.C.J. Bergo. *Transferência de calibração na discriminação de mogno e espécies semelhantes utilizando NIRS e PLS-DA*. 133p. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Brasil. **2014**.
- ¹¹⁵ B.G. Botelho, N. Reis, L.S. Oliveira, M.M. Sena. *Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA*. Food Chem. **2015**, 181, 31–37.
- ¹¹⁶ C.S. Gondim, R.G. Junqueira, S.V.C. Souza. *Tendências em Validação de Métodos de Ensaio Qualitativos (Trends in implementing the validation of qualitative methods of analysis)*. Rev. Inst. Adolfo Lutz. **2011**, 70, 433–447.
- ¹¹⁷ Annual Book of ASTM Standards, Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis - E1655-12, ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvania, EUA, 2012. 29p.
- ¹¹⁸ P. Valderrama, J.W.B. Braga, R.J. Poppi. *Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada*. Quim. Nova. **2009**, 32, 1278–1287.
- ¹¹⁹ P. Valderrama, J.W.B. Braga, R.J. Poppi. *Variable selection, outlier detection and figures of merit estimation in a PLSR multivariate calibration model. A case study for the determination of quality parameters in alcohol industry by near infrared spectroscopy*. J. Agric. Food Chem. **2007**, 55, 8331–8338.
- ¹²⁰ A. Borin, R.J. Poppi. *Multivariate quality control of lubricating oils using Fourier transform infrared spectroscopy*. J. Braz. Chem. Soc. **2004**, 15, 570–576.
- ¹²¹ J.W.B. Braga. *Aplicação e validação de modelos de calibração de segunda ordem em química analítica*. 279p. Teste de Doutorado. Universidade de Campinas, Brasil. **2008**.
- ¹²² E. Trullols, I. Ruisanchez, X.F. Rius. *Validation of qualitative analytical methods*. Trends Anal. Chem. **2004**, 23, 137–145.
- ¹²³ C.S. Gondim, O.A. Coelho, R.L. Alvarenga, R.G. Junqueira S.V. de Souza. *An appropriate and systematized procedure for validating qualitative methods: its application in the detection of sulfonamide residues in raw milk*. Anal. Chim. Acta

2014, 9, 11–22.

¹²⁴ A.R. Martins. *Desenvolvimento de método para discriminação entre marcas de uísque e identificação de adulteração por espectroscopia UV-Vis e PLS-DA*. 101p. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasil. **2015**.

¹²⁵ R. Tauler, B. Kowalski, S. Fleming. *Multivariate Curve Resolution Applied to Spectral Data from Multiple Runs of an Industrial Process*. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2040–2047.

¹²⁶ A. de Juan, R. Tauler. *Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: Progress in Concepts and Applications*. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2006**, 35, 163–176.

¹²⁷ H. Parastar, R. Tauler. *Multivariate curve resolution of hyphenated and multidimensional chromatographic measurements: A new insight to address current chromatographic challenges*. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 286–297.

¹²⁸ R. Tauler, M. Maeder, A. de Juan. *Multiset Data Analysis: Extended Multivariate Curve Resolution*. *Compr. Chemom.* **2009**, 473–505.

¹²⁹ A. de Juan, S. Navea, J. Diewok, R. Tauler. *Local rank exploratory analysis of evolving rank-deficient systems*. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2004**, 70, 11–21.

¹³⁰ A. de Juan, M. Maeder, T. Hancewicz, R. Tauler. *Use of local rank-based spatial information for resolution of spectroscopic images*. *J. Chemom.* **2008**, 22, 291–298.

¹³¹ A-L. Xia, H.L. Wu, Y. Zhang, S.H. Zhu, Q.J. Han, R.Q. Yu. *A novel efficient way to estimate the chemical rank of high-way data arrays*. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 598, 1–11.

¹³² M. Linder, R. Sundberg. *Second-order calibration: Bilinear least squares regression and a simple alternative*. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1998**, 42, 159–178.

¹³³ D. Milford, M. Sandell. *Singular value decomposition using an array of CORDIC processors*. *Signal Process.* **2014**, 102, 163–170.

¹³⁴ H. Gampp, M. Maeder, C.J. Meyer, A.D. Zuberbühler. *Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data-IV Model-free least-squares refinement by use of evolving factor analysis*. *Talanta.* **1986**, 33, 943..

¹³⁵ H.R. Keller, D. Massar, J.O. Debeer. *Exhaustive evolving factor analysis (E-EFA)*. *J. Chemom.* **2001**, 69, 89-101.

¹³⁶ L. Cao, B. de Harrington, J. Liu. *SIMPLISMA and ALS applied to two-way nonlinear wavelet compressed ion mobility spectra of chemical warfare agent simulants*. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 2575–2586.

¹³⁷ W. Windig, N.B. Gallagher, J.M. Shaver, B.M. Wise. *A new approach for interactive self-modeling mixture analysis*. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2005**, 77, 85–96.

¹³⁸ W. Windig, D.A. Stephenson. *Self-Modeling Mixture Analysis of 2nd-Derivative Near-Infrared Spectral Data Using the Simplisma Approach*. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 2735–2742.

- ¹³⁹ W. Windig, J. Guilment. *Interactive Self-Modeling Mixture Analysis*. Anal. Chem. **1991**, 63, 1425–1432.
- ¹⁴⁰ J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler. *A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB*. Chemom. Intell. Lab. Syst. **2005**, 76, 101–110.
- ¹⁴¹ J. Jaumot, A. de Juan, R. Tauler. *MCR-ALS GUI 2.0: New features and applications*. Chemom. Intell. Lab. Syst. **2015**, 140, 1–12.
- ¹⁴² Z. Zhang, Z. Ji, J. Ma, F. Xu. *Anatomy, cell wall ultrastructure and inhomogeneity in lignin distribution of Broussonetia papyrifera*. Cellulose Chem. Technol. **2012**, 46, 157–164.
- ¹⁴³ U.P. Agarwal, R.S. Reiner, S.A. Ralph. *Cellulose I crystallinity determination using FT-Raman spectroscopy: univariate and multivariate methods*. Cellulose. **2010**, 17, 721–733.
- ¹⁴⁴ F. Judith, H. Hardy, J. Jaumot, R. Tauler, A. de Juan, A. Gorzsás. *Vibrational spectroscopic image analysis of biological material using multivariate curve resolution–alternating least squares (MCR-ALS)*. **2015**, 10, 217–240.
- ¹⁴⁵ U.P. Agarwal, R.H. Atalla. *In-situ Raman microprobe studies of plant cell walls: Macromolecular organization and compositional variability in the secondary wall of Picea mariana (Mill.) B.S.P. Planta*. **1986**, 169, 325–332.
- ¹⁴⁶ U.P. Agarwal, S.A. Ralph. *FT-Raman spectroscopy of wood: Identifying contributions of lignin and carbohydrate polymers in the spectrum of black spruce (Picea mariana)*. Appl. Spectrosc. **1997**, 51, 1648–1655.
- ¹⁴⁷ M.C.A Silva, L.D.S. Rosa, T.A. Vieira. *Eficiência do nim (Azadirachta indica A. Juss) como barreira natural ao ataque de Hypsipyla grandella (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) sobre o mogno (Swietenia macrophylla King)*. Acta Amaz. **2013**, 43, 19–24.
- ¹⁴⁸ E. Mejía, X. Buitrón, M. Peña-Claros, J. Grogan. *Big-leaf mahogany (Swietenia macrophylla) in Peru, Bolivia and Brazil*. In: NDF Workshop Case Studies, WG 1-Trees, Case Study 4. **2008**. 36p.
- ¹⁴⁹ Technical Association of the Pulp and Paper Industry. *Solvent extractives of wood and pulp*. TAPPI test methods. Atlanta:TAPPI Press. **2007**.
- ¹⁵⁰ D. Templeton, T. Ehrman. *Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass*. National Renewable Energy Laboratory: Golden, CO, **1995**.
- ¹⁵¹ D. Templeton, T. Ehrman. *Determination of acid-Soluble Lignin in Biomass*. National Renewable Energy Laboratory: Golden, CO, **1995**.
- ¹⁵² W.E. Kaar, L.G. Cool, M.M. Merriman, D.L. Brink. *The Complete Analysis of Wood Polysaccharides Using HPLC*. J. Wood Chem. Technol. **1991**, 11, 447–463.
- ¹⁵³ R. Raymond, T. Ehrman. *Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography*. National Renewable Energy Laboratory:

Golden, CO, **1996**.

¹⁵⁴ M.A.E. Santana, E.Y.A. Okino. *Chemical composition of 36 Brazilian Amazon forest wood species*. *Holzforschung*. **2007**, 61, 469–477.

¹⁵⁵ J. Sjöström; R. Alén. *Analytical Methods in Wood Chemistry Pulping and Papermaking*. New York, **1999**. 316p.

¹⁵⁶ I.D. Santos. *Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica e contração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal de cinco espécies lenhosas do cerrado*. 57p. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasil. **2008**.

¹⁵⁷ S.R. dos Santos, C.A. Sansígolo. *Influência da densidade básica da madeira de clones de Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla na qualidade da polpa branqueada*. *Ciência Florest*. **2007**, 17, 53–63.

¹⁵⁸ J.L. Gomide, H.F. Neto, A.J. Regazzi. *Análise de Critérios de qualidade da madeira de euCalipto para produção de Celulose Kraft*. *Rev. Árvore*. **2010**, 34, 339–344.

¹⁵⁹ W.V. Evangelista, J.D.C. Silva, M.L.A. Valle, B.A. Xavier. *Caracterização anatômica quantitativa da madeira de clones de Eucalyptus camaldulensis Dehnh. e Eucalyptus urophylla S.T. Blake clones*. *Sci. For*. **2010**, 38, 273–284.

¹⁶⁰ R. Tauler. *MCR-ALS Toolbox*. Disponível em: http://www.cid.csic.es/homes/rtaqam/tmp/WEB_MCR/download.html. Acesso em: 1 mar. 2014.

¹⁶¹ P. Geladi, B. Sethson, J. Nyström, T. Lillhonga, T. Lestander, J. Burger. *Chemometrics in spectroscopy Part 2. Examples*. *Spectrochim. Acta Part B*. **2004**, 59, 1347–1357.

¹⁶² R. Gautam, S. Vanga, F. Ariese, S. Umopathy. *Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy*. *EPJ Tech. Instrum*. **2015**, 2, 1-38.

¹⁶³ T. Bocklitz, A. Walter, K. Hartmann, P. Rösch, J. Popp. *How to pre-process Raman spectra for reliable and stable models?* *Anal. Chim. Acta* **2011**, 704, 47–56.

¹⁶⁴ G.P. Sabin, A.M. de Souza, M.C. Breikreitz, R.J. Poppi. *Desenvolvimento de um algoritmo para identificação e correção de spikes em espectroscopia Raman de imagem*. *Quim. Nova*. **2012**, 35, 612–615.

¹⁶⁵ M. Jalali-Heravi, H. Parastar, M. Kamalzadeh, R. Tauler, J. Jaumot. *MCRC software: A tool for chemometric analysis of two-way chromatographic data*. *Chemom. Intell. Lab. Syst*. **2010**, 104, 155–171.

¹⁶⁶ J. Jaumot, R. Tauler. *MCR-BANDS: A user friendly MATLAB program for the evaluation of rotation ambiguities in Multivariate Curve Resolution*. *Chemom. Intell. Lab. Syst*. **2010**, 103, 96–107.

¹⁶⁷ U.P. Agarwal. *An overview of Raman spectroscopy as applied to lignocellulosic*

materials. Argyropoulos E Adv. Lignocellul. Charact. Ch. 9. TAPPI Press. Atlanta. **1999**, 201–225.

¹⁶⁸ N. Gierlinger, M. Schwanninger. *The potential of Raman microscopy and Raman imaging in plant research*. Spectroscopy. **2007**, 21, 69–89.

¹⁶⁹ J. Han, S. Singh, L. Sun, B. Simmons, M. Auer, B. Parvin. *Chemical profiling of the plant cell wall through raman microspectroscopy*. Life Sci. **2010**, 1273–1276..

¹⁷⁰ J. Ma, Z. Ji, X. Zhou, Z. Zhang, F. Xu. *Transmission electron microscopy, fluorescence microscopy, and confocal raman microscopic analysis of ultrastructural and compositional heterogeneity of Cornus alba L. wood cell wall*. Microsc. Microanal. **2013**, 19, 243–53.

¹⁷¹ Z. Ji, M. J-F. Ma, Z-H. Zhang, F. Xu, R-C. Sun. *Distribution of lignin and cellulose in compression wood tracheids of Pinus yunnanensis determined by fluorescence microscopy and confocal Raman microscopy*. Ind. Crops Prod. **2013**, 47, 212–217.

¹⁷² U.P. Agarwal, J.D. McSweeney, S.A. Ralph. *FT-Raman Investigation of Milled-Wood Lignins: Softwood, Hardwood, and Chemically Modified Black Spruce Lignins*. J. Wood Chem. Technol. **2011**, 31, 324–344.

¹⁷³ T. Hänninen, E. Kontturi, T. Vuorinen. *Distribution of lignin and its coniferyl alcohol and coniferyl aldehyde groups in Picea abies and Pinus sylvestris as observed by Raman imaging*. Phytochem. **2011**, 72, 1889–1895.

¹⁷⁴ M. Nuopponen, S. Willför, A-S. Jääskeläinen, A. Sundberg, T. Vuorinen. *A UV resonance Raman (UVR) spectroscopic study on the extractable compounds of Scots pine (Pinus sylvestris) wood. Part II: Hydrophilic compounds*. Spectrochim. Acta. Part A. **2004**, 60, 2963–2968.

¹⁷⁵ M. Nuopponen, S. Willför, A-S. Jääskeläinen, A. Sundberg, T. Vuorinen. *A UV resonance Raman (UVR) spectroscopic study on the extractable compounds of Scots pine (Pinus sylvestris) wood. Part I: lipophilic compounds*. Spectrochim. Acta. Part A. **2004**, 60, 2953–2961.

¹⁷⁶ M. C. Breikreitz, M. C. *Desenvolvimento e caracterização de formulações de fármacos pouco solúveis em água empregando espectroscopia de imagem e quimiometria*. 208p. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas. **2013**.

¹⁷⁷ A. de Juan, M. Maeder, T. Hancewicz, R. Tauler. *Local rank analysis for exploratory spectroscopic image analysis. Fixed Size Image Window-Evolving Factor Analysis*. Chemom. Intell. Lab. Syst. **2005**, 77, 64–74.

¹⁷⁸ X. Zhang, A. de Juan, R. Tauler. *Multivariate Curve Resolution Applied to Hyperspectral Imaging Analysis of Chocolate Samples*. Appl. Spectrosc. **2015**, 69, 993–1003.

¹⁷⁹ K. Fackler, M. Schwanninger. *Polysaccharide degradation and lignin modification during brown rot of spruce wood: a polarised Fourier transform near infrared study*. J. Near Infrared Spectrosc. **2010**, 18, 403-416.

¹⁸⁰ W. He, H. Hu. *Rapid Prediction of Different Wood Species Extractives and Lignin*

Content Using Near Infrared Spectroscopy. J. Wood Chem. Technol. **2013**, 33, 52–64.

¹⁸¹ C-L. So, B.K. Via, L.H. Groom, L.R. Schimleck, T.F. Shupe, S.S. Kelley, T.G. Rials. *Near infrared spectroscopy in the forest products industry*. For. Prod. J. **2004**, 54, 6–16.

¹⁸² R.F. Teófilo, J.P.A. Martins, M.M.C. Ferreira. *Sorting variables by using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression*. J. Chemom. **2009**, 23, 32–48.