



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422015000901176&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 7 maio 2018.

REFERÊNCIA

OLIVEIRA, Elian Meneses; BRAGA, Jez Willian Batista; COSTA, Alexandre Florian da. Discriminação de madeiras similares por fluorescência molecular e mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 9, p. 1176-1180, nov. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422015000901176&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 7 maio 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150127>.

DISCRIMINAÇÃO DE MADEIRAS SIMILARES POR FLUORESCÊNCIA MOLECULAR E MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS**Elián Meneses Oliveira^a, Jez Willian Batista Braga^{b,*} e Alexandre Florian da Costa^a**^aDepartamento de Engenharia Florestal, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, 70919-970 Brasília – DF, Brasil^bInstituto de Química, Universidade de Brasília, 70904-970 Brasília – DF, Brasil

Recebido em 05/05/2015; aceito em 11/06/2015; publicado na web em 23/07/2015

DISCRIMINATION BETWEEN SIMILAR WOODS BY MOLECULAR FLUORESCENCE AND PARTIAL LEAST SQUARES.

Wood is an extremely complex biological material, which can show macroscopic similarities that make it difficult to discriminate between species. Discrimination between similar wood species can be achieved by either anatomic or instrumental methods, such as near infrared spectroscopy (NIR). Although different spectroscopy methods are currently available, few studies have applied them to discriminate between wood species. In this study, we applied a partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) model to evaluate the viability of using direct fluorescence measurements for discriminating between *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urograndis*, and *Cedrela odorata*. The results show that molecular fluorescence is an efficient technique for discriminating between these visually similar wood species. With respect to calibration and the validation samples, we observed no misclassifications or outliers.

Keywords: fluorescence; woods; discrimination; PLS-DA.

INTRODUÇÃO

A madeira é um material biológico extremamente complexo, amplamente conhecido e utilizado. Porém, macroscopicamente, algumas espécies podem apresentar semelhanças, dificultando, assim, uma identificação confiável da espécie. A distinção ou discriminação de madeiras pode ser feita tanto por critérios científicos, levando em conta características anatômicas e organolépticas, quanto por procedimentos ou práticas populares, considerando apenas as características organolépticas ou nomes comuns. A identificação anatômica de espécies madeireiras é um processo relativamente complexo, que requer treinamento especializado, além de uma coleção de madeiras disponíveis para comparações entre espécies, de acordo com o nível de detalhamento exigido.¹

Processos não-anatômicos, como o teste de fluorescência e a espectroscopia do infravermelho próximo (NIR) também podem auxiliar na identificação de diferentes espécies, sendo estas técnicas emergentes e que exigem a realização de uma calibração para a obtenção de um método eficiente que permita a identificação de espécies produtoras de madeiras.¹⁻⁴

A fluorescência é uma etapa do processo de desativação, ou seja, processo pelo qual uma molécula excitada volta ao seu estado fundamental, havendo emissão de um fóton de radiação. A trajetória favorecida para o estado fundamental é aquela que minimiza o tempo de vida do estado excitado. Assim, se a desativação por fluorescência é rápida e mais favorável em relação aos processos não radiativos, tal emissão é observada.⁵ A técnica de espectroscopia de fluorescência tem sido uma ferramenta eficaz para a medição de pequenas quantidades de substâncias químicas, devido à sua alta sensibilidade e seletividade.⁶

O primeiro registro de observação do fenômeno fluorescência em madeiras se deu há mais de 400 anos, com a espécie de *Lignum nephriticum*. Esta espécie era bem conhecida na Europa, nos séculos XVI e XVII, devido aos copos ou taças que eram feitos desta madeira exótica, que exibia uma curiosa cor azul na superfície da água colocada no copo.⁷

A fluorescência em madeiras pode ser visualizada tanto por métodos simples que usam uma lanterna de ultravioleta (UV) para observar uma superfície recém-cortada da madeira (avaliação visual) ou por métodos mais elaborados, como o uso de espectrofluorímetros, que permite a obtenção de espectros.

Estudos realizados expõem diferentes espécies de madeiras à luz UV indicaram que a fluorescência é uma importante característica de diagnóstico na identificação de madeira e distinção entre cerne e alburno.⁸⁻¹¹ Observa-se que, dependendo da espécie, as madeiras apresentam fluorescências diferentes, com a cor variando de marrom ao violeta com praticamente todos os tons de laranja, amarelo, verde, azul e anil. A intensidade da fluorescência, no entanto, não está limitada a uma área particular da madeira. Em alguns casos, o cerne fluoresce de forma mais intensa que o alburno e, em outros casos ocorre o inverso.⁹ Por outro lado, em algumas espécies a fluorescência emitida quando a madeira é irradiada com luz UV é imperceptível a olho nu. Além disso, madeiras macroscopicamente semelhantes podem também apresentar fluorescência semelhante em aspectos de cor e intensidade da cor, dificultando o processo de discriminação entre espécies, sendo, então, necessária a utilização de uma técnica instrumental para a medição da fluorescência para fins de identificação correta da espécie produtora de madeira.

Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar medidas de fluorescência molecular emitida por madeiras de três espécies florestais, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urograndis* e *Cedrela odorata*, investigando o potencial desta técnica instrumental para fins de discriminação destas espécies, empregando calibração multivariada por mínimos quadrados parciais para análise discriminante (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares for Discriminant Analysis*).

PARTE EXPERIMENTAL

O estudo foi conduzido no Laboratório de Automação, Quimiometria e Química Ambiental (AQQUA) do Instituto de Química da Universidade de Brasília, em colaboração com o Departamento de Engenharia Florestal da Faculdade de Tecnologia da Universidade de Brasília.

*e-mail: jez@unb.br

Obtenção das amostras e preparo do material

As amostras das espécies florestais *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urograndis* e *Cedrela odorata* foram obtidas a partir de peças maiores cedidas pelo Laboratório de Produtos Florestais (LPF) do Serviço Florestal Brasileiro (SFB), pertencente ao Ministério do Meio Ambiente (MMA). Essas amostras foram identificadas por especialistas em anatomia de madeira do LPF/SFB e escolhidas por serem visualmente semelhantes entre si.¹²

Foram confeccionadas 90 amostras de dimensões uniformes (2 x 2 x 2 cm), sendo 30 amostras de cada espécie. Inicialmente, as 90 amostras foram secas em estufa a 50 °C, até massa constante. Em seguida, a superfície radial das amostras das madeiras foi lixada com lixas de papel grã n° 180 e 400, respectivamente, para retirada de camada oxidada, já que o processo de oxidação pode interferir na correta análise das amostras.

Determinação da fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência das espécies estudadas foram obtidos com o auxílio do aparelho espectrofluorímetro da marca Varian, modelo Cary Eclipse (Austrália), com acessório para medidas de amostras sólidas.

Para a realização das medidas foram utilizadas fendas de 5 nm em ambos os monocromadores de excitação e o de emissão, velocidade de varredura em 1200 nm/min, ganho da fotomultiplicadora em 600 V e com a radiação ultravioleta fornecida por uma lâmpada de xenônio pulsada de 50 W.

Foram adquiridos espectros de emissão de fluorescência entre 380 e 660 nm com excitação nos comprimentos de onda de 370, 400, 430, 460, 490, 520 e 550 nm.

Construção dos modelos de discriminação

Foram desenvolvidos três modelos, sendo que cada um discrimina uma espécie em relação às outras. Para a construção dos modelos de discriminação, os dados obtidos a partir das 90 amostras foram divididos aleatoriamente em dois conjuntos, sendo um usado para calibração (20 amostras por espécie) e o outro para validação (10 amostras por espécie). O modelo utilizado para a discriminação das espécies foi o PLS-DA, o qual já se encontra descrito em detalhes na literatura.¹³⁻¹⁶ O software utilizado para o desenvolvimento dos modelos de discriminação foi o PLS Toolbox®, versão 6.5, o qual é executado por meio do programa Matlab®, versão R2011a.

Conforme descrito por Botelho *et al.*, a validação de modelos de discriminação pode ser atestada pelo cálculo de figuras de mérito distintas das geralmente empregadas em modelos quantitativos, sendo estas: a taxa de erros falso positivo, taxa de erros falso negativo, a seletividade, a especificidade e a taxa de eficiência do método.¹³ Contudo, em casos onde têm-se uma discriminação clara entre as classes, sem ocorrência de erros de classificação, a observação apenas dessas figuras de mérito durante a otimização do modelo não permite a determinação das melhores condições de pré-processamento, região espectral e número de variáveis latentes. Pois, nesse caso, diferentes condições podem apresentar valores idênticos para todas as figuras de mérito mencionadas. Nessas situações, a otimização do modelo pode ser realizada observando os valores dos erros médios, expressos em termos da raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (RMSEC, do inglês *root mean square error of calibration*), validação cruzada (RMSECV, do inglês *root mean square error of cross-validation*) e a distribuição dos valores de classe estimados para as amostras de calibração. A princípio, as condições que apresentarem o menor valor de RMSECV e que não

sobreajustarem o modelo, o que pode ser comprovado na validação pela comparação dos valores de RMSEC e raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP, do inglês *root mean square error of prediction*), fornecerão o modelo com menor probabilidade de erros de classificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espalhamento de radiação é um fenômeno comum e que pode ser detectado ao se realizar as medidas de fluorescência. Esses espalhamentos ocorrem quando a energia incidente em uma direção é desviada para outras direções, havendo a produção de radiação difusa.¹⁷ Observou-se na Figura 1 que o espalhamento presente nas medidas é conhecido como Rayleigh, ocorrendo no mesmo comprimento de onda de excitação e, por este motivo, se desloca de acordo com a mudança do comprimento de onda de excitação. Esses espalhamentos atrapalham a modelagem, devendo ser excluídos do espectro para a construção dos modelos de discriminação. Desvios de linha de base também são observados nos espectros de uma mesma espécie. Para corrigir tais desvios, visando obter menores erros de discriminação, foi escolhido o pré-processamento "Variável Normal Padrão" (SNV, do inglês *Standard Normal Variate*).

Além das características já mencionadas, também pode ser observado na Figura 1 que as três espécies apresentam espectros muito semelhantes, com as mesmas bandas de emissão. Contudo, observa-se também que há uma diferença de intensidade de emissão entre as espécies. A espécie *Cedrela odorata* apresenta menor intensidade do sinal de fluorescência, seguida por *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urograndis*. Este comportamento facilita a discriminação entre as espécies. Entretanto, os espectros ainda apresentam intensidades muito próximas, dificultando a análise por inspeção visual. Além disso, a variação presente dentro de uma mesma espécie faz com que haja uma sobreposição entre os espectros de espécies distintas. Portanto, para se obter uma discriminação com maior segurança, evitando erros na identificação da espécie, é necessária uma modelagem dos espectros a partir de um modelo de discriminação multivariado.

Para o método apresentado nesse trabalho, foi observada uma clara discriminação das classes por meio da modelagem por PLS-DA, de forma que os valores de RMSEC, RMSECV e a distribuição dos valores de classe estimados foram utilizados para a otimização do método. A Tabela 1 apresenta os valores de RMSEC, RMSEP e a taxa de eficiência em porcentagem para os modelos construídos nos comprimentos de onda de excitação em 370 nm, 400 nm, 430 nm, 460 nm, 490 nm, 520 nm e 550 nm. Em todos os modelos a taxa de eficiência obtida foi de 100%. Portanto, o melhor comprimento de onda de excitação a ser utilizado para a discriminação das espécies pode ser determinado observando os resultados dos erros médios (RMSEC e RMSEP), sendo que os menores valores desses parâmetros e que não apresentem diferença estatisticamente significativa entre si indicaram o melhor o comprimento de excitação a ser escolhido. Erros com estas características implicam na ausência de sobreajuste do modelo, ou seja, o erro médio obtido para as amostras utilizadas para a calibração não apresentará uma diferença significativa do erro médio obtido para as amostras de validação do modelo. Portanto, pelo critério dos erros médios, o comprimento de onda de excitação escolhido foi 370 nm. Esse resultado é concordante com o fato dos espectros de emissão com excitação em 370 nm apresentarem um número maior de bandas de emissão e maior intensidade.

Partindo do modelo desenvolvido com os espectros de emissão obtidos com o comprimento de onda de excitação em 370 nm, os gráficos de dispersão dos valores de classe obtidos para a discriminação das três espécies (*Cedrela odorata*, *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urograndis*) são apresentados nas Figuras 2, 3 e 4, respectivamente.

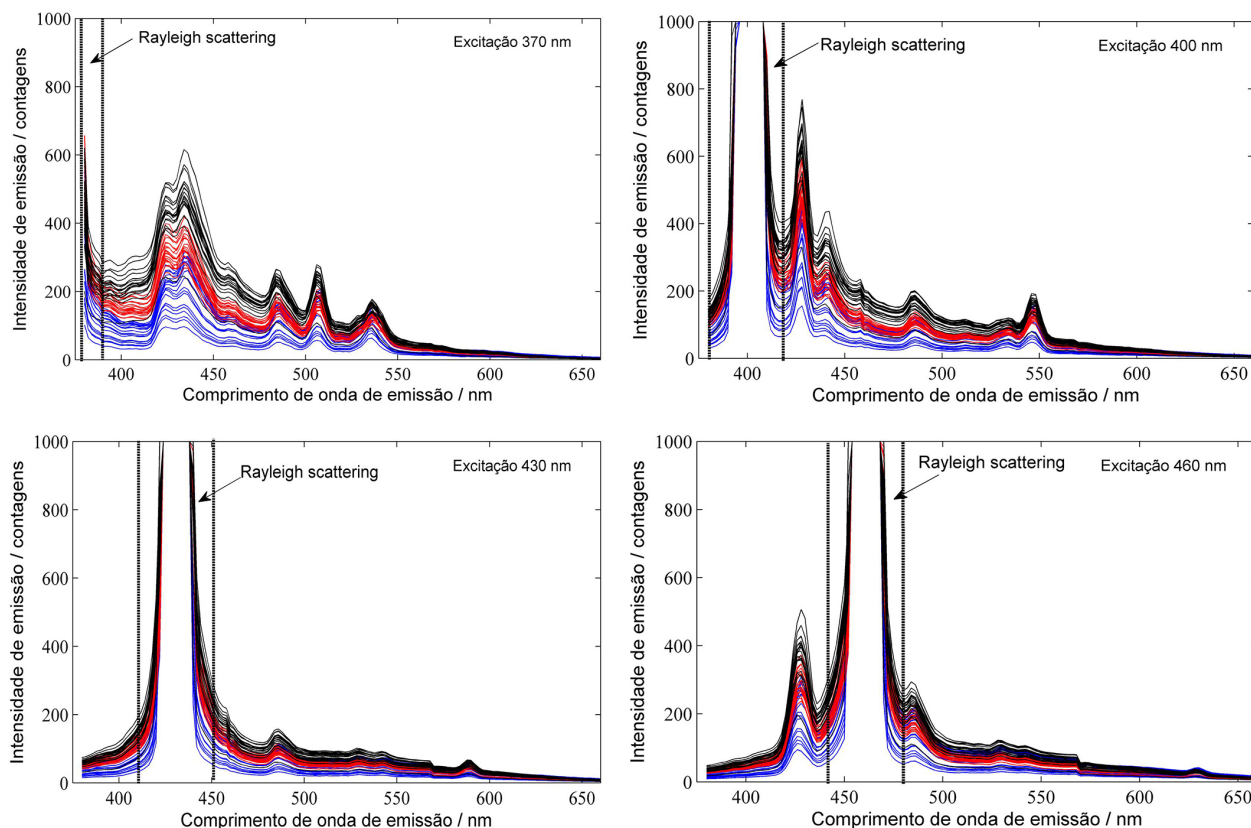


Figura 1. Espectros de emissão de fluorescência obtidos em diferentes comprimentos de onda de excitação. *Cedrela odorata* (azul); *Eucalyptus grandis* (vermelho) e *Eucalyptus urograndis* (preto)

Tabela 1. Erros médios obtidos para as amostras de calibração (RMSEC) e validação (RMSEP), em cada comprimento de onda de excitação

Excitação / nm	<i>Cedrela odorata</i>		<i>Eucalyptus grandis</i>		<i>Eucalyptus urograndis</i>		Eficiência (%)*
	RMSEC	RMSEP	RMSEC	RMSEP	RMSEC	RMSEP	
370	0,052	0,064	0,116	0,089	0,085	0,064	100
400	0,046	0,063	0,075	0,144	0,059	0,104	100
430	0,064	0,086	0,064	0,842	0,045	0,141	100
460	0,072	0,092	0,028	0,185	0,080	0,146	100
490	0,063	0,091	0,044	0,164	0,063	0,135	100
520	0,064	0,082	0,087	0,120	0,068	0,098	100
550	0,073	0,091	0,095	0,148	0,084	0,122	100

*Calculado com base nas amostras de validação como a razão entre o número de classificações corretas e o número total de amostras vezes 100.

O limite de discriminação representa o valor que melhor separa as duas classes. Caso uma amostra apresente valor de classe superior ao limite de discriminação, esta amostra é identificada como pertencente à espécie que o modelo está discriminando, enquanto que, se o valor de classe for inferior ao limite de discriminação, esta amostra é pertencente às demais espécies. Este limite de discriminação é determinado com base na dispersão das amostras de calibração, de forma a minimizar a ocorrência de erros de classificação. Caso as dispersões das duas classes sejam muito semelhantes, o limite de discriminação fica próximo a 0,5, valor que corresponde ao centro da escala. Caso contrário, há um deslocamento do limite de discriminação, visando minimizar possíveis erros de classificação. Este comportamento pode ser notado nas Figuras 2, 3 e 4, em que o limite de discriminação é 0,515, 0,583 e 0,352, para *Cedrela odorata*, *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urograndis*, respectivamente. Para a discriminação da espécie *Eucalyptus urograndis* pode-se observar que as amostras de calibração dessa espécie apresentam uma variação superior às das outras duas espécies, provocando o deslocamento do limite de discriminação para 0,352.

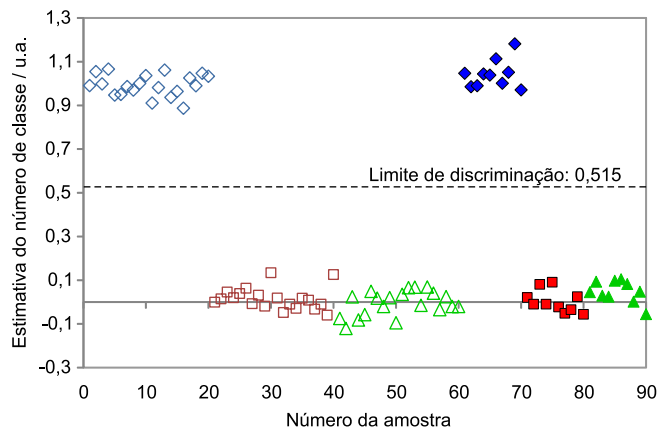


Figura 2. Dispersão das amostras de calibração (símbolos vazios) e validação (símbolos cheios) para discriminação da espécie *Cedrela odorata* outras duas espécies. (◇) *Cedrela odorata*, (□) *Eucalyptus grandis* e (△) *Eucalyptus urograndis*

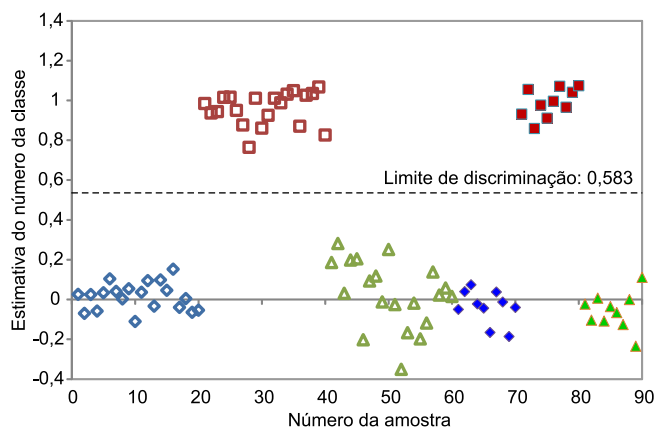


Figura 3. Dispersão das amostras de calibração (símbolos vazios) e validação (símbolos cheios) para discriminação da espécie *Eucalyptus grandis* outras duas espécies. (\diamond) *Cedrela odorata*, (\square) *Eucalyptus grandis* e (\triangle) *Eucalyptus urograndis*

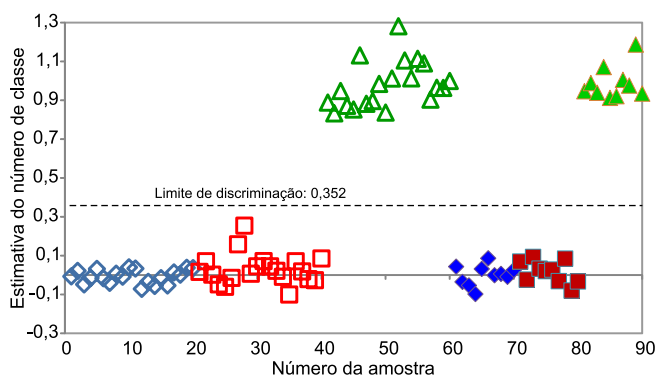


Figura 4. Dispersão das amostras de calibração (símbolos vazios) e validação (símbolos cheios) para discriminação da espécie *Eucalyptus urograndis* outras duas espécies. (\diamond) *Cedrela odorata*, (\square) *Eucalyptus grandis* e (\triangle) *Eucalyptus urograndis*

Ao analisar as Figuras 2, 3 e 4, observa-se que a espécie discriminada possui estimativas de valores de classe próximos a 1, diferente das outras duas espécies, que apresentam valores de classe próximos a 0, evidenciando que não existe erro sistemático presente nos modelos. Além disso, comparando a discriminação da espécie *Cedrela odorata* (cedro) em relação às demais espécies, observa-se uma menor dispersão dos valores de classe estimados, evidenciando um melhor ajuste do modelo de discriminação para esta espécie. Este resultado é concordante com o fato dessa espécie ser a mais distinta entre as três estudadas. Além disso, a dispersão das amostras de calibração é bem semelhante à dispersão das amostras de validação, confirmando assim, a ausência de sobreajuste do modelo.

Amostras anômalas (“outliers”) são definidas como amostras que apresentam um erro de estimativa do número de classe relativamente maior que a maioria das amostras de calibração.¹⁸ Observando a Figura 2 (*Cedrela odorata*), verifica-se visualmente que nenhuma amostra pode ser considerada anômala. Entretanto, nas Figuras 3 e 4 (*Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urograndis*, respectivamente), são observadas algumas amostras de calibração que poderiam ser identificadas como anômalas (amostras número 28 para *Eucalyptus grandis* e número 52 para *Eucalyptus urograndis*), devido a um maior distanciamento das demais amostras pertencentes à mesma espécie. Entretanto, devido ao número reduzido de amostras do conjunto de dados e da ausência de erros de classificação, decidiu-se por não excluir nenhuma amostra.

Observando-se ainda as Figuras 2, 3 e 4, verifica-se que as três espécies foram discriminadas corretamente, uma vez que os gráficos de dispersão confirmam os baixos erros citados anteriormente e uma clara separação entre as classes foi observada. Ademais, nenhuma amostra, de calibração e de validação, se aproxima do limite de discriminação, mesmo na presença de possíveis amostras anômalas, demonstrando que o método apresenta uma margem de confiança considerável para a identificação das espécies, principalmente para *Cedrela odorata* (cedro), caso em que as amostras estão mais distantes do limite de discriminação. Para os modelos finais não foram observados erros falso positivo ou falso negativo, os valores de sensibilidade e especificidade obtidos foram iguais aos seus valores máximos (1,0) e a eficiência igual a 100%.

CONCLUSÃO

As medidas de fluorescência molecular aliadas a modelos PLS-DA possibilitaram a obtenção de um método eficiente para discriminar espécies de madeira macroscopicamente semelhantes, uma vez que os gráficos de dispersão apresentaram-se bastante claros em relação à distinção entre a espécie discriminada e as demais espécies em estudo.

Apesar da semelhança entre os espectros de emissão, o melhor comprimento de onda para discriminar corretamente as espécies foi de 370 nm.

A dispersão dos dados foi menor para *Cedrela odorata* (cedro), mostrando um melhor ajuste do modelo de discriminação para esta espécie.

Pelo nosso conhecimento, não foram encontrados trabalhos empregando a técnica de fluorescência molecular para a discriminação de madeiras. Contudo, comparando os erros médios e as dispersões obtidas nesse trabalho com os resultados publicados empregando espectrômetros NIR de bancada para discriminar madeiras, pode-se concluir que as duas técnicas possuem eficiência similar.^{3,4}

Apesar dos ótimos resultados obtidos pelo método proposto, é observado que a fluorescência em madeiras pode ser influenciada por diversos fatores ambientais, tais como a temperatura, exposição da amostra à chuva, presença de umidade, etc. Portanto, novos estudos vêm sendo realizados em nosso grupo de pesquisa para avaliar a influência desses fatores e na discriminação de um número maior de espécies, além de verificar a potencialidade desta técnica para aplicação em campo para fins de fiscalização do transporte ou comercialização de madeiras.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a o CNPq (processo 307223/2012-4), ao Laboratório de Produtos Florestais do Serviço Florestal Brasileiro pela concessão das amostras e sua identificação e ao INCTBio pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Wheeler, E.A.; Baas, P.; *IAWA J.* **1998**, *19*, 241.
2. Duarte, V. C. S.; Oliveira, T. L. C.; Coradin, V. T. R.; Camargos, J. A. A.; Gontijo, A. B.; Marques, L. F.; Pastore, T. C. M.; *Resumos da 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Natal, Brasil, 2014.
3. Pastore, T. C. M.; Braga, J. W. B.; Coradin, V. T. R.; Magalhães, W. L. E.; Okino, E. Y. A.; Camargos, J. A. A.; Muñoz, G. I. B.; Bressan, O. A.; Davrieux, F.; *Holzforchung* **2011**, *65*, 127.
4. Braga, J. W. B.; Pastore, T. C. M.; Coradin, V. T. R.; Camargos, J. A. A.; Silva, A. R.; *IAWA J.* **2011**, *32*, 175.
5. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de análise instrumental*, 6ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2009, cap 18.

6. Pandey, K. K.; Upreti, N. K.; Srinivasan, V. V.; *Wood Sci. Technol.* **1998**, *32*, 68.
7. Muyskens, M.; *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 132.
8. Dyer, S. T.; *IAWA Bull.* **1988**, *9*, 98.
9. Krishna, S.; Chowdhury, K. A.; *Indian For.* **1935**, *61*, 74.
10. Miller, R. B.; *A guide to more useful woods of the world*, International Wood Collectors Society: Madison, 2007.
11. Teixeira, J. G.; Oliveira, B. R. U.; Latorraca, J. V. de F.; Amodei, J. B.; Gurgel, M. de M.; *Braz. J. Wood Sci.* **2012**, *3*, 54.
12. Coradin, V. T. R.; Camargos, J. A. A.; Marques, L. F.; Silva Jr, E. R.; *Madeiras similares ao mogno (Swietenia macrophylla King.): chave ilustrada para identificação anatômica em campo*, Serviço Florestal Brasileiro, Brasília, **2009**.
13. Botelho, B. G.; Reis, N.; Oliveira, L. S.; Sena, M. M.; *Food Chem.* **2015**, *181*, 31.
14. Gondim, C. S.; Junqueira, R. G.; Souza, S. V. C.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2011**, *70*, 433.
15. Wise, B. W.; Gallagher, N. B.; Bro, R.; Shaver, J. M.; Windig, W.; Koch, R. S.; *PLS-Toolbox 6.5 for use with Matlab™ (Manual)*; EigenVector Research Inc., United States of America, 2006.
16. Barker, M.; Rayens, W.; *J. Chemom.* **2003**, *17*, 166.
17. http://www.dca.iag.usp.br/www/material/akemi/fisicaII/apostila_cap_01.pdf, acessada em Janeiro 2015.
18. Valderrama, P.; Braga, J. W. B.; Poppi, R. J.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1278.