

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE MARINGÁ
Pós-Graduação em Física

PATRÍCIA GONÇALVES DE FREITAS

**Aplicação da espectroscopia óptica para
diagnóstico e análise de compostos biológicos**

Orientador: **Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso**

Co-orientador: **Prof. Dr. Luis Humberto da Cunha Andrade**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do título de mestre em Física.

Maringá, Março/2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida cheia de saúde, privilégios e pelo sustento.

Agradeço aos meus pais, pela educação, compreensão e amor a mim depositados. Tudo que fiz até hoje na minha vida, todo o estudo e tudo que consegui, é por tentativa de trazer o orgulho a vocês. Agradeço pela paciência, pelo carinho, toda dedicação, incentivo, e pela vida que vocês me proporcionaram.

Ao Professor Luis Humberto da Cunha Andrade, primeiramente por iniciar minha vida científica, pela orientação e co-orientação no desenvolvimento deste trabalho, dedicação de seu tempo, pela paciência, pelas oportunidades, pela confiança a mim depositada, e principalmente, por todo crescimento que me proporcionou. Tenho certeza que foi uma experiência muito valiosa e significativa que irá me acompanhar por toda minha vida. Obrigada!

Ao Professor Mauro Luciano Baesso, por ter me orientado, pela dedicação e confiança durante todo este tempo.

Ao Professor Sandro Marcio Lima, que me ajudou muito no início deste trabalho, pela paciência, pelo aprendizado, pelas sugestões e oportunidades.

Ao Professor Fábio, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, por ter realizados as medidas de MEV pra mim, pelo tempo dedicado para a realização destas medidas e pela atenção.

Ao Professor Anderson R. Lima Caires, da Universidade Federal da Grande Dourados, pela atenção, e por ter cedido as amostras das folhas de soja.

Ao Professor William F. Antonialli Junior, pelo tempo, por emprestar a lupa, pela atenção e pela ajuda, por ter cedido as amostras biológicas (abdomens de formigas) para a realização das medidas, e pela confiança.

Ao Professor Yzel Rondon Suarez, pelo tempo gasto comigo, pelos livros emprestados, pela paciência e pela ajuda com o programa de estatística.

Ao Professor Casé e ao Professor Giacometti da Unesp, pela atenção.

Ao Eng. Agrônomo da Embrapa de Dourados Carlos Lázaro, que forneceu as sementes de soja para um dos plantios.

Ao Sr. Vitor, funcionário da UEMS, que me ajudou a plantar os vasos de soja e a carregar terra. E a todos os funcionários do departamento de Física da UEM.

Ao FUNDECT e CAPES, pelo apoio financeiro, que foi de grande utilidade.

Agradeço a todos os meus familiares, avós, tios e tias, primos e primas, que me apoiaram, me incentivaram de alguma maneira em todo este tempo, sempre acreditando em mim.

Aos meus colegas do mestrado, que estiveram sempre por perto, nas horas das dúvidas.

A todos os meus amigos verdadeiros (novos e antigos), que sempre acreditaram e torceram por mim durante estes dois anos, não poderia citar cada nome porque seriam muitos. Obrigada pela amizade!

Ao Robson, pela dedicação, carinho, e pela paciência que teve comigo.

Enfim, a todas as pessoas que me ajudaram a enfrentar mais um obstáculo importante em minha vida.

Muito Obrigada a todos vocês!

Índice

Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	x
Resumo	xi
Abstract	xii
Objetivos	xiii
Capítulo 1	1
Introdução	1
2. Revisão de Literatura	4
2.1. Espectroscopia óptica na região espectral do infravermelho médio.	4
2.1.1. Modos vibracionais das moléculas	4
2.2. Detecção por meio do efeito fotoacústico.	6
2.3. Espectroscopia Fotoacústica no infravermelho com Transformada de Fourier	8
2.4. Espectrofotômetros infravermelhos	8
2.4.1. Transmitância e Absorbância	15
2.5. Vantagens do espectrômetro de FTIR	16
2.6. Análise discriminante	17
2.7. Microscopia Eletrônica de Varredura	18
2.8. Soja (Glycine Max Merr.)	20
2.8.1. Ferrugem Asiática	20
2.8.2. Ciclo e morfologia da Planta de Soja	23
2.9. Hidrocarbonetos cuticulares das formigas.	26
Capítulo 3	28
Materiais e Métodos	28
3.1. Plantio dos vasos de soja	28
3.2. Metodologia das medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para as folhas de soja	29
3.3. Preparação das amostras de soja para as medidas de FTIR-PAS	30

3.4. Coletas das formigas	31
3.4.1. Preparação dos abdomens de formigas da espécie <i>Ectatomma Brunneum</i> para as medidas de FTIR-PAS	31
Capítulo 4	33
Resultados e Discussões	33
4.1. Resultados da soja: Análise dos picos referente ao primeiro plantio	33
4.1.1. Variedade BRS 133	33
4.1.2. Variedade BRS 245 RR	40
4.2. Resultados da soja: Análise PAS-FTIR dos picos referente ao segundo plantio	44
4.2.1. Variedade BRS 245 RR	44
4.3. Discussão das medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	52
4.4. Microscopia Óptica	59
4.5. Análise dos abdomens de formigas da espécie <i>Ectatomma Brunneum</i>.	63
4.5.1. Resultados da Análise de função Discriminante.	66
5. Considerações Finais	69
Referências Bibliográficas	71

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Absorção de fótons pela amostra, ($I_0 > I$). _____	5
Figura 2.2 – Ilustração das vibrações de Estiramento do tipo Simétrico e Assimétrico. __	5
Figura 2.3 – Ilustração das vibrações de Deformações Angulares do tipo Balanço, Tesoura, Agitação e Torção. _____	6
Figura 2.4 – Esquema de uma célula fotoacústica. _____	7
Figura 2.5 – Interferômetro de Michelson. _____	9
Figura 2.6 – Um interferograma típico. Fonte: [14]. _____	14
Figura 2.7 – Espectro de um Background típico. _____	15
Figura 2.8 – Espectro de uma folha de soja. _____	15
Figura 2.9 – Esquema da varredura amostra pelo feixe. _____	18
Figura 2.10 – Esquema de um equipamento de MEV. _____	19
Figura 2.11 – Sintomas da ferrugem asiática nas folhas de soja: (a) e (b) são fotos da parte superior e (c) infecção do fungo na parte inferior das folhas. _____	22
Figura 2.12 - Ilustração de uma planta de soja e seus componentes. _____	23
Figura 2.13 – Estrutura externa da folha. Fonte: ^[46] . _____	25
Figura 2.14 – Morfologia interna da folha e suas camadas. Fonte: ^[46] . _____	25
Figura 2.15 – Representação do estômato da folha de soja, em vista frontal. Foto de microscopia eletrônica de varredura com uma ampliação de 5000X. _____	26
Figura 3.1 - Histograma ilustrando a divisão dos vasos com e sem a aplicação do fungicida. _____	28
Figura 3.2 – Formiga da espécie <i>Ectatomma Brunneum</i> . Fonte: ^[62] _____	32
Figura 4.1 - Espectros referentes à variedade de soja BRS 133 tratada com o fungicida. _____	34
Figura 4.2 - Espectros referentes à variedade de soja BRS 133 não tratada com o fungicida. _____	35
Figura 4.3 - Espectros referentes às diferenças entre os trifólios da variedade BRS 133. _____	36
Figura 4.4 – Gráfico de cores feito com a diferença entre as amostras tratadas e não tratadas da variedade de soja BRS 133, em diferentes estágios de crescimento da planta. _____	40
Figura 4.5 - Espectros referentes à variedade de soja BRS 245 RR tratada com o fungicida. _____	41

Figura 4.6 - Espectros referentes à variedade de soja BRS 245 RR não tratada com o fungicida. _____	41
Figura 4.7 - Espectros referentes às diferenças entre os trifólios da variedade BRS 245 RR. _____	42
Figura 4.8 - Gráfico de cores feito com a diferença entre as amostras tratadas e não tratadas da variedade de soja BRS 245 RR, em diferentes estágios de crescimento da planta. _____	43
Figura 4.9 - Espectros de PAS-FTIR referentes à variedade de soja sadia BRS 245 RR. _____	44
Figura 4.10 - Espectros de PAS-FTIR referentes à variedade de soja sadia BRS 245 RR. _____	45
Figura 4.11 - Espectros referentes às diferenças entre 1 e 4 trifólios da variedade BRS 245 RR. _____	46
Figura 4.12 - Espectros referentes às diferenças entre 5 e 8 trifólios da variedade BRS 245 RR. _____	47
Figura 4.13 – Gráfico de cores plotado com a diferença entre as amostras sadias e infectadas, da variedade de soja BRS 245 RR, em diferentes estágios de crescimento da planta. _____	49
Figura 4.14 – Espectro do fungo <i>P. pachyrhizi</i> extraído de folhas contaminadas. _____	49
Figura 4.15 – Diferença entre as amostras sadias e infectadas, da variedade de soja BRS 133 (a) e BRS 245 RR referentes ao primeiro plantio, e BRS 245 RR (c) do segundo plantio, todas com intervalo de 2000 a 1000 cm ⁻¹ . _____	51
Figura 4.16 - Foto de MEV da folha de soja sem a presença do fungo <i>P. pachyrhizi</i> . Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 44 dias. _____	52
Figura 4.17 - Folha de soja sem a presença do fungo <i>P. pachyrhizi</i> . Esta foto teve uma ampliação de 2000X e a planta estava com idade de 52 dias. _____	53
Figura 4.18 - Folha de soja sem a presença do fungo <i>P. pachyrhizi</i> . Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 66 dias. _____	53
Figura 4.19 - Folha de soja sem a presença do fungo <i>P. pachyrhizi</i> . Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 82 dias. _____	54
Figura 4.20 - Folha de soja infectada com o fungo <i>P. pachyrhizi</i> . Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 44 dias. _____	54
Figura 4.21 - Folha de soja infectadas com o fungo <i>P. pachyrhizi</i> . Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 55 dias. _____	55

Figura 4.22 – Folha de soja infectada com o fungo <i>P. pachyrhizi</i> . Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 58 dias. _____	55
Figura 4.23 – Folha de soja infectada com o fungo <i>P. pachyrhizi</i> . Esta foto teve uma ampliação de 1000X e a planta estava com idade de 58 dias. _____	56
Figura 4.24 - Folha de soja infectada com o fungo <i>P. pachyrhizi</i> . Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 66 dias. _____	56
Figura 4.25 - Folha de soja infectada com o fungo <i>P. pachyrhizi</i> . Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 66 dias. _____	57
Figura 4.26 - Folha de soja infectada com o fungo <i>P. pachyrhizi</i> . Esta foto teve uma ampliação de 200X e a planta estava com idade de 82 dias. _____	57
Figura 4.27 - Folha de soja infectada com o fungo <i>P. pachyrhizi</i> . Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 82 dias. _____	58
Figura 4.28 - Fotos de MEV realizadas nas amostras de soja infectadas com o fungo <i>P. pachyrhizi</i> com ampliação de 500X, 1000X e 3000X, respectivamente. _____	58
Figura 4.29 - Fotos de folhas sem a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 1,0x10. _____	59
Figura 4.30 - Fotos de folhas sem a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 2,5x10. _____	59
Figura 4.31 - Fotos de folhas sem a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 5,0x10. _____	60
Figura 4.32 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 1,0x10. _____	60
Figura 4.33 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 2,5 x10. _____	60
Figura 4.34 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 5,0 x10. _____	61
Figura 4.35 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 0,8x10. _____	61
Figura 4.36 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 1,25x10. _____	61
Figura 4.37 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 2,5x10. _____	62

Figura 4.38 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 5,0 x10.	62
Figura 4.39 - Espectros referentes aos abdomens de formigas da espécie <i>Ectatomma Brunneum</i> coletadas de diferentes localidades.	63
Figura 4.40 – Resultados da análise de função discriminante para as formigas <i>Ectatomma brunneum</i> .	67
Figura 4.41 – Principais dos biomas brasileiros. Fonte: ^[60]	67

Índice de Tabelas

Tabela 4.1 - Alguns picos comuns que são encontradas nos espectros infravermelhos das folhas de soja ^[7,9] .	37
Tabela 4.2 - Alguns picos comuns que são encontradas nos espectros infravermelhos dos abdomens de formigas <i>Ectatomma brunneum</i> ^[7,9] .	64

Resumo

Neste trabalho empregamos a técnica de espectroscopia fotoacústica no infravermelho médio por transformada de Fourier (PAS-FTIR) para análise de compostos biológicos como a ferrugem da soja e formigas. A caracterização da ferrugem asiática foi realizada por meio da análise dos modos vibracionais moleculares associadas à composição química de folhas de soja sadias e infectadas com o fungo da ferrugem asiática, *P. phachyrhizi*. Foram coletados vários espectros das folhas acompanhando o seu crescimento e a evolução do fungo a fim de monitorar alterações que o fungo provoca na folha. A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada para confirmar e verificar visualmente, de forma comparativa com os espectros de FTIR, a evolução do fungo *P. phachyrhizi* nas folhas de soja. Os resultados alcançados mostraram que há um aumento inicial no conteúdo de lipídio como reação da planta de tentar compensar suas reservas energéticas consumidas pelo fungo. Em um estágio mais evoluído da doença, foi observado também um aumento no conteúdo de ésteres da superfície foliar que está relacionado à reação química da planta em criar uma barreira química por meio do aumento da quantidade de cera cuticular. Esta mesma técnica, também foi utilizada na caracterização de hidrocarbonetos cuticulares em abdomens de formigas, os quais servem para a distinção entre castas. A distinção entre colônias de formigas oriundas de biomas pode ser observada, indicando a influência do meio natural na composição química do seu exoesqueleto. As formigas que vivem em colônias, as quais se situam em regiões climáticas próximas, se comportam similarmente, já as regiões que se distinguem muito em condições climáticas também mostram estas separações dos grupos de formigas estudados. Estes resultados mostram que a técnica de PAS-FTIR aliada à análise multivariada pode ser uma ferramenta importante para o estudo da taxonomia.

Abstract

In this work employ the technique of photoacoustic spectroscopy in the infrared by Fourier transform (FTIR-PAS) for analysis of biological compounds such as soybean rust and the ants. The characterization of the Asian rust was performed by analysis of molecular vibrational modes from the chemical composition of soybean leaves of healthy and infected with the Asian rust fungus, *P. phachyrhizi*. Several spectra were collected from leaves following their growth and development of the fungus to monitor the changes that cause the fungus in the leaf. The technique of scanning electron microscopy (SEM) was used to confirm and verify visually, in comparison with the spectra of FTIR, the development of the fungus *P. phachyrhizi* in the soybean leaves. The results showed that there is an initial increase in lipid content of the plant as a reaction to try to offset their energy reserves consumed by the fungus. In a more advanced stage of disease was also observed an increase in the content of esters of the leaf surface that is related to the chemical reaction of the plant to create a chemical barrier by increasing the amount of cuticular wax. This same technique was also used in the characterization of cuticular hydrocarbons in abdomens of ants, which serve to distinguish between the varieties. The distinguished from colonies of ants biomes can be observed, indicating the influence of environment on the chemical composition of its outer skeleton. Ants live in colonies, which are located in climatic regions similar, they behave similarly, since the regions that differ greatly in climatic conditions also show the separations of the groups of ants studied. These results show that the PAS-FTIR technique coupled with multivariate analysis may be an important tool for the study of taxonomy.

Objetivos

O objetivo do presente trabalho é acompanhar a evolução da ferrugem que aparece na soja, conhecida como ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, em diferentes estágios de crescimento da planta, utilizando a técnica de espectroscopia fotoacústica no infravermelho médio por Transformada de Fourier (PAS-FTIR), acompanhada pela análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e também pela análise de função discriminante multivariada. Esperou-se também com este, obter informações sobre as mudanças na composição química das folhas causadas pela ação do fungo por meio dos espectros de PAS-FTIR em função dos diferentes estágios de desenvolvimento da planta. Utilizamos a técnica de PAS-FTIR também para a caracterização e diferenciação de hidrocarbonetos cuticulares presentes na superfície abdominal de formigas, em conjunto com a técnica de análise de função discriminante. Por meio da diferença na concentração destes compostos cuticulares esperou-se realizar a distinção de colônias oriundas de diferentes biomas brasileiros.

Capítulo 1

Introdução

A técnica de espectroscopia fotoacústica no infravermelho médio por transformada de Fourier (PAS-FTIR) é uma medida direta da radiação absorvida pela amostra. As vantagens apresentadas pela técnica são muito interessantes para sua aplicação em materiais de grande fragilidade, como materiais biológicos. Devido à intensidade de radiação ser baixa não provoca a destruição da mesma, além de, poder ser empregada para medida de amostras com dimensões reduzidas. Além dessas características, a varredura espectral não emprega métodos ópticos dispersivos, a obtenção dos espectros pode ser realizada em poucos minutos, dessa forma, um grande número de amostras podem ser analisadas. É uma técnica de grande sensibilidade e confiabilidade, e é aplicada na análise de diversos materiais biológicos. Esta técnica já foi empregada com sucesso na análise do fungo *Aspergillus flavus*^[1,2] que ataca o milho, na diferenciação de microorganismos constituintes da superfície da maçã^[3], foi também empregada em nosso grupo para distinção de castas de insetos sociais^[4], na distinção entre as variedades convencionais e transgênicas de soja^[5] e também na detecção da ferrugem asiática nas folhas de soja infectadas com o fungo *Phakopsora pachyrhizi*^[6].

Uma vez que esta técnica já tenha mostrado sua potencialidade para análise de materiais biológicos, empregamos a mesma para análise da soja parasitada pela ferrugem asiática e na análise de formigas oriundas de diferentes biomas brasileiros.

A soja (*Glycine Max Merr.*) é uma cultura de grande valor econômico para todo o Brasil, principalmente para o nosso estado, e várias são as doenças que ocorrem, causando enormes perdas e prejuízos significativos para o produtor. Com isso, uma dessas doenças merece atenção especial, a ferrugem asiática, que foi percebida nas safras brasileiras a partir do ano de 2001, e hoje em dia, já apareceu em quase todos os estados produtores de soja. Essa é uma doença que tem causado grandes perdas nas lavouras de soja de todo o Brasil, chegando a perdas de até 100% dependendo do nível de infestação desta doença. A ferrugem da soja é uma doença que se espalha com grande rapidez e a dificuldade de um diagnóstico precoce faz com que a presença do fungo seja percebida somente quando este já está na fase de esporulação, que ocorre quando as urédias começam a se formar. Dessa

forma o emprego da técnica de espectroscopia PAS-FTIR pode auxiliar no entendimento das alterações químicas que ocorrem na soja quando parasitadas pelo fungo.

Neste trabalho a utilização da técnica PAS-FTIR serviu primeiramente, para a determinação de grupos funcionais presentes nas folhas de soja sadias e infectadas com o fungo da ferrugem asiática, o *Phakopsora pachyrhizi*, bem como, a diferenciação entre as mesmas. Na primeira etapa do trabalho foram realizadas as medidas PAS-FTIR e de MEV, nas folhas de soja da variedade BRS 133 e BRS 245 RR sadias e infectadas com a ferrugem asiática, referentes ao primeiro plantio, e depois realizadas as medidas nas amostras da variedade BRS 245 RR do segundo plantio. Outras técnicas como microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia óptica e análise de função discriminante também foram empregadas, juntamente com a técnica de (PAS-FTIR) a fim de complementar a análise realizada.

A técnica PAS-FTIR também foi utilizada na diferenciação de colônias de formigas da espécie *Ectatomma brunneum*. As formigas estão classificadas no grupo de insetos sociais, vivem em sociedade e cada uma tem sua função específica dentro da sua colônia. Estes insetos sociais possuem hidrocarbonetos cuticulares que variam de acordo com a colônia e com a fisiologia de cada indivíduo. É por meio destes hidrocarbonetos que o reconhecimento dos membros da mesma espécie, reconhecimento do ninho, e membros da mesma casta, é percebido. A percepção é feita por meio de uma pequena distância ou por meio do contato.

O trabalho está dividido em 5 capítulos, a partir desta introdução.

No capítulo 2 é apresentada a revisão de literatura, sendo comentado sobre, a espectroscopia no infravermelho, bem como, os equipamentos utilizados e o funcionamento dos mesmos para a obtenção de dados por meio desta. Também é dito sobre a soja, a ferrugem da soja e os insetos sociais introduzindo o conceito da análise de função discriminante.

No capítulo 3 é descrito o procedimento experimental realizado para a obtenção das amostras e realização das medidas de PAS-FTIR, MEV e análise discriminante para a soja e para as formigas.

O capítulo 4 apresenta os resultados experimentais obtidos destas medidas, por meio das técnicas de PAS-FTIR, MEV e da análise discriminante.

No capítulo 5 é apresentada a conclusão geral deste trabalho quanto à caracterização das amostras por meio da técnica de absorção molecular, bem como a

resposta química das amostras de soja infectadas ou não e a respostas dos abdomens de formigas de diferentes colônias e funções. Também neste capítulo é apresentada a eficiência das técnicas utilizadas.

2. Revisão de Literatura

2.1. Espectroscopia óptica na região espectral do infravermelho médio.

A espectroscopia óptica realizada na região espectral do infravermelho médio compreende a faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} [8-10]. Esta região é sensível às vibrações e rotações de grupos químicos moleculares e, sendo assim, é capaz de identificar e distinguir radicais moleculares e os tipos de ligações químicas envolvidas em determinada amostra, sendo este, o aspecto mais vantajoso dessa técnica [7].

A espectroscopia óptica infravermelha de absorção possui muitas vantagens como técnica de análise química. É uma técnica universal e vários materiais como, sólidos, líquidos, gases, pó e polímeros podem ser analisados. De modo geral, para análise de muitos materiais, a técnica de espectroscopia infravermelha é relativamente rápida, de fácil manuseio, possui alta sensibilidade e boa resolução.

A radiação na região do infravermelho (IR) quando interagida com moléculas orgânicas, provoca alterações nos modos vibracionais e rotacionais destas moléculas. Com isso, a frequência absorvida pela amostra é exatamente a frequência de vibração molecular responsável pela absorção, ou seja, é transformada em energia vibracional [8,9]. Uma transição infravermelha é permitida e passiva a detecção quando a interação da radiação IR causa, uma variação no seu momento de dipolo [9]. Dessa forma algumas moléculas denominadas como sendo diatômicas homonucleares não possuem espectro infravermelho devido à sua simetria, como o O_2 , N_2 ou Cl_2 [7,8].

2.1.1. Modos vibracionais das moléculas

Uma molécula pode absorver energia proveniente de uma fonte de radiação [12]. Isso ocorre quando a energia dos fótons é a mesma que a energia vibracional da molécula.

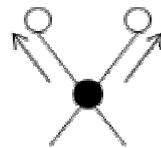
Quando um feixe de fótons com uma intensidade (I_0) incide em uma molécula que apresenta a mesma energia de vibração do feixe, cada molécula da amostra absorverá um fóton. Assim, a intensidade (I) dos fótons que não são absorvidos pela amostra será menor do que a intensidade incidente, Figura 2.1.



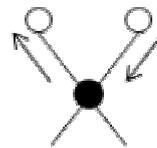
Figura 2.1 - Absorção de fótons pela amostra, ($I_0 > I$).

As posições dos átomos que compõe uma molécula não são fixas e podem variar de acordo com as vibrações e rotações que ocorrem na molécula, quando a frequência incidida corresponde à frequência de vibração da mesma ^[8]. Estas vibrações moleculares podem ser de estiramento ou de deformações angulares. A Figura 2.2 mostra um exemplo de vibração de estiramento cuja variação periódica da distância interatômica entre os átomos causa um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação, que pode ser simétricas ou assimétricas [8,9,12].

Vibrações de Estiramento



Simétrico



Assimétrico

Figura 2.2 – Ilustração das vibrações de Estiramento do tipo Simétrico e Assimétrico.

As vibrações de deformação angular, Figura 2.3, caracterizam-se pela variação ritmada do ângulo entre duas ligações, sem que a posição relativa dos átomos se altere. Estas vibrações de deformação angular podem ser de quatro tipos: tesoura, balanço, torção e sacudida ^[8,9,12].

Vibrações de Deformação Angular

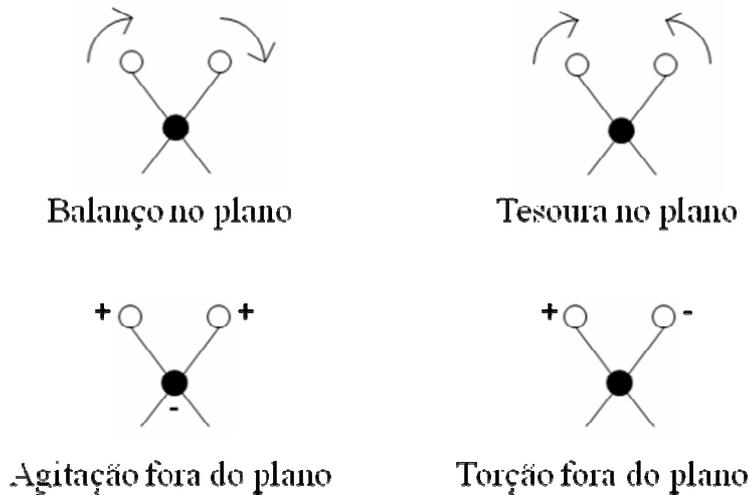


Figura 2.3 – Ilustração das vibrações de Deformações Angulares do tipo Balanço, Tesoura, Agitação e Torção.

2.2. Detecção por meio do efeito fotoacústico.

O efeito fotoacústico em sólidos foi observado pela primeira vez em 1880 por Alexandre Graham Bell, em seus estudos sobre o microfone óptico ou “photofone”. Ele percebeu que incidindo luz solar modulada em um sólido dentro de uma célula, gerava no ar à sua volta sons audíveis que podiam ser amplificados e captados a partir de um tundo ligado à referida célula ^[15,16]. Em 1881, Bell apresentou sua descoberta à Associação Americana para o Desenvolvimento da Ciência, nos seguintes termos: “a natureza dos raios que produzem efeitos sonoros em substâncias diferentes depende da natureza das substâncias que são expostas à radiação, e que os sons são em cada caso devido aos raios do espectro que são absorvidos pelo corpo”. Segundo sua interpretação, a intensidade do sinal fotoacústico dependia da quantidade de luz absorvida pelo material na célula, isto é, dependia do coeficiente de absorção do material.

Desde a descoberta do efeito fotoacústico muitos foram os avanços alcançados na área da espectroscopia óptica. Na seqüência do desenvolvimento da PAS, Busse e Bullemer obtiveram, em 1978, pela primeira vez, o espectro de absorção infravermelho médio para o vapor de metanol. Eles utilizaram um espectrofotômetro infravermelho por transformada de Fourier comercial e uma célula de absorção gasosa ajustada com um microfone. Seus resultados foram confrontados com os obtidos pela espectroscopia óptica convencional de transmissão dando uma boa concordância entre os métodos. Por este

motivo, muitos o consideram pioneiro na espectroscopia por detecção fotoacústica PAS [17].

Após estes, muitos outros trabalhos foram publicados em periódicos de grande prestígio internacional. Até 2002, pouco mais de 600 artigos haviam sido publicados sobre as diversas aplicações da PAS em diferentes materiais sólidos, líquidos e gasosos [17].

A aplicação dessa técnica se estende desde o campo da física, passando também pela Química, Biologia, Medicina e Engenharia. Isto porque esta técnica possui algumas vantagens sobre a espectroscopia óptica convencional (transmissão, reflexão e espalhamento). Uma destas vantagens é que a PAS é uma medida direta da absorção (mede apenas a radiação absorvida que relaxa na forma de calor), de forma que as porções de luz transmitida, refletida ou espalhada não interferem nas medidas. É uma técnica não destrutível, visto que a amostra não fica situada muito próxima da fonte, não provoca aquecimento da amostra analisada.

Assim, a PAS pode ser aplicada ao estudo de materiais opacos, pouco absorvedores, géis, na forma de pó ou amorfos, que são materiais onde a espectroscopia óptica convencional não é adequada.

O efeito fotoacústico é geração de um sinal acústico, causado pela absorção de uma radiação modulada dentro de uma célula fechada composta por um microfone, conforme ilustrado na Figura 2.4.

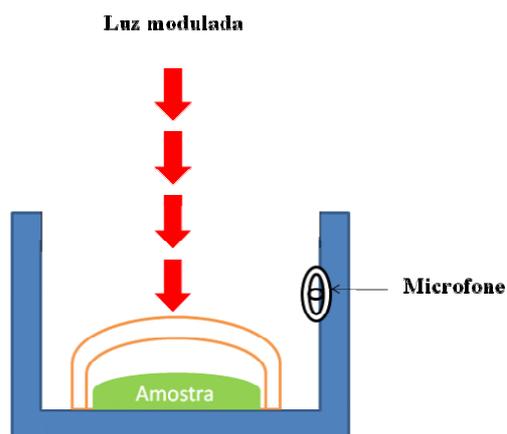


Figura 2.4 – Esquema de uma célula fotoacústica.

A radiação incidente, com determinada modulação, é absorvida pela amostra, provocando a vibração das moléculas, as quais emitem um sinal térmico em forma de calor. Este calor gerado irá se propagar por meio do meio gasoso que envolve a amostra, na

mesma modulação da radiação incidente. Esta variação de pressão será captada por um microfone situado dentro da câmara fotoacústica, transformando o sinal acústico captado em sinais elétricos. A intensidade do sinal captado será proporcional as ondas térmicas geradas pelo material e conseqüentemente à absorção da radiação incidente na amostra. O gás que preenche a célula fotoacústica também desempenha papel importante na sensibilidade da detecção o qual pode ser hélio ou nitrogênio ^[7].

2.3. Espectroscopia Fotoacústica no infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformada de Fourier (no inglês *Fourier Transform Infrared Spectrometer Photoacoustic – PAS- FTIR*) é uma ferramenta poderosa para análise de diferentes tipos de materiais, podendo ser usada na análise de sólidos e líquidos ^[1,3,8]. Esta técnica já foi empregada em análise semelhantes como a infecção do milho causada pelo um fungo *Aspergillus flavus* ^[1,2], na diferenciação de microorganismos constituintes da superfície da maçã ^[3] e também no Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica GEOF-UEMS na distinção entre espécies de soja transgênicas e convencionais ^[5] e na detecção da ferrugem asiática nas folhas de soja infectadas com o fungo *Phakopsora pachyrhizi* ^[9].

2.4. Espectrofotômetros infravermelhos

Existem vários tipos de espectrofotômetros usados para obter o espectro de absorção óptica no infravermelho ^[7]. A maioria dos instrumentos na época de 1980 era do tipo dispersivo, baseados nas redes de difração ^[8,9]. Foi somente depois, que estes espectrofotômetros foram substituídos pelos equipamentos com transformadas de Fourier, devido à sua velocidade e conveniência ^[8]. Estes espectrofotômetros são denominados Espectrofotômetros no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) ^[9]. Os componentes básicos destes equipamentos são o interferômetro de Michelson, a fonte e o detector.

O interferômetro de Michelson é a configuração óptica mais comum usada para experimentos de interferometria. Este instrumento foi inventado por Albert Abrahan Michelson com a intenção de provar a existência do meio luminífero éter. Contudo, seus resultados, somados a de outros cientistas da época como Morley e Miler, somente serviram para provar a invariância da velocidade da luz e reafirmar a teoria da relatividade. Apesar de não ter contribuído para seu propósito inicial, ou seja, de provar a existência do meio luminífero éter, este instrumento se mostrou bastante versátil para medidas que envolvem grande precisão.

O interferômetro de Michelson é um interferômetro de divisão de amplitude e constituído de um divisor de feixe (espelho semitransparente), um espelho plano móvel e de um espelho plano fixo ^[9,12], ilustrado na Figura 2.5.

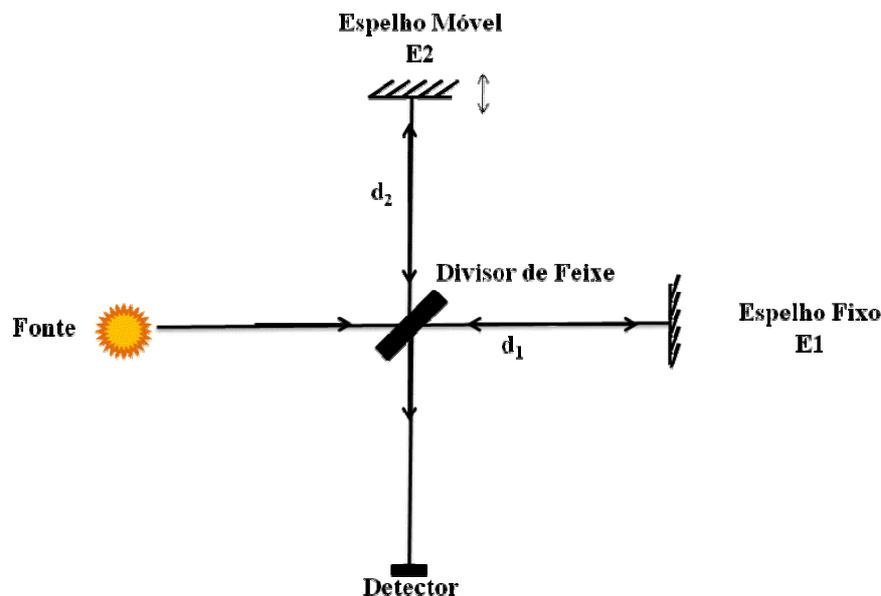


Figura 2.5 – Interferômetro de Michelson.

O feixe de radiação é propagado em direção ao divisor de feixe, que transmite 50% da radiação em direção a um espelho fixo (E1) e reflete os outros 50% em direção ao espelho móvel (E2). As distâncias d_1 e d_2 dos braços do interferômetro podem variar devido ao espelho móvel E2, de maneira que, isso provoca a variação no caminho óptico ^[10,12]. Os feixes são refletidos pelos espelhos E1 e E2 e retornam novamente em direção ao divisor de feixe onde são novamente recombinados, formando um padrão de interferência. Quando a diferença entre os caminhos ópticos d_1 e d_2 percorridos pelos feixes forem distintas, será observado um padrão de interferência que é capturado pelo detector. O

padrão de interferência observado depende da diferença de caminho óptico percorrido pelo laser e pela fonte de luz.

Para o emprego do interferômetro de Michelson para realização da espectroscopia óptica infravermelha, é utilizada uma fonte de radiação capaz de interagir com o material o qual se deseja analisar. A intensidade, após a recombinação dos feixes medida pelo detector é proporcional a média no tempo do quadrado do Campo elétrico, dada por:

$$I(x) = \langle E(x,t)^2 \rangle_T \quad (2.1)$$

$$\text{com, } E(x,t) = A \cos(kx - \omega t + \delta)$$

Sendo: δ constante de fase da onda; A = amplitude real da onda; $Ae^{i\delta}$ = amplitude complexa; $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ e $\omega = 2\pi.f$.

Como a intensidade percorre a distância d_1 e d_2 , referente aos dois braços, assim, é dada pela soma dos campos:

$$I(x) = \langle [E_1(x,t) + E_2(x,t)]^2 \rangle_T \quad (2.2)$$

$$I(x) = \langle E_1(x,t)^2 + E_2(x,t)^2 + 2E_1(x,t).E_2(x,t) \rangle_T \quad (2.3)$$

$$\text{como, } I_1 = \langle E_1(x,t)^2 \rangle_T, I_2 = \langle E_2(x,t)^2 \rangle_T \text{ e } I_{12} = 2\langle E_1(x,t).E_2(x,t) \rangle_T$$

podemos escrever:

$$I(x) = I_1 + I_2 + I_{12} \quad (2.4)$$

Resolvendo as equações, teremos:

$$I_1 = \frac{A_1^2}{2} \quad (2.5)$$

$$I_2 = \frac{A_2^2}{2} \quad (2.6)$$

$$I_{12} = A_1.A_2 \cos(k_1x - k_2x + \delta_1 - \delta_2) \quad (2.7)$$

Escrevendo I_{12} em termos de A_1 e A_2 :

$$I_{12} = 2\sqrt{I_1.I_2} \cos(k_1x - k_2x + \delta_1 - \delta_2) \quad (2.8)$$

Substituindo a equação (1.8), (1.6) e (1.5) em (1.4), temos a intensidade total:

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos \theta \quad (2.9)$$

com $\theta = k_1 x - k_2 x + \delta_1 - \delta_2$

A radiação incidente no interferômetro de Michelson deve ter intensidade I_0 , esta intensidade pode ser escrita em termos de campo elétrico como sendo:

$$I(x) = \left\langle \vec{E}(x, t) \cdot \vec{E}(x, t)^* \right\rangle_T \quad (2.10)$$

sendo * o complexo conjugado.

Podemos também escrever o campo elétrico em função da frequência, por uma função do campo em função da posição espacial, como segue:

$$\vec{E}(x, t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \sqrt{B(\nu)} \cdot e^{2\pi i(\nu t + x\sigma)} d\nu \quad (2.11)$$

sendo que $\sqrt{B(\nu)}$ representa a amplitude da frequência da componente ν , e $\sigma = \nu/c$ é a direção de propagação.

O feixe de saída do interferômetro tem como campo elétrico resultante, a soma das componentes provenientes dos dois espelhos:

$$\vec{E}_{saída}(x, t) = \frac{\vec{E}(x, t)}{2} + \frac{\vec{E}(x, t + \tau)}{2} \quad (2.12)$$

com τ sendo a diferença no tempo de propagação dos dois feixes.

Por meio do campo elétrico de saída do interferômetro, podemos considerar a intensidade de saída:

$$I_{saída} = \left\langle \left[\frac{\vec{E}(x, t)}{2} + \frac{\vec{E}(x, t + \tau)}{2} \right] \cdot \left[\frac{\vec{E}(x, t)}{2} + \frac{\vec{E}(x, t + \tau)}{2} \right]^* \right\rangle_T \quad (2.13)$$

Sabendo que o valor médio de uma função é dado por: $\langle f(t) \rangle_T = \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} f(t) dt$, com

$f(t)$ uma função qualquer. Aplicando na equação (2.13), fica:

$$I_{saída} = \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} \left[\frac{\vec{E}(x, t)^*}{2} \cdot \frac{\vec{E}(x, t)}{2} + \frac{\vec{E}(x, t)^*}{2} \cdot \frac{\vec{E}(x, t + \tau)}{2} + \frac{\vec{E}(x, t + \tau)^*}{2} \cdot \frac{\vec{E}(x, t)}{2} + \frac{\vec{E}(x, t + \tau)^*}{2} \cdot \frac{\vec{E}(x, t + \tau)}{2} \right] dt \quad (2.14)$$

Os termos $\frac{\vec{E}(x,t)^* \cdot \vec{E}(x,t)}{2}$ e $\frac{\vec{E}(x,t+\tau)^* \cdot \vec{E}(x,t+\tau)}{2}$ se tornam iguais no limite

quando $T \gg \tau$. Resolvendo a integral para esses termos teremos:

$$I_{Saida} = \frac{I_0}{4} + \frac{I_0}{4} + \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} \left[\frac{\vec{E}(x,t)^* \cdot \vec{E}(x,t+\tau)}{2} + \frac{\vec{E}(x,t+\tau)^* \cdot \vec{E}(x,t)}{2} \right] dt \quad (2.15)$$

Substituindo a equação (2.11) na equação (2.15), podemos expressar a intensidade de saída também em termos da frequência:

$$I_{Saida} = \frac{I_0}{2} + \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-\infty}^{+\infty} \left[\frac{\sqrt{B(\nu)} \cdot e^{-2\pi i(\nu+x\sigma)}}{2} \cdot \frac{\sqrt{B(\nu)} \cdot e^{2\pi i(\nu(t+\tau)+x\sigma)}}{2} + \frac{\sqrt{B(\nu)} \cdot e^{-2\pi i(\nu(t+\tau)+x\sigma)}}{2} \cdot \frac{\sqrt{B(\nu)} \cdot e^{2\pi i(\nu t+x\sigma)}}{2} \right] d\nu dt \quad (2.16)$$

$$I_{Saida} = \frac{I_0}{2} + \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{B(\nu)}{4} \left[e^{-2\pi i(\nu+x\sigma)} \cdot e^{2\pi i(\nu(t+\tau)+x\sigma)} + e^{-2\pi i(\nu(t+\tau)+x\sigma)} \cdot e^{2\pi i(\nu t+x\sigma)} \right] d\nu dt \quad (2.17)$$

Sabendo que o produto das exponenciais corresponde a exponencial da soma dos expoentes, temos:

$$I_{Saida} = \frac{I_0}{2} + \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{B(\nu)}{4} \left[e^{2\pi i\nu\tau} + e^{-2\pi i\nu\tau} \right] d\nu dt \quad (2.18)$$

Reescrevendo a equação na forma real:

$$I_{Saida} = \frac{I_0}{2} + \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{B(\nu)}{4} [\cos(2\pi\nu\tau) + \cos(-2\pi\nu\tau)] d\nu dt \quad (2.19)$$

Como a função cosseno é uma função par, podemos reescrever e resolver a equação para que esta fique na forma:

$$I_{Saida} = \frac{I_0}{2} + \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{B(\nu)}{2} \cos(2\pi\nu\tau) d\nu dt \quad (2.20)$$

$$I_{Saida} = \frac{I_0}{2} + \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{B(\nu)}{2} \cos(2\pi\nu\tau) d\nu \quad (2.21)$$

Com $B(\nu)$ representando agora a densidade espectral da radiação incidente.

A fim de simplificar a expressão chamaremos, $C(\tau) = I_{saída} - \frac{I_0}{2}$, então a equação

(2.21) resulta em:

$$C(\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{B(\nu)}{2} \cos(2\pi\nu\tau) d\nu \quad (2.22)$$

A densidade espectral é obtida por meio da aplicação da Transformada de Fourier (TF) inversa do cosseno na função (2.22). Sabe-se que para uma função $f(x)$:

$$f(x) = \sum_{-\infty}^{+\infty} c_n e^{i(n\pi x/L)} \quad (2.23)$$

tal que: $(-L < x < L)$

Pode-se obter a função c_n multiplicando a equação (2.23) por $e^{-i(n\pi x/L)}$ e somar para todos os valores possíveis de x :

$$c_n = \frac{1}{2L} \int_{-L}^{+L} f(x) e^{-i(n\pi x/L)} dx.$$

Analogamente, pode-se obter $B(\nu')$ da equação (2.22) como sendo:

$$B(\nu') = 2 \int_{-\infty}^{+\infty} C(\tau) \cos(2\pi\nu'\tau) d\tau \quad (2.24)$$

A intensidade de radiação de saída do interferômetro é obtida em função da diferença no tempo de propagação da radiação, por meio dos dois braços do interferômetro. Esta função da intensidade é chamada de interferograma.

Os detectores mais comuns sensíveis para esta faixa espectral são os de sulfatos de triglicina, que operam à temperatura ambiente e possuem respostas rápidas, os outros são os de telureto de cádmio e mercúrio, operam à temperatura do nitrogênio líquido [12].

As fontes de infravermelho são constituídas de sólidos inertes que sofrem um aquecimento entre 1000 e 1800°C. Geralmente, estas fontes podem ser de Nerst, um filamento que é fabricado a partir de adesivos de óxido de zircônio, tório e cério, ou fontes de Globar, uma barra de carvão de silício [8,12].

Quando a fonte usada é policromática, teremos que a interferência é a soma de todas as ondas senoidais para as frequências correspondentes, formando um interferograma, Figura 2.6.

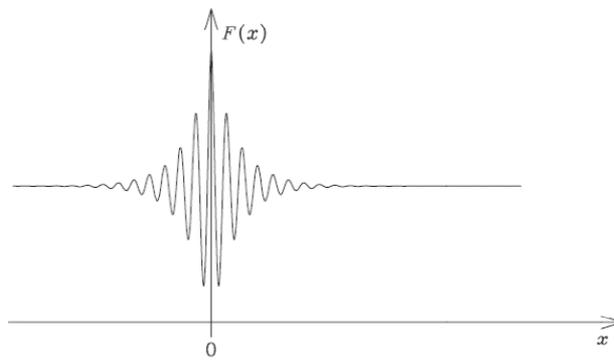


Figura 2.6 – Um interferograma típico. Fonte: ^[14].

O interferograma fundamental possui um sinal intenso próximo à posição onde a diferença no caminho para os dois feixes é zero. O espectro clássico que mostra a energia com uma função da frequência é obtido do interferograma pela Transformada de Fourier ^[12]. Assim, para obter o espectro infravermelho, primeiramente, um espectro de referência (background) é obtido, Figura 2.7.

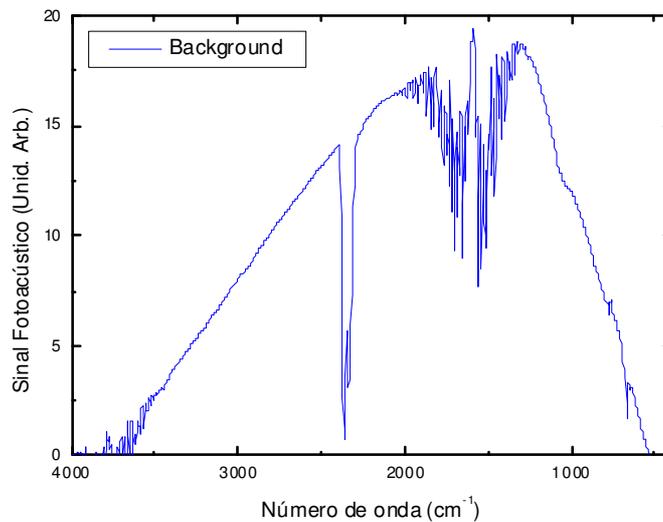


Figura 2.7 – Espectro de um Background típico.

Colocando a amostra entre o detector e o interferômetro, ela absorverá alguns comprimentos de onda, reduzindo as intensidades correspondentes. Com a divisão destes dois espectros, o espectro de absorção da amostra é então obtido, Figura 2.8.

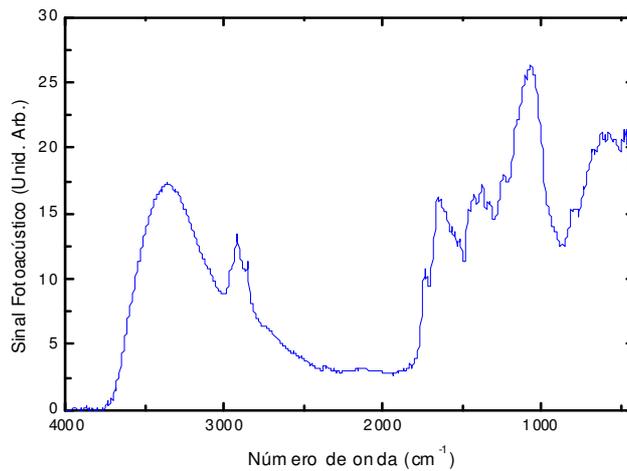


Figura 2.8 – Espectro de uma folha de soja.

Desta forma, nota-se que o interferômetro de Michelson pode ser utilizado em diversas aplicações ópticas, assim, destacamos sua aplicação na espectroscopia óptica infravermelha por transformada de Fourier.

2.4.1. Transmitância e Absorbância

O espectro de vibração molecular é composto de uma série de bandas. As intensidades destas bandas podem ser representadas em termos da transmitância (T) ou da absorbância (A) ^[10].

A absorbância é obtida pela lei de Lambert-Beer que institui a relação entre transmitância, espessura da amostra e concentração das espécies que absorvem. Assim, a intensidade transmitida pode ser escrita da seguinte forma:

$$I = I_0 \exp(-\sigma_{\text{abs}} N L) \quad (2.27)$$

Nesta equação, o termo σ_{abs} , representa a seção de choque de absorção, N a concentração da espécie absorvedora na amostra e, L o seu comprimento.

A transmitância é a relação entre a luz incidida (I_0) e a luz transmitida (I) por certa amostra, e o seu máximo pode ser 100%, é dada por ^[10,12]:

$$T = I/I_0 \quad (2.28)$$

Caso determinada amostra não absorva luz, o valor da transmitância será 1, conseqüentemente, se uma amostra absorve luz ela terá o valor da transmitância menor do que 1 ^[12].

2.5. Vantagens do espectrômetro de FTIR

Os espectrofotômetros infravermelhos com transformadas de Fourier possuem inúmeras vantagens, quando comparados com os instrumentos dispersivos.

São compostos de tal modo que, a única parte com movimento é o espelho móvel, resultando em menor desgaste com alta confiabilidade das medidas. Estas medidas, por sua vez, são realizadas em tempos relativamente pequenos com certa continuidade, por isso um grande número de amostras podem ser medidas ^[8,9,12].

O sinal do interferograma possui a vantagem de Fellgett, ou seja, é multiplexado, e o detector capta todas as frequências simultaneamente. Assim, uma única varredura, mesmo em velocidade baixa, dura cerca de alguns segundos e fornece a mesma sensibilidade em relação sinal/ruído. Quanto maior o número de varreduras maior a relação sinal/ruído, por isso, com a adição de vários espectros o ruído diminui, podendo então visualizar até aqueles sinais mais fracos, que poderiam ser encobertos ^[8,9,12].

Os sistemas FTIR não utilizam fendas, assim possuem uma maior abertura óptica quando comparados aos sistemas dispersivos. Por isso, tem maior entrada de energia (vantagem de Jacquinot) e conseqüentemente maior sensibilidade. Como não há fendas a resolução é a mesma para todo o conjunto de amostras medidas ^[8,9,12].

A frequência é modulada pelo espectrômetro, por isso, está livre da radiação espúria. A amostra fica localizada antes do detector e depois do interferômetro, assim a radiação emitida pela amostra não é modulada e, portanto, não é detectada nenhuma banda de emissão. Provoca menor aquecimento na amostra, já que a mesma fica afastada da fonte ^[8,12,13]. Além disso, como os dados sofrem uma conversão analógica para digital, os gráficos obtidos são de fácil manipulação ^[10].

Com todas estas características fica claro que os instrumentos de FTIR são bastante versáteis e possuem várias vantagens quando comparados aos espectrofotômetros dispersivos por varredura.

2.6. Análise discriminante

Os métodos estatísticos podem ser relacionados a apenas uma variável aleatória ou considerando várias variáveis relacionadas simultaneamente, de maneira que todas possuem a mesma importância ^[18]. A natureza não pode ser descrita por um número pequeno de variáveis, assim, os fenômenos naturais necessitam ser tratados sob uma visão multivariada.

A Análise de Função Discriminante ou Análise de Variáveis Canônicas pode ser utilizada para dar uma indicação da possível separação entre os materiais analisados. A distribuição multivariada é especificada por um vetor de médias, que contém os valores médios para todas as variáveis consideradas, e uma matriz de covariâncias, as quais medem o quanto todos os pares de variáveis estão relacionados ^[18]. Esta análise é aplicada, quando em relação a um indivíduo sobre o qual tenham sido feitas diversas mensurações, é necessário decidir à qual de dois, ou mais possíveis grupos, o mesmo pertence. A idéia básica é substituir o conjunto original das diversas mensurações por um único valor “Di”, definido como uma combinação linear delas. Um dos métodos utilizados para o cálculo das funções discriminantes é o da regressão linear, onde a variável dependente consiste na diferença entre as médias multivariadas de dois grupos e as variáveis independentes as variáveis e covariâncias das variâncias em estudo.

Para testar a significância da função encontrada, ou seja, verificar se os dois grupos considerados pertencem a uma única população ou as duas distintas populações, calcula-se a distância entre as duas médias multivariadas.

A diferenciação entre grupos é testada calculando a distância entre as duas médias multivariadas de grupos que pertencem a uma mesma população. Esta medida de distância é conhecida como "distância generalizada de Mahalanobis", e é usada para ser testada pela distribuição “F” com “p” graus de liberdade ^[18]. Quando utilizamos “distância” a comparação de um objeto com ele mesmo sempre dará igual a 0 ^[19]. Este método de representação de diferenças entre grupos leva em conta qualquer correlação que exista entre as variáveis usadas e é também independente das unidades de medida com que as variáveis estão expressas.

Quando há várias variáveis e várias amostras para serem comparadas, utilizamos o teste que utiliza a estatística lambda de Wilk's, que é dada por:

$$\Lambda = |W|/|T|$$

Com $|W|$ o determinante da matriz das somas de quadrados e de produtos cruzados da amostra e $|T|$ é o determinante da matriz das somas totais de quadrados e produtos cruzados.

A eficiência no método de várias variáveis, utilizadas no processo de “discriminação” dos grupos definidos é calculada a partir da estatística Wilk’s lambda. O estimador Wilk’s lambda varia entre 0 e 1, sendo que valores próximos a zero ocorrem quando os grupos são facilmente diferenciados entre si, por outro lado, se o valor de Wilk’s lambda for próximo de um os grupos são muito sobrepostos, ou seja, não são diferenciáveis por meio das variáveis utilizadas ^[18]. O valor de Wilk’s lambda pode ser convertido a um valor de F padrão.

Complementarmente a esta estatística também pode ser utilizada é o traço de Pillai. Esta pode ser escrita em função dos autovalores, sendo:

$$V = \sum_{i=0}^p \lambda_i / (1 + \lambda_i)$$

Com λ_i representando os autovalores.

Valores grandes para esta estatística fornecem evidencia de que as amostras são de populações com vetores médias diferentes ^[18].

2.7. Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) ou SEM (SEM – Scanning Electron Microscopy), consiste em um padrão de rastreamento com um feixe de elétrons focalizado o qual varre a superfície de uma amostra sólida, Figura 2.9.

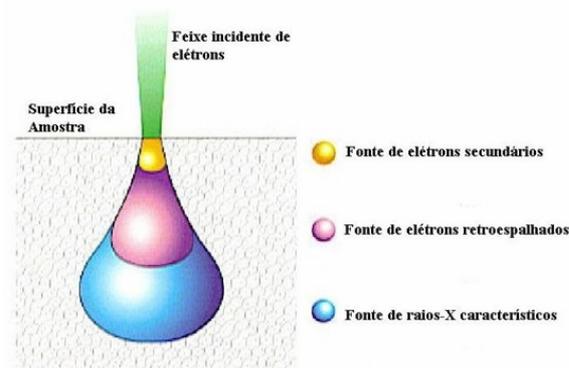


Figura 2.9 – Esquema da varredura amostra pelo feixe.

Durante o processo, os elétrons espalhados ou retro espalhados da superfície do material são detectados por meio de um detector de elétrons. O sinal é então coletado e armazenado em um computador, no qual é convertido em imagem da superfície da amostra, Figura 2.10.

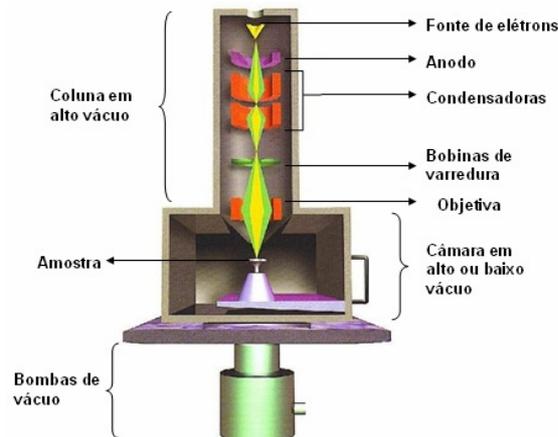


Figura 2.10 – Esquema de um equipamento de MEV.

Amostras com menor condutividade elétrica são mais difíceis de serem analisadas, pois a carga elétrica acumulada na superfície, gerada do feixe eletrônico, faz com que os elétrons sejam desviados da posição focal, causando um efeito de lente e assim distorcendo a imagem. A solução empregada para evitar este problema é o depósito de um filme condutor sobre a superfície não condutora a ser estudada, de forma a evitar o acúmulo de cargas na superfície da amostra. Para as superfícies onde se deseja obter um bom contraste das imagens, é utilizada a evaporação de um filme de ouro fino produzido por bombardeio ou evaporação em vácuo. A escolha de um metal como ouro é devido a sua excelente condutividade elétrica, podendo drenar rapidamente a carga elétrica superficial da amostra analisada e evitando o desvio dos elétrons retro-espalhados. Para amostras biológicas, um procedimento similar é empregado, envolvendo também o emprego da deposição de um filme condutor ^[8,20].

O uso desta técnica é apenas o primeiro passo no estudo das propriedades da superfície de um sólido, auxiliando no conhecimento da morfologia, topografia do material verificado e coletando diversas informações microestruturais.

2.8. Soja (*Glycine Max Merr.*)

Trazida dos Estados Unidos, a soja (*Glycine Max Merr.*) chegou ao Brasil em 1882, no estado da Bahia. O primeiro cultivo foi no estado de Rio Grande do Sul, no município de Santa Rosa, em 1914. A cultura se desenvolveu perfeitamente devido as semelhanças climáticas do ecossistema de origem (sul dos EUA) e dos materiais genéticos existentes no País, com as condições climáticas predominantes no extremo sul do Brasil ^[21].

A soja é uma cultura de grande importância econômica ao Brasil, entretanto, são várias as doenças que podem ocorrer, as quais limitam seu desenvolvimento prejudicando a economia no seu investimento. A soja atualmente é uma das principais fontes de renda de alguns estados brasileiros como Paraná e Mato Grosso do Sul ^[22].

A presença de doenças nas lavouras de soja, principalmente a causada pela ferrugem asiática, vem causando preocupação nos agricultores, devido à facilidade e rapidez da disseminação do fungo, e da ausência de cultivares resistente ou tolerante a esta doença.

2.8.1. Ferrugem Asiática

A ferrugem da soja é uma doença fúngica causada por duas espécies de fungo um é o *Phakopsora meibomiae* que provoca a ferrugem americana, a qual é uma espécie menos agressiva que foi confundida, no início da década de 90, com a variedade asiática. O outro causador da ferrugem é o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, agente da ferrugem asiática, uma espécie que provoca perdas enormes nas lavouras de todo o país ^[23-25]. Para saber qual a diferença entre as duas espécies de fungo é feita a distinção por meio da morfologia dos teliósporos e da análise do DNA ^[26].

A primeira divulgação do causador da doença da soja *Phakopsora pachyrhizi* foi em 1902 no Japão, sendo que em 1914 esta doença apareceu em vários outros países como epidemia ^[27,28]. Por volta de 1990 a doença foi descoberta na África, causando perdas entre 60 a 80%, atualmente, a ferrugem da soja “*P. pachyrhizi*” é tratada como sendo a principal doença que afeta áreas tropicais e subtropicais ^[25].

Foram observadas perdas de até 40% em culturas no Japão; de 10% a 50%, no sul da China; 10% a 40% na Tailândia e de 23% a 90% em Taiwan. Perdas quase totais podem

ocorrer em determinadas áreas, na maioria desses países ^[28]. No hemisfério ocidental, a ferrugem da soja foi primeiramente reportada em 1976 no Brasil e na Colômbia, a qual foi identificada no primeiro momento na soja tipo perene (*Glicine wightii*) ^[29]. No Brasil, anteriormente a 1992, a ferrugem da soja foi confundida com a espécie asiática *Phakopsora pachyrhizi* e tinha como base estudos que consideravam apenas os hospedeiros, fato que levou muitos pesquisadores a cometerem um engano, o qual foi solucionado mais tarde, identificado assim o fungo *Phakopsora meibomiaie* ^[25].

Foi identificada como epidemia, pela primeira vez, no continente Americano, em março de 2001, aparecendo no Paraguai e posteriormente, vindo a surgir no Brasil, em maio de 2001 ^[30,31]. Os primeiros estados que apresentaram foco da doença foram, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás ^[32].

A ferrugem do tipo asiática foi detectada em março de 2001 na localidade de Pirapó (Itapuá), Paraguai ^[33], ocorrendo disseminação no Paraguai e no Paraná no final dessa safra. Na região do Chapadão do Sul-MS, a ferrugem asiática foi observada pela primeira vez na safra de 2001/2002, mas é possível que a doença já estivesse ocorrendo bem antes disso e que, pela semelhança na sintomatologia, sendo confundida com aquelas que fazem parte do complexo de doenças de final de ciclo da soja. Segundo alguns autores, a semelhança, no aspecto visual, de lavouras afetadas por mancha parda e ferrugem e o uso de fungicidas para controle das doenças de final de ciclo, podem ter feito com que a ferrugem não fosse identificada em muitas lavouras e regiões, na safra 2001/2002 ^[34,22].

Fungos causadores de ferrugens necessitam do hospedeiro vivo para sobreviver e se multiplicar. O fungo pode habitar outras 95 espécies de plantas alternativas que também podem ser hospedeiras, além da soja ^[35].

As técnicas moleculares têm se mostrado bastante eficientes para auxiliar no diagnóstico mais rápido do que a análise de DNA, a técnica de PAS-FTIR é uma ferramenta poderosa para análise molecular de diferentes tipos de materiais e foi utilizada neste trabalho e em outras análises que foram realizadas no diagnóstico da contaminação de fungos na superfície do milho ^[1,2], na contaminação de diferentes microorganismos na superfície da maçã ^[3], também na detecção da ferrugem asiática nas folhas de soja infectadas com o fungo *Phakopsora pachyrhizi* ^[4].

Os primeiros sintomas da ferrugem asiática podem ser confundidos com outras doenças que também aparecem na soja, por isso, a necessidade de se estudar novos métodos que apresentam um diagnóstico mais rápido do que o acompanhamento em

campo. Informações prévias da aparência da doença podem ser úteis na redução de infestações da ferrugem [36].

Os sintomas da ferrugem asiática podem aparecer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo que o fungo aparece, principalmente, nas folhas mais baixas da planta, dificultando assim um diagnóstico precoce [30,26].

Inicialmente, aparece na parte inferior da folha pontos muito pequenos com uma coloração mais escura que a coloração natural da folha, às vezes, com um tom esverdeado e/ou acinzentado, com pequenas lesões foliares que recebem o nome de urédias. As urédias adquirem cor castanho-clara a castanho-escura [34]. As urédias, as quais podem chegar a um tamanho entre 2 a 5 mm de diâmetro [37], se rompem e começam a liberar os uredósporos, inicialmente de coloração hialina (cristalina), que se acumulam ao redor dos poros e podem ser carregados pelo vento [30,34].

A Figura 2.11 exemplifica algumas das folhas contaminadas usadas em nosso estudo. Podem-se observar as urédias que aparecem nas folhas de soja, ilustrando o amarelimento das folhas vistos na face superior (a) e (b), e as urédias na cor castanho na face superior (c).

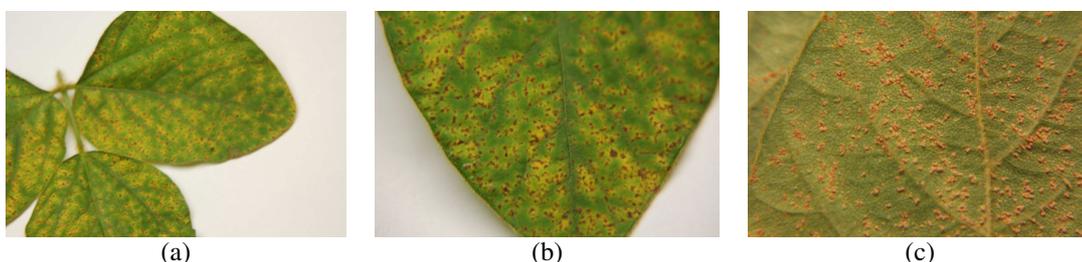


Figura 2.11 – Sintomas da ferrugem asiática nas folhas de soja: (a) e (b) são fotos da parte superior e (c) infecção do fungo na parte inferior das folhas.

Com o avanço da ferrugem da soja ocorre o amarelamento precoce das folhas e a queda prematura, impedindo que a planta termine o seu ciclo natural por completo, causando redução no enchimento dos grãos, redução do número de grãos e vagens, e conseqüentemente perda da qualidade e do rendimento [38]. Em alguns casos, dependendo da época do aparecimento da doença, pode ocorrer também a queda das vagens, provocando perdas totais das lavouras.

No Brasil já foram detectadas perdas de até 70%, quando realizadas comparações em áreas tratadas e não tratadas com fungicida [34].

A disseminação do fungo é rápida e fácil, podendo ocorrer principalmente por meio do vento, dessa forma, não há medidas de controle para a dispersão dos uredósporos. Por isso pode atingir grandes distâncias em pouco tempo [34,38].

Estudos realizados por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que a penetração do fungo pode ocorrer direto na superfície epidermal com a formação, logo em seguida, de tubos germinativos, alguns estudos apresentaram que algumas variedades, as quais possuem uma menor quantidade de cera nas folhas apresentaram uma maior porcentagem de uredósporos e apressórios formados. Esta barreira formada pela camada de cera impede a formação do filme de água na superfície da folha dificultando assim, a germinação e a penetração do fungo na epiderme da folha [39].

O processo de infecção depende da disponibilidade de água livre na superfície da folha e umidade entre 75-80%, sendo necessário no mínimo seis horas de molhamento foliar [30,40]. A faixa de temperatura favorável a infecção do fungo é de 15 e 28 °C, como mostrado em alguns trabalhos [41].

2.8.2. Ciclo e morfologia da Planta de Soja

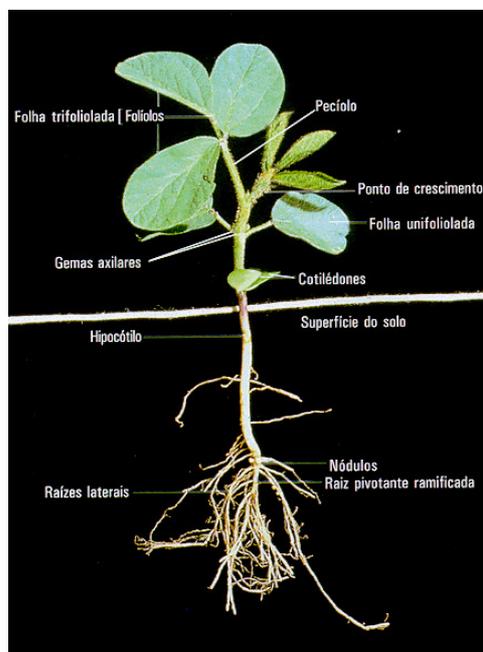


Figura 2.22 - Ilustração de uma planta de soja e seus componentes.

O crescimento, desenvolvimento e o rendimento da cultura soja resultam da interação entre o potencial genético de um determinado tipo de cultivar com o ambiente

que ele está submetido. Há uma interação entre a planta de soja e o ambiente, de maneira que, quando ocorrem mudanças no ambiente, também ocorrem no desenvolvimento da planta. Os cultivares de soja são classificados quanto ao seu hábito de crescimento (forma e estrutura morfológica) e pelo tempo de duração de dia e temperatura, necessários para iniciar o desenvolvimento. O tempo específico de duração entre os estádios de desenvolvimento podem variar de acordo com os diferentes tipos de variedades existentes, clima, regiões de cultivo, datas (épocas) e padrões de semeadura, mas principalmente pela temperatura. Assim, a duração de tempo entre os diferentes estádios será variável conforme as variações de temperatura. Deficiências de nutrientes, de umidade e outras condições estressantes à planta podem prolongar o tempo de duração entre os estádios vegetativos, porém, encurtam o tempo entre as fases reprodutivas ^[42].

O desenvolvimento da planta é dividido em duas fases: vegetativa (V) e reprodutiva (R). A fase vegetativa é nomeada numericamente como V1, V2, V3, até Vn, com exceção dos dois primeiros estádios que são designados como VE (emergência) e VC (estágio de cotilédone). O último estágio vegetativo é designado como Vn, onde “n” representa o número do último nó vegetativo formado pelo cultivar.

A fase reprodutiva apresenta oito estágios, cujas representações numéricas são R1 (início do florescimento), R2 (florescimento), R3 (início da formação de vagens), R4 (formação de vagens), R5 (início do enchimento das sementes), R6 (enchimento das sementes), R7 (início da maturação) e R8 (maturação plena) ^[42].

As folhas são órgãos de suma importância para as plantas, e desempenha a função de troca gasosa entre ela e o meio, processo no qual a respiração libera gás carbônico e de vapor de água, e quando ocorre o processo inverso é chamado de fotossíntese ^[43,44]. Na presença da luz solar as plantas absorvem energia e uma parte dessa energia é convertida em energia armazenada na forma de compostos orgânicos, como proteínas e açúcares. A outra parte é convertida em calor ou reemitida ^[44].

As primeiras folhas que surgem quando uma semente é germinada é denominada cotilédone, órgão onde ficam armazenadas as reservas. O limbo fica sobre um pequeno eixo desenvolvido, o pecíolo, o qual prende a folha ao caule ^[43].

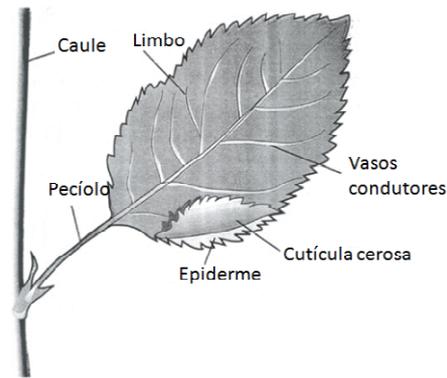


Figura 2.33 – Estrutura externa da folha. Fonte: [46].

As camadas externas de células que revestem o organismo primário da planta são denominadas epiderme superior e inferior [45]. Essa camada restringe a perda de água sob a forma de vapor (transpiração), tem função de proteção, faz trocas gasosas e realiza o metabolismo. Normalmente, a epiderme é revestida por uma película denominada cutícula, cuja espessura pode ser variável e pode conter ceras, as quais reduzem a permeabilidade das paredes das células [43,45]. Na epiderme também podemos encontrar tricomas (pêlos) que podem ser de diversas formas e tamanhos [43].

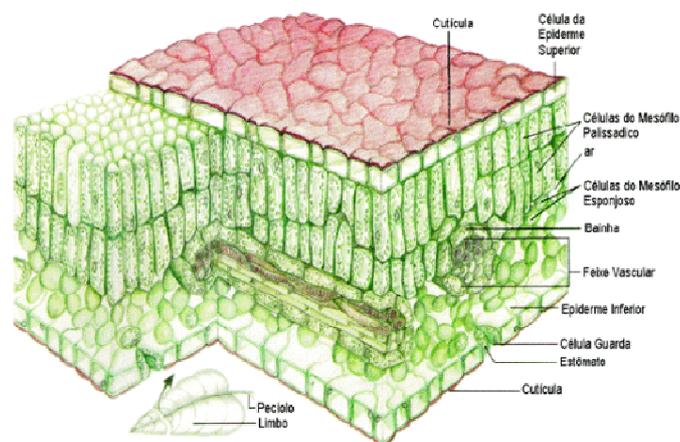


Figura 2.44 – Morfologia interna da folha e suas camadas. Fonte: [46].

Na epiderme há também a elementos que auxiliam na respiração da planta chamados de estômatos conforme mostrado na Figura 2.15. Estes elementos consistem de duas células guarda que se destacam e tem formato de rins, ou de grão de feijão, que possuem hilos voltados um para o outro e entre eles é formada uma abertura, onde ocorrem as trocas gasosas entre a planta e o meio em que vivem [43,45].

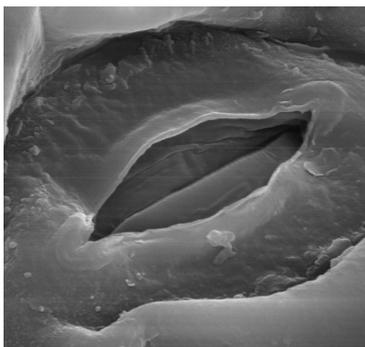


Figura 2.55 – Representação do estômato da folha de soja, em vista frontal. Foto de microscopia eletrônica de varredura com uma ampliação de 5000X.

2.9. Hidrocarbonetos cuticulares das formigas.

As formigas da espécie *Ectatomma Brunneum* são formigas predadoras e que possuem um ferrão bem desenvolvido para a dominação das suas presas [47]. Em geral, estas formigas vivem em colônias, formando assim, uma sociedade muito bem organizada, da forma que cada indivíduo tem sua função específica dentro da colônia onde habitam. Os principais componentes envolvidos no processo de reconhecimento intra-colonial pelos indivíduos de seus parceiros são os hidrocarbonetos cuticulares [48]. Em muitas espécies de insetos sociais, os hidrocarbonetos cuticulares de adultos variam de acordo com a colônia e com a fisiologia de cada indivíduo [49-51]. Estes compostos fornecem uma espécie de assinatura química de cada indivíduo que é reconhecida pelos membros da colônia [52-54].

Os hidrocarbonetos cuticulares estão agrupados numa classe de compostos voláteis conhecidos como “feromônios de superfície”. Estes feromônios são importantes para os insetos sociais, porque eles permitem o reconhecimento dos membros da mesma espécie, além do reconhecimento dos ninhos, e até mesmo, reconhecem os membros de diferentes castas. Geralmente, os feromônios aparecem absorvidos pela superfície do corpo e são percebidos por outros insetos, por meio de uma distância muito pequena ou podem ser detectados pelo contato direto [51]. Em suma, estes compostos químicos formam uma identidade química ou “impressão digital” específicos para cada casta. Devido a esta identificação química, os hidrocarbonetos que estão presentes na cutícula formam o grupo de compostos químicos que possuem importância fundamental para a sinalização intra e inter-colonial das formigas [54]. Esses hidrocarbonetos também possuem a função de proteger a cutícula e o animal como um todo, principalmente da desidratação [55], além de

regular a permeabilidade cuticular ^[51]. Pode-se dizer também que eles são excelentes marcadores de insetos, porque são permanentes e abundantes na cutícula dos insetos e, podem ser analisados até mesmo, em indivíduos mortos ^[56].

De um modo geral, os hidrocarbonetos estão relacionados com a identificação dos papéis e o comportamento dos indivíduos dentro de cada colônia, ou seja, a qual casta eles pertencem, qual a sua função na colônia e outras respostas comportamentais ^[57,51].

Trabalhos recentes, desenvolvidos no Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica - GEOF da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul demonstraram a diferenciação entre castas e o sexo de formigas da espécie *Ectatomma vizottoi* ^[4], e também fizeram a diferenciação entre duas espécies de formigas (*Ectatomma vizottoi* e *Ectatomma brunneum*) utilizando a técnica de FTIR-PAS juntamente com a técnica de análise discriminante multivariada (MANOVA) ^[18]. Outros trabalhos também utilizaram a concentração e a variação dos hidrocarbonetos para a distinção entre espécies, sexo ou funções dos insetos sociais dentro das colônias ^[58,59]. Esta diferença na concentração de hidrocarbonetos também foi verificada em espécies de vespas, mostrando que a variação no perfil de hidrocarbonetos foi suficientemente forte para discriminar indivíduos de acordo com as características de sua colônia ^[14].

Neste trabalho, empregamos a técnica de espectroscopia fotoacústica no infravermelho médio (FTIR-PAS), para diagnosticar a diferença entre a concentração destes hidrocarbonetos nos diferentes grupos de formigas, bem como, a diferença entre as colônias. Esse método foi utilizado devido à facilidade de manuseio e preparo das amostras, além de possuir alta sensibilidade e confiabilidade nos resultados fornecidos. Outros métodos, como a cromatografia gasosa acoplada com a espectrometria de massa, apresentam também alta confiabilidade, entretanto, são métodos que exigem um preparo maior das amostras, e pelo fato da técnica de PAS-FTIR possibilitar medidas de várias amostras em pouco intervalo de tempo com a mesma precisão das outras técnicas, ela foi utilizada neste trabalho.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1. Plantio dos vasos de soja

Foram realizados dois plantios distintos cuja metodologia empregada no plantio e o tratamento dos vasos serão descritos a seguir.

No primeiro plantio, as sementes de soja foram tratadas com o inoculante Rhizomax (gel), um inoculante líquido para soja que contém bactérias *Bradyrhizobium*, as quais servem para fixar nitrogênio nas raízes da planta fornecendo assim, a quantidade ideal de nutrientes que a planta necessita para ter um bom desenvolvimento. As sementes foram plantadas em 60 vasos de plástico de aproximadamente 4,7 L com terra adubada, na formulação 0-20-20 (0% de nitrogênio, 20% de fósforo e 20% de potássio) com micronutrientes. Metade dos vasos foram plantados com sementes transgênicas da variedade BRS 245 RR e 30 vasos com sementes convencionais da variedade BRS 133. Da variedade transgênica, 15 vasos foram submetidos à aplicação do fungicida *Impact Duo* (da Cheminova Brasil Ltda) para prevenir a infestação da ferrugem da soja, e os 15 restantes não tiveram aplicações do fungicida para que ficassem propositalmente susceptíveis a infestação da ferrugem. O mesmo procedimento descrito também foi seguido para os vasos de soja da variedade convencional. A Figura 3.1 resume o procedimento experimental seguido.

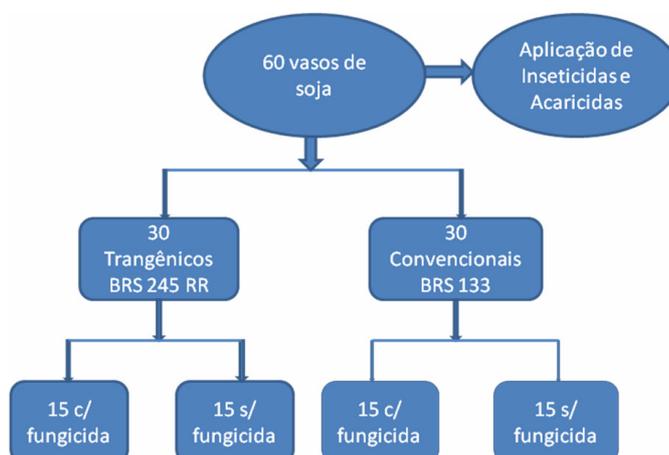


Figura 3.1 - Histograma ilustrando a divisão dos vasos com e sem a aplicação do fungicida.

Para prevenir a infestação de pragas, como insetos e ácaros, foram feitas aplicações de inseticidas e acaricidas, Endosulfan 350 EC MILENIA, em todos os vasos. Estas aplicações foram realizadas 25 dias após a germinação das sementes. O fungicida destinado à prevenção da ferrugem da soja foi aplicado 53 dias após o plantio das sementes, somente no conjunto de plantas que foram escolhidas a não terem a infestação da doença.

Os vasos foram mantidos em uma casa de vegetação aberta e por isso, a infestação das plantas com o fungo da ferrugem da soja ocorreu de forma natural. Na época do plantio a temperatura máxima nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março ficaram em torno de 28 a 32 °C e a temperatura mínima entre 18 e 22 °C, com uma umidade relativa do ar menor que 75%. Temperaturas altas, justamente na faixa mencionada, juntamente com uma alta umidade do ar, contribuem significativamente com a dispersão do fungo e conseqüentemente, uma maior infestação da doença.

No segundo plantio, apenas a variedade BRS 245 RR foi plantada e as sementes foram tratadas com o fungicida Derosal Plus e um inoculante à base de *Bradyrhizobium*. As sementes foram semeadas em terra adubada com a formulação 0-20-20 (0% de nitrogênio, 20% de fósforo e 20% de potássio), em vasos de plástico de 3 litros e também foram separadas como sadias e infectadas. A adubação foi realizada em duas parcelas, metade no preparo dos vasos e plantio e a outra metade 20 dias após a data de semeadura. Esta segunda parte da adubação foi diluída em água. A inoculação do fungo nas plantas foi realizada 28 dias após o plantio.

3.2. Metodologia das medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para as folhas de soja

Os experimentos de MEV foram realizados no Instituto de Física de São Carlos - IFSC-USP em um microscópio eletrônico de varredura da ZEISS modelo DSM 960. A realização desses experimentos foi feita na parte dorsal da folha e com as amostras secas, também foi depositada uma camada fina de ouro nas amostras, a fim de tornar as amostras de folhas condutoras e possibilitar um bom contraste nas imagens.

Outras medidas também foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, em microscópio da

marca JEOL do modelo 6380-LV, seguindo o mesmo procedimento de preparação descrito acima. As folhas foram fixadas em suporte de latão usando fita dupla-face de carbono, que é uma fita condutora de eletricidade.

3.3. Preparação das amostras de soja para as medidas de FTIR-PAS

O experimento de PAS-FTIR foi realizado nas folhas de soja, sadias e infectadas com o fungo *P.pachyrhizi*, em diferentes estágios de crescimento da planta. Para a preparação das medidas de PAS-FTIR, as folhas foram secas em uma estufa a vácuo durante 48 horas. Esse procedimento foi necessário para que toda a água das amostras fosse removida a fim de evitar a interferência do forte sinal do vapor de água nos espectros.

A obtenção dos espectros foi realizada em um espectrofotômetro fotoacústico de absorção óptica no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS) Thermo Nicolet Nexus 670, em atmosfera de ar seco. Os experimentos foram realizados com uma velocidade de varredura de 0,1581 cm/s e resolução de 8 cm⁻¹. Cada espectro analisado consistiu de uma média de 128 varreduras realizadas para cada amostra. A célula fotoacústica foi purgada com gás Hélio com a finalidade de maximizar o sinal fotoacústico, além de, remover o CO₂ e vapor de H₂O do seu interior ^[1]. Um espectro de referência de corpo negro (background) obtido de uma amostra de carbono foi coletado para a normalização da intensidade espectral. Logo após, espectros de absorção óptica no infravermelho médio (região entre 4000 e 400 cm⁻¹) foram realizados para as folhas de soja da variedade BRS 245 RR, BRS 133 e V-max, sadias e infectadas. Para a detecção, uma pequena parte da área central das folhas foi recortada para o preenchimento da célula fotoacústica, em círculos de diâmetro de 5 mm. As amostras foram dispostas no para introdução na câmara fotoacústica de modo que o feixe de radiação IR incidisse na parte inferior da folha. A região dorsal da folha foi escolhida para realização das medidas devido a ocorrência da ferrugem asiática iniciar sua infestação nesta região. Os dados foram processados com o Software Omnic fornecido pelo próprio fabricante do equipamento. Os gráficos foram gerados e processados com auxílio de programas gráficos. Devido a intensidade de o sinal fotoacústico ser em unidades arbitrárias, os gráficos gerados após a plotagem foram normalizados a partir do valor da área de cada espectro. A partir de todos

os espectros foi feita a média referente a cada coleta das folhas e essa média serviu para a diminuição de erros experimentais, que poderiam interferir na análise da amostra.

A análise das amostras realizou-se com o acompanhamento da evolução do fungo *P. pachyrhizi* no tecido epitelial das folhas. Assim, a resposta química das amostras foi acompanhada desde o estágio inicial até a formação das urédias e a liberação dos uredósporos.

3.4. Coletas das formigas

As formigas foram coletadas de várias colônias, oriundas de ninhos subterrâneos. A técnica de FTIR-PAS foi aplicada diretamente no abdômen dos indivíduos, onde os hidrocarbonetos cuticulares são mais concentrados ^[63].

3.4.1. Preparação dos abdomens de formigas da espécie *Ectatomma Brunneum* para as medidas de FTIR-PAS

O experimento de PAS-FTIR foi realizado nos abdomens de formigas da espécie *Ectatomma Brunneum*. Um total de 103 formigas pertencentes a esta espécie *E. brunneum* de seis regiões brasileiras foram coletadas e os abdomens foram coletados, após terem sido anestesiados e as formigas mortas.

Para a preparação das medidas de PAS-FTIR, os abdomens foram secos em uma estufa a vácuo durante 48 horas. Esse procedimento foi necessário para que toda a água das amostras fosse removida a fim de evitar a interferência do forte sinal do vapor de água nos espectros.

A obtenção dos espectros foi realizada em um espectrofotômetro fotoacústico de absorção óptica no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS) Thermo Nicolet Nexus 670 em atmosfera de ar seco. Os experimentos foram realizados com uma velocidade de varredura de 0,1581 cm/s e resolução de 8 cm⁻¹. Uma média de 64 varreduras foi realizada para a coleta do espectro de cada amostra. A célula fotoacústica foi purgada com gás Hélio para maximizar o sinal fotoacústico, além de, remover o CO₂ e vapor de H₂O do seu interior ^[1]. O espectro de fundo “background” foi coletado para a

normalização da intensidade espectral. Logo após, esses procedimentos os espectros de absorção óptica no infravermelho médio (região entre 4000 e 400 cm^{-1}) foram coletados. Cada abdômen foi colocado individualmente dentro da célula fotoacústica, para uma melhor resolução, os abdomens foram postos no centro do cadinho, para que a incidência do feixe infravermelho atingisse a região central do abdômen.

A análise das amostras foi efetuada com o acompanhamento da espécie de formigas *Ectatomma Brunneum*, Figura 3.2, de diferentes regiões. Assim, a resposta química das amostras foi acompanhada e a análise e observação da concentração de hidrocarbonetos cuticulares nos abdomens das formigas foram realizadas.



Figura 3.2 – Formiga da espécie *Ectatomma Brunneum*. Fonte: ^[62]

Capítulo 4

Resultados e Discussões

Conforme descrito no Capítulo 3, analisaremos por meio da técnica de PAS-FTIR a ferrugem da soja. Apresentaremos a seguir os resultados que foram obtidos por meio da aplicação desta técnica nas folhas cultivadas das variedades transgênicas BRS 245 RR e convencionais BRS 133. Esta técnica aplicada em nossa análise revela algumas características químicas presentes principalmente na cutícula da folha, que é a área foliar onde possui primeira interação com o feixe de radiação incidente e, sendo assim, os resultados que foram obtidos, assim como toda a análise realizada, é referente principalmente a superfície foliar. Serão discutidos também os resultados obtidos com a diferenciação de castas de formigas das espécies *Ectatomma brunneum* e *Camponotus rangeri*.

4.1. Resultados da soja: Análise dos picos referente ao primeiro plantio

4.1.1. Variedade BRS 133

Os espectros infravermelhos podem ser divididos em três regiões espectrais: dos grupos funcionais de 4000 a 1300 cm^{-1} , região de “impressão digital de cada composto”, de 1300 a 900 cm^{-1} e compostos aromáticos, heteroaromáticos e alquenos de 900 a 500 cm^{-1} [9].

Pode-se observar que os espectros são similares entre si, indicando uma boa reprodutibilidade da técnica. A banda larga que aparece entre 3700 a 2200 cm^{-1} corresponde a região de absorção do OH⁻ presente nas folhas. Nesta mesma região espectral, na faixa de 3100 a 2700 cm^{-1} , podemos observar a presença das bandas oriundas da vibração do tipo estiramento de ligações do tipo CH. Estas bandas são muito comuns em praticamente todos os compostos biológicos, cuja base de sua composição química é formada por hidrocarbonetos e água. A região entre 1800 a 500 cm^{-1} compreende a faixa conhecida na espectroscopia IR como sendo a região da “impressão digital” do material

devido a sensibilidade à especificidade da composição química do material. Sendo assim, nossa análise será concentrada principalmente nesta região.

A Figura 4.1 mostra os espectros obtidos para as folhas de soja sadias dessa variedade, que foram tratadas e usadas como padrão para identificar as alterações nas folhas infectadas. Pode-se observar a similaridade entre si dos espectros, entretanto, devido a composição química da folha ser um “coquetel” de uma infinidade de compostos químicos diferentes, realizamos a média das amostras de folhas não infectadas para identificar o padrão médio espectral das superfícies das folhas e assim, diminuir o erro experimental. Esta média foi realizada em cada etapa de crescimento da planta, ou seja, para o primeiro trifólio foram retirados 21 espectros, para o segundo foram feitos 15 espectros, o terceiro continha 10 espectros e o quarto trifólio foram 11 espectros. Estas médias são mostradas na Figura 4.1.

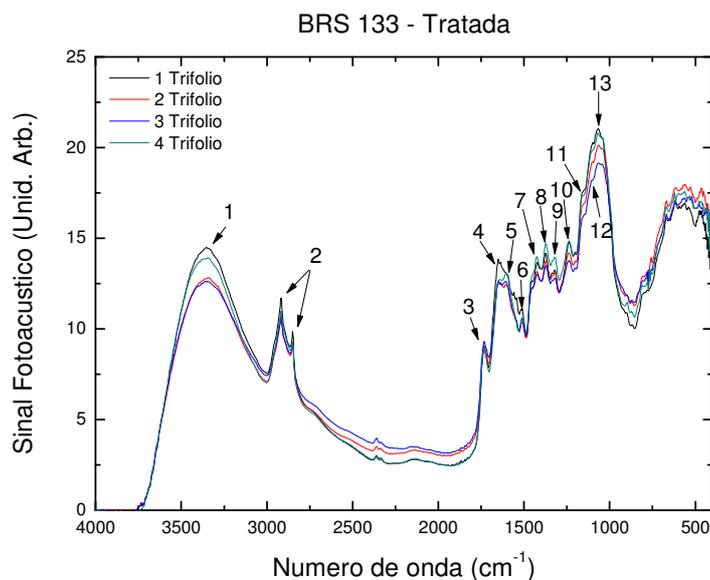


Figura 4.1 - Espectros referentes à variedade de soja BRS 133 tratada com o fungicida.

Cada amostragem descrita, na Figura 4.1, corresponde a um determinado estágio de desenvolvimento da ferrugem da soja. Pode-se observar que existe um comportamento similar das bandas analisadas para todos os estágios de evolução da planta, havendo uma pequena oscilação para as amostragens, principalmente nas bandas compreendidas na região espectral entre 1700 e 1500 cm^{-1} , que é a região das amidas, e na região de 1300 a 1000 cm^{-1} , que é a região dos ésteres. Devido a estas variações, o estudo da influência da ferrugem asiática na folha foi realizado periodicamente, comparando cada estágio das folhas contaminadas com as folhas sadias.

A Figura 4.2, a seguir, mostra os espectros obtidos das folhas de soja infectadas que não tiveram a aplicação do fungicida e que manifestaram a doença da ferrugem. Do primeiro ao quarto trifólio foram realizados 21, 15, 10 e 14 espectros, respectivamente. Da mesma forma que os espectros das folhas saudias, as médias das amostras de folhas infectadas foram feitas para identificar o padrão médio de comportamento apresentado pelas folhas infectadas.

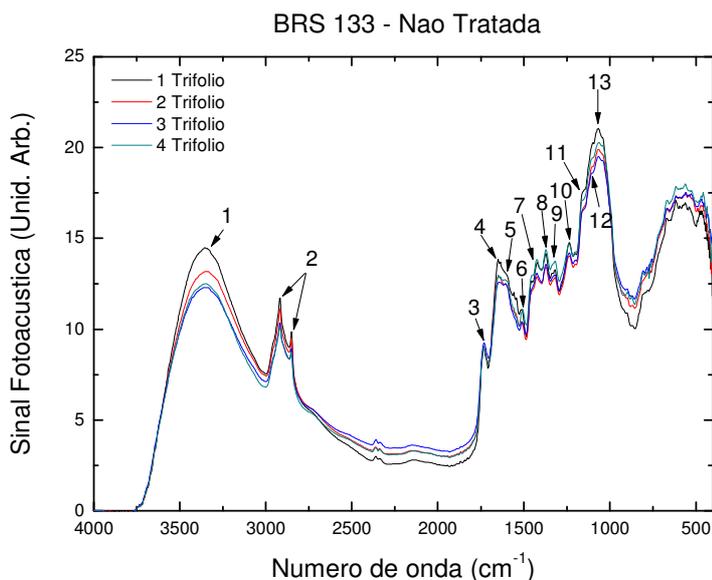


Figura 4.2- Espectros referentes à variedade de soja BRS 133 não tratada com o fungicida.

As amostras que tiveram a aplicação de fungicida apresentaram uma maior variação dos picos 1065 (éster) e 1597 cm^{-1} (aminas), já nas amostras sem a aplicação do fungicida este pico apresentou uma variação menos intensa na maioria das medidas.

Realizamos nesta seção procedimento de subtração dos espectros das folhas infectadas pelas saudias. E somente a partir desta diferença, é que foi possível a análise e interpretação dos picos de forma clara

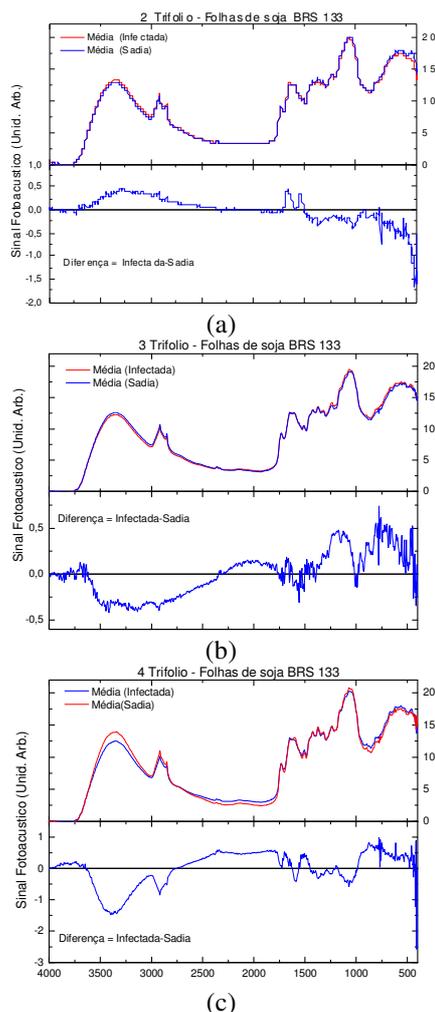


Figura 4.3 - Espectros referentes às diferenças entre os trifólios da variedade BRS 133.

A Figura 4.3 (a) representa dois gráficos, que relacionam os espectros do segundo trifólio da Variedade BRS 133 sadias e infectadas com o fungo *P. pachyrhizi*. A partir do gráfico da diferença entre os espectros da soja infectada e sadia pode-se notar que houve uma variação na região em torno de 1500 a 1700 cm^{-1} , que compreende a região dos amidos, de forma que ocorreu um aumento deste composto molecular na folha de soja infectada. A Figura 4.3 (b) apresenta os espectros relativos ao terceiro trifólio e mostra o aumento na região de 1100 a 1000 cm^{-1} , dos ésteres e dos ácidos acéticos. Vários componentes biológicos como gorduras, essências e ceras, contêm ligações de ésteres. Este aumento do conteúdo de amido e de ésteres, os quais são compostos comumente encontrados em ceras ou na cutícula de folhas, indica uma reação da planta frente à infestação. Assim, a planta tende a aumentar a produção de amidos para compensar a retirada de açúcares pelo fungo e aumentar o espessamento da cutícula foliar, de forma a criar uma barreira na tentativa de impedir a penetração do fungo nas folhas. A Figura 4.3

(c) relaciona os espectros do quarto trifólio, mostra que houve um aumento na região dos amidos, se comportando similarmente aos espectros do primeiro trifólio, e uma redução na quantidade de cera da folha ocasionada pelo aumento da infestação do fungo.

A diferença, entre os espectros das folhas de soja infectadas e sadias, confirmou a variação na região das bandas de amidas (1651 cm^{-1}) e aminas (1597 cm^{-1}) presentes nas folhas de soja. O aumento nesta região foi mais notório nos espectros referente ao segundo e quarto trifólio, este aumento pode estar relacionado à absorção, dos açúcares e nutrientes das folhas, pelo fungo.

Após esta análise uma interpretação mais detalhada pode ser realizada com o auxílio da Tabela 4.1, mostrada a seguir.

Tabela 4.1 - Alguns picos comuns que são encontradas nos espectros infravermelhos das folhas de soja ^[7,9].

Picos	Número de Onda (cm^{-1})	Grupo Funcional	Modo de Vibração
1	3356	O-H ou N-H – Amidas	Estiramento
2	2916	CH_2 – Alcanos	Estiramento Assimétrico
2	2850	CH_2 – Alcanos	Estiramento Simétrico
3	1732	C=O – Éster	Estiramento
4	1651	C=O - Amida I, II e III	Estiramento
5	1597	NH_2 - Amina I	Tesoura
6	1508	C-N(CH_3) ₂ - Amida III	Estiramento
7	1423	O-H In plane - Ácidos carboxílicos	Deformação
8	1373	C- CH_3 – Alcanos	Deformação Simétrica (modo dobrável)
9	1319	C-N - Amina I, II	Estiramento
10	1238	C-C-O – Acetato (sais e ésteres do ácido acético)	Estiramento
11	1161	C-C-O – Éster	Estiramento
12	1107	O-C-C - Éster Aromático	Estiramento
13	1065	O-C-C – Éster	Estiramento

Os principais picos que representam o espectro no infravermelho da folha de soja são:

(1) 3356 cm^{-1} : banda larga com formato de sino entre $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, com pico central em 3356 cm^{-1} , nessa região ocorreu uma pequena variação que se deve a absorção dos grupos N-H.

(2) 2916 e 2850 cm^{-1} : dois picos intensos devidos aos estiramentos assimétricos e simétricos de ligações C-H, ocorreram leves reduções da intensidade destes picos. Esses dois picos apareceram para ressaltar a diminuição do conteúdo lipídico.

(3) 1732 cm^{-1} : pico referente ao estiramento de C=O de éster saturado que corresponde ao grupo funcional dos aldeídos ^[7].

(4) 1651 cm^{-1} : A banda de amida I é geralmente mais intensa que a banda de amida II. No estado sólido geralmente as duas bandas se sobrepõem. Em muitos casos a banda de amida II se sobrepõe à banda de estiramento da ligação C=O. Ela é devida principalmente à deformação angular da ligação N-H, associada ao estiramento da ligação C(O)-N ^[9]. É nessa região de absorção que ocorre a variação da proteína e da glicose da folha.

Em todos os tipos de amidas (I, II, III), os espectros no infravermelho apresentam uma banda referente ao estiramento da ligação C=O, que é conhecida como banda de amida I ^[9].

(5) 1597 cm^{-1} : Banda de aminas aromáticas referentes à absorção do NH_2 , região dos açúcares, com vibração do tipo tesoura.

(6) 1508 cm^{-1} : Região da amida III, C-N(CH₃)₂, com vibração do modo de estiramento.

(7) 1423 cm^{-1} : Absorção do O-H no plano, as duas amostras, tratada e não tratada tiveram o comportamento parecido, aumento da intensidade deste pico, durante o crescimento da folha, sendo que, as amostras tratadas tiveram um aumento maior. Essa é a região dos ácidos carboxílicos com vibração no modo balanço.

(8) 1373 cm^{-1} : esse pico refere-se à vibração de deformação angular simétrica (“modo dobrável”) de C-CH₃ dos alcanos, geralmente, se sobrepõe à de deformação angular simétrica de CH₂, que ocorre em $1480\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$.

(9) 1319 cm^{-1} : referente ao grupo das aminas I e II, com vibração de modo estiramento da absorção de C-N. As aminas aromáticas absorvem em números de ondas entre $1360\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$.

(10) 1238 cm^{-1} : pico referente ao estiramento da ligação C-C-O que corresponde aos sais e ésteres do ácido acético, a variação deste pico é devido à mudança da concentração do éster, essa variação pode acontecer pela formação deste composto durante

o metabolismo do fungo ^[1]. As duas amostras de folhas de soja tiveram aumento de intensidade nesta região no decorrer do crescimento da planta e desenvolvimento do fungo da ferrugem.

As absorções de estiramento de ligações C-N de amins alifáticas geralmente apresentam intensidades de fraca a média e ocorrem na região de 1240 a 1030 cm^{-1} . Geralmente os espectros de amins terciárias apresentam três bandas nessa região, enquanto nos de amins secundárias se observam duas bandas e, nas amins primárias aparecem apenas uma banda ^[9].

(11) 1161 cm^{-1} : ocorrem absorções da ligação de estiramento de C-C-O dos ésteres, os dois tratamentos tiveram decréscimo nessa região no decorrer do crescimento da planta.

(12) 1107 cm^{-1} : estiramento dos ésteres aromáticos que apresentaram redução.

(13) 1065 cm^{-1} : esta região representa o pico de maior intensidade do carboidrato, este pico encontra-se na região de “impressão digital” no infravermelho.

As diferenças apresentadas na Figura 4.3 podem ser mostradas simultaneamente para que seja observada em uma escala temporal da evolução da ferrugem na soja. A Figura 4.4 mostra o gráfico de contorno da diferença entre os espectros no tempo. Pode-se notar que a maior variação ocorreu nas últimas folhas coletadas, ou seja, do 3º para o 4º trifólio e na região entre 1600 a 2500 cm^{-1} , representados pelo aumento da intensidade das cores, sendo que, quanto mais vermelho, mais significativo foi este pico em relação ao desenvolvimento da planta, e a região menos intensa, representada pela cor azul, se refere a pouca ou nenhuma variação do pico em questão.

É na região em torno de 1600 cm^{-1} , que ocorre absorções das bandas referentes à concentração de amido, os quais podem ser transportados na forma de açúcares ^[45]. Nota-se também que ocorre uma relação entre os compostos moleculares da folha, à medida que a concentração de amido aumenta (em torno de 1500-1700 cm^{-1}) a região dos ésteres (1300-1000 cm^{-1}) diminui.

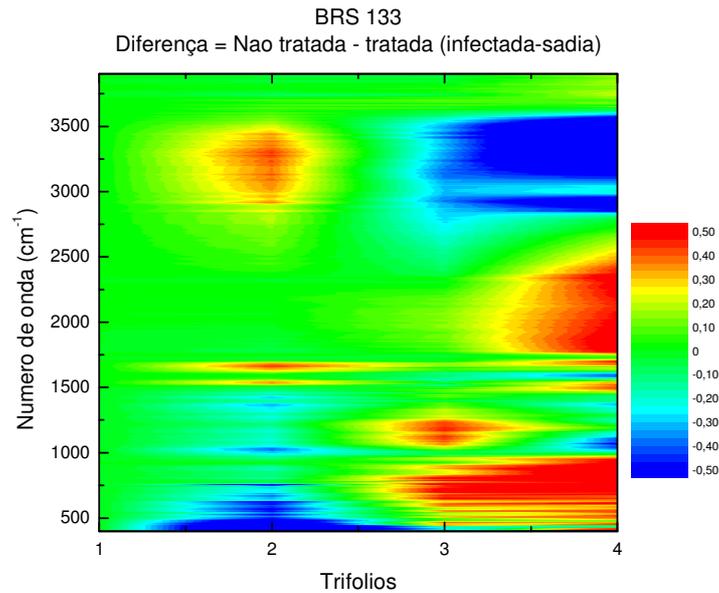


Figura 4.4 – Gráfico de cores feito com a diferença entre as amostras tratadas e não tratadas da variedade de soja BRS 133, em diferentes estágios de crescimento da planta.

4.1.2. Variedade BRS 245 RR

Apresentaremos a seguir a análise realizada na variedade BRS 245 RR, tratada e não-tratada com o fungicida Impact Duo da mesma forma que realizada na seção 4.1.1 anterior.

A Figura 4.5 mostra os espectros obtidos das folhas de soja não infectadas que tiveram a aplicação do fungicida. Do primeiro ao quarto trifólio foram realizados 12, 11, 12 e 12 espectros, respectivamente. As médias destes espectros foram colocadas na Figura 4.5.

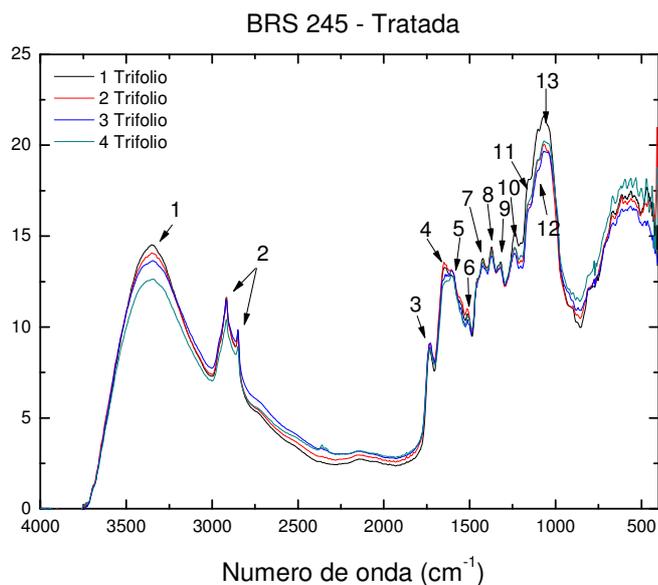


Figura 4.5 - Espectros referentes à variedade de soja BRS 245 RR tratada com o fungicida.

A 4.6 mostra os espectros das folhas de soja infectadas que não tiveram a aplicação do fungicida. Do primeiro ao quarto trifólio foram realizados 12, 11, 12 e 12 espectros, respectivamente. As médias dos espectros das folhas infectadas são mostradas na Figura 4.6, a seguir.

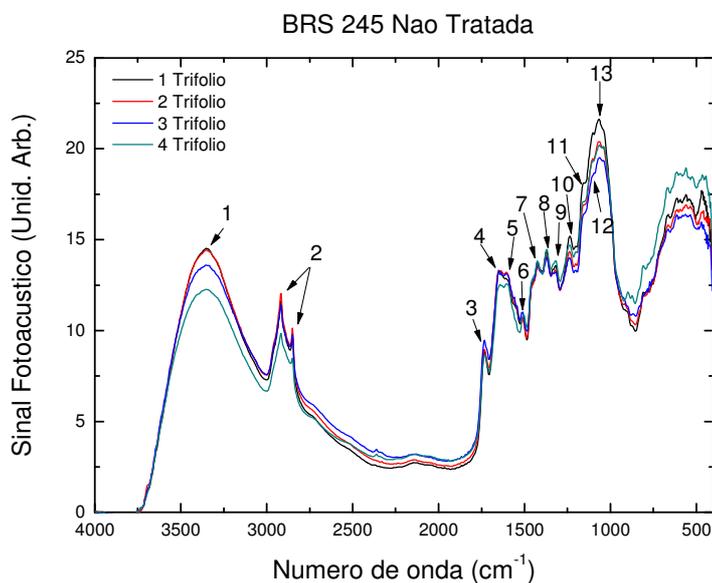


Figura 4.6 - Espectros referentes à variedade de soja BRS 245 RR não tratada com o fungicida.

Os gráficos das Figuras 4.5 e 4.6 mostraram que, em relação à análise infravermelha, as amostras desta variedade transgênica apresentaram o mesmo comportamento da variedade de soja convencional. Os picos selecionados são os mesmos, e estão apresentados na Tabela 4.1, como foi visto anteriormente.

Na região dos açúcares (5), da Figura 4.5 e 4.6, pode-se notar que as amostras não tratadas tiveram uma significativa redução da concentração dos açúcares no decorrer do desenvolvimento das plantas de soja em relação às amostras não tratadas

Na Figura 4.7, pode ser observado um resultado similar ao mostrado na Figura 4.3 indicando um aumento na região do amido, que pode estar relacionado na resposta química de proteção da folha em relação ao fungo *P. pachyrhizi*, conforme já discutido anteriormente.

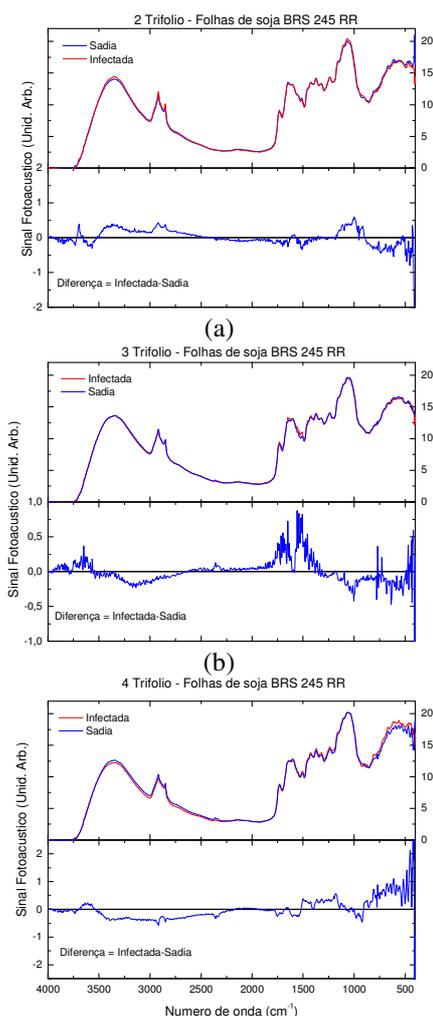


Figura 4.7 - Espectros referentes às diferenças entre os trifólios da variedade BRS 245 RR.

Analisando a Figura 4.7, nota-se que os picos (2) relativos aos estiramentos assimétricos e simétricos de ligações C-H, também demonstraram reduções da intensidade. A banda de amida I (4), região de absorção da proteína da folha, teve uma redução em relação ao 1º trifólio, confirmando a perda de proteína que pode ter sido consumida pelo crescimento do fungo *P. pachyrhizi*.

O pico referente ao estiramento da ligação C-C-O (10) teve uma diminuição da sua concentração devido à mudança da concentração do éster, por causa da formação deste composto durante o metabolismo do fungo. As duas amostras de folhas de soja apresentaram esta redução no decorrer do crescimento da planta.

Os picos (11) e (12) que representam absorções da ligação de C-C-O dos ésteres, que diminuíram suas intensidades em relação ao primeiro trifólio nos dois tratamentos.

Outra redução significativa que se tornou aparente em ambos os tratamentos ocorreu no pico (13) região dos carboidratos, os quais servem na reposição e armazenamento de energia para a planta.

O espectro de contorno da Figura 4.8 mostra a evolução da diferença do espectro no tempo. Pode-se observar que não houve uma diferença tão significativa desse espectro quando comparado ao da Figura 4.4, o que nos leva a entender que as variedades transgênicas são menos suscetíveis as doenças do que as variedades de soja convencionais. Ainda assim, houve uma pequena variação na região dos amidos em torno de 1500 cm^{-1} e dos ésteres, na região de 1060 cm^{-1} , conforme observado. Mesmo sendo mais resistente às doenças, a variedade de soja transgênica não está totalmente protegida contra o fungo causador da ferrugem.

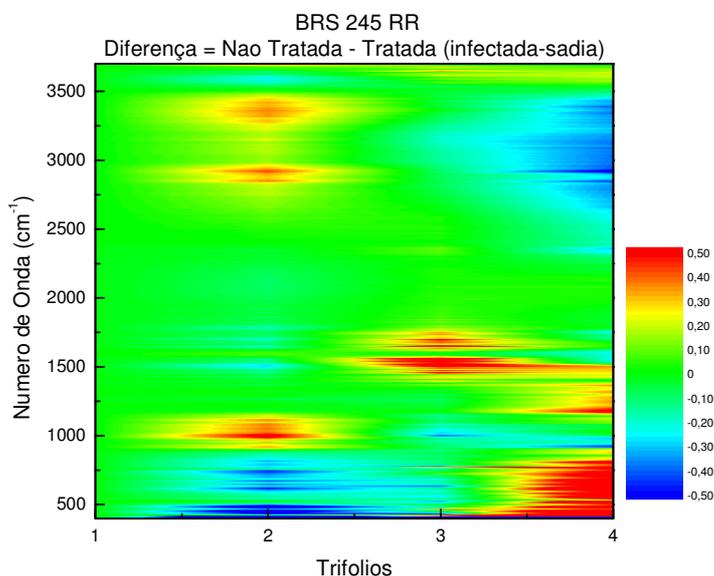


Figura 4.8 - Gráfico de cores feito com a diferença entre as amostras tratadas e não tratadas da variedade de soja BRS 245 RR, em diferentes estágios de crescimento da planta.

4.2. Resultados da soja: Análise PAS-FTIR dos picos referente ao segundo plantio

4.2.1. Variedade BRS 245 RR

A Figura 4.9 mostra os espectros de PAS-FTIR das folhas de soja da variedade BRS 245 RR, a qual é uma variedade de soja do tipo transgênica. Cada espectro corresponde a média de espectros de infravermelho, obtidos para várias folhas saudias, em cada coleta, seguindo o mesmo procedimento descrito na seção 4.1.1.

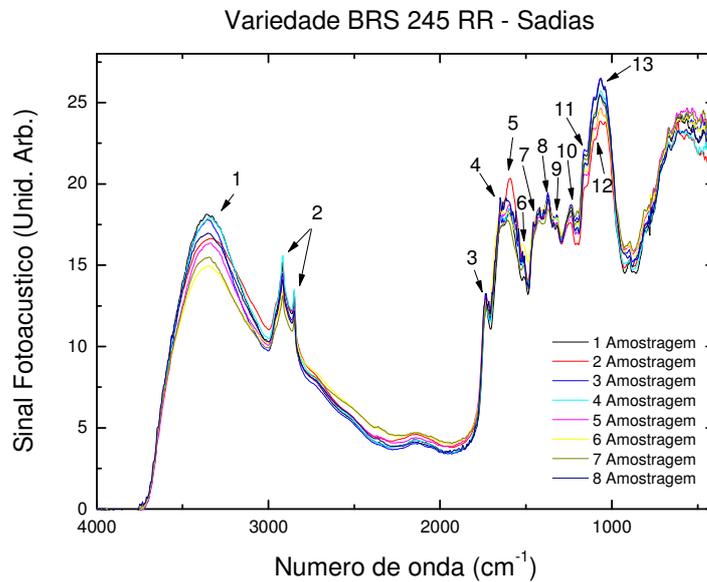


Figura 4.9 - Espectros de PAS-FTIR referentes à variedade de soja sadia BRS 245 RR.

A Figura 4.10 mostra o espectro das folhas de soja contaminadas com a ferrugem asiática. Pode-se observar que existe grande similaridade da forma do espectro mostrado aos da Figura 4.9 e aos da seção 4.1.

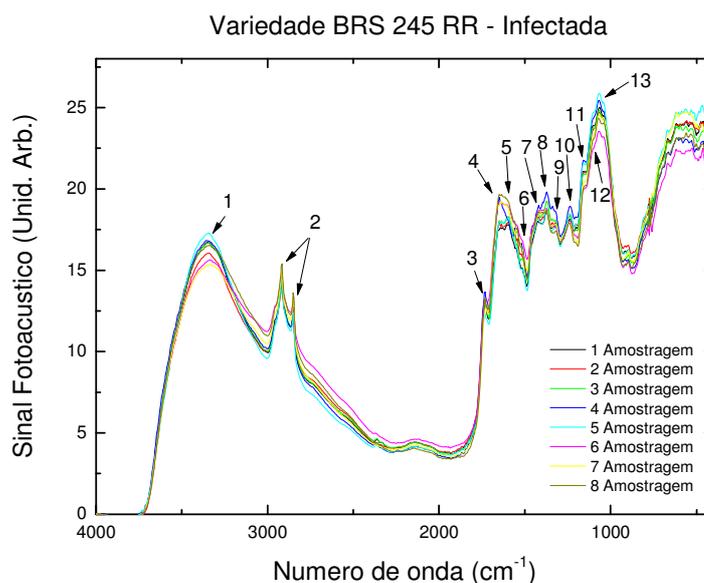


Figura 4.10 - Espectros de PAS-FTIR referentes à variedade de soja sadia BRS 245 RR.

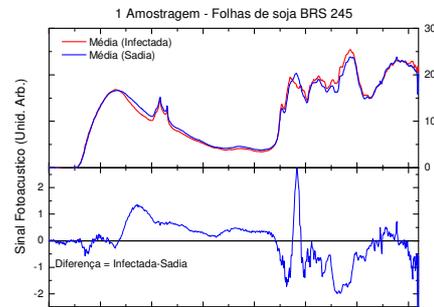
Observa-se nestes espectros um ligeiro alargamento na região referente ao amido (1500 a 1750 cm^{-1}), quando comparado com a mesma região espectral da Figura 4.9. As intensidades das bandas nos picos 4, 5, 12 e 13, apresentam uma diferença quando comparadas com os espectros das folhas sadias, nesta mesma região.

Realizamos nesta seção o mesmo procedimento de subtração dos espectros das folhas infectadas pelas sadias, já feitos na seção 4.1, devido à grande semelhança entre os espectros das folhas de soja sadias e infectadas.

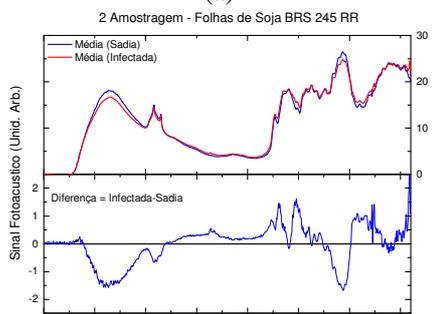
A partir da análise da Figura 4.11 (a), nota-se que há uma variação na região dos amidos, indicando que ocorreu um aumento deste composto molecular na folha de soja infectada, como um tipo de reação da planta em relação ao fungo, repetindo os resultados identificados na seção 4.1. A Figura 4.11 (b) mostra uma diminuição na região de 1100 a 1000 cm^{-1} , dos ésteres e dos ácidos acéticos, relacionados a quantidade de cera na superfície da folha de soja, seguindo o mesmo comportamento observado no primeiro plantio.

A Figura 4.11 (c) mostra uma forte redução na mesma região dos ésteres. Como nessa região aparecem principalmente, absorções devido aos ésteres (em formas de ceras cuticulares), com a entrada do fungo por meio da parede celular, essa redução indica que houve um rompimento da região cuticular, fazendo com que a planta ficasse desprotegida. A partir desta coleta, o fungo da ferrugem já podia ser observado visualmente por meio de

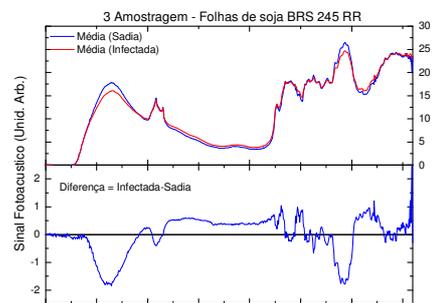
uma lupa de laboratório, confirmando o início da infestação do fungo nesse estágio de desenvolvimento.



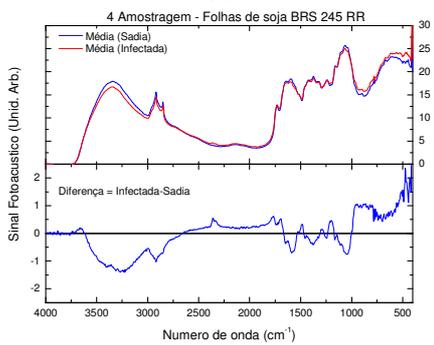
(a)



(b)

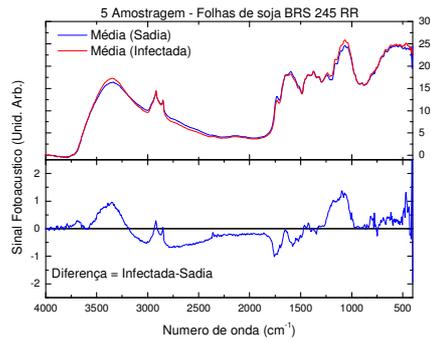


(c)

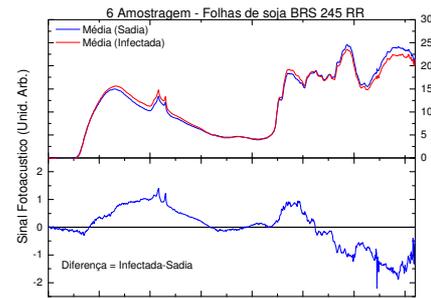


(d)

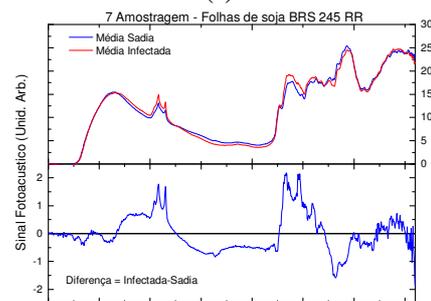
Figura 4.11 - Espectros referentes às diferenças entre 1 e 4 trifólios da variedade BRS 245 RR.



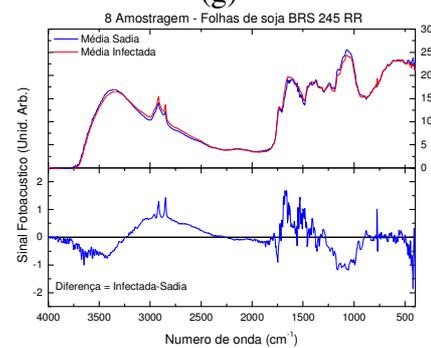
(e)



(f)



(g)



(h)

Figura 4.12 - Espectros referentes às diferenças entre 5 e 8 trifólios da variedade BRS 245 RR.

Estes espectros foram retirados das mesmas folhas que foram realizadas as medidas de MEV, descritas na seção 3.2.

Nos gráficos da Figura 4.12 (a) pode ser observado o aumento da região espectral de 1000 a 1300 cm^{-1} indicando o aumento do conteúdo de ésteres e fenilamidas, os quais, como já mencionado, são compostos químicos comuns em ceras, assim, como as ceras

cuticulares das plantas têm a função de formar uma barreira química essencial para sua proteção. Uma vez que as plantas podem desencadear processos de químicos que podem inibir a proliferação de fungos e bactérias, então o aumento de ésteres ou da cera cuticular pode representar um mecanismo químico de defesa que a planta tenha acionado para sua proteção.

No sétimo e oitavo trifólios da planta obtivemos os espectros mostrados na Figura 4.12 (g) e (h). Nesta etapa, o desenvolvimento do fungo já se encontrava em seu nível de infestação bastante avançado, e por isso, existe uma grande variação na região dos açúcares que estão sendo retirados da superfície foliar pelo fungo, por meio dos tubos germinativos, estes serão discutidos na seção 4.3. E como a absorção é feita na superfície da folha, compreende-se que o feixe de radiação está sendo direcionado sobre estes tubos. Como os nutrientes da folha são captados pelo fungo por meio destes tubos os quais formam uma rede, subentende-se que essa medida corresponde aos amidos e nutrientes que o fungo está retirando da folha e que estão no interior dos tubos germinativos.

A diferença, entre os espectros das folhas de soja infectadas e sadias, confirmou a variação na região das bandas de amidas (1651 cm^{-1}) e aminas (1597 cm^{-1}) presentes nas folhas de soja. O aumento nesta região foi notório nos espectros das Figuras 4.11 e 4.12, como visto anteriormente, este aumento pode ser devido à absorção, dos açúcares e nutrientes das folhas, pelo fungo.

Pelo gráfico de contornos mostrado na Figura 4.13, pode-se notar que ocorreram alterações em quase todos os estágios de desenvolvimento das folhas coletadas.

A mesma relação prevista anteriormente foi observada também de uma forma mais perceptível neste gráfico, ou seja, com o aumento da concentração de amido, a concentração dos ésteres diminui.

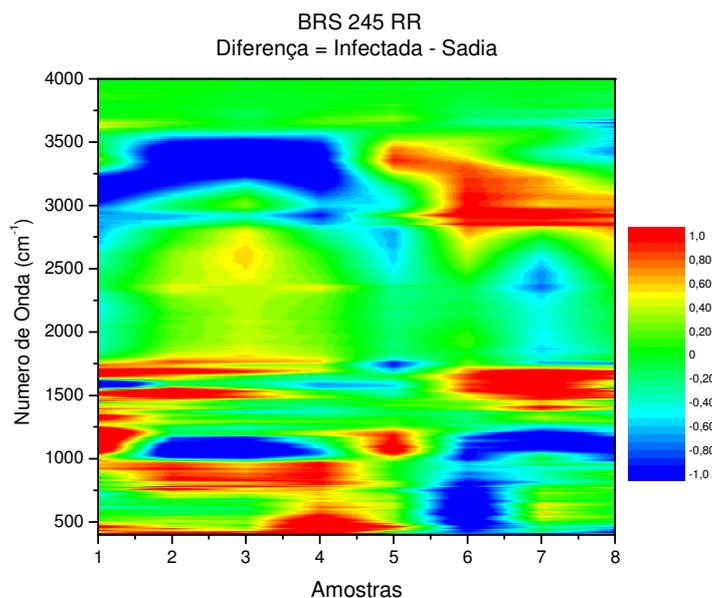


Figura 4.13 – Gráfico de cores plotado com a diferença entre as amostras sadias e infectadas, da variedade de soja BRS 245 RR, em diferentes estágios de crescimento da planta.

Complementarmente a estes resultados, realizamos também o espectro do próprio fungo, Figura 4.14, que foi extraído pela agitação das folhas sobre uma superfície branca.

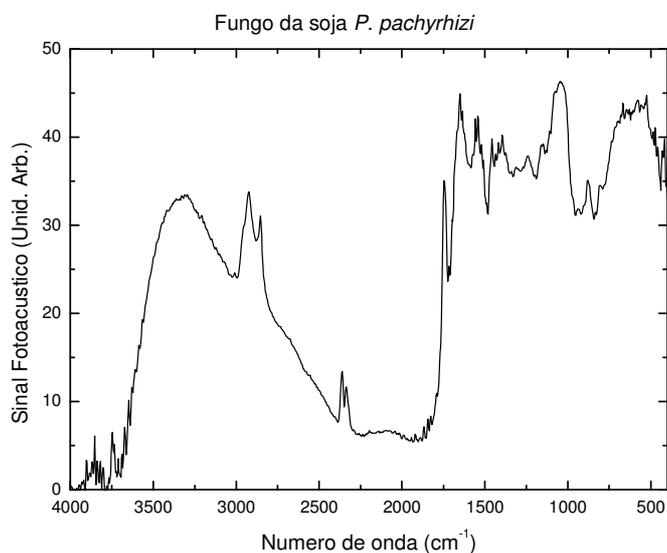


Figura 4.14 – Espectro do fungo *P. pachyrhizi* extraído de folhas contaminadas.

Pode-se notar que o espectro apresentado é característico do espectro de hidrocarbonetos das proteínas, como por exemplo, a queratina a qual é comum de ser encontrada em pêlos, unhas, e outros materiais orgânicos que contenham amidas terciárias, neste caso, a proteína em questão deve-se provavelmente à composição química da parte

externa do fungo. É importante notar que o espectro da folha contaminada não confere simplesmente com a adição do sinal fotoacústico da folha sadia mais o espectro do fungo, indicando assim que o espectro da folha contaminada é produto da infecção provocada pelo fungo e, portanto, indicando reações metabólicas na presença do parasita.

Com a diminuição da escala dos gráficos apresentados na Figura 4.15, as variações que ocorreram nos estágios de desenvolvimento e evolução do fungo, podem ser notoriamente visualizadas. A variedade BRS 133 do primeiro plantio, Figura 4.15 (a), apresentou uma pequena mudança na região de 1500-1700 cm^{-1} , quando comparada com o segundo plantio, já a variedade BRS 245 RR do primeiro plantio, Figura 4.15 (b), foi a que mostrou a menor alteração nesta região, sendo que, este primeiro plantio foi tratado com o fungicida e, por isso, a variedade transgênica ficou menos susceptível a infestação do fungo. A variedade BRS 245 RR referente ao segundo plantio, Figura 4.15 (c), que foi plantada em ambiente controlado e não teve aplicação de fungicida, apresentou uma maior diferenciação em relação às intensidades dos picos.

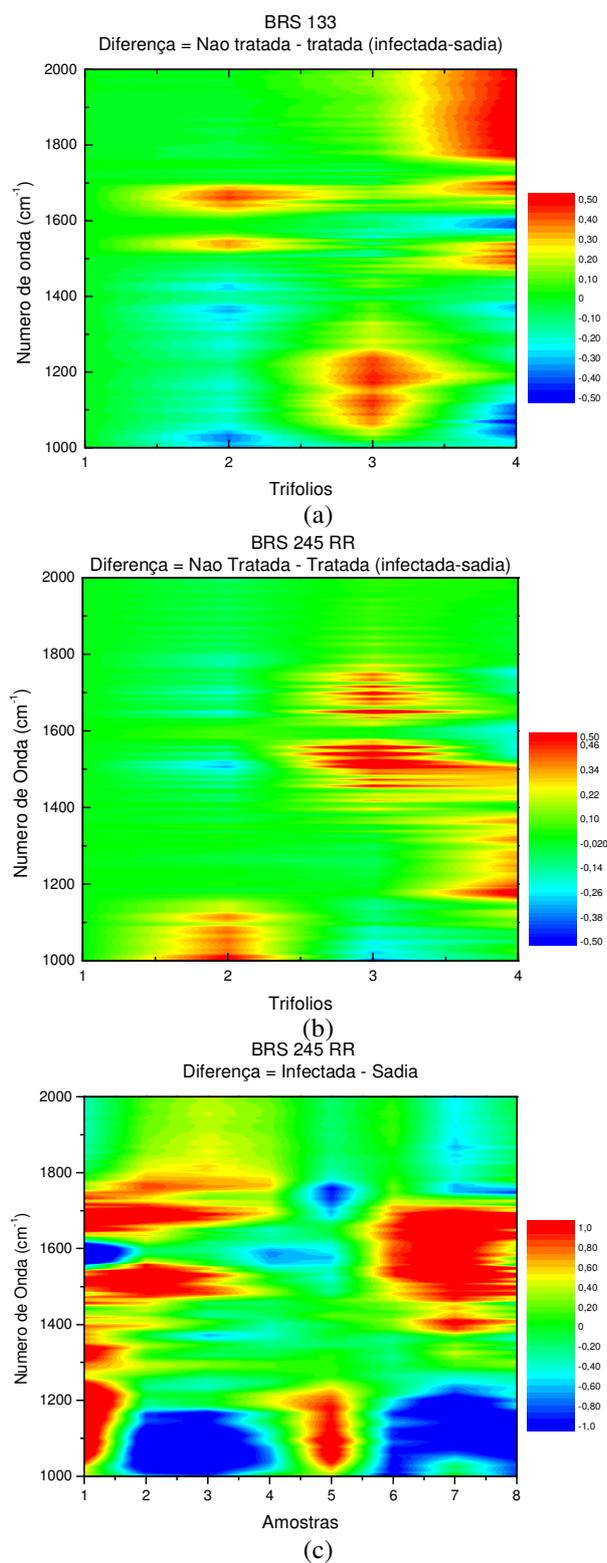


Figura 4.15 – Diferença entre as amostras sadias e infectadas, da variedade de soja BRS 133 (a) e BRS 245 RR referentes ao primeiro plantio, e BRS 245 RR (c) do segundo plantio, todas com intervalo de 2000 a 1000 cm^{-1} .

4.3. Discussão das medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As medidas de MEV tiveram com objetivo acompanhar a evolução da ferrugem da soja, por meio de uma técnica visual já conhecida para este estudo, de forma que os mesmos estágios da evolução da doença possam ser acompanhados pela técnica de Espectroscopia Óptica Fotoacústica Infravermelha por Transformada de Fourier (Photoacoustic Spectroscopy by Fourier Transform Infrared – PAS-FTIR).

O uso da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu verificar a morfologia e a estrutura das folhas de soja com a ausência e presença do fungo causador da doença da ferrugem da soja. Esta técnica mostrou claramente a evolução do fungo *P. Pachyrhizi* na superfície inferior das folhas de soja desde a primeira até a última coleta. As amostras da variedade BRS 245 RR que tiveram as imagens obtidas pela técnica de MEV são correspondentes ao segundo plantio, cuja análise FTIR já foi discutida na seção 4.2.

As Figuras a seguir mostram diferentes imagens de MEV em diferentes ampliações e locais da superfície das folhas sadias, desidratadas, utilizadas como controle. Pode-se observar que as imagens revelam um aspecto enrugado da superfície foliar devido à prévia secagem a vácuo para realização das medidas de FT-IR.

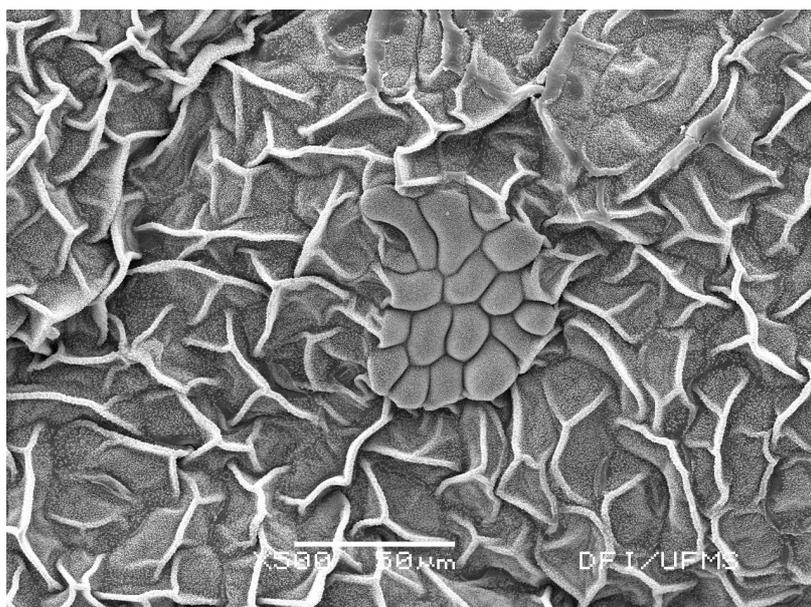


Figura 4.16 - Foto de MEV da folha de soja sem a presença do fungo *P. pachyrhizi*. Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 44 dias.

Pode-se observar que, na Figura 4.16 no meio da imagem, a folha não foi totalmente desidratada de modo que as células podem ser observadas de uma maneira mais arredondada. Nesta interpretação, essa desidratação não afetou a análise e interpretação dos resultados obtidos, dessa forma, pode-se observar que as imagens das Figuras 4.16 a 4.19 mostram claramente que não existe nenhuma infestação do fungo *P. pachyrhizi* nas folhas de soja submetidas à análise, usadas como controle.

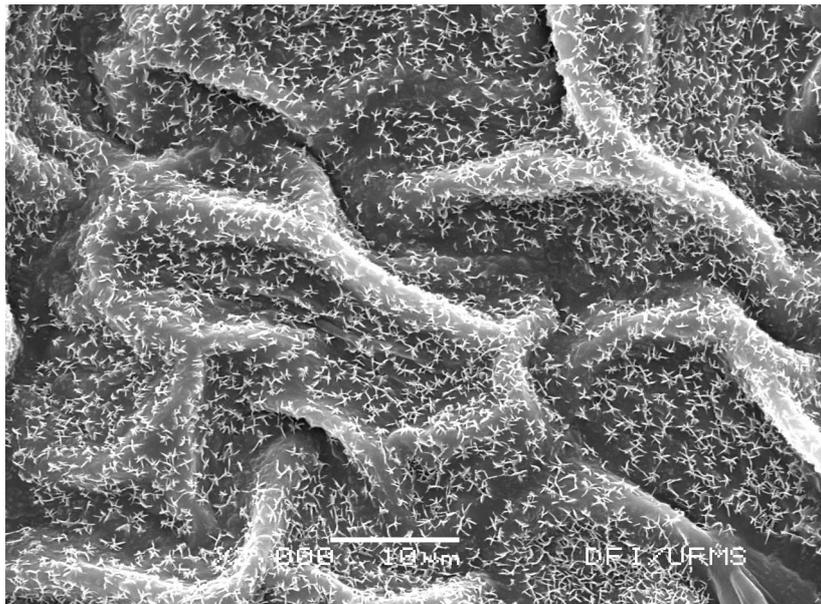


Figura 4.17 - Folha de soja sem a presença do fungo *P. pachyrhizi*. Esta foto teve uma ampliação de 2000X e a planta estava com idade de 52 dias.

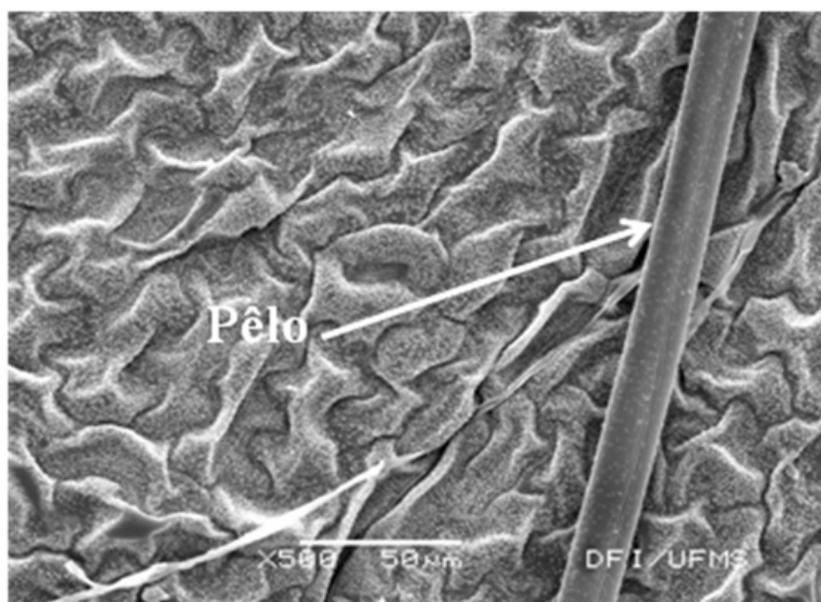


Figura 4.18 - Folha de soja sem a presença do fungo *P. pachyrhizi*. Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 66 dias.

O que aparece nas fotos, na epiderme, é a presença de pêlos que podem ser de diversas formas e tamanhos, os quais aparecem nas Figuras 4.18 e 4.19.

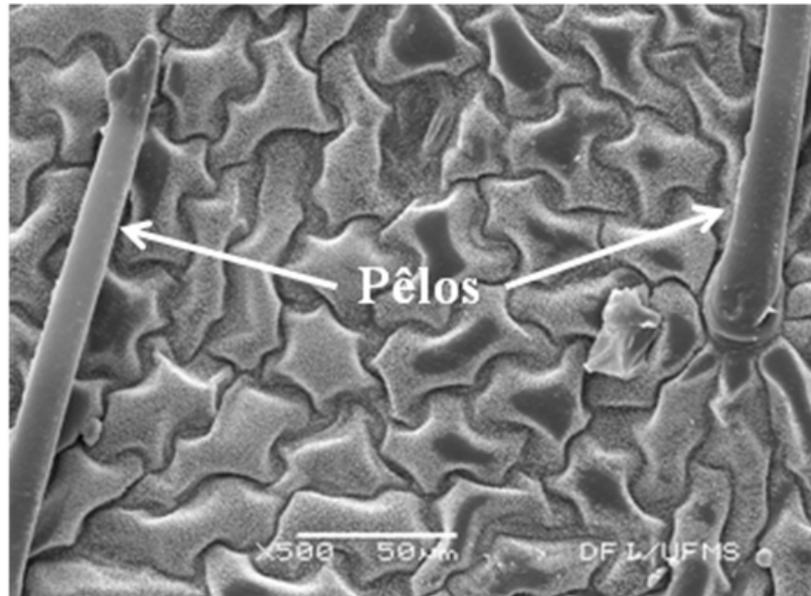


Figura 4.19 - Folha de soja sem a presença do fungo *P. pachyrhizi*. Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 82 dias.

Nas Figuras 4.20 a, a seguir, mostram as imagens de MEV das folhas de soja da variedade BRS 245 RR contaminadas com fungo *P. Pachyrhizi* que foram cultivadas seguindo o procedimento descrito na seção 3.2.

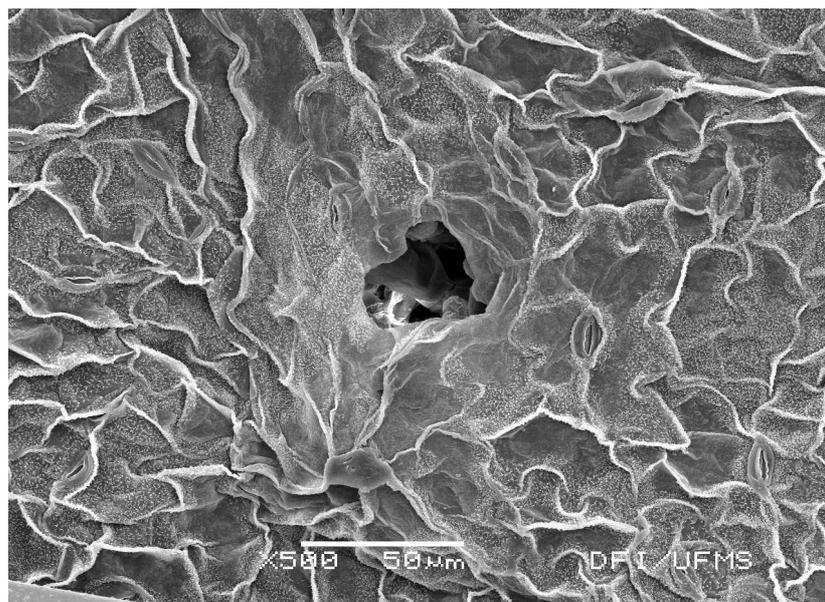


Figura 4.20 - Folha de soja infectada com o fungo *P. pachyrhizi*. Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 44 dias.

Pode-se observar que a clara identificação visual das urédias ocorre a partir da quarta coleta das folhas, Figura 4.21 onde é visualizada a formação do fungo.



Figura 4.21 - Folha de soja infectada com o fungo *P. pachyrhizi*. Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 55 dias.

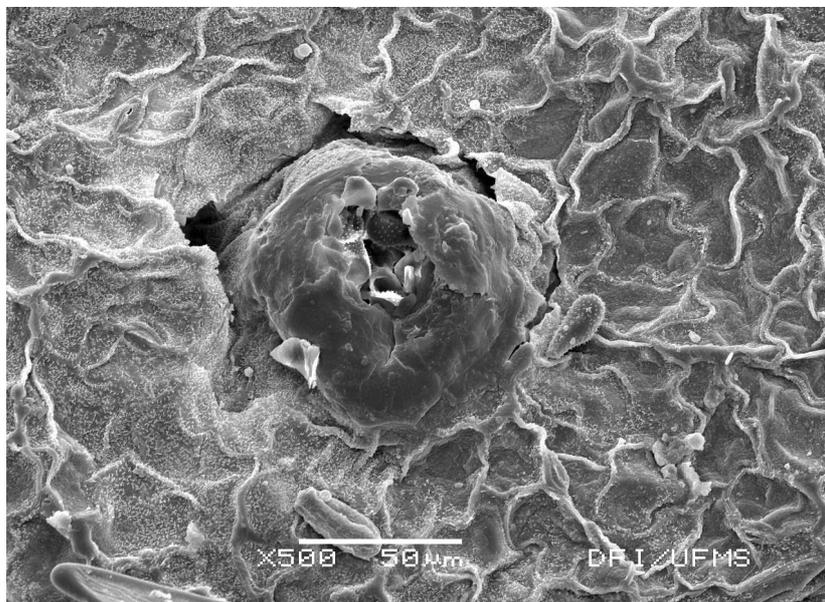


Figura 4.22 – Folha de soja infectada com o fungo *P. pachyrhizi*. Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 58 dias.

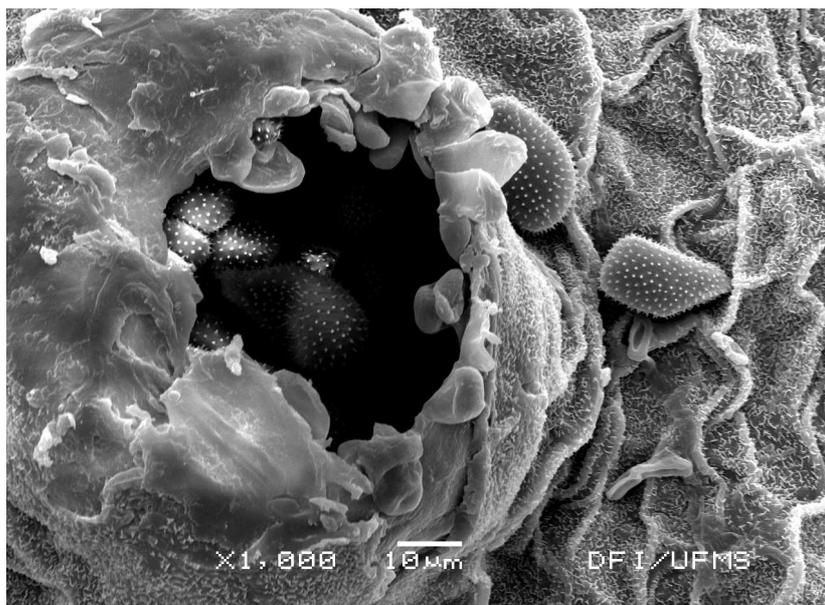


Figura 4.23 – Folha de soja infectada com o fungo *P. pachyrhizi*. Esta foto teve uma ampliação de 1000X e a planta estava com idade de 58 dias.

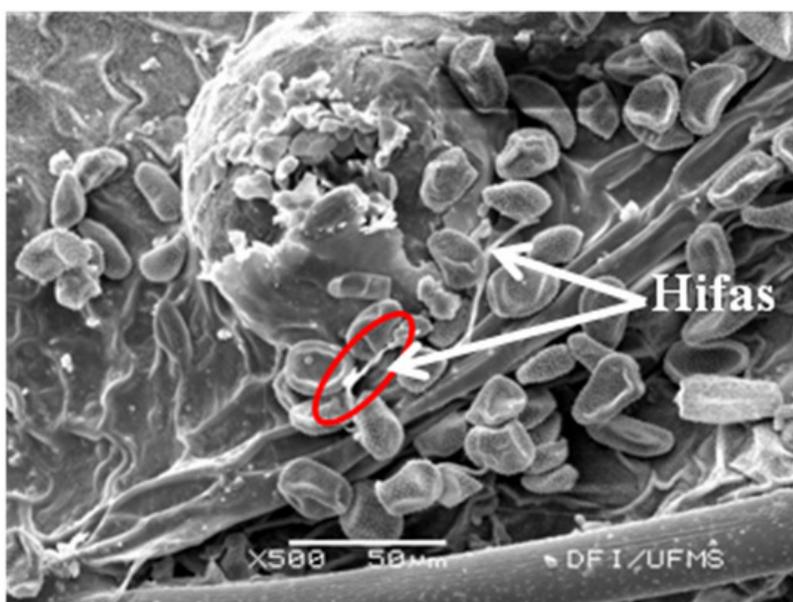


Figura 4.24 - Folha de soja infectada com o fungo *P. pachyrhizi*. Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 66 dias.

A partir da sexta coleta, Figura 4.24, as folhas infectadas já apresentaram sinais de infestação e formação de hifas na superfície da amostra.

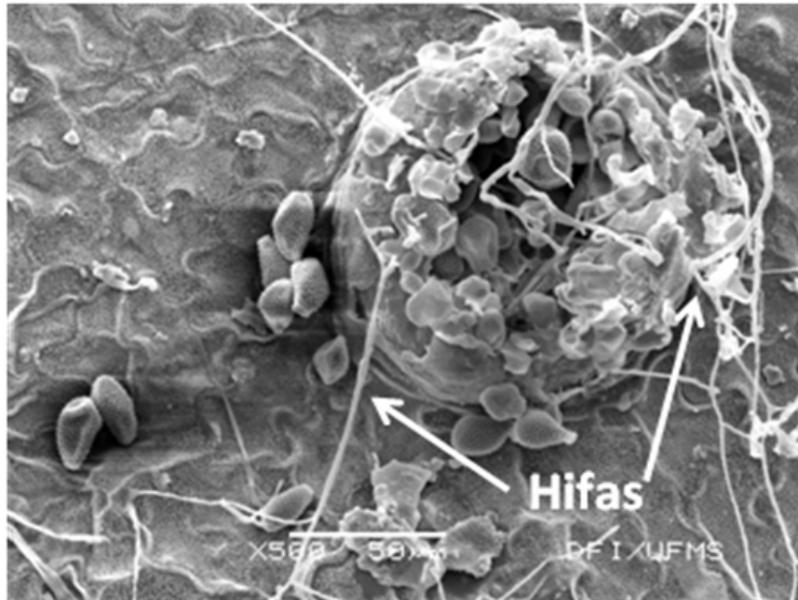


Figura 4.25 - Folha de soja infectada com o fungo *P. pachyrhizi*. Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 66 dias.

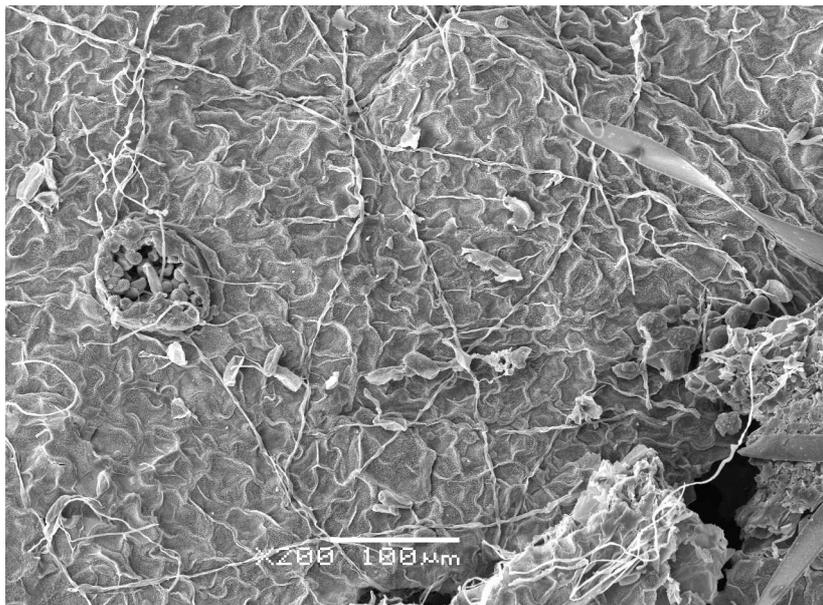


Figura 4.26 - Folha de soja infectada com o fungo *P. pachyrhizi*. Esta foto teve uma ampliação de 200X e a planta estava com idade de 82 dias.

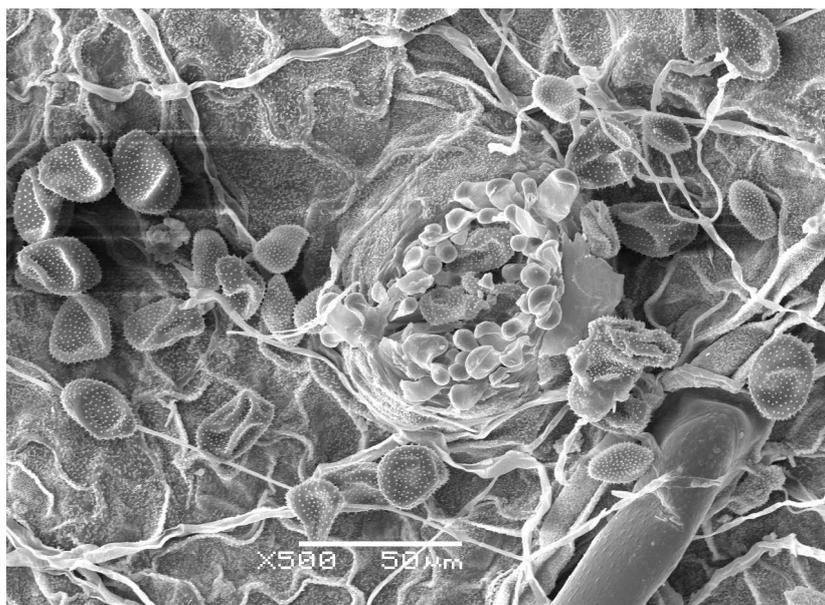


Figura 4.27 - Folha de soja infectada com o fungo *P. pachyrhizi*. Esta foto teve uma ampliação de 500X e a planta estava com idade de 82 dias.

A presença dos tubos germinativos (hifas) que se aderem à superfície das folhas pode ser observada a partir da Figuras 4.24, estes tubos servem para facilitar a penetração do fungo nos tecidos do hospedeiro e desempenha função importante no seu desenvolvimento sendo por meio destes, que os fungos absorvem água e os nutrientes da folha. A presença de hifas e uredósporos também foram verificadas em outros trabalhos [1, 4].

Outras imagens de MEV foram realizadas no Instituto de Física de São Carlos - IFSC-USP em um microscópio eletrônico de varredura da ZEISS modelo DSM 960.

A Figura 4.28 ilustra amostras de uredósporos de *P. pachyrhizi* com ampliações de até 3000X, mostrando a morfologia do fungo. Nota-se que está começando a formação dos tubos germinativos, na amostra com aumento de 3000X, os quais servem para a retirada de nutrientes e alimentação do fungo

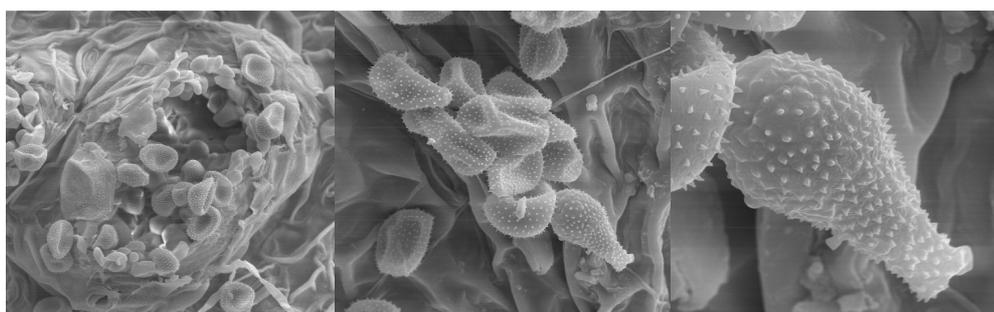


Figura 4.28 - Fotos de MEV realizadas nas amostras de soja infectadas com o fungo *P. pachyrhizi* com ampliação de 500X, 1000X e 3000X, respectivamente.

4.4. Microscopia Óptica

Um Estéreo Microscópio, acoplado a câmera digital com sistema de captação de imagem, foi utilizado para estudar a microestrutura das folhas de soja, pois, conhecendo um pouco da estrutura morfológica da folha, a análise da técnica de PAS-FTIR se torna mais fácil para o entendimento quando analisada conjuntamente com outra técnica. A análise microscópica também possibilita um maior entendimento no que acontece com a estrutura da folha, quando o agente causador de doença da ferrugem da soja ataca as lavouras de soja.

As Figuras a seguir (4.29 a 4.31), ilustram as folhas de soja que não apresentam a presença do fungo *P. pachyrhizi*. As fotos correspondem às folhas com 66 dias de semeadura.



Figura 4.29 - Fotos de folhas sem a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 1,0x10.



Figura 4.30 - Fotos de folhas sem a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 2,5x10.



Figura 4.31 - Fotos de folhas sem a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 5,0x10.

Por meio da comparação com outras folhas que apresentam do fungo, nota-se a grande diferença entre as folhas sadias (Figuras 4.29 a 4.30) e infectadas (Figuras 4.32 a 81).

As Figuras 4.32 a 4.34 mostraram fotos das folhas de soja infectadas com o fungo da ferrugem da soja, que foram tiradas com o auxílio de um microscópio óptico. Na folha infectada, pode-se ver que o fungo está no início da esporulação, sendo que as urédias (pequenas lesões em formas de bolhas transparentes) estão começando a aparecer. Nas figuras, as folhas foram retiradas das plantas que estavam com 58 dias de cultivo.



Figura 4.32 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 1,0x10.



Figura 4.33 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 2,5 x10.



Figura 4.34 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 5,0 x10.

Nas fotos apresentadas nas Figuras 4.35 a 4.38, a ampliação gradativa de uma mesma região permite uma melhor observação da ação do fungo contaminando a folha de soja. Com o auxílio do microscópio, podem-se visualizar as lesões o que o fungo da ferrugem da soja causa na estrutura da folha quando a mesma é parasitada por ele. Nota-se uma coloração no tom marrom avermelhado que é exatamente onde o fungo está localizado na. Nestas figuras, as folhas foram retiradas das plantas que estavam com 66 dias de cultivo.



Figura 4.35 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 0,8x10.



Figura 4.36 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 1,25x10.



Figura 4.37 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 2,5x10.



Figura 4.38 - Folhas com a presença do fungo da ferrugem asiática. Ampliação de 5,0 x10.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura pode-se observar claramente a infestação do fungo da ferrugem em diferentes estágios de evolução. Entretanto as análises por observação de imagens de MEV ou de microscopia óptica somente permitem a identificação clara da infestação do fungo quando as pústulas ou urédias já estão se rompendo. Isso indica que a doença já se encontra em um estágio avançado de desenvolvimento. Já a técnica de PAS-FTIR permite que a observação, logo nos primeiros estágios de contaminação, das alterações químicas provocadas pelo fungo da ferrugem, ou seja, é capaz de identificar prematuramente o stress de açúcares sofrido pela planta. Ademais, a técnica de PAS-FTIR permite que sejam observadas as alterações tanto no nível de açúcares quanto de ésteres, revelando as reações da planta frente à infestação.

4.5. Análise dos abdomens de formigas da espécie *Ectatomma Brunneum*.

Foram coletados vários espectros dos abdomens de formigas *Ectatomma brunneum* de diferentes castas e localidades, de modo a verificar se que a distinção entre castas seria percebida pela técnica de PAS-FTIR, conforme já descrito anteriormente.

A Figura 4.39 mostra a média dos espectros correspondentes para todas as castas das formigas. Nota-se que há diferença entre os espectros, mas que os números de onda dos picos correspondentes deslocam apenas em termos da intensidade, tornando difícil a separação de castas apenas visualmente. Esta sutil variação observada mostra que ocorre uma diferenciação entre estes membros em relação ao conteúdo de hidrocarbonetos cuticulares.

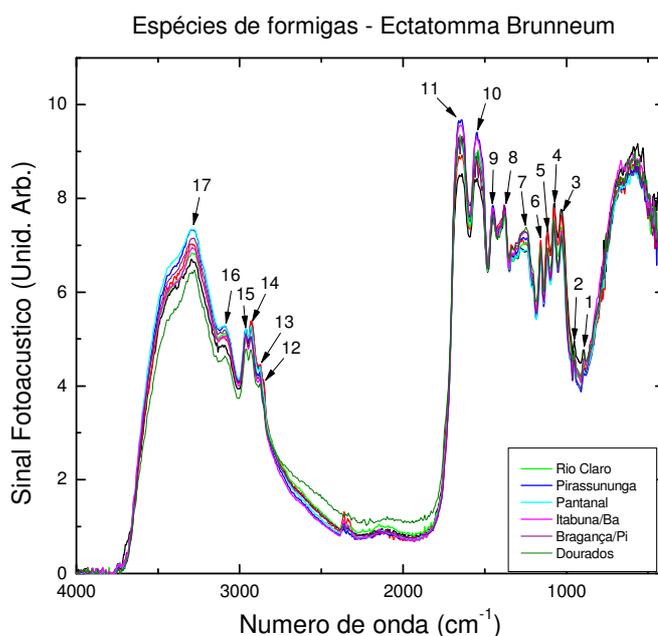


Figura 4.39 - Espectros referentes aos abdomens de formigas da espécie *Ectatomma Brunneum* coletadas de diferentes localidades.

Foram analisados 17 picos, que aparecem nos espectros dos abdomens de formigas da espécie *Ectatomma brunneum*, os quais correspondem às absorções dos hidrocarbonetos cuticulares das formigas de localidades diferentes.

A posição dos principais picos em função da frequência de oscilação dos grupos funcionais moleculares, identificados nos espectros de PAS-FTIR da Figura 4.39, está listada na Tabela 4.2 a seguir.

Tabela 4.2 - Alguns picos comuns que são encontradas nos espectros infravermelhos dos abdomens de formigas *Ectatomma brunneum* ^[7,9].

Picos	Número de Onda (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	Modo Vibracional
1	895	C-H - Alquenos	Deformação fora do plano
2	953	C-H – Alquenos	Deformação fora do plano
3	1030	C-O-C – Éter	Estiramento Assimétrico
4	1076	O-C-C - Éster Saturado	Estiramento
5	1115	O-C-C - Éster Aromático	Estiramento
6	1157	C-N - Amina II Saturada	Estiramento
7	1242	C-C-O - Éster Saturado (Acetato)	Estiramento
8	1377	C-CH ₃ – Alcanos	Deformação Simétrica Modo dobrável
9	1454	C-CH ₂ – Alcanos	Tesoura
10	1550	N-H - Amida II	Deformação no plano
11	1651	C=O - Amida I, II e III	Estiramento
12	2854	-C-H (CH ₂)	Estiramento Simétrico
13	2874	-C-H (CH ₃)	Estiramento Simétrico
14	2931	-C-H (CH ₂)	Estiramento Assimétrico
15	2962	-C-H (CH ₃)	Estiramento Assimétrico
16	3093	=C-H	Estiramento
17	3294	≡C-H	Estiramento

Os principais picos que representam o espectro no infravermelho dos abdomens das formigas são:

(1) 895 cm⁻¹: absorção dos alquenos, com vibrações de deformação fora do plano.

(2) 953 cm⁻¹: mostra as ligações de deformação fora do plano dos alquenos, que ocorrem geralmente na região de 1000-650 cm⁻¹.

Os alquenos são compostos que estão presentes durante o amadurecimento das frutas, como as formigas se alimentam do sulco produzido pela decomposição das mesmas, a presença destes grupos funcionais nos abdomens de formigas é claramente explicada.

(3) 1030 cm⁻¹: a banda de estiramento assimétrico do éter (C-O-C), geralmente é intensa da região de 1300 e 1000 cm⁻¹. Podem ser formados pela síntese orgânica.

(4) 1076 cm^{-1} : para todos os ésteres saturados, esta vibração aparece entre 1100 e 1030 cm^{-1} .

(5) 1115 cm^{-1} : banda de baixa intensidade dos ésteres aromáticos. Os ésteres estão relacionados às gorduras animais, ceras cuticulares e também a alguns tipos de essências, quando reagem com água podem formar ácidos orgânicos.

(6) 1157 cm^{-1} : a banda das aminas secundárias saturadas aparece entre 1180 e 1130 cm^{-1} .

(7) 1242 cm^{-1} : banda referente aos ésteres saturados. Esta banda que aparece na região em torno de 1240 cm^{-1} é única dos acetatos.

(8) 1377 cm^{-1} : esta banda é muito importante, sendo que a presença ou sua ausência é uma forte indicação da presença ou ausência do grupo metila na amostra. Os alcanos podem ser encontrados na natureza na forma, sólida, líquida ou gasosa.

(9) 1454 cm^{-1} : esta banda é típica da vibração do tipo tesoura dos metilenos.

(10) 1550 cm^{-1} : as amidas secundárias são o tipo mais comum de amidas e são geralmente muito intensas.

(11) 1651 cm^{-1} : banda de amida I observada quando ocorre ligação de hidrogênio é geralmente mais intensa que a banda de amida II. No estado sólido geralmente as duas bandas se sobrepõe. Ela é devida principalmente à deformação angular da ligação N-H, associada ao estiramento da ligação C-N. É nessa região que ocorre a variação do conteúdo protéico.

(12) 2854 cm^{-1} : pico devido ao estiramento simétrico de ligações CH_2 .

(13) 2874 cm^{-1} : referente ao estiramento simétrico de ligações de CH_3 .

(14) 2931 cm^{-1} : pico dos alcanos no modo de vibração de estiramento assimétrico do CH_2 .

(15) 2962 cm^{-1} : Esta região é a variação natural que vibração de estiramento assimétrico do CH_3 aparece nos alcanos. Esta configuração das bandas no espectro infravermelho mostra a forte indicação de que ambos CH_2 e CH_3 são grupos presentes na amostra.

(16) 3093 cm^{-1} : absorções de OH, com estiramento de CH, referentes aos alquenos.

(17) 3294 cm^{-1} : absorções de OH, com estiramento de CH dos alquenos.

Nos espectros de absorções dos abdomens de formigas, nota-se que houve uma estreita semelhança entre os mesmos, indicando assim, a necessidade de interpretação estatística para diferenciar as colônias de *Ectatomma brunneum*

4.5.1. Resultados da Análise de função Discriminante.

A análise discriminante foi realizada pela intensidade dos 17 picos descritos na Tabela 2 utilizando todos os espectros dos abdomens de formigas pertencentes a espécie *E. brunneum*. Esta análise foi utilizada para determinar se os grupos da colônia pré-definidos poderão ser estatisticamente discriminados. Foi observada uma significativa diferenciação das populações analisadas de *E. brunneum* pela composição dos hidrocarbonetos cuticulares pelas estatística analisadas (Wilk's lambda = 0,007; F = 14,015, P <0,001). Nossos resultados mostraram que as duas primeiras raízes canônicas explicaram 74,3% da variação nos dados de hidrocarboneto cuticular.

Apenas onze picos foram considerados significantes, e conseqüentemente, interpretados. O pico mais importante para a diferenciação das populações na primeira raiz canônica foi o de 1651 cm⁻¹, que apresentou valores mais elevados nas populações do Pantanal. O pico de 3093 cm⁻¹, no entanto, mostrou uma relação inversa ao pico 1651 cm⁻¹, com valores mais elevados nas populações de Rio Claro e Bragança. Na segunda canônica raiz, o pico 1115 cm⁻¹ foi o principal fator de diferenciação populacional, com os maiores valores nas populações de Bragança e Pantanal. Por outro lado, o pico de 1033 cm⁻¹ apresentou valores mais elevados nas populações de Dourados e Pirassununga. A Figura 4.40 mostra a separação dos grupos das formigas da mesma espécie que estão em localidades diferentes.

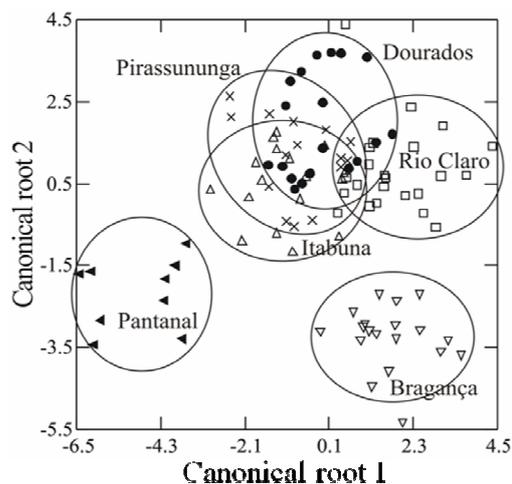


Figura 4.40 – Resultados da análise de função discriminante para as formigas *Ectatomma brunneum*.

Pela análise estatística da Figura 4.40, a separação dos grupos mostra que há distinção das colônias em relação aos hidrocarbonetos cuticulares. Nota-se que os grupos que estão em regiões que apresentam condições ambientais parecidas, se comportam de forma semelhante em relação uns aos outros, ou seja, a região do Pantanal é uma região típica com suas condições ambientais que diferem totalmente das outras regiões, como por exemplo da Mata Atlântica, que por sua vez, difere das regiões de cerrado, como a região de Dourados e Rio Claro. A Figura 4.41 ilustra esta distinção de biomas e relaciona os dados da análise discriminante da Figura 4.40 simplificando a explicação dada anteriormente.



Figura 4.41 – Principais dos biomas brasileiros. Fonte: ^[60]

Outros trabalhos também analisaram hidrocarbonetos cuticulares de vespas ^[53,61] e os resultados comprovam que a variação no perfil de hidrocarbonetos auxilia para discriminar o papel dos indivíduos dentro da colônia.

5. Considerações Finais

No decorrer deste trabalho, foram realizados vários experimentos que utilizaram a técnica de espectroscopia fotoacústica no infravermelho médio por transformada de Fourier (PAS-FTIR). Os resultados apresentados demonstraram a versatilidade e eficiência da técnica para a análise, distinção e comparação de materiais biológicos. A técnica de PAS-FTIR foi aplicada em folhas de soja para análise da ferrugem asiática, causada pelo fungo *P. pachyrhizi* nas variedades de soja convencional BRS 133 e transgênica BRS 245 RR. A análise foi realizada em diferentes plantios da soja sempre fazendo a comparação entre indivíduos (vasos) contaminados com a ferrugem e com amostra controle, sem manifestação da infecção. Em todos os plantios e para as duas variedades estudadas, foi verificada a alternância na concentração de amido com a concentração de ésteres da soja infectada em relação à soja sadia. Sendo que a variação no conteúdo de amido pode ser verificada logo nos primeiros dias após a infestação ter se estabelecida na planta. Este aumento da produção de amido deve estar relacionado ao estresse químico provocado pelo fungo, que faz com que a planta, percebendo seu déficit energético, aumenta a produção de amido, que está relacionado a sua reserva energética, para compensar os açúcares consumidos pelo fungo. A estabilização do conteúdo de amido e o aumento na produção de ésteres, observado entre o segundo e terceiro trifólios, pode ser explicado por meio do segundo mecanismo de proteção que a planta desenvolve para conter a infestação do fungo. Quando a infecção fúngica atinge um alto grau de proliferação, a planta desencadeia um mecanismo de aumento na espessura da cera cuticular para conter, por meio da formação de uma barreira química, o desenvolvimento do fungo. Após o sexto trifólio, o conteúdo de amido volta a aumentar em virtude da densa rede de hifas, oriunda dos esporos, formada na superfície da folha que drenam os açúcares da folha, e assim são destacados na forma de amido nos espectros de FTIR. Os dados experimentais também revelaram que a variedade transgênica BRS245RR apresentou uma resistência maior às alterações químicas na folha provocadas pelo fungo.

As imagens de MEV e microscopia óptica confirmaram a presença do fungo *P. pachyrhizi* cuja morfologia e as lesões formadas na folha são conhecidas na literatura. A vantagem da técnica de PAS-FTIR em relação à técnica visual ou de microscopia está em sua capacidade de identificar o estresse químico, causado pelo fungo, antes que o método

visual ou de microscopia possa identificar o parasita. Entretanto, a espectroscopia por PAS-FTIR não é capaz de distinguir, por meio da visualização direta dos espectros, a ferrugem da soja de outras doenças ou de outros fungos, sendo que para sua precisa identificação as técnicas de imagens de MEV ou microscopia são mais indicadas.

A aplicação da técnica de análise multivariada, aplicada aos espectros de PAS-FTIR de folhas contaminadas com fungos de espécie distintas, poderá ser uma alternativa que possibilitará distinguir a infecção, assim como, a resposta química desencadeada na planta. Este tema deverá ser um dos projetos de pesquisa interessante para serem abordados no futuro.

Em relação à distinção de colônias de formigas por meio da aplicação da técnica de espectroscopia PAS-FTIR observamos que os espectros obtidos analisados por meio da análise multivariada (MANOVA) revelaram a potencialidade da técnica para identificação e distinção de colônia de formigas, oriundas de diferentes localizações geográficas no Brasil. Os resultados indicaram que colônias de formigas, de mesma espécie, possuem a composição química do hidrocarboneto cuticular dependente do bioma onde habitam. Tal distinção é impossível de ser feita por meio de técnicas visuais ou por meio de microscopia, e coloca a PAS-FTIR como uma alternativa mais economicamente viável que a técnica de DNA, provando assim ser de grande utilidade para o estudo da taxonomia de insetos.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a técnica de PAS-FTIR é sensível ao conteúdo químico de compostos biológicos, entretanto, devido as discretas diferenças apresentadas na comparação entre espectros além da diversidade grupos químicos contidos na composição da amostra biológica analisada, a interpretação desses espectros pode ser complicada necessitando em muitos casos da análise estatística para compreensão dos resultados. Assim a espectroscopia FTIR juntamente com a análise multivariada é uma ferramenta importante para o estudo de compostos biológicos.

Contudo, todas estas análises comprovam a equivalência da técnica de PAS-FTIR, se mostrando uma ferramenta útil e poderosa na caracterização e separação de grupos de compostos moleculares de superfícies de materiais biológicos.

Referências Bibliográficas

- [1] GORDON, S. H.; SHUDY, R. B.; WHEELER, D. T. Wiclow; GREENE, R. **Identification of Fourier transform infrared photoacoustic spectral features for detection of *Aspergillus flavus* infection in corn.** International of Food Microbiology. 35 (1997) 179-186.
- [2] GREENE, Richard V.; GORDON, Sherald H.; JACKSON, Mark A.; BENNETT, Glenn A. **Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS.** J. Agric. Food Chem. 40 (1992). 1144-1149.
- [3] IRUDAYARAJ, Joseph; YANG, Hong; SAKHAMURY, Sivakesava. **Differentiation and detection of microorganisms using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy.** Journal of Molecular Structure. 606 (2002). 181-188.
- [4] ANTONIALLI JUNIOR, W. F.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; SUAREZ, I. R. **Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy.** Gen. and Mol. Res. 6(3): 492-499, 2007.
- [5] CAIRES, R. L. Anderson; M. R. O. Teixeira; SÚAREZ R. Yzel; ANDRADE, Luis Humberto da Cunha; LIMA, Sandro Marcio. **Discrimination of Transgenic and Conventional Soybean Seeds by Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy.** Applied Spectroscopy, v. 62, p. 1044-1047, 2008
- [6] ANDRADE, L. H. C.; FREITAS, P. G.; MANTOVANI, B. G.; FIGUEIREDO, M. S.; LIMA, R. A.; LIMA, S. M.; RANGEL, M. A. S.; MUSSURY, R. M. **Detection of soybean rust contamination in soy leaves by FTIR photoacoustic spectroscopy.** Eur. Phys. J. Especial topics. 153 (2008) 539-541.
- [7] SMITH, Brian C. **Infrared spectral interpretation: a systematic approach.** Boca Raton, Florida: CRC Press, 1999.

- [8] SKOOG, Douglas A.; HOLLER, James F.; NIEMAN, Timothy A. **Princípios de análise instrumental**. Tradução de Igeez Caracelli, Paulo Celso Isolani et. al. 5ª edição. Reimpressão 2006. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- [9] BARBOSA, Luiz Claudio de Almeida. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: UFV, 2007.
- [10] SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis, X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução de Paula Fernandes de Aguiar, Ricardo Bicca de Alencastro. 6ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2000.
- [12] CIENFUEGOS, Freddy; VAITSMAN, Delmo. **Análise nstrumental**. Rio de Janeiro, RJ: Interciência Ltda, 2000.
- [13] HECHT, Eugene. **Óptica**. Tradução de José Manoel N. V. Rebordão. 2ª edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.
- [14] KAUPPINEN, Jyrki; PARTANEN, Jari. **Fourier transform in spectroscopy**. 1st edition. Berlin: Wiley VCH, 2001.
- [15] ROSENCWAIG, Allan; GERSHO, Allen. **Theory of the photoacoustic effect with solids**. Journal of Applied Physics, v. 47, n. 1, January, 1976.
- [16] ROSENCWAIG, Allan. **Photoacoustic and photoacoustic spectroscopy**. Chemical Analysis. v. 57. New York: John Wiley & Sons, 1980.
- [17] MICHAELIAN, Kirk H. **Photoacoustic infrared spectroscopy**. V. 159. New Jersey: John Wiley & Sons, Hoboken, 2003.
- [18] MANLY, Bryan J. F. **Métodos estatísticos multivariados: uma introdução**. Tradução de Sara Correa Caramona. 3ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2008.

[19] McGARIGAL, K.; CUSHMAN, S.; STAFFORD, S. *Multivariate Statistics for Wildlife and Ecology Research*. Springer-Verlag. New York, 283p. 2000.

[20] CALLISTER, W. D. Jr. **Ciências e Engenharia de Materiais: uma Introdução**. São Paulo: LTC, 2007.

[21] COSTA, J. A. **Cultura da soja**. Porto alegre: Ivo Manica e José Antônio Costa, 1996.

[22] MENDES, Marta A. S.; FREITAS, Vân M. de. **Sigatoka-negra e ferrugem asiática: duas doenças de grande impacto econômico**. Brasília: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia, 2006. 16p. Documentos: (0102-0110. 167).

[23] Datacooper: casos de ferrugem da soja cresceram 300% no MS. Disponível em: <http://www.datacooper.com.br/news.php.?news=645>. Acessado dia 10/07/08 às 10h57min.

[24] CUNHA, Patrícia F.; ALVES, Eduardo; CASTRO, Hilário A. de; SOUZA, Paulo E. de; ALMEIDA, Álvaro M. R. de; HOCHENBACK, Silvana R. **Distribuição e identificação de *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem da soja no estado de Minas Gerais**. Ciên. Agrotec. Lavras, v.31, n.3, p. 672-677, maio-junho 2007.

[25] CARVALHO JUNIOR, A. A.; FIGUEREDO, M. B. **“A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil”**. Summa Phitopatologica. Jaboticabal, v.26, n.2, p. 197-200, abril-junho 2000.

[26] Ambiente Brasil. Disponível em: <http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php?base=./agropecuario/index.html&conteudo=./agropecuario/doencas/ferrugem.html>. Acessado dia 10/07/08 às 10h49min.

[27] BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. **Resistance to soybean rust and mode of inheritance**. Crop Science. Mandisson, v.20, n.2, p. 254-255, Mar/Apr 1980.

[28] SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of soybean diseases**. 3rd edition. St Paul, Minnesota, USA: APS Press, 1989.

- [29] YORINORI, J. T. **Soja: controle de doenças**. In Vale, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. Controle de doenças de plantas: grandes culturas. V. 2. Viçosa: [s/n], 1997. p. 953-1024.
- [30] KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BENJAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4ª edição, v.2. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.
- [31] Coodetec. **Tecnologia da nossa terra**. Disponível em: <http://www.coodetec.com.br/artigos.asp?id=23>. Acessado dia 10/07/08 às 11h00min.
- [32] Royal Embrapa. Disponível em: <http://www.mejorcontrol.com.ar/docs/octubre2004/royalembrapa.pdf>. Acessado dia 10/07/08 às 10h40min.
- [33] YORINORI, J. T; PAIVA, W. M. **Ferrugem da soja: Phakopsora pachyrhizi Sydow**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. Folder.
- [34] SILVA, João F. V.; et. al. **Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil - 2006**. . Londrina: Embrapa Soja, 2005.
- [35] BORGES, Daniella I. **Óleos e extratos vegetais no controle da ferrugem asiática da soja (Glycine Max (L.) Merrill)**. Lavras: UFLA, 2007. Dissertação de mestrado.
- [36] BONDE, M. R.; PETERSON, G. L. **Containment Facility on soybean rust and its causal agent**. XI Appendix I: invited papers. USDA, ARS, Foreign Disease – Weed Science research, Maryland.
- [37] SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. **Compendium of soybean diseases**. 4th edition. St Paul, American Phitopatological Society, 1989. p. 3-4.

- [38] SILVA JUNIOR, Jorge da. **Efeitos de fungicida aplicados em diferentes estádios de controle da ferrugem asiática e na produtividade da soja (*Glycine Max (L.) Merrill*)**. Lavras: UFLA, 2006. 59 p. Dissertação de mestrado.
- [39] MAGNANI, Elisandra B. Z; ALVES, Eduardo; ARAÚJO, Dejânia V. **eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja**. Fitopatologia Brasileira. 32 (2), mar./abr. 2007.
- [40] MEDICE, Regiane. **Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja**. Lavras: UFLA, 2007. Dissertação de mestrado.
- [41] SOUZA, Patrícia F. C.; ALVES, Eduardo; CASTRO, Hilário A. de. **Influencia da temperatura no desenvolvimento de teliosporos de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja**. Summa Phitopatologica. Botucatu, v.32, n.3, p. 227-231, 2006.
- [42] Como a planta de soja se desenvolve. Disponível em: [http://www.inpi.org.br/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/dsfbcb829a2f54298832569f8004695c5//\\\$filesojanovo3-5.pdf](http://www.inpi.org.br/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/dsfbcb829a2f54298832569f8004695c5//\$filesojanovo3-5.pdf). Acessado dia 10/01/09 às 14h40min.
- [43] FERRI, Mário G. **Botânica: morfologia interna das plantas (anatomia)**. 9ª Ed. São Paulo: Nobel, 1999.
- [44] MARQUEZINI, Maria V. **Aplicação da espectroscopia fotoacústica ao estudo “in vivo” da toxicidade metálica em plantas**. Campinas: UNICAMP, 1990. Dissertação de mestrado.
- [45] CUTTER, Elizabeth G. **Anatomia vegetal. Primeira parte: células e tecidos**. 2ª Ed. Tradução de Vera Maria Caruso Catena. São Paulo: Roca, 1986.
- [46] Figura. Disponível em: <http://biologia.ifsc.usp.br/bio2/aulas/teoria-22.pdf>. Acessado dia 12/02/09 às 20h30min.

- [47] LAPOLA, D. M.; ANTONIALLI JUNIOR, W. F.; GIAMOTTI, E. **Arquitetura de ninhos da formiga neotropical *Ectatomma Brunneum*, F Smith, 1858 (Formicidae, Ponerinae) em ambientes alterados.** Rev. Bras. Zoociências, v.5, n.2, p. 177-188 dez/2003.
- [48] ESPELIE, F. R.; HERMANN, H. R. **Surface lipid of the social wasp *Polistes annularis* (L.) and its nest and nest pedicel.** J. Chem. Ecol. V. 16, n.6, 16: 1841-1852, 1990.
- [49] BLOMQUIST, G. J.; TILLMAN, J. A.; MPURU, S.; SEYBOLD, S. J. **The cuticle and cuticular hydrocarbons of insects: structure, function and biochemistry. In: pheromone communication in social insect.** Bolder, Westview Press, p. 35-54, 1998.
- [50] LENOIR, A.; FRESNEAU, D.; ERRARD, C.; HEFETZ, A. **individuality and social representation concept.** Birkhauser Verlag, Basel, 219-237, 1999.
- [51] ABDALLA, Fábio C.; JONES, Graeme R.; MORGAN, Erik D.; LANDIM, Carminda C. **Comparative study of the cuticular hidrocarbon composition of *Melipona bicolor lepeletier*, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) works and queens.** Genet. Mol. Res. 6(2): 390-395, 2007.
- [52] SUMANA, A.; LIEBERT, Aviva. E.; BERRY, Anne S.; SWITZ, Ghislaine T.; ORIAN, Colin M.; STARKS, Philip T. **Nest hydrocarbons as Cues for Philopatry in a paper wasp.** International Journal of behavioural biology-ethology. V. 111, issue 5, p. 469-477, 2005.
- [53] GAMBOA, G. J. **Kin recognition in social wasps. In: natural history and evolution of paper wasps (Turillazi S and West-Eberhard MJ, eds).** Oxford: Oxford University Press, 1996. p.161-177.
- [54] FERREIRA-CALIMAN, M. J.; CABRAL, G. C. P.; MATEUS, S.; TURATTI, I. C. C.; NASCIMENTO, F. S.; ZUCCHI, R. **Composição química da epicutícula de**

operárias de melipona marginata (Hymenoptera, apinae, meliponini). Sociedade Brasileira de Ecologia do Brasil – SEB. VIII CEB.

[55] LOCKEY, K. H. **Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function.** Comp: Biochem. Physiol. 89B: p.595-645, 1988.

[56] PENNANEC'H, M.; PHO, D. B.; PECHINE, J. M.; JALLON, J. M. **Insect hydrocarbons: analisys, structures and fuctions.** EPPO Bull. 25: 343-348, 1995.

[57] SINGER, T. L.; SPELIE, K. E.; GAMBOA, G. J. **Nest and nestmate discrimination in independent-founding wasps.** Westview, Boulder, p. 105-125, 1998.

[58] HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. **Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons.** Annual Review on Entomology. V.50, 371-393, 2005.

[59] TANNURE-NASCIMENTO, Evelize C. **Sócio-etologia dos agregados coloniais de Polistes satan Bequaert, 1940: fenologia, mediadores comportamentais e sinalização química (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae).** Ribeirão Preto: USP-FFCLRP, 2006. Tese de doutorado.

[60] Principais Biomas brasileiros – Figura. Disponível em: <http://www.wwf.org.br/>. Acessado dia 14/03/09 às 15h20min.

[61] TANNURE-NASCIMENTO, I. C.; NASCIMENTO, F. S.; TURATTI, I. C.; LOPES, N. P.; TRIGO, J. R.; ZUCCHI, R. **Colony membership is reflected by variations in cuticular hydrocarbons profile in a neotropical paper wasp, Polistes satan (Hymenoptera, Vespidae).** Gen. and Mol. Res. 6(2): 390-395, 2007.

[62] Ectatomma Brunneum – Figura. Disponível em: <http://www.eol.org/pages/483986>. Acessado dia 20/01/09 às 17h30min.

[63] CUVILLIER-HOT, V.; COOB, M.; MALOSSE, C.; PEETERS, C. **Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, queenless ant.** J. Insect Phys. 47 (4-5): 485-493, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)