



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Unidade Universitária de Dourados  
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

---

**COMPARAÇÕES INTRA E INTERPOPULACIONAL DE  
COMPONENTES VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS DE  
*Erythroxylum anguifugum* Mart. (ERYTHROXYLACEAE)  
POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.**

**Acadêmico: Cristiano Figueiredo dos Santos**

Dourados – MS  
Março / 2014





Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Unidade Universitária de Dourados  
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

---

**COMPARAÇÕES INTRA E INTERPOPULACIONAL DE  
COMPONENTES VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS DE  
*Erythroxylum anguifugum* Mart. (ERYTHROXYLACEAE)  
POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.**

**Acadêmico: Cristiano Figueiredo dos Santos**  
**Orientador: Dr. Etenaldo Felipe Santiago**  
**Co-orientador: Dr. Sandro Marcio Lima**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais”.

Dourados – MS  
Março / 2014





Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Unidade Universitária de Dourados  
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

Acadêmico: Cristiano Figueiredo dos Santos

Orientador: Dr. Etenaldo Felipe Santiago

APROVADO, 28 de março de 2014.

---

**Dr. Etenaldo Felipe Santiago**  
(orientador)

---

**Dr. Eriton Rodrigo Botero – UFGD**

---

**Dra. Sáuria Lúcia Rocha de Castro – UEMS**



## AGRADECIMENTOS

Ao professor Felipe, pela orientação e apoio.

Às queridas amigas Elaine Novak e Ana Carolina Correia de Oliveira e ao amigo Ivan Ramão Miranda Freitas, pela amizade que vale para além dos títulos. Se o programa contribuiu com meu crescimento acadêmico/profissional, vocês foram fundamentais para que este crescimento tenha sido também pessoal.

À Fernanda Oliveira Batagliotti, Tiziana Azario de Medeiros e Hânia Cardamoni Godoy por terem trazido à nossa jornada mais risadas, alegria, cumplicidade e álcool.

Às amigas parceiras de trabalho e experiências, Jalina Carvalho Casarin e Michele Aparecida dos Santos Nóbrega por terem tornado as coisas menos difíceis e mais prazerosas.

À parte da minha família e aos amigos e amigas de Dourados e de Campo Grande que sempre me ajudaram durante essa jornada. Vocês me esperaram e me despediram nas tantas idas e vindas que preencheram esse tempo. Também me perdoaram e compreenderam a ausência em alguns momentos.

À Priscilla Soares Teruya, minha querida e paciente amiga que presenciou e suportou toda variação de humor durante o período de estudo e que também fez com que eu me sentisse amparado pela sua companhia. Sem sua amizade e carinho, tudo seria mais difícil. Obrigado gatinha.

Ao meu namorado Kleber Padonavi de Souza por todo apoio e incentivo, especialmente na fase final do trabalho.

Ao pessoal do Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica da UEMS que sempre foram tão solícitos comigo. Agradecimentos mais que especiais ao professor Sandro Márcio Lima, por toda atenção que sempre me proporcionou, e à Cristiane Ávila Santana, por ter sido tão disponível e parceira.

Ao Vitor Alves da Silva (Vitinho), ao João do campus de Aquidauana e à Michele Reiko Miagusko de Oliveira Beloto, por terem me socorrido quando precisei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa.



## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	9
1.1. Biodiversidade brasileira .....	<a href="#">9</a>
1.2. Importância da diversidade em projetos de restauração de áreas degradadas .....	10
1.3. Diversidade, distinção populacional e taxonomia vegetal.....	12
1.4. Espectroscopia fotoacústica como ferramenta em estudos biológicos.....	14
1.5. <i>Erythroxylum anguifugum</i> Mart.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	<a href="#">19</a>

### CAPÍTULO 2: ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA COMO FERRAMENTA PARA DISCRIMINAÇÃO DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Erythroxylum anguifugum*.

RESUMO .....	26
ABSTRACT.....	27
1. INTRODUÇÃO.....	28
2 . MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
2.1 Coleta do material botânico e preparação de amostras.....	29
2.2 Análises espectroscópicas.....	30
2.3 Delineamento amostral e análises estatísticas.....	30
3. RESULTADOS .....	31
4. DISCUSSÃO.....	37
5. CONCLUSÃO.....	39
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40



## RESUMO

Os processos de degradação e superexploração dos recursos naturais resultam, muitas vezes, em perdas da biodiversidade. Neste contexto, ferramentas que possam auxiliar a avaliação da diversidade biológica se fazem importantes e necessárias. O objetivo deste trabalho foi o de discriminar populações naturais de *Erythroxylum anguifugum* Mart. (Erythroxylaceae) por meio de espectroscopia fotoacústica, analisando amostras reprodutivas e vegetativas desta planta. O capítulo 1 deste trabalho faz uma pequena revisão sobre considerações pertinentes ao tema, incluindo aspectos sobre a diversidade biológica, a importância do estudo da biodiversidade, a técnica utilizada - FTIR-PAS, e a espécie estudada. O capítulo 2 apresenta o artigo intitulado “Espectroscopia fotoacústica como ferramenta para discriminação de populações naturais de *Erythroxylum anguifugum* Mart.” e aponta a espectroscopia como eficaz na distinção populacional, embora a extrapolação de dados deva, neste caso, ser evitada.

**PALAVRAS-CHAVE:** Carácter, diversidade, flor, populações.



### ABSTRACT

The processes of degradation and overexploitation of natural resource results, oftentimes, in loss of biodiversity. In this context, tools that help evaluate the biological diversity are important and required. The aim of this study was to discriminate natural populations of *Erythroxylum anguifugum* Mart. (Erythroxylaceae) using photoacoustic spectroscopy over vegetative and reproductive samples of this plant. Chapter 1 of this work is a small revision about relevant considerations over the topic, including a view over biological diversity, significance of biodiversity studies, the technique used – FTIR-PAS and the focused specie. Chapter 2 presents the article entitled “Photoacoustic spectroscopy as a tool to discriminate natural populations of *Erythroxylum anguifugum* Mart.” and point spectroscopy as effective in population discrimination, although data extrapolation should be avoided in this case.

**KEYWORDS:** Character, diversity, flower, population.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1. Biodiversidade brasileira.

O Brasil tem a mais vasta biota continental da Terra, com o maior sistema fluvial do mundo, cinco importantes biomas – dois deles *hotspots* mundiais, ou seja, regiões com altas taxas de endemismo ameaçadas por elevado grau de perda da hábitat (Cerrado e Mata Atlântica), mais de 13% das espécies de seres vivos, sendo um dos países inspiradores do conceito de megadiversidade (MYERS et al., 2000; BRANDON et al., 2005). Cerca de 19% da biodiversidade vegetal mundial é encontrada no Brasil (GIULIETTI et al., 2005).

Ainda assim a perda da biodiversidade é uma questão que mobiliza diversos países, inclusive tropicais como o Brasil. Para se ter uma ideia, na mais recente lista da flora brasileira ameaçada de extinção, o número de espécies quadruplicou, quando comparada com a lista anterior (MORAES, 2010).

A redução de áreas ocupadas por vegetação nativa tem levado a taxas alarmantes de perda de biodiversidade e ao empobrecimento dos recursos genéticos (MYERS et al., 2000). Áreas naturais por toda a parte têm sido convertidas e ‘sacrificadas’ para um ganho econômico de curto prazo, a uma taxa cada vez maior e por uma população humana cada vez mais crescente (MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT apud ARONSON et al., 2006).

Países em desenvolvimento concentram a maior parte da pobreza, desnutrição, guerras e doenças e, além disso, também concentram a maior ocorrência de *hotspots* da biodiversidade. Nestes países, tanto a restauração de ecossistemas e de paisagens degradadas como a conservação da natureza só serão profícuas se estiverem ligadas a pesquisas de caráter socioeconômico e de desenvolvimento, assim como a geração de empregos e treinamento de pessoal (ARONSON et al., 2006).

A diversidade ecológica é um indicador em potencial de ecossistemas, e seu monitoramento pode contribuir para o estabelecimento de uma relação mais confiável entre diversidade e sustentabilidade, na medida em que seja possível definir qual o

mínimo de diversidade capaz de ainda permitir o funcionamento dos ciclos dentro do ecossistema (TÓLOTA & CHAER apud MORAES et al., 2010).

O conhecimento da diversidade genética intra e/ou interpopulacional é de fundamental importância, pois tem proporcionado importantes contribuições no gerenciamento de bancos de germoplasma e na conservação de recursos genéticos, nas quais a riqueza alélica e genotípica das espécies encontra-se em seu estado natural ou resguardada pelos acessos (genótipos) (FERREIRA, 2007).

Estudar diversidade inter e intra-populacional é importante porque uma vez que duas populações são expostas a diferentes variações de condições ambientais, ao longo do tempo, as interações genótipo-ambiente fazem com que diferentes genótipos predominem em cada população. As populações se diferenciam e, assim, em cada uma delas os organismos individuais podem se sair melhor em seu próprio ambiente (RICKLEFS, 2003).

Uma vez que a habilidade de uma espécie em responder às variações do meio é limitada pela sua diversidade intraespecífica, estudos que considerem a variação das espécies e suas propriedades adaptativas relacionando-as aos condicionantes ambientais são necessários (BITTENCOURT, 2007).

Embora todos os atributos fenotípicos de um indivíduo tenham uma base genética, eles são também influenciados por mudanças no ambiente, seja através dos efeitos das condições ambientais sobre os indivíduos, seja através da própria resposta dos indivíduos às mudanças em seus ambientes. Estas variações ambientalmente induzidas no fenótipo são denominadas de plasticidade fenotípica (RICKLEFS, 2003). A plasticidade fenotípica pode ainda estar relacionada a processos de especialização e formação de ecótipos por seleção disruptiva sendo, portanto, um importante mecanismo gerador de variabilidade (SAIKI et al., 2008).

## **1. 2. Importância da diversidade em projetos de restauração de áreas degradadas.**

Quando se fala em áreas degradadas, é importante estabelecer a diferença entre os conceitos de restauração e recuperação (ESPÍNDOLA et al., 2005) embora Moraes et al. (2010) afirmem que as ações destinadas à recuperação de áreas degradadas se

distinguem menos pela técnica do que pelos termos adotados para denominá-las, que incluem recuperação, reabilitação, revegetação, recomposição e restauração.

Os objetivos e definições destes termos, segundo Moraes et al. (2010) são apresentados abaixo:

- ✓ Recuperação: Restabelecimento da estrutura e da produtividade em uma área degradada usando espécies arbóreas nativas e exóticas. Neste caso, os benefícios seriam mais de caráter socioeconômico ou teriam um aspecto mais funcional (função protetora do ecossistema), como o controle de processos erosivos em uma bacia hidrográfica.
- ✓ Reabilitação: Restabelecimento da estrutura, da produtividade e de alguma, mas não necessariamente toda, diversidade vegetal e animal originalmente existente. Ressalte-se que por razões econômicas ou mesmo ecológicas podem ser usadas espécies exóticas. Ao longo do tempo, a função protetora e os serviços ecológicos da floresta original podem ser restabelecidos.
- ✓ Restauração: Restabelecimento da estrutura, produtividade e diversidade de espécies da flora original. No médio e longo prazo, processos e funções ecológicas devem se assemelhar aos da floresta original. Para tal, é necessária a existência de remanescentes que abriguem um número significativo de espécies animais e vegetais nativas e que funcionem como um sistema de referência para a área a ser restaurada.

Nesse sentido a restauração de áreas degradadas representa uma atividade básica para a conservação *in situ*, refazendo comunidades e estabelecendo corredores entre fragmentos vegetacionais (REIS et al., 2003). A restauração de corredores entre áreas protegidas desconectadas pode manter populações que poderiam morrer por conta da fragmentação do habitat. Adicionalmente, a restauração pode proporcionar novos empregos ao mesmo tempo em que aumenta o estoque de bens e serviços ambientais, dos quais todas as economias dependem (ARONSON et al., 2006).

Qualquer ação para restaurar um ecossistema florestal deve ser tomada no sentido de acelerar a sucessão, propiciando o aumento da biodiversidade o mais rápido

possível, já que a biodiversidade é um dos aspectos fundamentais para a restauração ecológica (MORAES et al., 2010).

Entretanto, nem sempre em projetos de recuperação de áreas degradadas são considerados critérios mínimos de diversidade, ainda que esta possa aumentar a estabilidade do ecossistema e conferir capacidade de reação à distúrbios (MORAES et al., 2010). A manutenção da diversidade genética das espécies utilizadas em reflorestamentos pode garantir melhor recuperação do ecossistema, aumentando a resistência e resiliência (GIORDANI, 2012).

As comunidades vegetais diversificadas são potencialmente mais estáveis pela provável existência de mais e diversas respostas a processos básicos variáveis. A diversidade representa tanto a chance da presença de certas espécies (aspecto demográfico) quanto a variação das características das espécies (aspecto fenotípico) em um ecossistema (MORAES et al., 2010).

### **1.3. Diversidade, distinção populacional e taxonomia vegetal.**

Uma população é constituída de indivíduos de uma espécie numa dada área. Cada população vive principalmente em manchas de habitat adequado. O número de indivíduos numa população pode variar com o suprimento de alimento, a taxa de predação e outros fatores ecológicos naquele habitat (RICKLEFES, 2003).

Entretanto, apesar deste conceito permitir uma ideia de coesão, segundo Futuyama (2002), a maioria das características varia pelo menos um pouco. Na verdade uma população é um conjunto imensamente diverso de genótipos onde a norma é a diversidade (FUTUYMA, 2002).

A diversidade em plantas pode ser verificada de diversas maneiras e o mais simples indicador de diversidade é a própria variabilidade morfológica. Mas estas características podem ser influenciadas pelo ambiente, apresentando variação contínua e grande plasticidade (ALMEIDA, 2006).

Em estudos de populações naturais diversos marcadores moleculares (SSR, RAPD, AFLP, ISSR, RFLP) têm sido utilizados, com base em suas expressões gênicas (ZUCCHI, 2002; BATISTINI, 2006; FERREIRA, 2007; FACANALI, 2008; MORENO

et al., 2009; MOURA et al., 2009). Outra estratégia para a mensuração da diversidade genética molecular é a utilização do Índice de Diversidade de Shannon, que pode ser utilizado tanto para comparar diversidade entre espécies como entre populações da mesma espécie (CAVALLARI, 2004).

As formas morfológicas ou fisiologicamente diferentes de plantas, chamadas ecótipos, são frequentemente encontradas num padrão de mosaico, em associação à diferentes microhabitats. Muito frequentemente a adaptação de diferentes populações de uma espécie à condições ambientais similares é fenotipicamente indistinguível (FUTUYMA, 2002).

Estudos com finalidade filogenética e taxonômica de plantas podem incluir aqueles que se dedicam à morfologia de frutos, sementes e ao desenvolvimento de plântulas e de plantas jovens (BATTILANI et al., 2011) além daqueles que tratam da forma, da função e da evolução dos diferentes padrões dos sistemas de nervação das folhas (BATTILANI et al., 2013). Mesmo assim, considerando o grande número de espécies vegetais, a análise tradicional de órgãos vegetativos e reprodutivos (florais) é insuficiente para solucionar problemas taxonômicos e impasses filogenéticos (OLIVEIRA, 2001).

Ainda que existam algumas questões pendentes, em geral, os caracteres reprodutivos apresentam um número superior de estruturas se comparados com os vegetativos e podem ser, geralmente, considerados mais constantes, além de fornecer um volume superior de informações (STACE, 1991).

A utilização de química (quimiotaxonomia ou quimiosistemática) e da bioquímica (sistemática ou taxonomia molecular) tem-se mostrado uma ferramenta complementar e eficiente em sistemática vegetal (FACANALI, 2008). Tanto a espectrometria (ALEXANDRE & BUENO, 2006; ALEXANDRE, 2007), quanto a espectroscopia (SHEN et al., 2008; DURGANTE et al., 2013) foram utilizadas no intuito de contribuir para a elucidação de questões dessa área. Técnicas moleculares tem permitido contestar velhas perguntas com novos métodos (JORDANO, 2009).

Os componentes reprodutivos das plantas, quando comparados com componentes vegetativos, são mais estáveis e conservativos ao longo do tempo, de forma que são menos influenciáveis por alterações ambientais. Slauson (1995) relata

que em espécies do gênero *Agave* foram utilizados caracteres vegetativos para a diagnose das espécies e, com o tempo, aspectos morfológicos das folhas foram grosseiramente modificados em razão das condições ambientais e que, como resultado, a maioria das descrições taxonômicas feitas durante aquela época é irreconhecível. Além disso, em *Agave mckelveyana* mesmo com a deiscência da antera ocorrendo noturnamente, a polinização se dá, primariamente, por insetos. Neste gênero as características florais são conservativas e retém traços de polinização por morcegos mesmo com que atualmente a polinização se dê majoritariamente por insetos.

Por outro lado, com a contribuição dos estudos genéticos, os caracteres vegetativos tem ganhado especial atenção, sobretudo em grupos com extrema especialização floral. Salazar & Dressler (2011) demonstraram que, pelo menos em alguns grupos particulares de orquídeas, as estruturas vegetativas podem ser melhores preditoras de relações filogenéticas do que atributos florais, já que a morfologia floral de orquídeas é evolutivamente instável. Embora os caracteres vegetativos tenham sido tradicionalmente considerados como taxonomicamente informativos, estudos moleculares tem demonstrado sua relevância a ponto de serem utilizados no Australian Orchid Genera (JONES et al., 2008).

Daí decorre a importância da devida atenção à análise tanto de caracteres reprodutivos quanto vegetativos em estudos taxonômicos e/ou que trabalhem com a questão da diversidade.

#### **1.4. Espectroscopia fotoacústica como ferramenta em estudos biológicos.**

A espectroscopia fotoacústica (em inglês, PAS: Photoacoustic Spectroscopy) é uma técnica que teve início com a descoberta do efeito fotoacústico, em 1881, por Alexander Graham Bell. A partir da década de 1970, esta técnica ganhou grande impulso e hoje pode ser considerada como uma das principais técnicas de análise e caracterização de materiais (MELO et al., 2008).

O efeito fotoacústico surge quando um feixe de luz, que é periodicamente modulado, incide sobre uma amostra dentro de uma câmara fechada e cheia de gás. A amostra se aquece pela absorção da luz e isto resulta em um fluxo de calor periódico

dela para o gás em questão, ou em sua expansão térmica ou em outros efeitos, causando variação de pressão dentro da câmara. Esta variação de pressão é detectada por um microfone interno à câmara (célula) fotoacústica. Na técnica fotoacústica, essa variação da pressão é convertida em sinais elétricos. Algumas das vantagens da espectroscopia fotoacústica sobre a técnica convencional é que a primeira permite analisar as amostras sem destruí-las, permite que as amostras sejam opacas e sólidas e também que uma mesma amostra seja acompanhada quando submetida à diversos tratamentos (MELO et al., 2008; DOLE et al., 2011).

Um grande avanço na tecnologia do estudo do infravermelho foi a introdução da transformada de Fourier nos espectrômetros. No final de 1800, Albert Michelson desenvolveu o interferômetro para mensurar a velocidade da luz. Dois anos depois, Lord Rayleigh reconheceu que a saída de um interferômetro poderia ser convertida em um espectro por meio de um desenvolvimento matemático desenvolvido cerca de 70 anos antes pelo matemático francês Jean Fourier. Entretanto, por conta da complexidade dos procedimentos matemáticos, só em 1949 Pedro Fellgett, que era astrônomo, conseguiu obter um espectro a partir de um interferograma (DERRICK et al., 1999).

A espectroscopia de absorção no infravermelho médio por detecção fotoacústica é uma técnica não invasiva com profundidade de penetração que varia de micrômetros até várias monocamadas moleculares. Podem ser utilizadas amostras gasosas, líquidas ou sólidas e a técnica é particularmente útil para amostras altamente absorventes (DOLE et al., 2011). Ela tem se mostrado uma técnica poderosa para o estudo de macromoléculas biológicas e sistemas biológicos complexos como células e tecidos (DUYGU et al., 2009).

A espectroscopia no infravermelho é uma das técnicas espectroscópicas mais comuns utilizada pelos químicos orgânicos e inorgânicos. Consiste na medição da absorção de diferentes frequências do infra-vermelho por uma amostra posicionada no caminho de um feixe de luz. O principal objetivo é determinar grupos funcionais químicos presentes na amostra, já que diferentes grupos funcionais absorvem frequências características de radiação infra-vermelho (HSU, 1997).

Cada molécula possui suas próprias frequências naturais de vibração, absorvendo ondas eletromagnéticas de frequências específicas e gerando um espectro de

absorção característico, justamente quando ocorre a ressonância entre a frequência da radiação infravermelha incidente e as frequências naturais de vibração da amostra (LEITE & PRADO, 2012).

Estudos recentes tem demonstrado a potencialidade da técnica na identificação de espécies (KLARICA et al., 2011; WANG, 2012; XU et al., 2012) e na discriminação de espécies (JIA et al., 2007; SANTOS et al., 2010; ALMEIDA et al., 2012; DORETO, 2012; FISCHNALLER et al., 2012). Além disto, existem estudos que se dedicaram à análise fitoquímica de plantas (SATHISH et al., 2012), ao monitoramento de alterações na arquitetura da parede celular (ALONSO-SIMÓN et al., 2011), aos componentes celulares de plantas medicinais (KACURÁKOVÁ et al., 2000; BASERI & BAKER, 2011) e à relação entre a taxonomia e os espectros obtidos de algumas plantas (SHEN et al., 2008). Recentemente Khairudin et al. (2013) utilizaram espectroscopia por transformada de Fourier para caracterizar distintas populações de plantas.

Na verdade, espectroscopia também foi utilizada para a identificação de madeiras (BASTOS et al., 2012), determinação de matéria orgânica em solos (SOUZA et al., 2012), caracterização de ataques de fungos em madeiras (COSTA, 2009), identificação de contaminação em agriculturas (ANDRADE et al., 2008) e comparar a composição cuticular de formigas (ANTONIALLI-JUNIOR et al., 2007; ANTONIALLI-JUNIOR et al., 2008), entre outras aplicações.

### **1.5. *Erythroxylum anguifugum* Mart.**

A América do Sul é um dos centros mais importantes de diversidade e endemismo de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae). Este gênero contém, grosso modo, 230 espécies de arbustos e árvores tropicais, dos quais 187 são nativas dos neotrópicos. No Brasil 114 espécies são encontradas, sendo que 73 são endêmicas (PLOWMAN & HENSOLD, 2004; LOIOLA & SALES, 2012; LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2014).

As espécies de *Erythroxylum* no Brasil são encontradas em florestas úmidas, como Amazônia, e em tipos vegetacionais secos, como a Caatinga e Cerrado (LOILA & SALES, 2008; 2012).

Este gênero reúne espécimes de hábitos arbóreos, arbustivos e subarbustivos que possuem representantes com propriedades medicinais, sendo as mais populares as cocas (*E. coca* Lank. e *E. novogranatense* (D. Morris) Hieron) e suas variedades mais conhecidas e estudadas por conta da presença de alcaloides em suas folhas (BIERRAS & SAJO, 2004a; 2004b).

*Erythroxylum anguifugum* (Figura 1) é uma espécie arbórea terrestre popularmente conhecida como ‘pimenteirinha’ ou ‘fruta-do-pombo’ em razão da forma e cor de seus frutos, embora frutos simples drupóides de cor vermelha quando maduros sejam, em geral, comuns ao gênero (SILVA et al., 2008). Tem ampla distribuição geográfica e ocorre nos domínios fitogeográficos Amazônia e Cerrados (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2014), tendo sido considerada por Pott & Pott (2009) uma espécie lenhosa que, no Pantanal, pode agrupar-se com outras espécies justamente de acordo com as mesmas origens fitogeográficas.



**Figura 1** – *Erythroxylum anguifugum*: (a) indivíduo adulto em primeiro plano e (b) detalhes de frutos verdes e maduros. FOTOS: C. F. SANTOS.

Sua área de distribuição, no Brasil, inclui os estados do Acre, Amazonas, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rondônia e Roraima (PLOWMAN & HENSOLD, 2004).

Trata-se de uma espécie que cresce em vegetação ripária ou alagável no Pantanal (POTT & POTT, 2009). Neste bioma a espécie foi amostrada em meio a paratudal (SOARES & OLIVEIRA, 2009), ou ocorrendo tanto em paratudal como em mata ciliar e no ecótono entre estas áreas (MOTA et al., 2011). No Pantanal foi observado que seus

frutos são parte importante da dieta de algumas espécies de animais, compondo parte predominante das fezes (obs. pess.) (Figura 2). Sementes de *E. anguifugum* já foram encontradas em fezes de aves de centro e de borda dos capões do Pantanal Miranda-Abobral (FRANCO, 2010).



**Figura 2** – Sementes de *E. anguifugum* observadas em fezes secas e frescas de animais. FOTOS: E. F. SANTIAGO & Z. R. HOLSBACK.

Como outras espécies da família, *E. anguifugum* é relacionada com propriedades medicinais e é citada como remédio contra doença insidiosa, como contra-veneno de ofídios e como bom “repelente” de cobras (SILVA, 2004), especialmente a casca da raiz (INDRIUNAS & AOYAMA, 2013).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, T. L.; BUENO, M. I. M. S. Classification of some species, genera and families plants by x-ray spectrometry. **X-ray Spectroscopy**, vol. 35, p. 257-260. 2006.

ALEXANDRE, T. L. **Espectrometria de Raios-X Aliada à Quimiometria no Estudo de Vegetais**. 2007. 83p. Dissertação. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP. 2007.

ALMEIDA, C. M. A. **Diversidade genética em populações de *Aechmea fulgens* Brongn. (Bromeliacea) em fragmentos de Mata Atlântica em Pernambuco**. 2006. 57p. Dissertação de mestrado (Agronomia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE. 2006.

ALMEIDA, F. S.; LIMA, S. M. ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. Differentiation of neotropical fish species with statistical analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy Data. **Applied Spectroscopy**, vol. 66, n.7, p. 782-785. 2012.

ALONSO-SIMÓN, A.; GARCÍA-ANGULO, P.; MÉLIDA, H.; ENCINA, A.; ÁLVAREZ, J. M.; ACEBES, J. L. The use of FTIR spectroscopy to monitor modifications in plant cell wall architecture caused by cellulose biosynthesis inhibitors. **Plant Signaling & Behavior**, vol. 6, n. 8, p. 1104-1110. 2011.

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. **The European Physical Journal Special Topics**, vol. 153, p. 539-541. 2008.

ANTONIALLI JUNIOR, W. F.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, vol. 6, n. 3, p. 492-499. 2007.

ANTONIALLI JUNIOR, W. F.; SÚAREZ, Y. R.; IZIDA, T.; ANDRADE, L. H. C.; LIMA, S. M. Intra and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, vol. 7, n. 2, p. 559-566. 2008.

ARONSON, J.; CLEWELL, A. F.; BLIGNAUT, J. N.; MILTON, S. J. Ecological restoration: A new frontier for nature conservation and economics. **Journal for Nature Conservation**, vol. 14, p. 135-139. 2006.

BASERI, M. K.; BAKER, S. Identification of cellular components of medicinal plants using ftir. **Romanian Journal of Biophysics**, Bucharest, v. 21, n. 4, p. 277-284. 2011.

BASTOS, L. F.; ALESSIO, K. O.; MENEZES, C. M.; COSTA, A. B.; MARDER, L. Aplicação da espectroscopia no infravermelho próximo e da análise exploratória de dados para identificação de madeiras na indústria de móveis. **Tecno-lógica**, vol. 16, n. 1, p. 25-29. 2012.

BATTILANI, J. L.; SANTIAGO, E. F.; DIAS, E. S. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de *Guibourtia hymenifolia* (Moric.) J. Leonard (Fabacea). **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v. 35, n. 5, p. 1089-1098. 2011.

BATTILANI, J. L.; SANTIAGO, E. F.; DIAS, E. S. Morfologia dos diásporos, germinação e desenvolvimento das fases juvenis de *Adelia membranifolia* (MÜLL. ARG.) Pax & K. Hoffm. (Euphorbiaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria – RS, v. 23, n. 1, p. 77-87. 2013.

BATISTINI, A. N. **Diversidade morfológica genética e química de populações naturais de *Anemopaegma arvense* (VELL.) STELLF.** 2006. 86p. Tese de doutorado (Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal – SP, 2006.

BIERAS, A. C.; SAJO, M. G. Ontogenia foliar de três espécies de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) ocorrentes no Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, vol. 27, n. 1, p. 71-77. 2004a.

BIERRAS, A. C.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) do Cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta botanica brasílica**, n. 18, vol. 3, p. 601-612. 2004b.

BITTENCOURT, J. V. M. **Proposta para a conservação genética da *Araucaria angustifolia*.** Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2007. 7p.

BRANDON, K.; FONSECA, G.A .B.; RYLANDS, A. B.; SILVA, J. M. C. Conservação brasileira: desafios e oportunidades. **Megadiversidade**, vol.1, n. 1, p. 7-1. 2005.

CAVALLARI, M. M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação.** 2004. 92p. Dissertação de mestrado (Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP. 2004.

COSTA, M. A. **Avaliação de metodologias alternativas para caracterização do ataque de fungos apodrecedores de madeira.** 2009. 83p. Dissertação de mestrado (Ciências Florestais). Universidade de Brasília, Brasília – DF. 2009.



DERRICK, M. R.; STULIK, D.; LANDRY, J. M. **Infrared Spectroscopy in Conservation Science: Scientific Tools for Conservation**. The Getty Conservation Institute. Los Angeles. 1999.

DOLE, M. N.; PATEL, P. A.; SAWANT, S. D.; SHEDPURE, P. S. Advance applications of Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, vol. 7, n. 2, p. 159-166. 2011.

DORETO, P. S. **Diferenciação de espécies de plantas aquáticas através da espectroscopia fotoacústica por transformada de Fourier (FTIR-PAS)**. 2012. 24p. Dissertação de mestrado (Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados – MS, 2012.

DURGANTE, F. M.; HIGUCHI, N.; ALMEIDA, A.; VICENTINI. Species Spectral Signature: Discriminating closely related plant species in the Amazon with Near-Infrared Leaf-Spectroscopy. **Forest Ecology and Management**, vol. 291, p. 240-248. 2013.

DUYGU, D. Y.; BAYKAL, T.; AÇIGÖZ, I.; YILDIZ, K. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies. **G. U. Journal of Science**, vol. 22, n. 3, p. 117-121. 2009.

ESPÍNDOLA, M. B.; BECHARA, F. C.; BAZZO, M. F.; REIS, A. Recuperação ambiental e contaminação biológica: aspectos ecológicos e legais. **Biotemas**, vol. 18, n. 1, p. 27-38. 2005.

FACANALI, R. **Estudo da biologia reprodutiva, diversidade genética e química de populações de *Ocimum selloi* Benth.** 2008. 129p. Tese de doutorado (Agronomia, Horticultura) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu – SP, 2008.

FERREIRA, F. M. **Diversidade em populações simuladas com base em locos multialélicos**. 2007. 177p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2007.

FISCHNALLER, S.; DOWELL, F. E.; LUSSER, A.; SCHILICK-STEINER, B. C.; STEINER, F. M. Non-destructive species identification of *Drosophila obscura* and *D. subobscura* (Diptera) using near-infrared spectroscopy. **Fly**, vol. 6, n. 4, p. 284-289. 2012.

FRANCO, C. V. **Chuva de sementes dispersa por aves e morcegos em capões do Pantanal Miranda-Abobral, Mato Grosso do Sul**. 2010. 53p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2010.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2 ed. Ribeirão Preto – SP: Funpec, 2002. 631p.



GIORDANI, A. N. **Avaliação genético-populacional de duas espécies pioneiras em áreas de restauração ecológica na floresta Atlântica.** 2012. 42p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR. 2012.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, C. V. D. 2005. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, vol. 1, n. 1, p. 52-61. 2005.

HSU, C. P. S. 1997. **Infrared Spectroscopy.** IN: Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Prentice Hall Publisher. 995p. 1997.

INDRIUNAS, A.; AOYAMA, E. M. 2013. Plantas empregadas em acidente ofídicos de *Systema Materiae Medicae Vegetabilis Brasiliensis* de Martius. In: II SIMPÓSIO SOBRE DIVERSIDADE DA MATA ATLÂNTICA. 2013. **Anais...** p. 189-194. 2013.

JIA, F.; MAGHIRANG, E.; DOWEEL, F.; ABEL, C.; RAMASWAMY, S. Differentiating Tobacco Budworm and Corn Earworm Using Near-Infrared Spectroscopy. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 3, p. 759-764. 2007.

JONES, D. L.; HOPLEY, T.; DUFFY, S. M.; RICHARDS, K. J.; CLEMENTS, M. A.; ZHANG, X. **Australian Orchid Genera: an information and identification system.** Centre for Australian National Biodiversity Research and Australian National Herbarium. 2008. Disponível em <<http://www.anbg.gov.au/cpbr/cd-keys/orchidkey/html/intro.html>>. Acesso em 03 mar. 2014.

JORDANO, P. Ecología y genes. **Ecosistemas**, vol. 18, n. 1, p. 1-2. 2009

KACURÁKOVÁ, M.; CAPEK, P.; SASINKOVÁ, V.; WELLNER, N.; EBRINGEROVÁ, A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n.2, p. 195-203. 2000.

KHAIRUDIN, K.; SUKIRAN, N. A.; GOH, H.; BAHARUM, S. N.; NOOR, N. M. Direct discrimination of different plant populations and study on temperature effects by Fourier transform infrared spectroscopy. **Metabolomics**, July, 2013.

KLARICA, J.; BITTNER, L.; PALLUA, J.; PEZZEI, C.; HUCK-PEZZEI, V.; DOWELL, F.; SCHIED, J.; BONN, G. K.; HUCK, C.; SCHILICK-STEINER, C.; STEINER, F. M. Near-Infrared Imaging Spectroscopy as a Tool to Discriminate Two Cryptic *Tetramorium* Ant Species. **Journal of Chemical Ecology**, vol. 37, n. 6, p. 549-552. 2011.

LEITE, D. O.; PRADO, R. J. Espectroscopia no Infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, vol. 34, n. 2, p. 2504, 2012.

LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL. 2014. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>> Acesso em: 16 fev. 2014.

LOIOLA, M. I. B.; SALES, M. F. Two new species of *Erythroxylum* sect. *Rhabdophyllum* (*Erythroxylaceae*) from north-eastern Brazil. **Kew Bulletin**, vol. 63, n. 4, p. 655-659. 2008.

LOIOLA, M. I. B.; SALES, M. F. *Erythroxylum ayrtonianum* (*Erythroxylaceae*): a new species from Brazil. **Novon**, vol. 22, n. 1, p. 48-50. 2012.

MELO, W. L. B.; PIRES, G. G.; LÓIO, D. A.; VAZ, C. M. P. **Aplicação de Espectroscopia Fotoacústica nos estudos de solos intactos**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008. 5p.

MORAES, L. F. D.; CAMPELLO, E. F. C.; FRANCO, A. A. Restauração florestal: do diagnóstico de degradação ao uso de indicadores ecológicos para o monitoramento das ações. **Oecologia Australis**, vol. 14, n. 2, p. 437-451. 2010.

MORAES, M. A. Até que ponto a ciência pode contribuir para a conservação da diversidade biológica. **Ciência & Cultura**, vol. 62, n. 3, p. 6-7. 2010.

MORENO, M. A.; TARAZI, R.; FERRAZ, E. M.; GANDARA, F. B.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial em populações de *Hymenaea stigonacarpa* Mart. ex Hayne mediante a utilização de marcadores microssatélites cloroplastidiais. **Scientia Florestalis**, vol. 37, n. 84, p. 513-523. 2009.

MOTA, M. C.; SANTANA, P. C.; HERTEL, M.; FRIOL, N. R.; CAVARIANI, M. M.; FILHO, M. R. C. M. F.; FRANCISCO, M. G.; TOREZAN, J. M. D. Análise comparativa de duas formações vegetacionais e de seu ecótono, Miranda – MS. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, vol. 32, n. 2, p. 213 – 222. 2011.

MOURA, T. M.; SEBBENN, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; OLIVEIRA, G. C. X.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. **Scientia Florestalis**, vol. 37, n. 82, p. 143-150. 2009.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, vol. 403, p. 853-858. 2000.

OLIVEIRA, D. M. T. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de Phaseoleae, Sophoreae, Swartzieae e Tephrosieae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo – SP, v. 24, n. 1, p. 85-97. 2001.



PLOWMAN, T.; HENSOLD, N. Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Brittonia**, vol. 56, n. 1, p. 1-53. 2004.

POTT, A.; POTT, V. J. Vegetação do Pantanal: fitogeografia e dinâmica. In: 2º SIMPÓSIO DE GEOTECNOLOGIAS NO PANTANAL. 2009. **Anais**. Corumbá – MS. p. 1065 – 1076. 2009. Disponível em <<http://www.geopantanal2009.cnptia.embrapa.br/>> Acesso: 16 fev. 2014.

REIS, A.; BECHARA, F. C.; ESPÍNDOLA, M. B.; VIEIRA, N. K.; SOUZA, L. L. Restauração de áreas degradadas: a nucleação como base para incrementar processos sucessionais. **Natureza & Conservação**, vol. 1, n. 1, p. 28-36. 2003.

RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza**. 5 ed. Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan, 2003. 503p.

SAIKI, P. T. O.; SILVA, B.; LOMÔNACO, C. Expressão de caracteres reprodutivos e vegetativos de *Senna velutina* (Vogel) H. S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae) em dois ambientes distintos de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, vol. 31, n. 2, p. 363-369. 2008.

SALAZAR, G. A.; DRESSLER, R. L. The leaves got it right again: DNA phylogenetics supports a sister-group relationship between *Eurystyles* and *Lankesterella* (Orchidaceae: Spiranthinae). **Lankesteriana**, vol. 11, n. 3, p. 337-347. 2011.

SANTOS, C.; FRAGA, M. E.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research in microbiology**, vol. 161, p. 168-175. 2010.

SATHISH, S. S.; JANAKIRAMAN, N.; JOHNSON, M. Phytochemical Analysis of *Vitex altissima* L. using UV-VIS, FTIR and GC-MS. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, vol. 4, n. 1, p. 56-62. 2012.

SHEN, J. B.; LU, H. F.; PENG, Q. F.; ZHENG, J. F.; TIAN, Y. M. FTIR spectra of *Camellia* sect. *Oleifera*, sect. *Paracamellia*, and sect. *Camellia* (Theaceae) with reference to their taxonomic significance. **Journal of Systematics and Evolution**, vol. 46, n. 2, p. 194-204. 2008.

SILVA, A. J. Estudo botânico e químico da catuaba (Erythroxylaceae Catuaba do Norte). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 14, n. 1, p. 67-77. 2004.

SILVA, B. M. S.; CESARINO, F.; SADER, R.; LIMA, J. D. Germinação e armazenamento de sementes de coca (*Erythroxylum ligustrinum* DC. – Erythroxylaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 30, n. 3, p. 25-29. 2008.

SLAUSON, L. Factors affecting the distribution, pollination, ecology, and evolution of *Agave chrysantha* peebles and *A. palmeri* Engelm. (Agavaceae). In: **Biodiversity and**



**management of the Madrean Archipelago.** United States Department of Agriculture, Forest Service, General Technical Report RM-GTR-264. 1995. Pp. 194–205.

SOARES, J. J.; OLIVEIRA, A. K. M. O paratidal do Pantanal de Miranda, Corumbá-MS, Brasil. **Revista Árvore**, vol. 33, n. 2, p. 339-347. 2009.

SOUZA, D. M; MADARI, B. E.; GUIMARAES, F. F. Aplicação de técnicas multivariadas e inteligência artificial na análise de espectros de infravermelho para determinação de matéria orgânica em amostras de solos. **Química Nova**, vol. 35, n. 9, p. 1738-1745. 2012.

STACE, C. A. **Plant taxonomy and biosystematics**. 2 ed. Cambridge University Press. 1991. 272 p.

WANG, Y. Application of Fourier Transform Infrared Microspectroscopy (FTIR) and Thermogravimetric Analysis (TGA) for quick identification of Chinese herb *Solanum lyratum*. **Plant Omics Journal**, v. 5, n. 6, p. 508-513. 2012.

XU, R.; CHEN, Y.; WAN, D.; WANG, J. Identification of four Sedum plant medicines by Fourier transform infrared spectra. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, n. 30, p. 107-110. 2012.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de Eugenia dysenterica DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130p. Tese de doutorado (Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP. 2002.



**ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA COMO FERRAMENTA PARA DISCRIMINAÇÃO DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Erythroxylum anguifugum* Mart..**

**RESUMO**

O erro em estimativas da diversidade biológica é um dos maiores problemas em muitos programas de monitoramento da biodiversidade. Apesar das metodologias genéticas existentes, muitas ações de restauração ecológica ignoram a importância da diversidade populacional em suas ações. Objetivou-se diferenciar populações de *Erythroxylum anguifugum* (Erythroxylaceae) por meio de espectroscopia fotoacústica por transformada de Fourier (FTIR-PAS) utilizando folhas e componentes florais. Para isto, porções de exemplares de *E. anguifugum* foram coletados em dois municípios de Mato Grosso do Sul. Os espectros permitiram a seleção de 12 picos que foram comparados intra e interpopulacionalmente por meio de MANOVA. Análise de agrupamento para as populações também foi realizada. Embora tenham sido encontradas diferenças significativas dentro e entre as populações, os resultados devem ser considerados com cautela. Ainda assim, ressalta-se a importância e potencialidade do uso da espectroscopia fotoacústica como ferramenta em estudos biológicos e ecológicos assim como a necessidade de novos trabalhos que possam permitir melhor acurácia na interpretação dos dados.

**PALAVRAS – CHAVE:** Carácter, diversidade, flor, nativas, população.



**PHOTOACOUSTIC SPECTROSCOPY AS TOOL TO DISCRIMINATION OF NATURAL POPULATIONS OF *Erythroxylum anguifugum* Mart..**

**ABSTRACT**

The error in estimates of biological diversity is a major problem in many biodiversity monitoring programs. Despite existing genetic methodologies, many of restoration actions ignore the importance of population diversity in their actions. The aim of this study was discriminate populations of *Erythroxylum anguifugum* (Erythroxylaceae) using Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy, using leafs and floral compounds. For this, parts of *E. anguifugum* were collected in two cities in Mato Grosso do Sul State. The spectra allowed selection of 12 peaks which were compared within and between population via MANOVA. Cluster analysis for the populations were also performed. Although significant differences were found within and between populations, the results should be considered with caution. Still, it underscores the importance and potential use of photoacoustic spectroscopy as a tool in biological and ecological studies as well as the need for further work that might allow better accuracy in data interpreting.

**KEY WORDS:** Character, diversity, flower, native, population.

## 1. INTRODUÇÃO

A negligência de diferentes fontes de erro na estimativa da diversidade biológica é um dos maiores problemas em muitos programas de monitoramento da biodiversidade (DANIELSEN et al., 2003). Embora o conceito de população mínima viável seja importante em biologia da conservação, Hill et al. (2005) chamam a atenção para o fato de que existem muitas incógnitas, em termos de teoria e de dados, para fazer julgamentos sobre que limites seriam estes, já que é difícil distinguir populações.

Trabalhos que investigaram a diversidade populacional em plantas utilizaram metodologias genéticas de marcadores moleculares (MORENO et al., 2009; MOURA et al., 2009). Entretanto, estas técnicas nem sempre são baratas, de fácil execução e, em geral, exigem técnicos altamente instruídos para sua realização.

Como resultado, novas metodologias têm sido buscadas como alternativas para investigar a diversidade e taxonomia entre seres vivos. Uma destas alternativas é a espectroscopia. Esta técnica tem sido proposta como ferramenta eficaz na distinção e/ou identificação de bactérias (AMIÉL et al., 2001), algas (GIORDANO et al., 2009), lagartas (JIA et al., 2007), moscas (FISCHNALLER et al., 2012), formigas (ANTONIALLI-JUNIOR et al., 2007; 2008; KLARICA et al., 2011), peixes (ALMEIDA et al., 2012) e plantas (SHEN et al., 2008; WANG et al., 2012; XU et al., 2012).

Embora Khairudin et al. (2013) tenham trabalhado a distinção de populações de plantas com o uso de espectroscopia, estes autores não investigaram as possíveis diferenças das respostas de material vegetativo e reprodutivo quando submetidas às análises. Esta investigação se justifica porque a própria utilização de caracteres florais ou não-florais para a distinção entre espécimes é uma questão ainda calorosa na taxonomia vegetal (SALAZAR & DRESSLER, 2011).

Os componentes reprodutivos das plantas, quando comparados com componentes vegetativos, são mais estáveis e conservativos ao longo do tempo, de forma que são menos influenciáveis por alterações ambientais. Slauson (1995) relata que em espécies do gênero *Agave* foram utilizados caracteres vegetativos para a diagnose das espécies e, com o tempo, aspectos morfológicos das folhas foram

grosseiramente modificados em razão das condições ambientais e que, como resultado, a maioria das descrições taxonômicas feitas durante aquela época é irreconhecível. Além disso, em *Agave mckelveyana* mesmo com a deiscência da antera ocorrendo noturnamente, a polinização se dá, primariamente, por insetos. Neste gênero as características florais são conservativas e retém traços de polinização por morcegos mesmo com que atualmente a polinização se dê majoritariamente por insetos.

*Erythroxylum anguifugum* Mart. (Erythroxylaceae) é uma espécie arbórea terrestre que tem ampla distribuição geográfica ocorrendo nos domínios fitogeográficos Amazônia e Cerrados e é popularmente conhecida como ‘pimenteirinha’ ou ‘fruta-do-pombo’. Populações naturais ocorrem em todo o Mato Grosso do Sul em formações de floresta estacional semidecidual, floresta ciliar ou floresta de galeria. (SILVA et al., 2008; LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2014).

Objetivou-se avaliar a eficiência do uso da espectroscopia fotoacústica por transformada de Fourier como ferramenta para discriminar populações naturais de *E. anguifugum* provenientes dos municípios de Fátima do Sul e de Aquidauana, MS, por meio da comparação das análises espectroscópicas de seus componentes vegetativos (folhas) e reprodutivos (flores).

## **2 . MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta do material botânico e preparação de amostras**

Porções vegetativas (folhas) e reprodutivas (flores) de *E. anguifugum* foram coletadas em dois municípios em distintas bacias hidrográficas, distantes entre si cerca de 250 Km, em Mato Grosso do Sul. Além da localização em diferentes bacias hidrográficas, a escolha também considerou a diferença de biomas e o prévio conhecimento da distribuição da espécie nestes locais.

No município de Fátima do Sul, bacia hidrográfica do rio Paraná, a coleta ocorreu na mata ciliar do Rio Dourados. As flores foram coletadas com auxílio de uma pinça metálica de borda larga e acondicionadas em potes plásticos. No município de Aquidauana, bacia hidrográfica do rio Paraguai, a coleta ocorreu dentro da área da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS). As áreas foram percorridas a pé e após o encontro dos indivíduos, todos com flores, procedeu-se a coleta. Ambas as

porções, flores e folhas, foram acondicionadas, separadamente, em potes plásticos identificados.

No laboratório as folhas foram encaminhadas para estufa por pelo menos 24 horas a 70°C para secagem. As flores foram separadas em verticilos florais (cálice, corola, androceu e gineceu) e encaminhadas para os mesmos procedimentos das folhas.

## 2.2 Análises espectroscópicas

Antes das análises, o espectrofotômetro foi purgado com ar seco por pelo menos uma hora antes da medida, com a finalidade de limpar o ambiente e diminuir a umidade. A célula fotoacústica também foi purgada de 5 a 10 minutos antes da medida e durante todo o processo com gás Hélio, que não possui sinal infravermelho e aumenta a sensibilidade do microfone da célula fotoacústica.

As diferentes porções de *E. anguifugum* foram submetidas a um espectrofotômetro infravermelho por transformada de Fourier da marca Thermo-Nicolet modelo 670. A oscilação do microfone da célula fotoacústica teve o sinal analógico convertido para digital por meio do *software* do próprio equipamento (“Omnic”). Os espectros medidos para as diferentes porções da planta foram normalizados pelo espectro de emissão da lâmpada, obtido pela medida fotoacústica de uma amostra padrão de carvão.

Os espectros foram obtidos com resolução de 16 e 128 scans para cada amostra. Depois de determinada a área de cada espectro, as mesmas foram normalizadas para garantir a unidade entre as amostras. Para a análise de algumas amostras (gineceu e androceu, principalmente), o material botânico teve de ser macerado para que pudesse ser melhor conformadas na peça que vai até a célula fotoacústica.

## 2.3 Delineamento amostral e análises estatísticas

As porções das plantas foram coletadas, em cada município, em pelo menos 15 indivíduos de *E. anguifugum*, sendo que o número de indivíduos amostrados variou com a disponibilidade de indivíduos em condição de floração em cada localidade. Evitou-se a coleta em indivíduos muito próximos, de forma que o material foi coletado com

distância superior a cinco metros como forma de diminuir a chance de indivíduos com parentesco direto.

Foram anotados dados do local de coleta (bioma, fitofisionomia, solo, relevo, frequência de ocorrência da espécie), bem como do clima, o horário de coleta, a data de coleta, os/as coletores/as.

Em cada indivíduo amostrado, relacionou-se a altura estimada, e a presença ou ausência de folhas, frutos e flores. Quando presentes, estes elementos foram categorizados. Para folhas, as categorias foram: jovens, maduras e velhas. Para flores, botão floral, madura ou senil. Os frutos foram categorizados verdes ou maduros. Foram criados critérios que permitiam o enquadramento dos elementos em apenas uma das categorias existentes.

As análises estatísticas incluíram Análises de variância multivariadas não-paramétricas (MANOVA) com 100 permutações. Intrapopulacionalmente, as variáveis foram associadas por meio do índice de Morisita-Horn e as estruturas foram classificadas por meio de um cluster. O coeficiente de correlação cofenética (CCC) também foi calculado. Análise dos componentes principais (PCA) foi efetuada. Com os eixos principais realizou-se MANOVA *post-hoc*. As análises foram realizadas, através do cálculo da área dos espectros, utilizando o software R – versão 2.15.3.

### 3. RESULTADOS

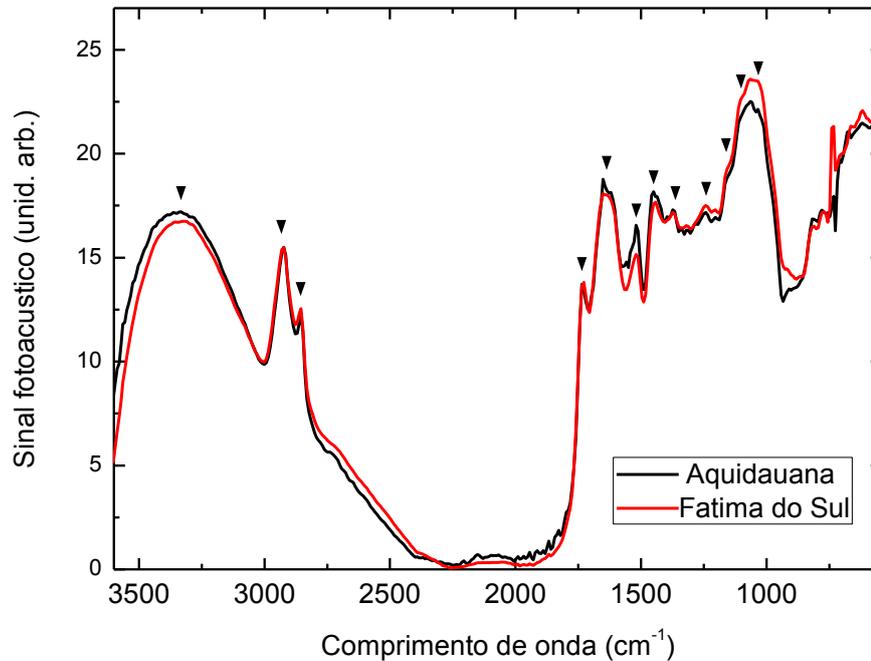
A análise dos espectros permitiu a seleção de 12 picos de absorção relacionados a ligações químicas de Hidrogênio, Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio. Os picos selecionados para comparação ( $1033\text{ cm}^{-1}$ ,  $1095\text{ cm}^{-1}$ ,  $1157\text{ cm}^{-1}$ ,  $1241\text{ cm}^{-1}$ ,  $1334\text{ cm}^{-1}$ ,  $1450\text{ cm}^{-1}$ ,  $1542\text{ cm}^{-1}$ ,  $1635\text{ cm}^{-1}$ ,  $1735\text{ cm}^{-1}$ ,  $2854\text{ cm}^{-1}$ ,  $2931\text{ cm}^{-1}$ ,  $3332\text{ cm}^{-1}$ ) e os espectros médios das populações de Aquidauana e de Fátima do Sul podem ser

visualizados

na

Figura

1.



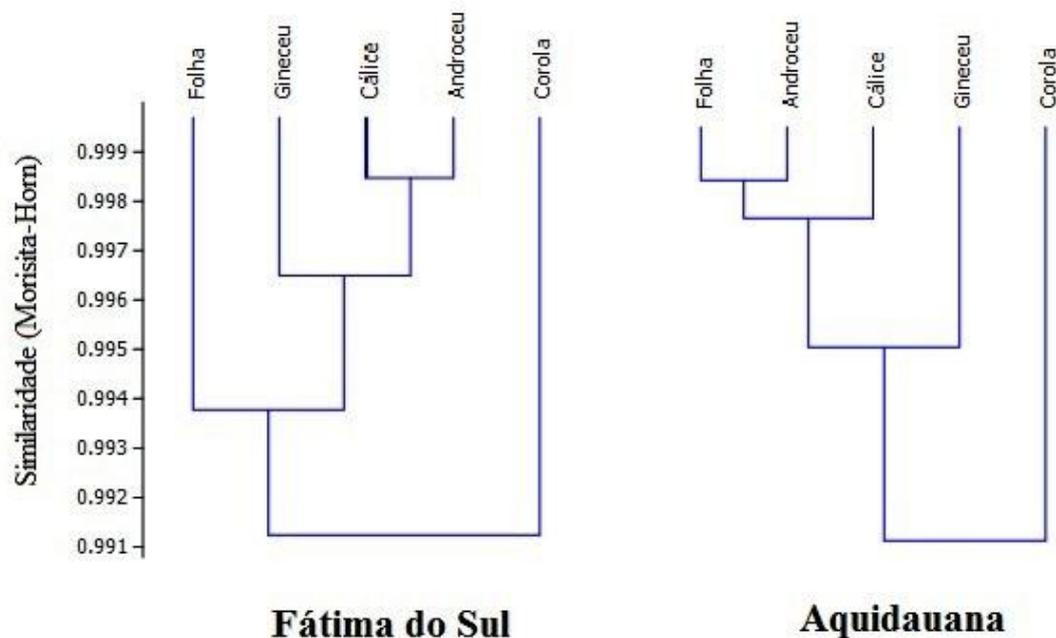
**Figura 1** – Espectros médios de *Erythroxylum anguifugum* das populações de Aquidauana e Fátima do Sul, Mato Grosso do Sul, e picos selecionados para comparação estatística.

A MANOVA é um teste não paramétrico de diferença significativa entre dois ou mais grupos, com base em qualquer medida de distância, normalmente utilizados para dados ecológicos (ANDERSON, 2001). Estas análises indicaram diferenças significativas entre os componentes ( $F=6,83$ ;  $p=0,009$ ), entre as populações ( $F=9,54$ ;  $p=0,009$ ) e na interação entre componentes e populações ( $F=16,91$ ;  $p=0,009$ ).

Adicionalmente, MANOVA foi realizada excluindo folhas das análises. Novamente observaram-se diferenças significativas entre os componentes ( $F=8,82$ ;  $p=0,009$ ), entre as populações ( $F=7,17$ ;  $p=0,009$ ) e na interação entre componentes e populações ( $F=18,23$ ;  $p=0,009$ ).

Os caracteres foram estatisticamente diferentes nas populações de Aquidauana ( $F=11,69$ ;  $p=0,009$ ) e de Fátima do Sul ( $F=12,10$ ;  $p=0,009$ ), inclusive quando testados somente componentes reprodutivos ( $F=10,29$ ;  $p=0,009$  para ambas as populações).

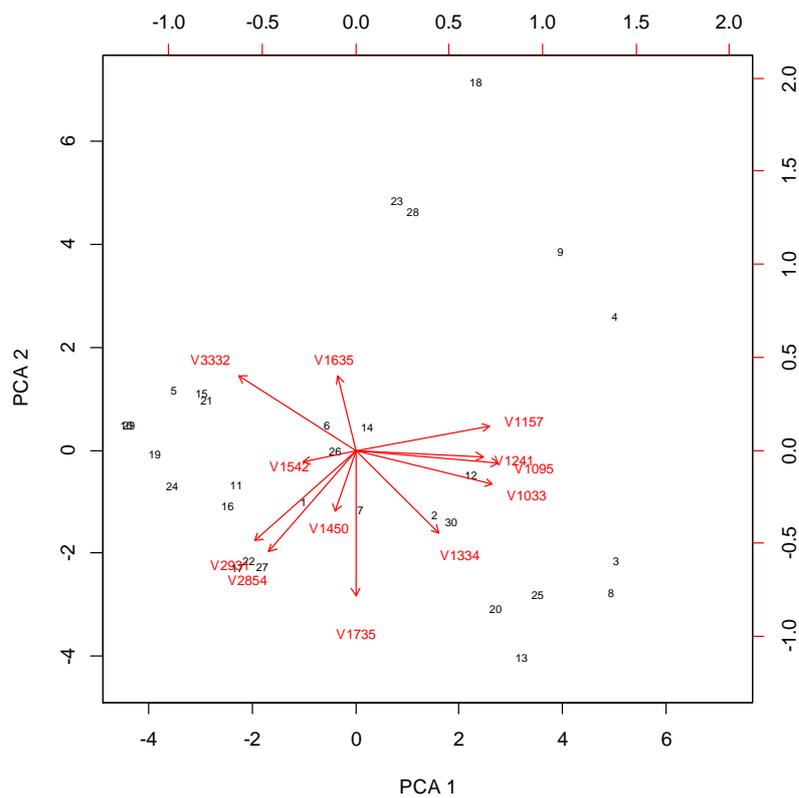
As análises de agrupamento resultaram em coeficientes de correlação cofenética de 0.9343 para Aquidauana e de 0.6303 para Fátima do Sul, e podem ter seus clusters visualizados na Figura 2.



**Figura 2** – Dendrograma utilizando a similaridade de Morisita-Horn para valores médios das análises espectroscópicas de Fátima do Sul e de Aquidauana, Mato Grosso do Sul.

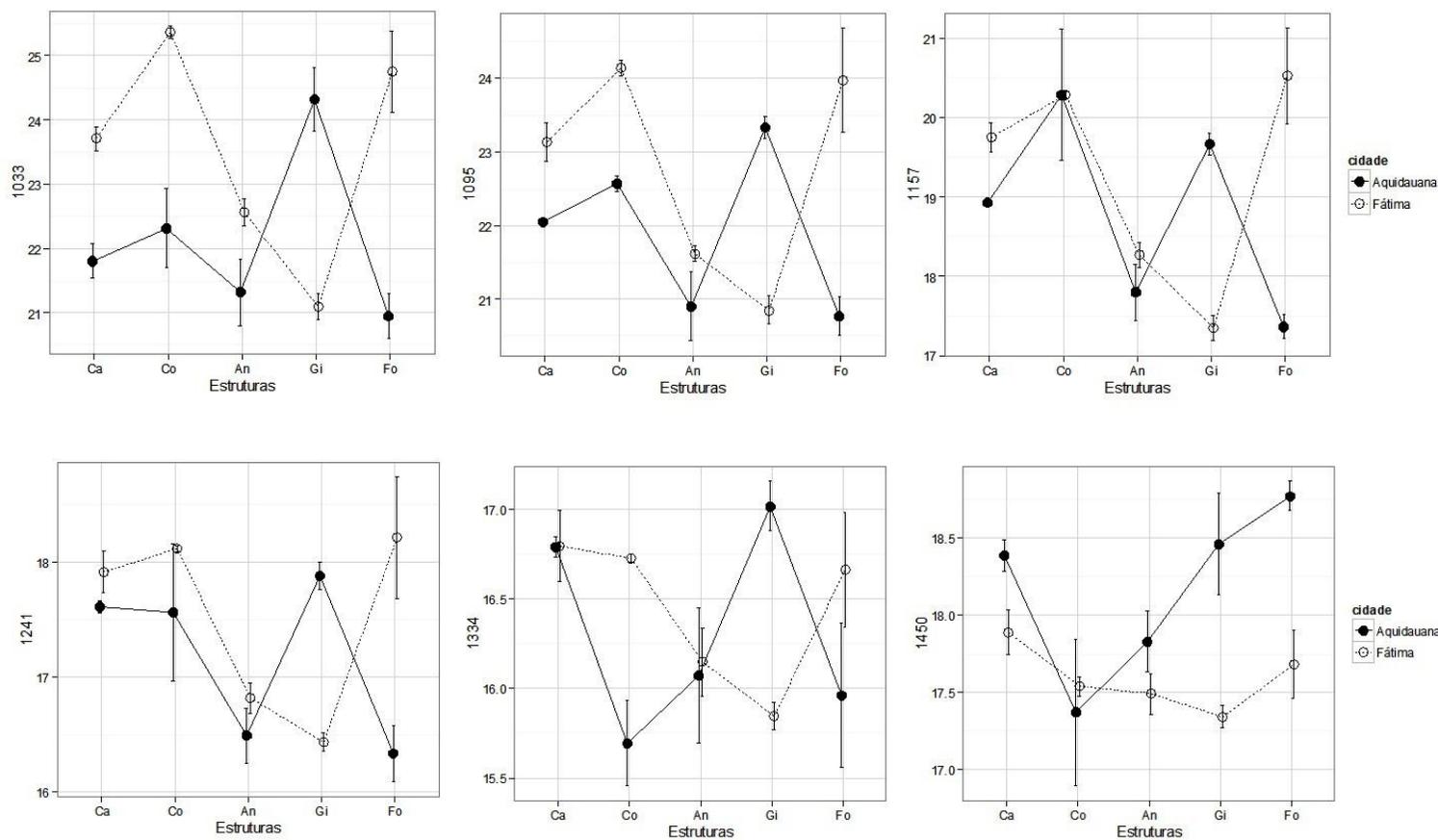
Na análise de componentes principais (PCA), a soma da variabilidade retida nos componentes explicou 80,58% da variabilidade original dos dados referentes aos efeitos dos componentes, em que componente principal 1 (PC1) e o componente principal 2 (PC2) retiveram 46,41 e 34,17%, respectivamente, das informações originais dos dados,

embora MANOVA dos caracteres destes dois eixos não tenha mostrado diferença significativa, como pode ser visto na Figura 3.

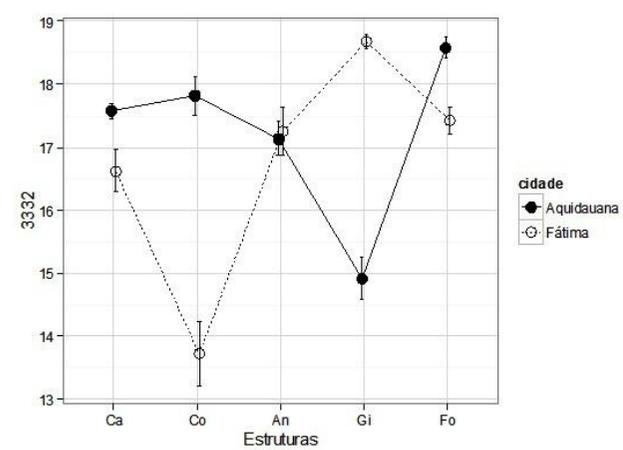
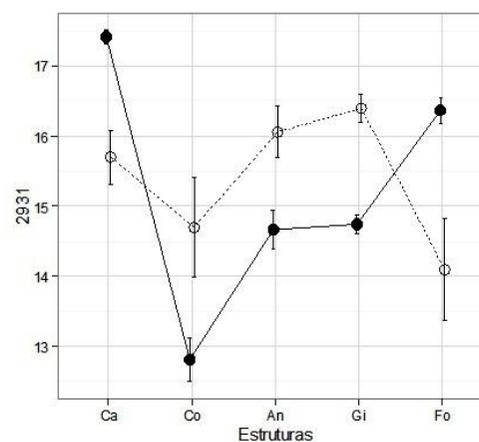
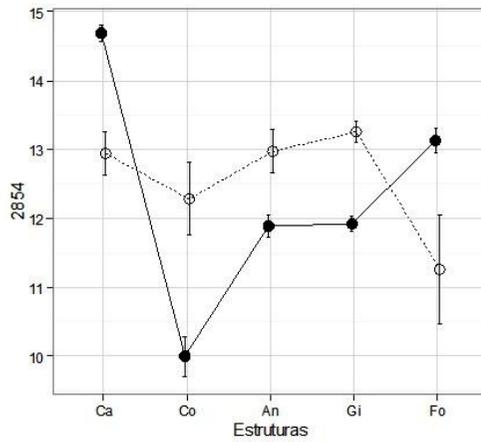
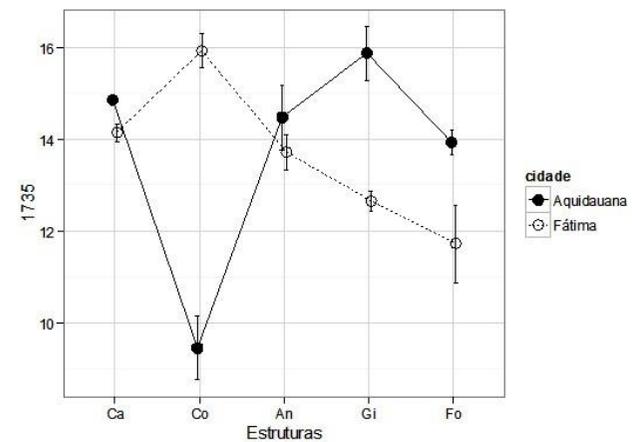
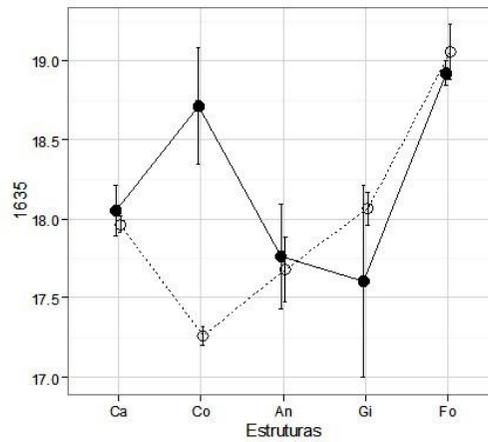
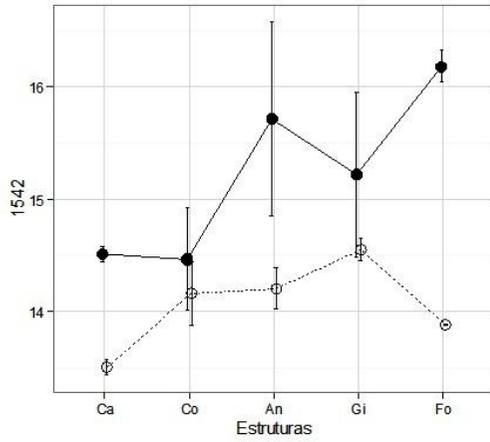


**Figura 3** – Biplot da Análise de Componentes Principais (PCA) dos picos selecionados para comparação.

Os valores médios de intensidade dos picos e o erro padrão, em cada população, podem ser visualizados na Figura 4.



**Figura 4** – Média e erro padrão das intensidades de sinal fotoacústico dos componentes (Ca = cálice; Co = corola; An = androceu; Gi = gineceu; Fo = folha) de *Erythroxylum anguifugum* nas populações de Aquidauana e Fátima do Sul, Mato Grosso do Sul. (Continua...)



#### 4. DISCUSSÃO

A maior parte dos picos selecionados para comparação está na região entre 4000 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ , que segundo Duygu (2009) é uma região de bandas de interesse biológico. Entretanto os componentes de produtos naturais raramente são puros, em decorrência do número de reações que ocorrem simultaneamente em sistemas biológicos, como afirma Derrick (1999). Uma mistura contendo pequenas variações de muitos componentes produz um espectro de infravermelho com algumas bandas irregulares, especialmente na região de impressão digital (DERRICK, 1999).

Foi possível, por meio da MANOVA, diferenciar os componentes tanto dentro da população quanto entre as populações e distinguir Fátima do Sul de Aquidauana, muito embora os resultados devam ser interpretados com cautela, uma vez que existem muitas variáveis para um número amostral relativamente baixo. Mesmo que MANOVA tenha sido utilizada por décadas, esta estatística se baseia em pressupostos que geralmente não são completamente atendidos por dados ecológicos (ANDERSON, 2001). De fato, no campo da bioestatística, há de se tomar cuidado para não enxergar o mundo em termos de abstrações matemáticas que não tem correspondência com o mundo real (MAGNUSSON & MOURÃO, 2005).

Ainda que tenham sido efetuadas três repetições nas análises para o cálculo da média dos valores dos picos, foram utilizadas 12 variáveis dependentes para duas independentes, das quais uma com cinco níveis (componentes) e outra com dois (populações). Resultados obtidos a partir de um conjunto tão pequenos de dados, quando extrapolados para comparações que envolvam populações precisam ser interpretados com cuidado.

Fischnaller et al. (2012) e Rodríguez-Fernandez et al. (2011) ao trabalharem com distinção em nível de espécie utilizando espectroscopia apontam que em seus trabalhos o baixo índice de classificação correta por análises estatísticas de dados espectroscópicos podem ter sido causados pela inclusão de múltiplas populações em uma amostra ou pela interpretação de uma parte muito pequena do espectro.

Se por um lado, por exemplo, o pico em torno de 1542  $\text{cm}^{-1}$  (modo vibracional “Stretching” e grupo funcional CNH – Amida II) (LIN-VIEN et al., 1991) tenha sido

apontado como o mais importante para as diversas análises, por outro, o aparecimento de resultados significativos é esperado para o teste quando se leva em conta o número de combinações possíveis no modelo em função do número de variáveis acima mencionadas.

Mesmo que o número amostral tenha sido pequeno, o objetivo original foi alcançado. O aumento do esforço amostral para um número maior de amostras esbarrou na dificuldade que muitos estudos biológicos encontram em diminuir fontes de variação na amostragem. No caso de populações de plantas, os fatores incluem diferenças, por exemplo, na floração dos indivíduos que podem, de ano para ano, variar em relação à qualidade e quantidade das flores. A própria floração anual da espécie impediu que coletas adicionais fossem realizadas. Diferenças na época e duração das florações podem estar relacionadas com variações ambientais não controláveis como, por exemplo, o regime hídrico ou condições do solo que a planta enfrentou no período anterior.

Embora existam trabalhos que se utilizam de testes estatísticos conjuntamente com dados espectroscópicos para fazer inferências biológicas, muitos destes trabalhos, de fato, não mencionam nem apontam o número de amostras utilizadas (*eg.* AMIEL et al., 2001; FISCHNALLER et al., 2012).

As análises de agrupamento indicaram que a corola é o componente que mais se distancia dos outros. Cálice, androceu e gineceu aparecem relativamente agrupados nos dois conjuntos. As folhas ora estão mais próximas do androceu, o que ocorre em Aquidauana, ora aparecem mais relacionadas com o conjunto gineceu-cálice-corola. O coeficiente de correlação cofenética (CCC) é uma medida de similaridade que quanto maior for, indica maior semelhança entre as medidas. Valores de CCC maiores que 0,7 podem ser relacionados à agrupamentos adequados, o que pode ser aplicado para Aquidauana mas não para Fátima do Sul. Isso pode ajudar a inferir sobre as diferenças encontradas nas formas de agrupamento dos componentes em cada população.

Ainda que na análise dos componentes principais dois componentes tenham sido importantes, a utilização destes em uma análise MANOVA não indicou diferença significativa. Magnusson & Mourão (2005) relatam que algumas das vantagens das “análises eigen” são ilusórias e que a PCA, por exemplo, assume relações lineares entre

as variáveis, o que pode não existir, o que pode sugerir explicações para que a MANOVA tenha resultado em valores não significativos.

A análise dos gráficos contidos na Figura 3 permite inferir como as médias (e erros padrões) das análises são variáveis em cada população, para cada pico e em cada componente analisado. De fato, no pico em torno de 1542  $\text{cm}^{-1}$  pode-se perceber que as médias entre as populações, para todos os componentes, mantêm-se afastadas, sem que as linhas se cruzem, ou seja, sem que os valores médios da população de Fátima do Sul atinjam valores médios da população de Aquidauana, mesmo que para outros componentes.

Neste trabalho a espectroscopia fotoacústica foi uma ferramenta útil de distinção populacional de *Erythroxylum anguifugum* e de componentes desta planta. Assim sendo, este trabalho ressalta a técnica de espectroscopia fotoacústica como ferramenta promissora de distinção populacional rápida e não invasiva, que pode interagir com áreas de interesse biológico como a ecologia, a sistemática filogenética, taxonomia e biogeografia, por exemplo. Além disso, é importante que novos trabalhos utilizando a espectroscopia como ferramenta de investigação populacional sejam realizados.

## 5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a espectroscopia fotoacústica, neste trabalho, foi uma ferramenta útil e eficaz de distinção populacional de *Erythroxylum anguifugum*, embora os resultados obtidos sugiram maior robustez de dados em análises futuras semelhantes.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. S.; LIMA, S. M. ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. Differentiation of neotropical fish species with statistical analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy Data. **Applied Spectroscopy**, vol. 66, n.7, p. 782-785. 2012.

ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, vol. 26, p. 32-46. 2001.

AMIEL, C.; MARIEY, L.; DENIS, C.; PICHON, P.; TRAVERT, J. FTIR spectroscopy and taxonomic purpose: contribution to the classification of lactic acid bacteria. **Lait**, vol. 81, p. 249-255. 2001.

ANTONIALLI JUNIOR, W. F.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, vol. 6, n. 3, p. 492-499. 2007.

ANTONIALLI JUNIOR, W. F.; SÚAREZ, Y. R.; IZIDA, T.; ANDRADE, L. H. C.; LIMA, S. M. Intra and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, vol. 7, n. 2, p. 559-566. 2008.

DANIELSEN, F.; MENDONZA, M. M.; ALVIOLA, P.; BALETE, D. S.; ENGHOFF, M.; POULSEN, M. K.; JENSEN, A. E. Biodiversity monitoring in developing countries: what are we trying to achieve? **Oryx**, vol. 37, n. 4, p. 1-3. 2003.

DERRICK, M. R.; STULIK, D.; LANDRY, J. M. **Infrared Spectroscopy in Conservation Science: Scientific Tools for Conservation**. The Getty Conservation Institute. Los Angeles. 1999.

DUYGU, D. Y.; BAYKAL, T.; AÇIGÖZ, I.; YILDIZ, K. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies. **G. U. Journal of Science**, vol. 22, n. 3, p. 117-121. 2009.

FISCHNALLER, S.; DOWELL, F. E.; LUSSER, A.; SCHILICK-STEINER, B. C.; STEINER, F. M. Non-destructive species identification of *Drosophila obscura* and *D. subobscura* (Diptera) using near-infrared spectroscopy. **Fly**, vol. 6, n. 4, p. 284-289. 2012.

GIORDANO, M.; RATTI, S.; DOMENIGHINI, A.; VOGT, FRANK. Spectroscopic classification of 14 different microalga species: first steps toward spectroscopic

measurement of phytoplankton biodiversity. **Plant Ecology & Diversity**, vol. 2, n. 2, p. 155-164. 2009.

HILL, D.; FASHAN, M.; TUCKER, G.; SHEWRY, M.; SHAW, P. **Handbook of Biodiversity Methods: survey, evaluation and monitoring**. Cambridge – UK, 2005. 589p. Disponível em <<http://sunsetridgemsbiology.wikispaces.com/file/view/Biodiversity+Handbook.pdf>> Acesso em 04 mar. 2014.

JIA, F.; MAGHIRANG, E.; DOWEEL, F.; ABEL, C.; RAMASWAMY, S. Differentiating Tobacco Budworm and Corn Earworm Using Near-Infrared Spectroscopy. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 3, p. 759-764. 2007.

KHAIRUDIN, K.; SUKIRAN, N. A.; GOH, H.; BAHARUM, S. N.; NOOR, N. M. Direct discrimination of different plant populations and study on temperature effects by Fourier transform infrared spectroscopy. **Metabolomics**, July, 2013.

KLARICA, J.; BITTNER, L.; PALLUA, J.; PEZZEI, C.; HUCK-PEZZEI, V.; DOWELL, F.; SCHIED, J.; BONN, G. K.; HUCK, C.; SCHILICK-STEINER, C.; STEINER, F. M. Near-Infrared Imaging Spectroscopy as a Tool to Discriminate Two Cryptic *Tetramorium* Ant Species. **Journal of Chemical Ecology**, vol. 37, n. 6, p. 549-552. 2011.

LIN-VIEN, D.; COLTHUP, N. B.; FATELEY, W. G.; GRASSELLI, J. G. **The handbook of infrared and raman characteristic of organic molecules**. Academic press limited. London. 1991.

LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL. 2014. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>> Acesso em: 16 fev. 2014.

MAGNUSSON, W. E.; MOURÃO, G. **Estatística sem matemática: a ligação entre as questões e as análises**. Editora Planta. Londrina – PR. 138p. 2005.

MORENO, M. A.; TARAIZI, R.; FERRAZ, E. M.; GANDARA, F. B.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial em populações de *Hymenaea stigonacarpa* Mart. ex Hayne mediante a utilização de marcadores microssatélites cloroplastidiais. **Scientia Florestalis**, vol. 37, n. 84, p. 513-523. 2009.

MORENO, M. A.; TARAIZI, R.; FERRAZ, E. M.; GANDARA, F. B.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial em populações de *Hymenaea stigonacarpa* Mart. ex Hayne mediante a utilização de marcadores microssatélites cloroplastidiais. **Scientia Florestalis**, vol. 37, n. 84, p. 513-523. 2009.

MOURA, T. M.; SEBBENN, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; OLIVEIRA, G. C. X.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. **Scientia Florestalis**, vol. 37, n. 82, p. 143-150. 2009.



RODRÍGUES-FERNANDEZ, J. I.; CARVALHO, C. J. B.; PASQUINI, C.; LIMA, K. M. G.; MOURA, M. O.; ARÍZAGA, G. G. C. Barcoding without DNA? Species identification using near infrared spectroscopy. **Zootaxa**. 2011.

SALAZAR, G. A.; DRESSLER, R. L. The leaves got it right again: DNA phylogenetics supports a sister-group relationship between *Eurystyles* and *Lankesterella* (Orchidaceae: Spiranthinae). **Lankesteriana**, vol. 11, n. 3, p. 337-347. 2011.

SHEN, J. B.; LU, H. F.; PENG, Q. F.; ZHENG, J. F.; TIAN, Y. M. FTIR spectra of *Camellia* sect. *Oleifera*, sect. *Paracamellia*, and sect. *Camellia* (Theaceae) with reference to their taxonomic significance. **Journal of Systematics and Evolution**, vol. 46, n. 2, p. 194-204. 2008.

SILVA, B. M. S.; CESARINO, F.; SADER, R.; LIMA, J. D. Germinação e armazenamento de sementes de coca (*Erythroxylum ligustrinum* DC. – Erythroxylaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 30, n. 3, p. 25-29. 2008.

SLAUSON, L. Factors affecting the distribution, pollination, ecology, and evolution of *Agave chrysantha* peebles and *A. palmeri* Engelm. (Agavaceae). In: **Biodiversity and management of the Madrean Archipelago**. United States Department of Agriculture, Forest Service, General Technical Report RM-GTR-264. 1995. Pp. 194–205.

WANG, Y. Application of Fourier Transform Infrared Microspectroscopy (FTIR) and Thermogravimetric Analysis (TGA) for quick identification of Chinese herb *Solanum lyratum*. **Plant Omics Journal**, v. 5, n. 6, p. 508-513. 2012.

XU, R.; CHEN, Y.; WAN, D.; WANG, J. Identification of four *Sedum* plant medicines by Fourier transform infrared spectra. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, n. 30, p. 107-110. 2012.