



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Análise Exploratória da Separação de Espécies de Orquídeas por Espectroscopia no  
Infravermelho Próximo e PCA

Thayllan de Jesus Lima

Orientador: Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Trabalho de conclusão de curso

Brasília,

1º/2023



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Análise Exploratória da Separação de Espécies de Orquídeas por Espectroscopia no  
Infravermelho Próximo e PCA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Química da Universidade de Brasília  
como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Química.

Thayllan de Jesus Lima

Orientador: Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Brasília,

1º/2023

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os meus familiares e amigos que me ajudaram e me apoiaram nesse curso, sem eles eu não teria chegado até aqui.

Agradeço também a todos que se disponibilizaram a ler este trabalho e dar um *feedback*, principal aos integrantes da banca por todo o trabalho em ajudar a melhorar o meu projeto.

Ao Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD) da UnB, pela infraestrutura e parceria na realização desse trabalho. Em especial, um grande agradecimento ao Dr. José Herlânio de Lima que colaborou ativamente com esse trabalho. Além de fornecer as espécies estudadas e realizar a identificação botânica, também me deu grandes orientações que sem elas eu não conseguiria ter chegado ao final deste trabalho.

Por fim, um agradecimento super especial ao meu orientador, Dr. Jez Willian Batista Braga. O senhor foi um exemplo para mim, tanto como professor quanto pessoa, sempre esteve disposto a me ajudar, independente do horário. Só tenho a agradecer o senhor pela paciência e pelo tempo investidos, desde o início do nosso projeto de Técnica de Pesquisa até o final deste projeto

# Sumário

1 Introdução.....	7
2 Referencial Teórico.....	11
2.1 Orquídeas.....	11
2.1.2 O tráfico de orquídeas no Brasil e no Mundo.....	13
2.1.3 Escolha das espécies.....	15
2.2 Espectroscopia no Infravermelho.....	15
2.3 Quimiometria.....	17
2.3.1 Análise de Componentes Principais.....	17
3 Metodologia.....	19
3.1 Equipamento e <i>softwares</i> .....	19
3.2 Amostras e aquisição dos espectros.....	19
3.3 Material depositado.....	25
4 Resultados esperados.....	26
4.1 Espectros Médio de Infravermelho Próximo.....	26
4.2 Modelo PCA para separação das espécies <i>Habenaria</i> e <i>Mesadanella</i> do primeiro dia de análises.....	28
4.3 Modelo PCA para separação das espécies <i>Habenaria</i> e <i>Mesadanella</i> do segundo dia de análises.....	30
4.4 Modelo PCA dos dados da espécie <i>Habenaria</i> nos dois dias de análises.....	32
4.5 Modelo PCA dos dados da espécie <i>Mesadanella</i> nos dois dias de análises.....	34
4.6 Modelo PCA dos dados das espécies <i>Habenaria</i> e <i>Mesadanella</i> nos dois dias de análises.....	36
5 Cronograma.....	40
6. Referências Bibliográficas.....	42

## Resumo

O tráfico da fauna e da flora é um problema global, muitos países têm sua biodiversidade utilizada como fonte de renda ilegal, trazendo assim, um prejuízo ao ecossistema local. Um dos maiores alvos desse comércio ilegal, é o tráfico de orquídeas, devido a sua beleza, fama e as diversas cores, acabam sendo fatores fundamentais para fazer com que a planta seja um alvo para compradores e colecionadores. Contudo, essa comercialização da planta está levando algumas espécies a extinção. A similaridade das orquídeas é algo que agrava ainda mais a situação de extinção, muitas espécies são similares entre si o que acaba sendo utilizado por comerciantes para facilitar a compra e venda destas plantas. Desse modo, se faz necessário o desenvolvimento de um método que seja capaz de diferenciar essas plantas sem a necessidade de sua flor. Nesse cenário a combinação da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) com as ferramentas da quimiometria se apresenta como uma alternativa interessante. O presente trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade de diferenciação de orquídeas através das análises com NIR. Foram utilizadas duas espécies de orquídeas (*Habenaria glaucophylla* e *Mesadenella cuspidata*) para verificar a possibilidade de diferenciação de espécies. A aquisição de dados foi feita em dois estágios de crescimento com diferença de dois meses. Além disso, nas últimas medidas foi constatada o ataque de fungos nas plantas. Os espectros coletados das duas espécies e nos dois estágios de crescimento se mostraram bastante semelhantes, ressaltando a necessidade de PCA. Apesar das interferências relacionadas a idade da planta e da presença de fungos, foi possível diferenciar razoavelmente bem as espécies com o uso de NIR. Os espectros coletados na parte superior da folha apresentaram os melhores resultados de separação. As componentes principais 3 e 4 do modelo PCA foram responsáveis pela separação das plantas em função do estágio de crescimento (ou presença de fungos) e espécies estudadas, respectivamente.

Palavras-chave: Infravermelho próximo, orquídeas, tráfico de espécies

## **Abstract**

*The trafficking of fauna and flora is a global problem. Many countries have their biodiversity used as a source of illegal income, provoking damage to the local ecosystem. One of the biggest targets of this illegal trade is the trafficking of orchids, due to their beauty, fame and different colors, which end up being key factors in making the plant a target for buyers and collectors. However, this commercialization of the plant is leading some species to extinction. The similarity of orchids is something that further aggravates the situation of extinction, many species are similar to each other which ends up being used by traders to facilitate the purchase and sale of these plants. Therefore, the development of a new method that can differentiate these plants without need for their flower is imperative, in this scenario the combination of near infrared spectroscopy (NIR) with chemometric tools presents itself as an interesting alternative. This work aimed to verify the viability of differentiating orchids through NIR analyses. Two species of orchids (*Habenaria slaucopylla* and *Mesadenella cuspidata*) were used to verify the possibility of species differentiation. Data acquisition was performed in two stages of growth with a difference of two months. In addition, in the last measurements it was verified the attack of fungi in the plants. Spectra collected from both species and at both growth stages were very similar, highlighting the need for PCA. Despite the interferences plant's age and the fungi's presence, it was possible to differentiate the species using reasonably well NIR. The spectra collected in the upper part of the plant showed the best separation results. Principal components 3 and 4 of the PCA model were responsible for separating plants according to growth stage (or presence of fungi) and studied species, respectively.*

*Keywords: Near infrared, orchids, species trafficking*

## 1. Introdução

O Brasil é o maior país da América do Sul, seu vasto território o permitiu ter a maior biodiversidade de todo o mundo, com mais de 116 mil espécies de animais e mais de 46 mil espécies de plantas [1]. Dentre a flora brasileira, só a classe das *Orchidaceae*, popularmente conhecida como Orquídea, possui cerca de 2443 espécies sendo que 1573 são nativas do Brasil. Como resultado da sua beleza e apreciação para fins ornamentais, o tráfico dessas espécies acaba sendo muito comum, com um mercado ilegal tanto nacional quanto internacional.

O tráfico ilegal de espécies da fauna e da flora pode acabar se tornando um problema, tanto no lugar em que se é extraído a espécie, levando a uma diminuição da população podendo chegar a uma extinção, quanto para o local de destino, podendo se tornar uma espécie invasora onde não terá predação, dominando áreas e tomando o lugar de espécies nativas. Essa mudança de território pode ser responsável por levar pragas de outras regiões, gerando um problema maior ao local alvo deste tráfico.

Dentro do mercado ilegal de plantas, o tráfico de orquídeas é um dos mais praticados na América do Sul e na Ásia devido ao grande número de espécies endêmicas [2]. A beleza, a variedades de cores e de flores assim como o aroma das orquídeas são fatores que contribuem para que seja um alvo desses crimes ambientais. Muitas pessoas compram essas flores como forma decorativa para jardins e casas, mas não sabem o prejuízo que estão causando tanto para a planta, por estar em um ambiente com condições climáticas novas, quanto ao meio ambiente por ter uma espécie exótica [2].

O órgão responsável por combater esse tráfico ilegal, não só de orquídeas, mas de toda a fauna e a flora brasileira, é o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Este órgão é responsável por monitorar e pôr em prática a Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies de Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES), que é um tratado para conservação da fauna e flora silvestre através do monitoramento da atividade comercial para garantir a sobrevivência da espécie [2]. O IBAMA está a frente desse monitoramento do tráfico ilegal das espécies e desde a criação do órgão, e já foi responsável por diversas apreensões de plantas e animais,

contribuindo para manter a integridade da biodiversidade brasileira e dos seus recursos naturais.

Mesmo se tratando de um assunto problemático, o comércio de plantas também é legalizado e controlado pelo IBAMA. Contudo, algumas pessoas acabam se valendo da similaridade existente entre algumas espécies para tentar tirar vantagem disto para comercializar espécies ameaçadas de extinção que podem chegar a ter um valor financeiro maior, afirmando ser um outra espécie. Um exemplo é a espécie *Cattleya guttata* (Figura 1) ameaçada de extinção, ser bastaste parecida com a *Cattleya bicolor* (Figura 2).



Figura 1. *Cattleya guttata* (Fonte: Ocotea.net)



Figura 2. *Cattleya bicolor* (Fonte: Empório das Orquídeas)

Por mais que se trate de espécies diferentes, visualmente são duas plantas bem parecidas que um observador não treinado no assunto poderia facilmente presumir se tratar da mesma espécie. Esse efeito é dado principalmente quando as plantas não estão floridas. Algumas espécies não floridas são difíceis de serem identificadas e diferenciadas até mesmo por



especialista botânico antes de sua florescência. Logo, se para especialistas já é um trabalho complicado, para um leigo pode acabar sendo impossível essa diferenciação

Perante a importância do assunto, é necessário um método de diferenciação das orquídeas antes de sua florescência, ajudando no combate e evitando o tráfico de certas espécies ameaçadas de extinção pelo simples fato da similaridade com espécies onde o comércio é legalizado.

A princípio, uma das principais formas de se diferenciar plantas é feita macroscopicamente, analisando a estrutura da planta como um todo e comparando com estruturas semelhantes, mas para isso, são necessários profissionais altamente especializados, que no geral são escassos. Infelizmente, como o tráfico de plantas é uma atividade que vem crescendo ao passar dos anos, a demanda de profissionais qualificados para esse serviço é muito grande e acaba não sendo suprida, assim, no intuito de otimizar esse trabalho, o desenvolvimento de técnicas e métodos de diferenciação se torna fundamental no combate ao tráfico de plantas.

Uma técnica que tem se mostrado muito promissora no ramo de identificação de madeiras é a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) [3,4], tendo como a principal vantagem o fato de ser uma forma de medida rápida, portátil, não destrutiva [4,5]. Após o desenvolvimento do método para diferenciação de espécies de orquídeas, a realização da análise requerer um curto tempo para o treinamento do analista e para a análise da amostra em si, se mostrando fácil de ser manuseado.

Contudo, mesmo o NIR tendo uma alta precisão, a elevada sobreposição de sinais nessa região espectral faz com que a análise de espectros necessite da aplicação de métodos multivariados estatísticos e computação para que seja possível a interpretação das informações relevantes presentes nos dados, área que é conhecida como Quimiometria [5].

Devido ao grande problema ambiental do tráfico de espécies e com base na grande utilização de NIR para a identificação de madeiras [6], o presente trabalho de conclusão de curso teve como objetivo principal realizar uma análise

exploratória para verificar a possibilidade de discriminar espécies de orquídeas macroscopicamente semelhantes sem a necessidade da presença floral e a observação de sua morfologia por meio de um especialista botânico, fazendo o uso da espectroscopia no infravermelho próximo com o auxílio da quimiometria.

## 2. Referencial Teórico

### 2.1. Orquídeas

A família *Orchidaceae* apresenta cerca de 850 gêneros e mais de 25000 espécies espalhadas por todo o mundo (com exceção das áreas desérticas e nos antárticos), tendo sua maior diversidade nos trópicos. Esta família, abrange cerca de 7% das angiospermas, uma das maiores famílias deste filo [6]. Essa ampla diversidade de espécies resulta em orquídeas de vários tamanhos, cores, formatos e aromas, se tornando uma flor bastante popular no mundo inteiro.

No Brasil, são encontradas 2443 espécies, sendo 1573 endêmicas [1], sendo quase 10% das espécies catalogadas em todo o mundo e 5,5% são encontradas apenas em solo brasileiro. Apesar de toda a biodiversidade do Brasil, este se encontra em quarto lugar entre os países com maiores quantidades de espécie de orquídeas, atrás do Equador (mais de 3549 espécies), Colômbia (mais de 2723 espécies) e a Nova Guiné (mais de 2717 espécies). Tendo a América do Sul, três dos maiores países com espécies de Orquídeas do mundo [6].

As orquídeas são plantas herbáceas, possuem caule flexível e são espécies mais frágeis, sendo a maioria epífitas (vivem sobre outras plantas, mas não são parasitas), mas existem espécies terrestres e fitofíticas (nesse caso são parasitas que irão roubar a seiva da hospedeira) [7]. O crescimento das orquídeas é feito de dois modos diferentes: monopodial e simpodial.

O crescimento monopodial (Figura 1), é feito através de um eixo central, neste caso, não apresenta rizoma nem pseudobulbos, assim a predominância é dada pela parte central da planta podendo ou não desenvolver qualquer ramificação lateral [7]. Como exemplo deste crescimento, podem ser citadas as espécies do gênero: *Vanilla*, *Huntleya*, *Ornithocephalus*, entre outros. O crescimento simpodial (Figura 4), cresce a partir das gemas vegetativas, aquela que se desenvolve e forma folhas, ramos e outras estruturas, situadas ao longo de um rizoma, sendo assim, de crescimento lateral (formação de ramificações) [7]. Como exemplo deste crescimento, podem ser citadas as espécies do gênero: *Cattleya*, *Oncidium*, *Bulbophyllum*, *Encyclia*, entre outros.

### MONOPODIAL

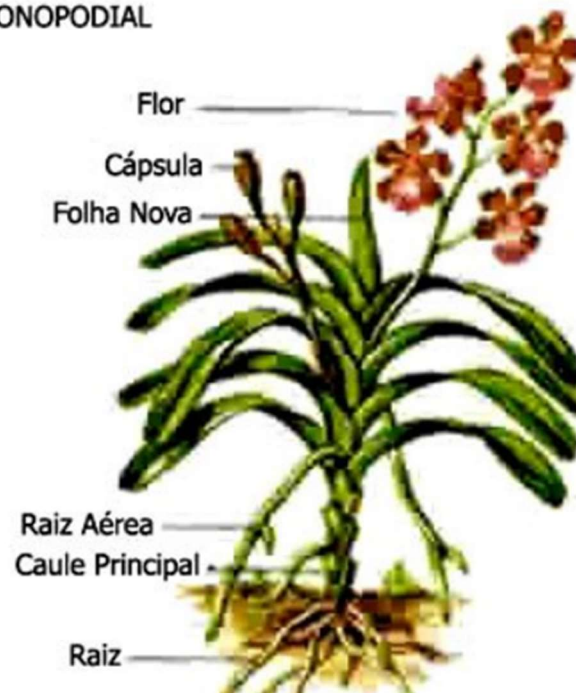


Figura 3. Tipo de Crescimento Monopodial (Fonte: Blog Plantei)

### SIMPODIAL



Figura 4. Tipo de Crescimento Simpodial (Fonte: Blog Plantei)

Como características gerais, as orquídeas apresentam:

- Raízes: servem para fixar e para prover água e sais minerais à planta [7]
- Pseudobulbo: presente na maioria das orquídeas epífitas (Vive pelo menos um estágio de sua vida utilizando uma outra espécie como suporte). Se trata de um caule modificado e funciona como órgão de armazenamento de água e nutrientes [7, 9].

- Folhas: variam muito dependendo da espécie, em tamanho, forma e consistência. São os órgãos responsáveis pela captação da luz e trocas gasosas para realizar a fotossíntese. As folhas da orquídea, depois de sua flor, é a forma mais comum de se identificação de uma espécie. [7, 8]
- Flores: Se trata da principal forma de identificar uma espécie da família. Se trata da estrutura reprodutiva da planta e possui diferentes tamanhos, formas e cores [7, 10].
- Fruto: o fruto é uma cápsula e quando maduro, abre-se ao longo da estrutura das folhas carpelares que o formam, liberando milhares de minúsculas sementes que são dispersadas pelo ar [7].

Devido ao grande número de espécies, as formas das folhas e das plantas acabam sendo bastante heterogêneas, podendo ter folhas muito grandes e outras muito pequenas, variando em formatos lineares, redondos, roliças, aciculares entre outros. Sem contar a inúmera quantidade de flores distintas, tendo formatos e cores bastante diversificadas. O que faz jus ao seu posto de maior família de plantas existente [6].

#### 2.1.2. O tráfico de orquídeas no Brasil e no Mundo

Os países em desenvolvimento são os grandes responsáveis pelo tráfico ilegal de vida silvestre. Estimativas indicam que o comércio ilícito da vida silvestre nesses países, no qual se inclui a flora, a fauna e seus subprodutos, movimentam entre 258 bilhões de dólares por ano [12, 13]. A retirada dos recursos naturais, da fauna e da flora tem consequências graves ao meio ambiente, devido ao fato de esgotamento de recursos naturais e o impacto no ecossistema local, além de privar certas comunidades de obterem seu sustento.

Infelizmente, o tráfico da flora não é um assunto em que as grandes autoridades prestem tanta atenção, tendo um foco principal no mercado ilegal da fauna e não dando a atenção necessária para a flora. Acontece que uma grande parte da população não entende os riscos que envolve ao ter uma espécie não endêmica na região. O comércio ilegal de plantas é um crime grave e deve ser tratado como tal, esse problema, segundo a UNCTAD (Conferência da ONU

sobre Comércio e Desenvolvimento), está levando diversas espécies a extinção [13] e esses números tendem a aumentar cada vez mais, pelo fato de serem esse comércio como uma fonte muito lucrativa sem levar em conta os danos que causam ao meio ambiente.

O ecossistema local de um lugar que recebe uma planta não nativa é o mais afetado nesse processo, isso porque a inserção de um indivíduo novo pode acabar trazendo uma quantidade de problemas que tendem a piorar com o passar do tempo. Pode-se ter duas situações, uma em que a planta não se adapta as condições climáticas do local e uma outra em que as condições são perfeitas para a planta se proliferar. Na primeira hipótese, a planta vai acabar sofrendo com essa mudança de local, não conseguirá sobreviver e acabará morrendo.

Na segunda hipótese, visto que a introdução de espécies não nativas em ecossistemas naturais representa uma das maiores ameaças à perda de diversidade biológica do planeta [14], a planta consegue se proliferar e, em algumas situações, estabelece o domínio sobre as espécies nativas podendo inibir essas espécies, em virtude da limitação de espaço e recursos [15]. Dessa forma, as espécies que são nativas do local acabariam não tendo espaço em seu meio e poderiam desaparecer daquele local em virtude dessa prática. Uma outra preocupação é transferência de pragas de uma região para a outra, por exemplo, ao se traficar algumas espécies de café para um outro país, poderia se acabar levando o bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*), uma praga local, para outros lugares, gerando problemas significativos a uma plantação e proliferar por todo o país.

No geral, as orquídeas são as espécies mais protegidas pela CITES, praticamente 75% da lista é composta por essa família e mesmo com toda essa proteção, a espécie continua sendo vendida de forma ilegal, principalmente pela sua similaridade com outras espécies [11], acontece que esse fator da semelhança é justamente o ponto fraco da operação de combate ao tráfico, a diferenciação acaba sendo muito complicada se não for feita por especialistas na área, algo que nem sempre se tem disponível.

Praticamente, todas as espécies encontradas no Brasil são listadas na CITES para preservação das espécies, devido a diversa variedade encontrada aqui e principalmente por sua raridade que desperta interesse de alguns colecionadores. Contudo, a legislação brasileira permite o comércio de orquídeas desde que a espécie venha de uma reprodução artificial [2], toda essa preocupação evitou que diversas espécies entrassem em extinção. Como ressalta Garcia (2007) sobre a ação da CITES que um papel importante nessa conservação:

O resultado da implementação da regulamentação do comércio da fauna e da flora corrobora em dois aspectos principais que se complementam: a preservação das espécies e de sua função ecológica, permitindo a continuidade da capacitação dos ecossistemas e evitando, com isso o enfraquecimento desses, bem como o consequente desequilíbrio ecológico; e a continuidade da atividade, pela conservação de seu recurso base, contribuindo para o desenvolvimento sustentável, em seus aspectos sociais e econômicos (Garcia, 2007, p. 145)

Como medida de proteger ainda mais a família das orquídeas, o IBAMA regulamentou criadouros específicos e controlados, que devem seguir todas as normas visando o comércio legal e seguro das espécies [2]. Mesmo com tantas medidas de proteção, isso não impede totalmente o tráfico, o que leva algumas espécies de orquídeas a entrarem em risco de extinção.

Apesar de tudo, o IBAMA segue lidando com crimes contra a flora brasileira e vem fazendo apreensões de orquídeas (cerca de 4 mil foram apreendidas de 2015 à 2018) e realocando-as para que não interfira no ecossistema local.

### 2.1.3. Escolha das Espécies

A escolha das espécies estudadas teve como principal fator a disponibilidade de amostras. Para alcançar um bom número de dados, eram necessárias pelo menos 8 plantas para uma melhor amostragem.

Um outro fator fundamental para a escolha das espécies foi o tamanho da folha que a Orquídea apresentava. Caso a folha fosse muito pequena, a radiação emitida do MicroNIR poderia acabar vazando pelas extremidades e dando interferência com fontes externas.

Dessa forma, as plantas que tinham uma folha suficientemente larga e com uma bom quantidade de espécies disponíveis, foram escolhidas como foco deste trabalho.

## 2.2. Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia é uma área formada por diferentes técnicas instrumentais que estuda as interações da radiação com a matéria. Essas técnicas podem ser classificadas de acordo com a energia da radiação, como mostra a figura 5 a seguir da diferentes regiões do espectro eletromagnético.

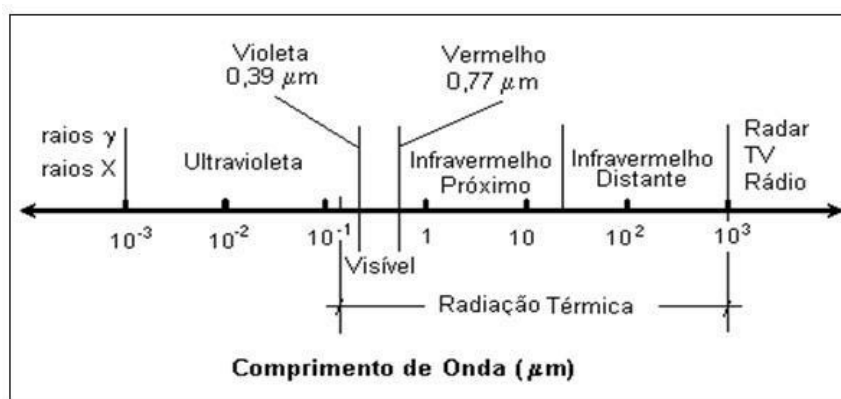


Figura 5. Espectro Eletromagnético (Fonte: ResearchGate)

O resultado de uma análise espectroscópica é representado através de um gráfico que mostra a intensidade em função de uma escala de medida que é proporcional a energia da radiação incidida na amostra, que no caso da radiação infravermelha é comumente expresso pela intensidade de transmitância, reflectância ou absorvância em função do comprimento de onda (nm) ou número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). Esse gráfico é conhecido como "espectro". A radiação na região do infravermelho tem energia para promover apenas dois tipos de interação com a matéria: transições vibracionais e rotacionais [16]. O resultado dessas transições, são expressos através dos valores de intensidade do espectro.



A análise por infravermelho é amplamente utilizada para a determinação de compostos orgânicos [16] devido à essas moléculas absorverem radiação infravermelha. Essa radiação é responsável por realizar transições vibracionais e rotacionais, porém, não inclui transições eletrônicas [4, 16]. O infravermelho é dividido em três regiões: O Próximo (780 à 2500 nm), o Médio (2500 à 50000 nm) e o Distante (50000 nm à  $10^6$  nm). Espectros na região do infravermelho médio, geralmente exibem bandas de absorção estreitas, pouco espaçadas que resultam de transições dentre os vários níveis vibracionais existentes. Variações em níveis rotacionais podem dar origem a uma série de bandas para cada estado vibracional [16].

Essa região contém transições características dos diversos grupos funcionais de moléculas orgânicas, região conhecida como de impressão digital. Já a região do infravermelho próximo (NIR), é conhecida pela sua instrumentação mais simples em relação às demais, sua velocidade, sua simplicidade no preparo de amostras, necessitar de pouco treinamento do analista e por não, em muitas situações, proporcionar uma análise não destrutiva [4, 16].

### 2.3. Quimiometria

A Quimiometria é a área da química que se baseia no uso de métodos matemáticos, estatísticos e de computação aplicados para a análise de dados químicos [5], de certa forma, é uma colaboração da matemática, química e a estatística para extrair informações dos dados obtidos.

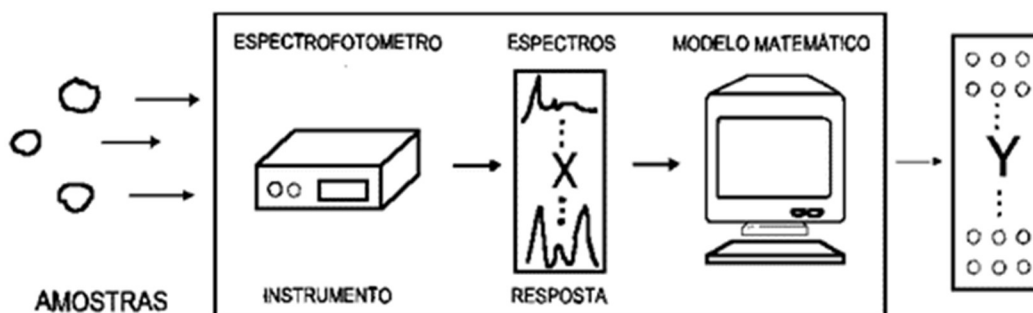


Figura 6. Esquema da Quimiometria aplicado no tratamento de dados (Fonte: Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial) [17]

As ferramentas quimiométricas podem auxiliar a obter mais informações a entender mais a fundo os dados obtidos [17], isso porque elas permitem um estudo multivariado de todos os comprimentos de onda de um espectro de uma vez, evidenciando a existência de padrões e destacando diferenças espectrais mais marcantes.

Uma das ferramentas mais utilizadas é a Análise de Componentes Principais, que transforma grandes matrizes de dados em matrizes menores, as quais podem ser mais facilmente examinadas, plotadas e interpretadas. A PCA extrai os fatores mais importantes dos dados, preservando a maior parte da variância. Esses fatores descrevem as interações multivariadas entre as variáveis medida e revelam tendências subjacentes aos dados.

### 2.3.1. Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais é uma técnica da estatística multivariada que consiste em transformar um conjunto de dados contendo muitas variáveis em outro conjunto contendo um número menor de variáveis (denominadas de componentes principais) [18]. Este método se baseia na eliminação da correlação das variáveis coletadas experimentalmente, de forma que são geradas novas variáveis ortogonais, que acabam agrupando as variáveis que tem uma relação muito significativa, de acordo com suas variâncias.

Essa transformação de dados consegue identificar padrões e revelar as variáveis de maior importância, além de reduzir os dados nas componentes principais (CP). Como cada CP modela uma combinação linear independente presente nos dados, presente apenas nela, acabam sendo fontes de separação de informações distintas entre si [18]. Cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais. A primeira componente principal modela a direção de maior variância nos dados, e assim segue em ordem decrescente de variância [19].

As primeiras componentes têm um papel fundamental nesse processo, conseguindo explicar uma grande parte do que separa as amostras, portanto,

conseguindo reduzir o número de variáveis de um conjunto complexo de dados para poucas dimensões.

O foco principal deste método é agrupar os dados que apresentam relação entre si, mantendo toda a informação relevante para a análise, essa organização é feita através de uma decomposição matricial, o que acabará revelando as variáveis de maior importância dentro do conjunto de dados [18, 19].

Matematicamente, quatro conceitos são usados para a formação dos componentes principais, Matriz de Variância-Covariância e Matriz de Correlação que vão dar origem aos Autovalores e aos Autovetores. Os autovalores medem a quantidade de variância explicada por cada componente principal. Por outro lado, os autovetores contêm as informações de como as amostras e variáveis se relacionam entre si [16, 18, 19].

Ao final da elaboração das CP's, a importância delas são avaliadas devido sua contribuição, ou seja, a proporção de variância total explicada pelo componente [18], esta informação é o que indicará quantos componentes foram utilizados na análise final para diferenciar as espécies.

A técnica de PCA é capaz de lidar muito bem com conjunto de dados com número elevado de variáveis, mas se torna mais valiosa quando se trata de espaços bi ou tridimensionais [18], isso porque, as componentes principais podem ser expressas através de um gráfico, que permite uma visualização mais fácil do seu comportamento [19].

A escolha desta técnica é feita devido aos inúmeros dados que apresentam uma correlação, afinal, se trata da mesma espécie de orquídea. Assim, a utilização de PCA irá reunir as principais informações dos espectros que separam as amostras, processar os dados e transformá-los em informação interpretável e útil.

Com os dados processados, espera-se que as componentes principais destaquem a informação espectral que diferencie cada espécie de orquídea.

### 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Equipamentos e *Softwares*

O equipamento utilizado neste trabalho, foi um espectrômetro de infravermelho próximo portátil, o MicroNIR1700, JDSU (908 à 1690nm), com lâmpadas de tungstênio como fonte de radiação e uma matriz de detectores InGaAs (Índio, Gálio e Arsênio). A aquisição de dados foi realizada através de um *software* (MicroNIR 1.6.1) e o tratamento através do *software* MatLab, versão 7.12, utilizando o pacote PLS-Toolbox 8.8.1.

### 3.2. Amostras e Aquisição dos Espectros

As análises foram realizadas em colaboração CRAD (Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas) com o auxílio do Dr. José Herlânio de Lima que participou do trabalho, como especialista botânico que forneceu as amostras e realizou a identificação botânica das espécies. As espécies escolhidas para o estudo foram a *Habenaria glaucophylla* (Figura 7) e a espécie *Mesadenella cuspidata* (Figura 8).



Figura 7. Três vasos com a espécie *Habenaria glaucophylla*



Figura 8. Três vasos com a espécie *Mesadenella cuspidata*

As espécies foram identificadas, numeradas e um código (Figura 9) foi associado a cada uma das folhas analisadas.

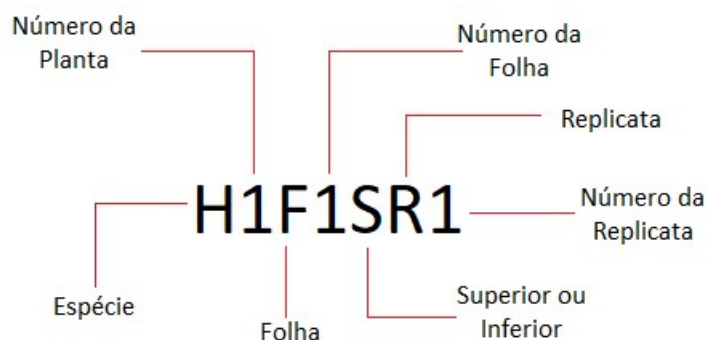


Figura 9. Código de Identificação

O código começa diferenciando as duas espécies distintas de orquídeas, H para *Habenaria slaucopylla* e M para a espécie *Mesadenella cuspidata*, para isso, os vasos foram posicionados e cada planta foi numerada para diferenciar uma das outras (Figura 10). Para cada planta, foi analisada três folhas. No entanto, esse número variou, pois, algumas espécies não estavam completamente desenvolvidas e suas folhas não conseguiam cobrir por completo o detector do MicroNIR.

As medições foram feitas tanto na parte superior quanto inferior das folhas, no intuito de observar se os dados eram compatíveis nas duas faces. Por fim, cada análise fot feita em triplicata na mesma folha para garantir uma maior representatividade dos resultados.



Figura 10. Numerações das plantas das duas espécies

Devido a pequena espessura das folhas, para evitar interferências externas e para fins de manter a repetibilidade do método, uma folha de papel toalha foi dobrada 4 vezes e colocada na superfície oposta as leituras (Figura 11). Durante o estudo, foi observado que a ausência dessa folha de papel poderia gerar interferências nas medidas amostra devido a interação do infravermelho com a mão do analista, principalmente quando a folha apresentava furos (Figura 11) ou manchas de fungos (Figura 12).



Figura 11. Folha da espécie *Mesadenella cuspidata*, com furos por seu corpo, na superfície branca do Papel Toalha



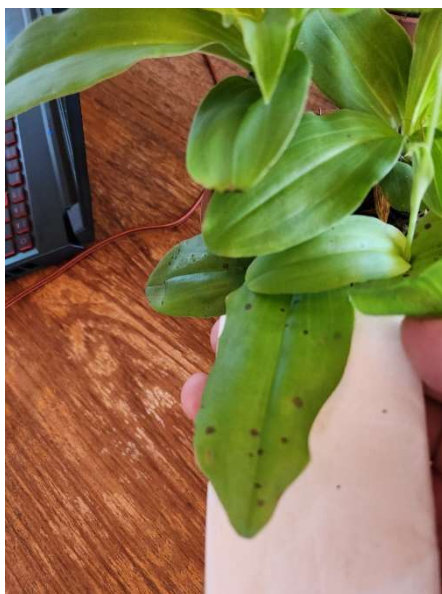


Figura 12. Folha da espécie *Habenaria glaucophylla*, com manchas de fungo por seu corpo, na superfície branca do Papel Toalha

Por fim, a análise foi feita com o equipamento apoiado na folha com papel funcionando com um suporte para evitar a interferência da mão do analista (Figura 13). As análises foram realizadas pelos mesmos analistas para garantir uma maior reprodutibilidade dos dados.



Figura 13. Forma como as análises foram feitas

As análises foram executadas da mesma maneira para todas as folhas de cada espécie, em triplicata. É importante destacar que as medidas espectrais foram registradas em duas datas distintas. Na primeira, referente às fotos anteriores, as plantas estavam com 60 dias de vida e sem a presença

significativa de fungos em suas folhas. Os dados obtidos organizados em uma planilha do *software* Excel para em seguida ser importada no *software* MatLab para a análise por PCA.

A segunda análise foi realizada cerca de dois meses após a aquisição dos primeiros dados, a fins de investigar se a idade da planta teria alguma influência no resultado final. Contudo, na data da realização dessas medidas observou-se que as plantas, além de estarem dois meses mais velhas, tinham sido atacadas por fungos e tinham várias de suas folhas com manchas escuras, conforme detalhado a seguir

Foram estudas duas espécies: *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay e *Habenaria glaucophylla* Barb.Rodr. Um indivíduo de cada espécie foi depositado no Herbário da Universidade de Brasília (UB) (acrônimos de acordo com Thiers [2021]). A herborização do material foi realizada de acordo com IBGE (1991) [22,23]

O procedimento de amostras de obtenção dos espectros foi o mesmo realizado na primeira parte, como mostrado na Figura 13. E os códigos de identificação foram semelhantes ao da figura 9, (H) para *Habenaria glaucophylla* e (M) para *Mesadenella cuspidata*. O padrão para numeração das plantas seguiu o mesmo da figura 10.



Figura 14. Vasos da espécie *Habenaria glaucophylla*, 2 meses após a primeira medição





Figura 15. Vasos da espécie *Mesadenella cuspidata*, 2 meses após a primeira medição

Ambas as espécies de orquídeas sofreram um ataque de fungos nesse período de dois meses e acabaram tendo parte de suas folhas bem danificadas (figura 16). Portanto, as medidas coletadas nesses dois momentos têm a diferença na composição química, devido a idade das plantas, e a influência desse ataque de fungos.



Figura 16. Estado das folhas após o ataque dos fungos

Para a preparação da exsicata (exemplares da planta foram secas e identificadas no herbário) das amostras utilizadas no trabalho, foi realizada a prensagem das duas espécies de orquídeas com o auxílio do Dr. José Herlânio de Lima (figura 17). O processo da prensa consiste em dispor as amostras das espécies, contra folhas de jornais e placas de alumínio. Em seguida, essas placas são amarradas com duas pranchas de madeira, prensadas e levadas a uma estufa por 1 semana (figura 18) [21].

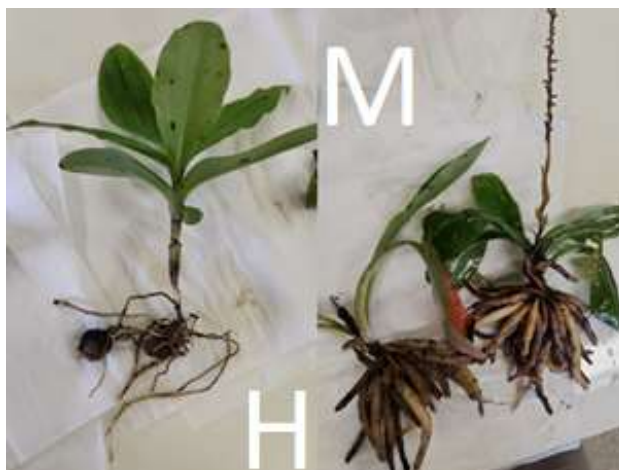


Figura 17. Preparação das plantas para o processo de prensagem

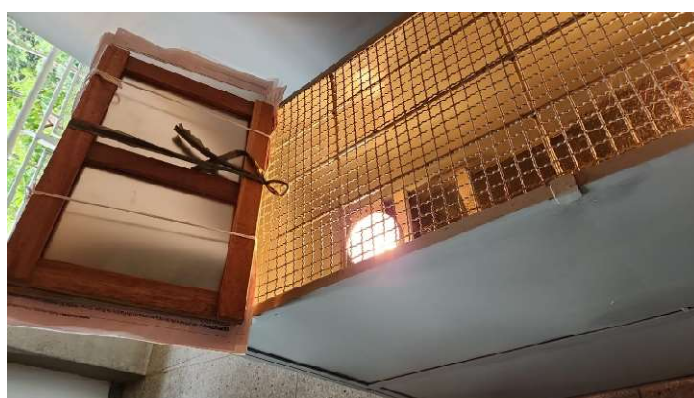


Figura 18. Amostras prensadas no processo de secagem na estufa

### 3.3. Material Depositado

*Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay – *The Genera and Species of Orchidaceous Plants*, 471 (1840).

Material depositado: BRAZIL. DISTRITO FEDERAL: Taguatinga, Floresta Nacional de Brasília, 03.XII.2022, J.H. Lima 62 (UB), floresceu em cultivo em III.2023.

*Habenaria glaucophylla* Barb.Rodr. – *Genera et Species Orchidearum Novarum*, 1:160 (1877).

Material depositado: BRAZIL. DISTRITO FEDERAL: Taguatinga, Floresta Nacional de Brasília, 03.XII.2022, J.H. Lima 63 (UB), floresceu em cultivo em I.2023.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Espectros Médio de Infravermelho Próximo

Os espectros foram pré-processados com Padronização Normal de Sinal (SNV), Centragem na Média (Mean Center) e posteriormente analisados por Análise por Componentes Principais (PCA).

Primeiramente foi elaborado um gráfico para verificar se as duas espécies apresentariam alguma distinção visual de seus espectros NIR.

Ao aplicar o primeiro pré-processamento (SNV) nos espectros da espécie *Habenaria*, foram obtidos os espectros apresentados na figura 19 para as medidas realizadas nas superfícies superior e inferior da planta. O mesmo foi feito com a espécie *Mesadenella*, sendo obtidos os espectros da figura 20.

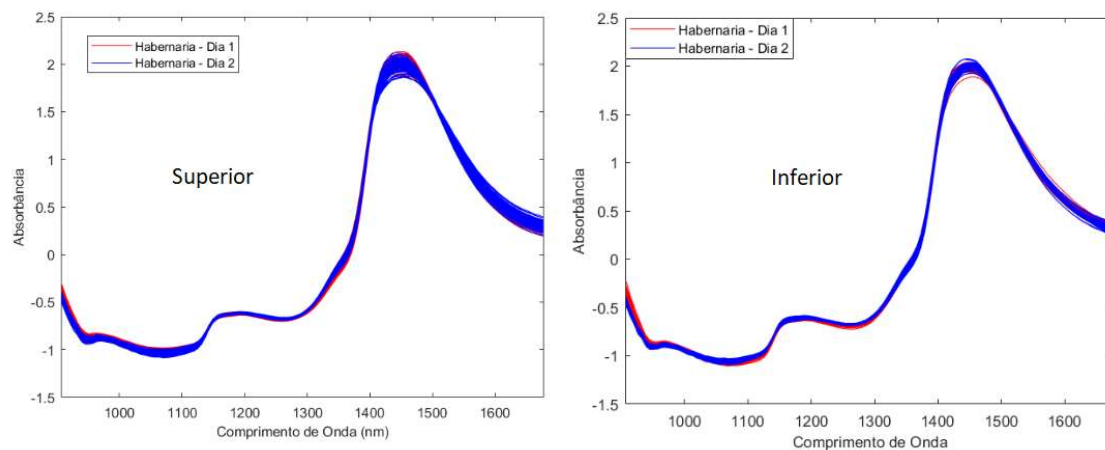


Figura 19. Espectros médio da espécie *Habenaria*

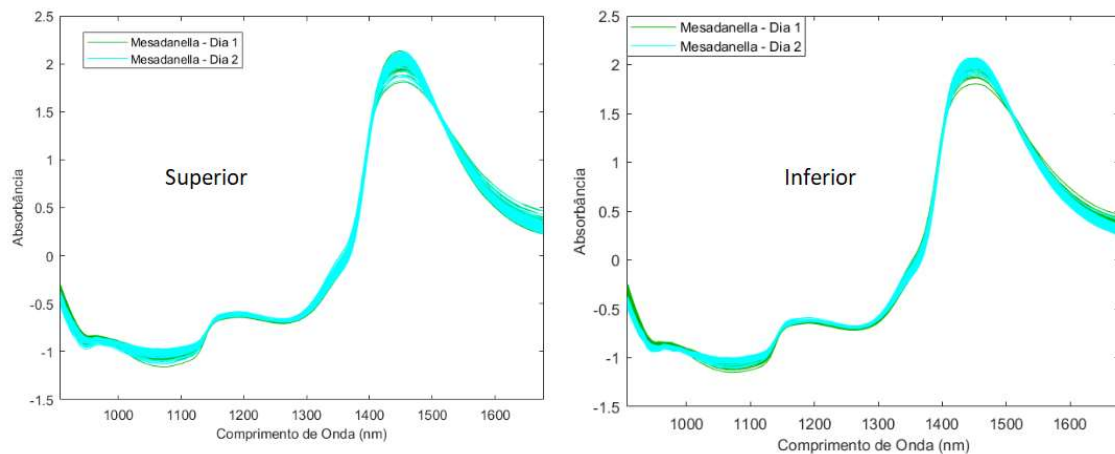


Figura 20. Espectros médio da espécie *Mesadanella*

Por fim, foram plotados os espectros médios de ambas as espécies juntas, separadas também por inferior e superior. Como pode ser observado nas figuras de 19 a 21, as duas espécies apresentaram espectros muito semelhantes entre si e que visualmente também não se notam diferenças entre os dados medidos na superfície inferior e superior da folha, o que destaca a necessidade de aplicar PCA para tentar evidenciar se existe informações espectrais que permitem a separação das espécies.

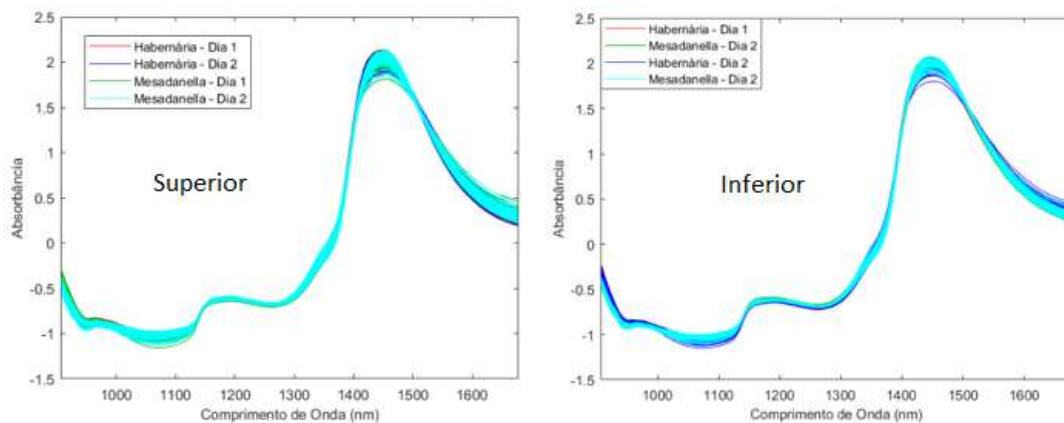


Figura 21. Espectros médio de ambas as espécies

Foram criados modelos de análises de componentes principais para os dados obtidos na superfície inferior e superior da folha. Ao observar os resultados, constatou-se que houve uma melhor separação entre as espécies com os dados obtidos na parte superior. De forma que a discussão apresentada a seguir focará nos dados obtidos na superfície superior da folha.

#### 4.2. Modelo PCA para separação das espécies *Habenaria* e *Mesadanella* do primeiro dia de análises

Foi gerado um modelo de PCA das duas espécies de orquídeas no primeiro dia de análises para verificar se existia algum tipo de diferenciação entre as espécies neste estágio de evolução das plantas, representado por esse primeiro dia de análise. O modelo contendo apenas três componentes principais reteve 97,15% da variância total dos dados sendo PC1 responsável por 78,54%, PC2 por 15,30% e PC3 por 3,28%. O gráfico de escores contém as informações que relacionam as amostras, enquanto o gráfico de pesos contém informações capazes de relacionar as variáveis (comprimento de onda).

Observando os gráficos de escores e pesos das PC1 e a PC2 (figura 22), nota-se que a informação presente nestas duas componentes não separa as amostras em função das espécies, pois existe uma dispersão praticamente aleatória no gráfico de escores. Por outro lado, em PC3, observou-se uma maior separação das amostras, sendo a espécie H caracterizada por escores negativos e a espécie M por escores positivos. Portanto, essa componente reteve as informações que conseguem separar relativamente bem as espécies estudadas.

Para identificar qual ligação química está mais relacionada à essa separação das espécies neste primeiro dia, deve ser observado o gráfico de pesos de PC3.

O gráfico revela que os pesos mais positivos estão na região inicial do espectro, próxima a 900nm (característica de transições de ligação C-H de grupos CH<sub>3</sub>). Essa região é mais responsável pela separação da espécie *Mesadanella* que apresentou escores positivos. Já para a espécie *Habenaria*, está relacionada com a região do espectro que apresenta pesos negativos, sendo mais marcante a região próxima de 1500nm (relacionada à transições de ligações R-OH). Essa região do espectro é mais responsável pela separação da espécie *Mesadanella*.

Cabe destacar que a PC3 contém apenas 3,28% da variância dos dados, indicando que a informação responsável pela separação das espécies nesse estágio de crescimento das plantas é apenas uma fração mínima da variação total dos espectros, o que corrobora com o fato da similaridade visual observada na figura 21.

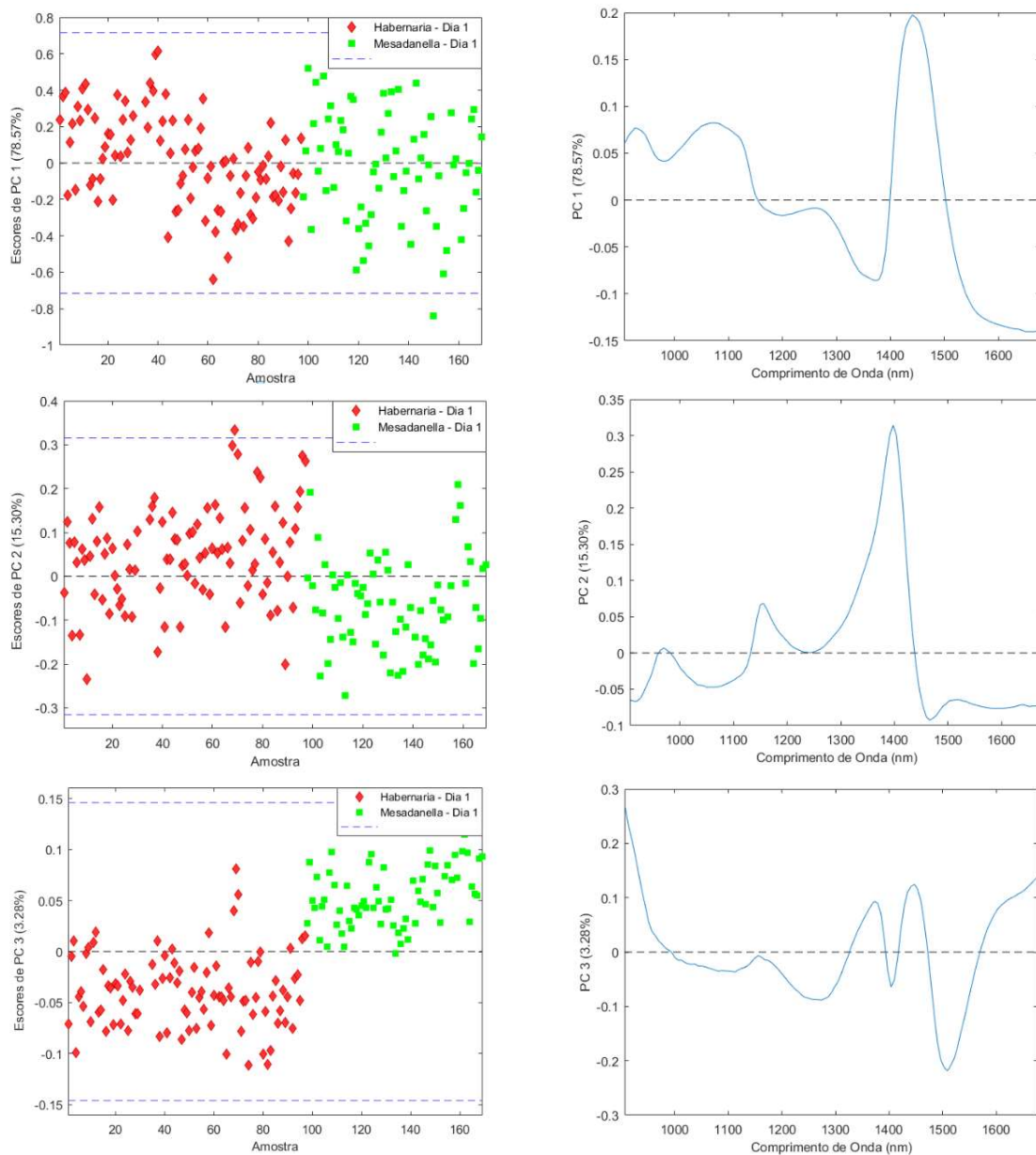


Figura 22. Gráfico de Escores (esquerda) e Pesos (direita) de ambas as espécies no primeiro dia de análise

#### 4.3. Modelo PCA para separação das espécies *Habenaria* e *Mesadanella* do segundo dia de análises

De forma análoga ao que foi apresentado na seção anterior, foi gerado um novo modelo de PCA das duas espécies de orquídeas no segundo dia de análises para verificar se existia algum tipo de diferenciação entre as espécies no seu estágio mais avançado de crescimento (dois meses após as primeiras medidas). O modelo contendo apenas três componentes principais reteve 97,87% da variância total dos dados, sendo PC1 responsável por 80,51,%, PC2 por 14,77% e PC3 por 2,59%.

Observando os gráficos de escores de PC1 e PC2 (figura 23), nota-se que a informação presente nestas duas componentes não separa as amostras em função das espécies, pois se observa apenas uma dispersão sem tendência clara. Semelhante ao observado na seção anterior, em PC3 também se observa uma maior separação das amostras de cada espécie. Novamente a espécie H é mais caracterizada por escores negativos, enquanto a espécie M apresenta majoritariamente escores positivos.

Ao observar o gráfico de pesos, constatamos uma similaridade muito grande com o resultado obtido com os dados medido com as plantas dois meses mais jovens. Os pesos mais positivos estão localizados na parte inicial do espectro na região de 900nm. Sendo mais importantes para a separação da espécie M. Já para a espécie H, está novamente relacionada com a parte negativa dos pesos, principalmente a banda localizada na região de 1500nm.

Esse resultado evidencia que a informação que separava as amostras no primeiro dia de análises se mantém presente neste segundo dia. Também é observado o aumento de intensidade de algumas bandas de um dia para o outro, como por exemplo a banda próximo a 1250 nm referente as ligações relacionadas à presença de compostos aromáticos. Essas diferenças podem ter acontecido em função da idade da planta ou da presença dos fungos.

É interessante destacar que novamente a PC3 contém apenas uma fração mínima da variação total dos espectros (2,59% da variância dos dados).



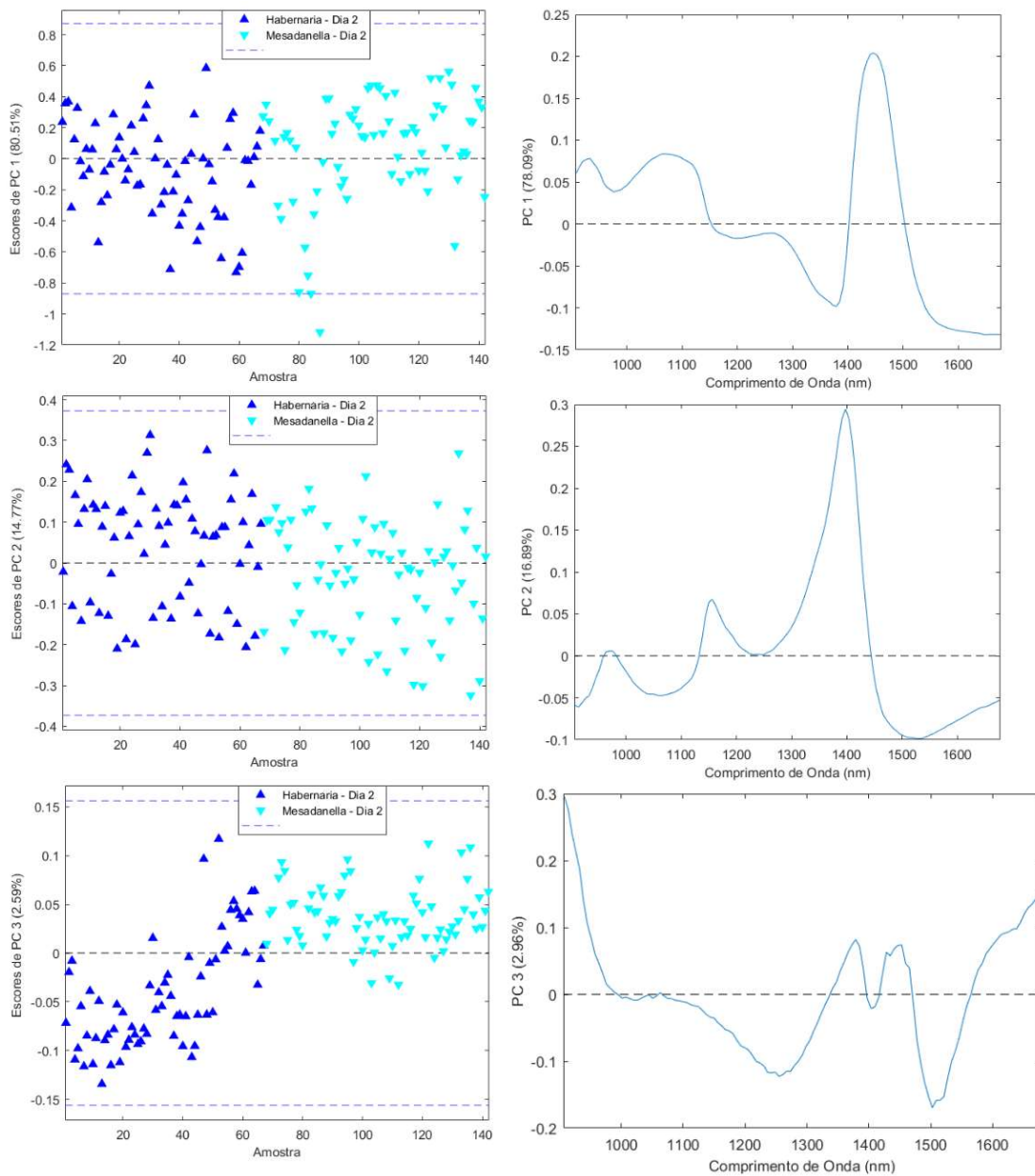


Figura 23. Gráfico de Escores (esquerda) e Pesos (direita) de ambas as espécies no segundo dia de análise

#### 4.4. Modelo PCA dos dados da espécie *Habernaria* nos dois dias de análises

De forma análoga ao que foi apresentado nas seções anteriores, foi gerado um novo modelo de PCA, agora, da espécie *Habernaria* nos dois dias de análises para verificar se existia algum tipo de diferenciação entre as espécies em função da idade ou da presença de fungos. O modelo contendo apenas três



componentes principais reteve 98,25% da variância total dos dados, sendo PC1 responsável por 78,17%, PC2 por 13,65% e PC3 por 6,43%.

Observando os escores de PC1 e PC2 da figura 24, nota-se que a informação presente nestas duas componentes não separa as amostras em função da idade da planta, pois existe uma dispersão aleatória no gráfico. Novamente, em PC3, que apresenta apenas 6,43% da variância total dos dados, observa-se uma maior separação das amostras, sendo essa componente a que contém informações que conseguem separar as espécies em função da idade das plantas presença de fungos.

Repetindo o que foi observado nas seções anteriores, os pesos mais positivos se localizaram na região de 900nm. Essa região do espectro foi mais responsável pela separação da espécie *Habenaria* no primeiro dia. Já para o segundo dia, está relacionado com os pesos negativos, sendo as regiões mais importantes as próximas à 1220nm e 1500nm.

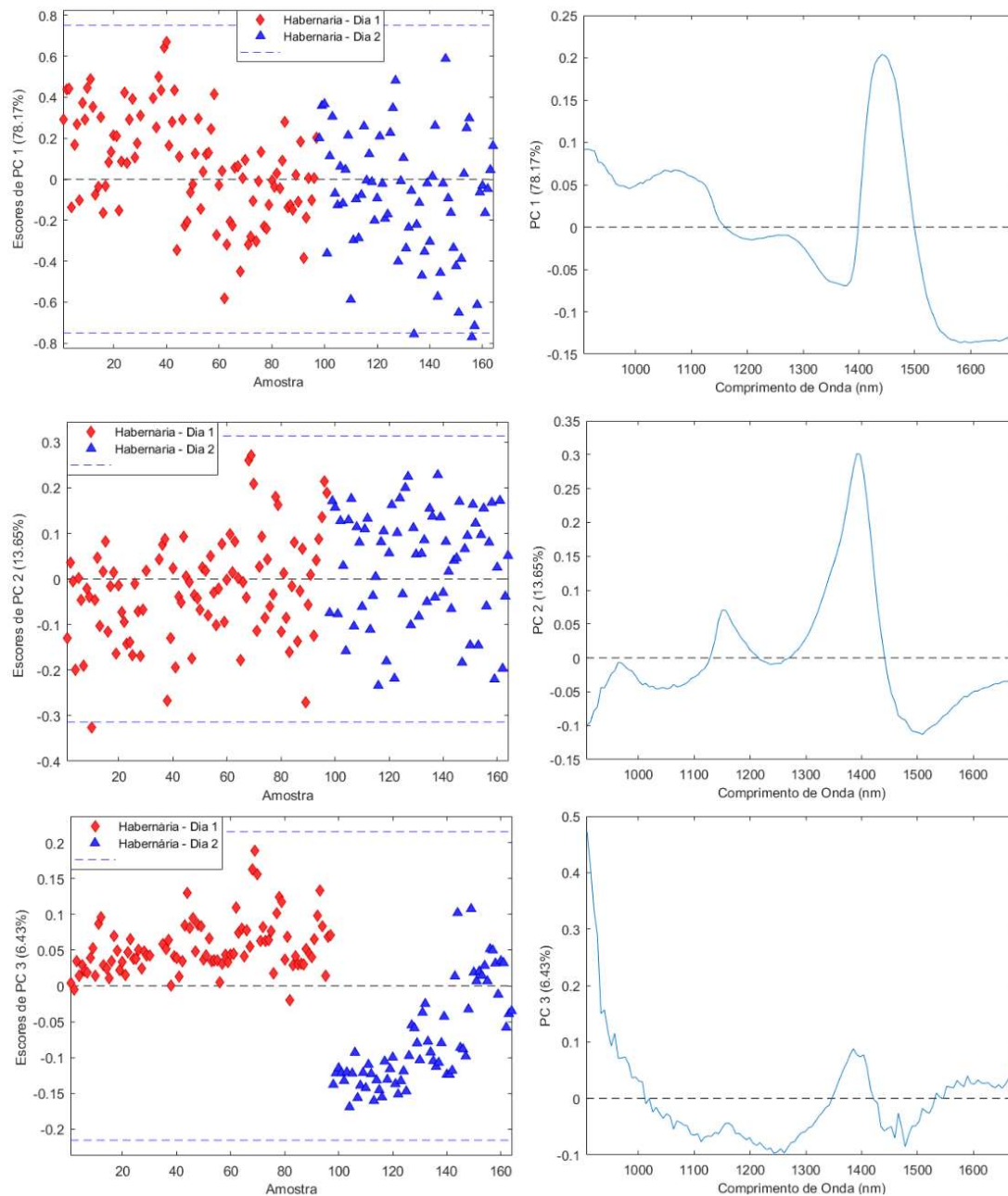


Figura 24. Gráfico de Escores (esquerda) e Pesos(direita) da espécie *Habernaria* em ambos os dias de análise

#### 4.5. Modelo PCA dos dados da espécie *Mesadanella* nos dois dias de análises

De forma análoga, foi gerado um outro modelo de PCA, agora, da espécie *Mesadanella* nos dois dias de análises para verificar se existia algum tipo de diferenciação entre as espécies em função da idade ou da presença de

fungos. O modelo contendo apenas três componentes principais reteve 98,78% da variância total dos dados, sendo PC1 responsável por 80,91%, PC2 por 11,85% e PC3 por 6,02%.

Ao se inspecionar o gráfico de escores PC1 e PC2 da figura 25, nota-se que a informação presente nestas duas componentes não separa as amostras em função da idade da planta. Novamente, em PC3, que apresenta 6,02% da variância total dos dados, observa-se uma maior separação das amostras, sendo essa componente a que contém informações que conseguem separar as espécies em função da idade ou presença de fungos.

Assim como nas seções anteriores, os pesos mais positivos se localizaram na região de 900nm. Essa região do espectro é mais responsável pela separação da espécie *Mesadanella* no primeiro dia. Já para o segundo dia, está relacionado com os pesos mais negativos, sendo a região próxima de 1120nm a mais importante.

A ligação química presente nessa parte de 900nm é característica de uma interação CH<sub>3</sub>, essa região é mais presente no primeiro dia de análise, entretanto, no segundo dia apresenta uma ligação química característica em 1220nm relacionada à presença de uma cadeia aromática (relacionada à transições de cadeias aromáticas).

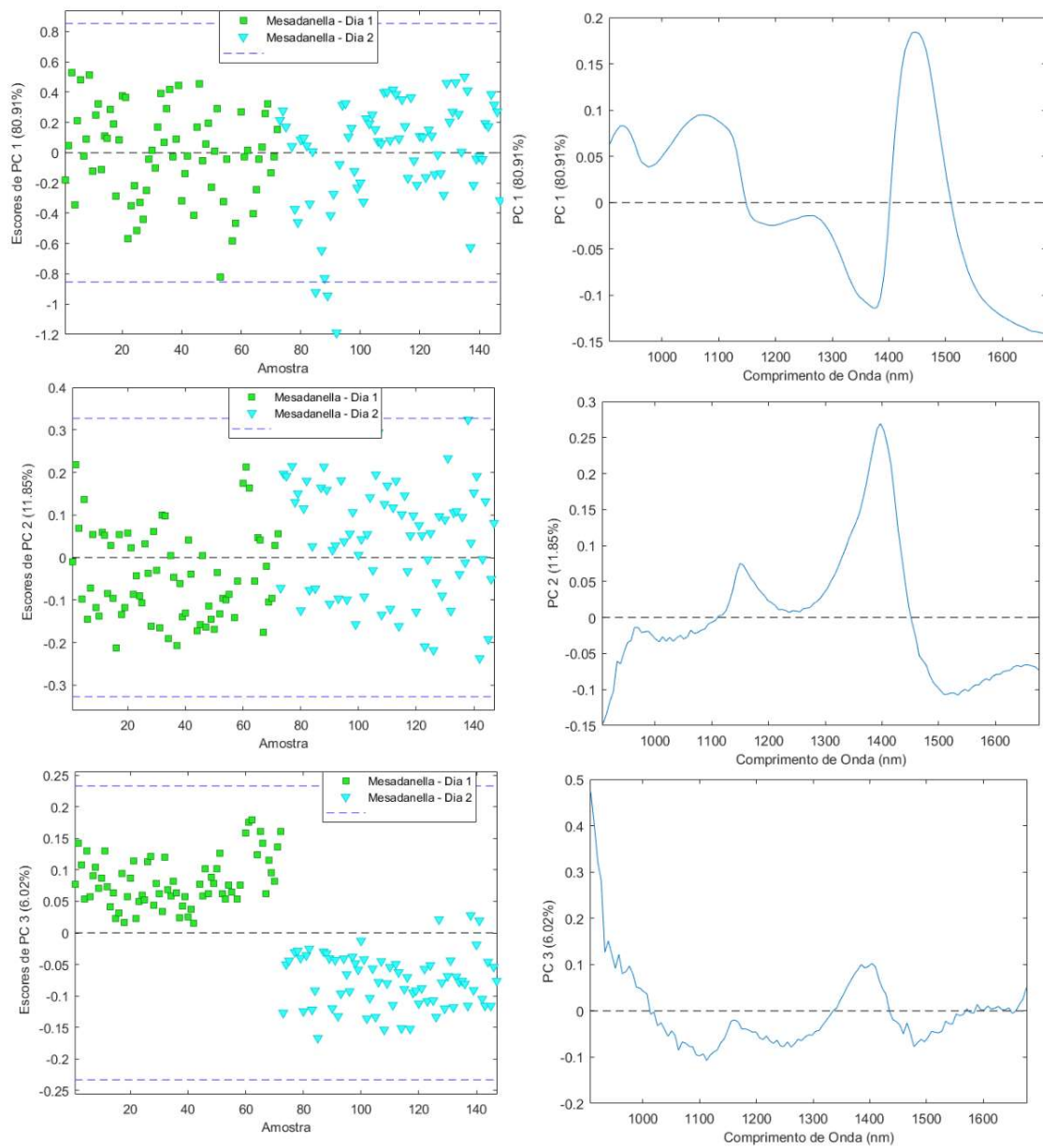


Figura 25. Gráfico de Escores e Pesos das espécies *Mesadanella* em ambos os dias de análise

#### 4.6. Modelo PCA dos dados das espécies *Habenaria* e *Mesadanella* nos dois dias de análises

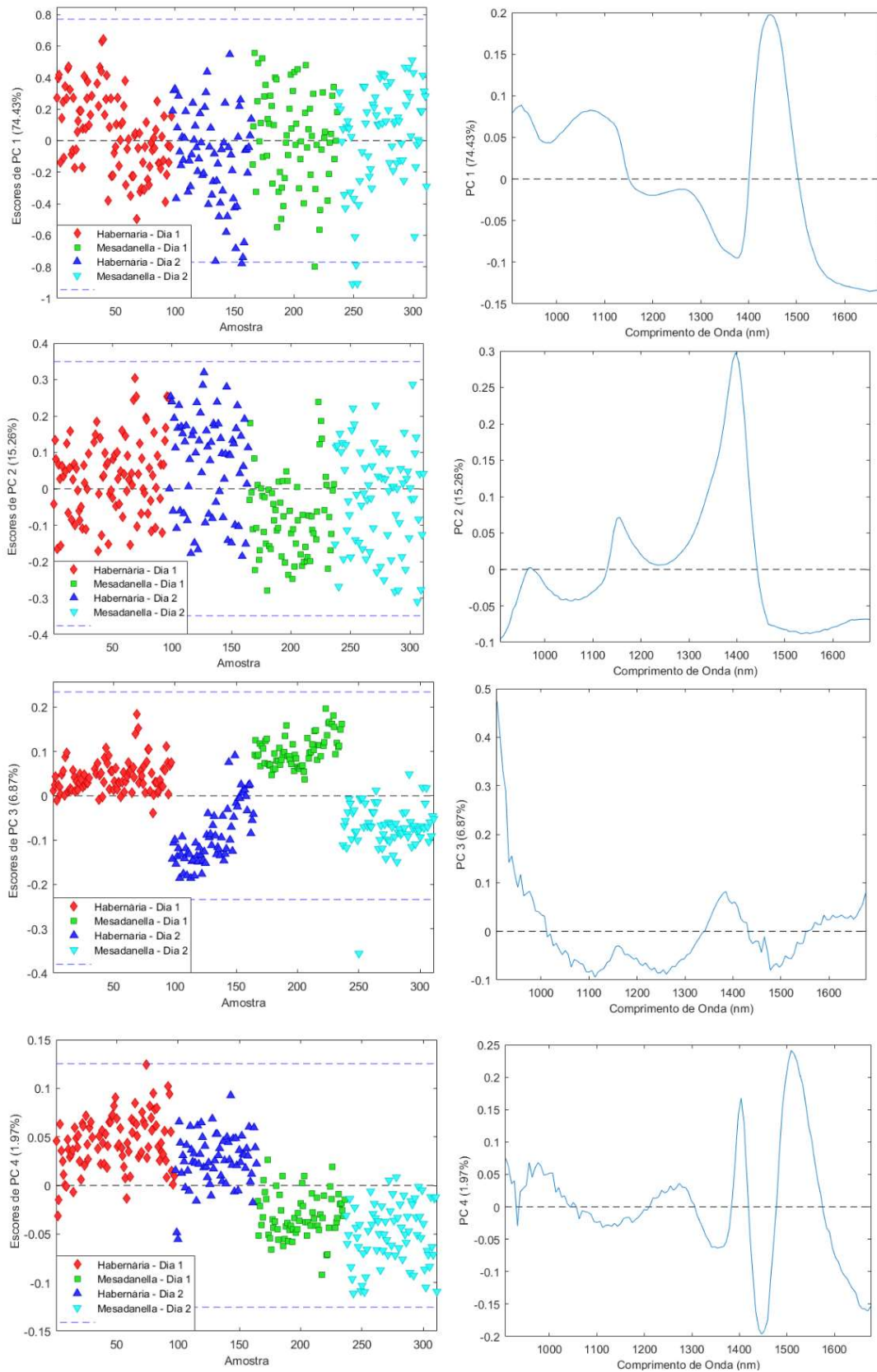


Figura 26. Gráfico de Escores e Pesos de ambas as espécies em ambos os dias de análise na parte superior

Foi gerado um modelo de PCA das duas espécies nos dois dias de análises para verificar se as separações entre espécies e por estágio de crescimento ou presença de fungos se manteriam quando todos os dados fossem analisados simultaneamente. Esse modelo conteve quatro componentes principais, que reteve 98,53% da variância total dos dados, sendo PC1 responsável por 74,43%, PC2 por 15,26% e PC3 por 6,87% e PC4 por 1,97%.

Observando a PC1 e a PC2 gerada, nota-se que a informação presente nestas duas componentes, que novamente representa a grande parte da variação espectral dos dados, não separa bem as amostras em função da idade da planta ou espécie, sendo a dispersão praticamente aleatória no gráfico de escores de PC1 e uma leve tendência a separação em PC2. Em PC3 e PC4, observa-se uma separação bem mais nítida das amostras, em função dos dias de medida e espécies.

Em PC3, que apresenta apenas 6,87% da variância dos dados, observa-se uma separação das amostras que contém informações que conseguem separar as espécies em função dos dias. Em PC4, que apresenta 1,97% da variância dos dados, observa-se uma separação das amostras que contém informações que conseguem separar ambas as espécies.

Para identificar qual ligação química está mais responsável por essa separação das espécies em ambos os dias, foi interpretado o gráfico de pesos de PC3 e PC4.

Os pesos de PC3 mais positivos estão localizados na parte inicial do espectro na região de 900nm. Essa região do espectro é mais responsável pela separação do primeiro dia de análises. Já para o segundo dia, está relacionado com a parte negativa do espectro, principalmente próxima à região de 1120nm e 1240nm .

Os pesos de PC4 mais positivos estão localizados na região de 1400nm (característica de transições de ligações C-H de grupos -CH<sub>2</sub>) e a região aromática de 1550nm. Essa região do espectro é mais responsável pela separação da espécie *Habenaria*. Já para o segundo dia, está relacionado com a parte negativa do espectro na região de 1450nm característica de transições

de ligações C-H de grupos -CH) que é mais responsável pela separação da espécie *Mesadanella*.

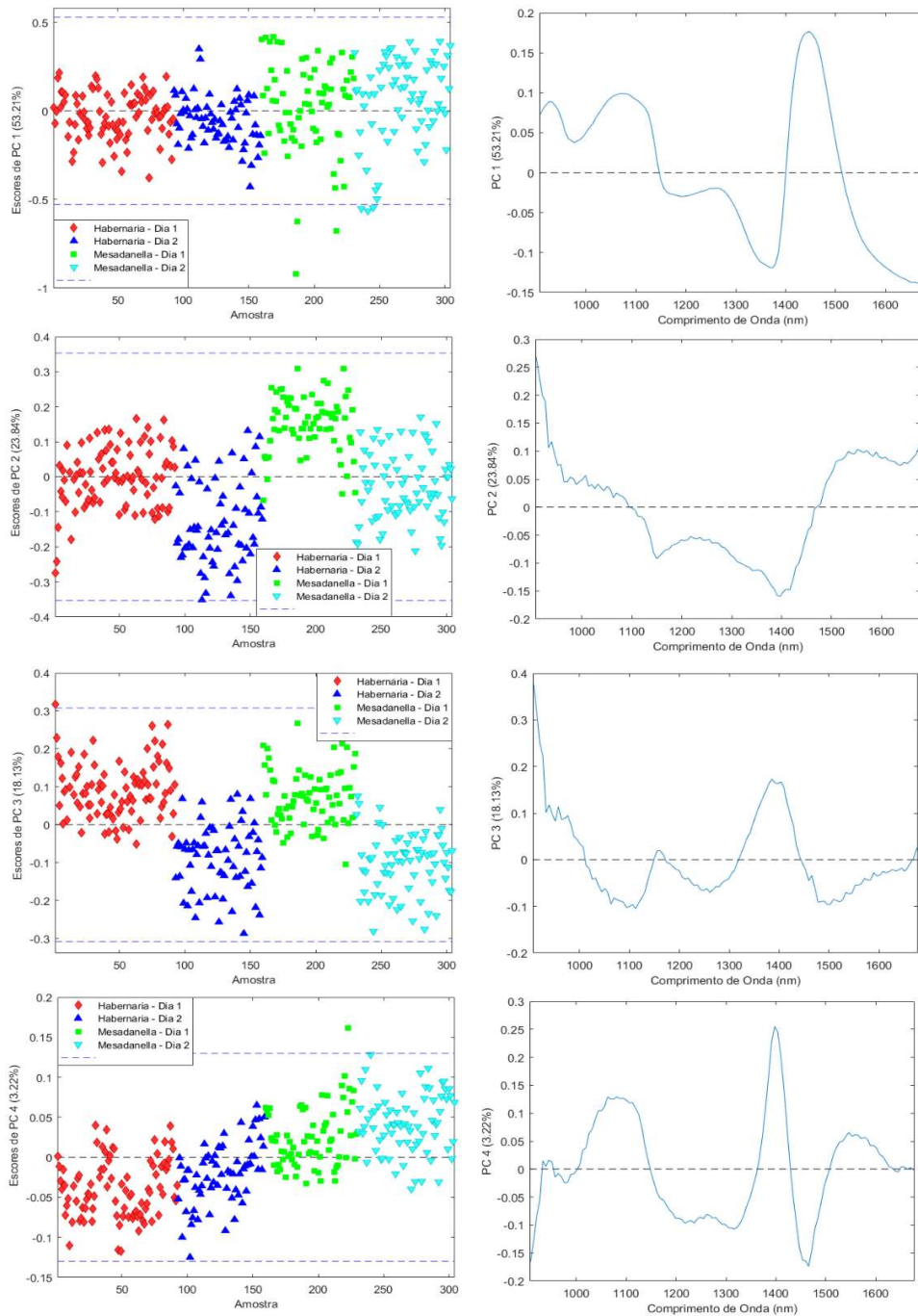


Figura 27. Gráfico de Escores e Pesos de ambas as espécies em ambos os dias de análise na parte inferior

A figura 27 apresenta os resultados análogos da figura 26, mas calculados com os dados obtidos na parte inferior da folha. Esse modelo foi



utilizado como base para escolha da superfície (inferior ou superior) da folha que seria utilizado na discussão detalhada do trabalho.

A escolha se baseou principalmente no gráfico de Escores de PC3, que consegue separar as espécies. No gráfico de PC3 da parte superior da folha foi observado uma separação melhor do que no gráfico de PC3 da parte inferior, que apresenta uma maior sobreposição entre os escores das espécies.

Devido aos escores de PC3 e PC4 da parte superior da folha apresentar uma melhor separação das espécies, foi plotado um gráfico PC3xPC4 onde se tem uma separação mais nítida de todos os fatores envolvidos neste trabalho.

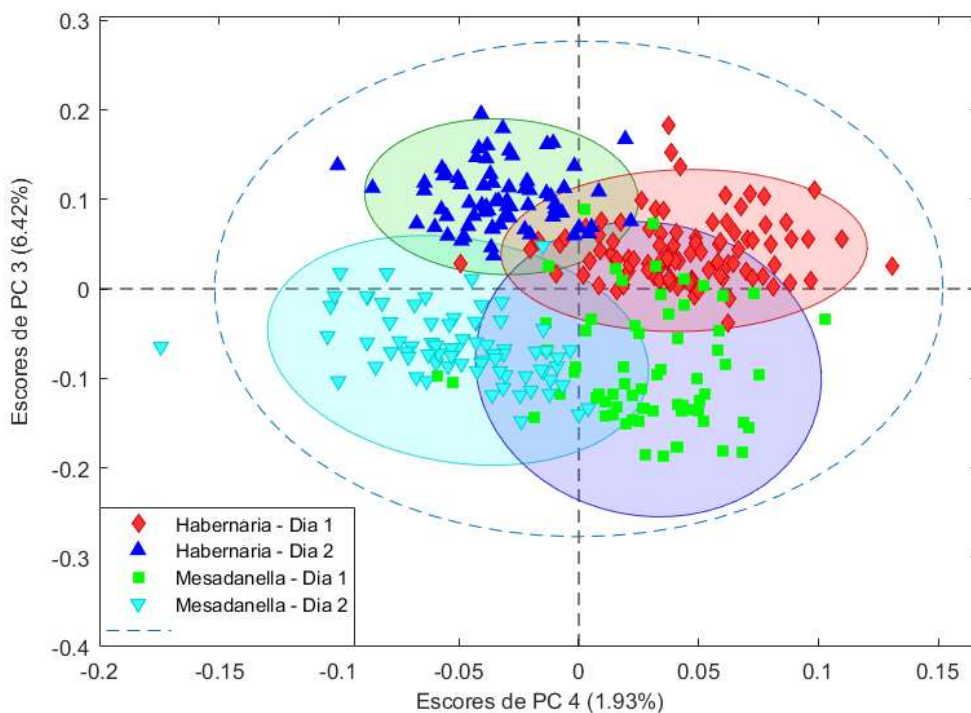


Figura 28. Gráfico de Escores PC3xPC4

A análise das elipses é capaz de separar razoavelmente tanto as espécies quanto as plantas em função da idade ou presença de fungos. Mesmo as elipses tendo uma região em comum com as outras, é possível conseguir diferenciar as regiões de cada uma das espécies em cada dia de análise.



## 5. Conclusão

Devido que a necessidade de um método mais simples de identificação de espécies de orquídeas, neste trabalho foi testado a perspectiva de tentar diferenciar espécies de orquídeas por NIR. A diferenciação de duas espécies de orquídeas (*Habenaria* e *Mesadanella*) foi explorada com a utilização de um modelo PCA.

Dois fatores foram levados em conta, o primeiro foi a proposta inicial do trabalho de conseguir diferenciar as duas espécies de orquídeas com base nos dados adquiridos no NIR. O segundo fator analisado, veio em consideração da influência da data de realização de uma medida para outra (fator que também foi influenciado pelo ataque de fungos), visto que a composição química presente nas folhas pode sofrer alguma alteração em função desses fatores.

Para a diferenciação de espécies foi observado que é possível de distinguir uma planta da outra com as análises NIR com 99% de confiança. Em relação a diferenciação da idade da planta, foi observado que também é possível diferenciar as plantas com base na idade ou presença de fungos. Contudo, se por um lado essa diferenciação em função de idade e presença de fungos é interessante e pode ter aplicações voltadas para a identificação de fungos e seu combate por fungicidas, considerando o foco em identificação de espécies, essa diferenciação também representa um problema a ser investigado em futuros trabalhos.

Deve-se saber se o espectro NIR de uma planta funciona como uma identidade da espécie, independentemente da idade ou estágios de evolução ou presença de fungos podem atrapalhar a identificação das espécies. Esse fator dever ser pensado quando se leva em consideração que a composição química da planta muda conforme a planta envelhece.

Ainda assim, a análise NIR se mostrou capaz de fazer uma diferenciação preliminar promissora de espécies de orquídeas empregando análise não supervisionada por PCA

## 6. Referências Bibliográficas

- [1] **Biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade> Acesso: 14/01/2023
- [2] Garcia, G. B. L. A conservação da fauna e da flora silvestre no Brasil: A questão do tráfico ilegal de plantas e animais silvestres e o desenvolvimento sustentável. **Revista Jurídica**. Brasília, v. 9, n. 86, p.134-150, ago./set., 2007
- [3] Pastore, T. C. M.; Braga, J. W. B.; Coradin, V. T. R.; Magalhães, W. L. E.; Okino, E. Y. A.; Camargos, J. A. A.; Muñiz, G. I. B.; Bressan, O. A.; Davrieux, F. *Near infrared spectroscopy (NIRS) as a potential tool for monitoring trade of similar woods: Discrimination of true mahogany, cedar, andiroba, and curupixá*. **Holzforschung**, Vol. 65, pp. 73-80, 2011.
- [4] Soares, L.F.; Silva, D.C.; Bergo, M.C.J.; Coradin, V.T.R.; Braga, J.W.B.; Pastore, T.C.M. Avaliação de espectrômetro NIR portátil e PLS-DA para a discriminação de seis espécies similares de madeiras amazônicas. **Quim. Nova**, Vol. 40, No. 4, 418-426, 2017.
- [5] Workman, J.; Mobley, P. R.; Kowalski, B. R.; Bro, R. Review of chemometrics applied to spectroscopy: quantitative and qualitative analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, 31 (1-2):73-124, 1996.
- [6] Pansarin, L.M; Ferreira, A.W.C; Pereira, E.F; Miranda, M. **A Família Orchidaceae**. Laboratório de Biologia Molecular e Biossistemática de Plantas. 2018. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://sites.ffclrp.usp.br/lbmbp/index.php/p/familia> Acesso: 17/01/2023
- [7] Silva, M.F.F; Silva, J.B.F. Orquídeas Nativas da Amazônia Brasileira. **Rev. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi**. 2ª Edição. Belém-Pará. 2010.
- [8] Lima, J.H. Desenvolvimento de protocolos para o cultivo in vitro de espécies de *Cyrtopodium* nativas do Cerrado com potencial ornamental. **Tese de Doutorado**. Universidade de Brasília – Instituto de Ciências Biológicas. Brasília. 2022.

- [9] Sousa, A.E.R. Conhecendo as Orquídeas do Pará. **Rev. Belém: Museu Paraense Emílio Goeld.** 23ª Feira Pan-Amazônica do Livro e das Multivozes. Belém-Pará. 2019.
- [10] Nicolau, P.B. Conhece a flor das Orquídeas?!. **Lusorquídeas.** Vol. IX, nº11. 2017. pg 24-26.
- [11] Phelps, J. *A BLOOMING TRADE: Illegal trade of ornamental orchids in mainland Southeast Asia (Thailand, Lao PDR, Myanmar).* **TRAFFIC.** Selangor, Malásia. 2015.
- [12] Muraoka, T.R. Tráfico de fauna silvestre pelos correios no Brasil: uma análise quantitativa e qualitativa. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal de Santa Catarina – Centro de Ciências Biológicas. Florianópolis, 2019.
- [13] **Unctad quer mais atenção internacional com o tráfico de plantas.** ONU News: Perspectiva Global Reportagens Humanas. 2016. Disponível em: <https://news.un.org/pt/audio/2016/10/1187291> Acesso: 18/01/2023
- [14] Fernandes, G.W; Santos, R; Barbosa, N.P.U; Almeida, H.A; Carvalho, V; Angrisano, P. Ocorrência de plantas não nativas e exóticas em áreas restauradas de campos rupestres. **Planta Daninha 33.** 2015.
- [15] Hughes, F.; Vitousek, P.M. *Barriers to shrub reestablishment following fire in seasonal submontane woodland in Hawaii.* **Oecologia.** v. 93, n. 4, p. 557-563, 1993.
- [16] Skoog, D.A; West, D.M; Hooler, J.F; Crouch, S.R. **Fundamentals of Analytical Chemistry.** 9<sup>th</sup> ed. Cengage Learning. 2013
- [17] Ferreira, M.M.C; Antunes, A.M; Melgo, M.S; Volpe, P.L. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova.** Vol. 22. 1999.
- [18] Alves, C.A.V. Análise Multivariada Aplicada as Ciências Agrárias: Análise de Componentes Principais. **Programa de Pós-Graduação em Agronomia.** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. UFRRJ. Seropédica – Rio de Janeiro. 2008.

- [19] Ferreira, M. M. C. **Quimiometria Conceitos, Métodos e Aplicações**. Editora Unicamp: Campinas, 2015.
- [20] Magalhães, L.O; Arantes, L.C; Braga, J.W.B. Identification of NBOMe and NBOH in blotter papers using a handheld NIR spectrometer and chemometric methods. **Microchemical Journal**. Vol. 144. P. 151–158. Brasília – Distrito Federal. 2019.
- [21] **A prensa para a secagem de plantas**. Escola de Botânica. 2022. Disponível em: <https://www.escoladebotanica.com.br/post/prensa> Acesso: 08/05/2023
- [22] **IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)** (1991). Manual técnico da vegetação brasileira. Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro, Brasil, 92 pp.
- [23] Thiers, B. (2021). Index herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff [continuously updated]. **New York Botanical Garden's Virtual Herbarium**. <http://sweetgum.nybg.org/science/ih>. Acesso: 01/03/2023