UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAIO BRUNO WETTERICH

Uso de imagens de fluorescência para monitoramento da evolução do cancro
cítico

São Carlos
2012

CAIO BRUNO WETTERICH

Uso de imagens de fluorescência para monitoramento da evolução do cancro
cíttrico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Básica
Orientador: Prof. Dr. Luis Gustavo Marcassa

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Wetterich, Caio Bruno

Uso de imagens de fluorescência para monitoramento da evolução do cancro cítrico / Caio Bruno Wetterich; orientador Luis Gustavo Marcassa – versão corrigida -- São Carlos, 2012.

92 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Física Básica) -- Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2012.

1. Cancro Cítrico. 2. Imagens de Fluorescência. 3. Fluorescência da Clorofila. 4. PCA. 5. SVM. I. Marcassa, Luis Gustavo, orient. II. Título.

Aos meus pais e à minha namorada pelo
carinho, motivação e apoio para o
desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar e ajudar nos momentos de angústia e dificuldades, me revelando caminhos e oportunidades para que pudesse fazer minhas escolhas.

Aos meus pais, Carmo e Maria Isabel, que tanto me apoiaram e incentivaram a continuar este trabalho, não me deixando abater pelas dificuldades encontradas. Com suas experiências de vida me ajudaram a tomar decisões importantes para o futuro. Sem vocês minha vida não teria sentido.

A minha namorada, Denise, que nesta trajetória me apoiou de forma incondicional em minhas escolhas com sua paciência e amor. Às longas conversas que me fizeram pensar e ser uma pessoa diferente. Sem ela ao meu lado as dificuldades seriam maiores.

Aos meus demais familiares, em especial meu irmão Cássio, pela sua sinceridade e alegria, que me ajudaram em momentos difíceis. À minhas avós Antonia e Rosa, madrinha Inês, tios e tias, primos e primas, que me respeitam e se orgulham pelo meu trabalho.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Luis Gustavo Marcassa pelo seu suporte e acompanhamento para o desenvolvimento deste trabalho. Sua sinceridade, opinião e nossas conversas me fizeram tomar decisões importantes sobre minhas expectativas e interesses para o futuro. Seus conhecimentos me fizeram crescer intelectualmente.

Aos meus amigos, Paulo Roberto, Jamile e Paulinho, sem vocês os fins de semana não seriam os mesmos. Paulo Roberto e Jamile, o companheirismo de vocês é muito importante. Ao Jorge e a Marina que me deram uma segunda família.

Ao pesquisador José Belasque Jr., que representava o FUNDECITRUS no suporte e coleta de amostras em nosso projeto. Aprendi muito ao seu lado sobre a citricultura. Ao Emery Lins que me ajudou muito no início desta jornada.

Aos meus amigos da Física da Unesp de Rio Claro, em especial: Adriano Otuka, Bruno Moser, Carlos Awano, Igor Fier, Luís Felipe, Renato Juliano e Tiago Botari, que fizeram do estudo da física um pouco mais fácil e alegre. Agradeço pelo apoio e amizade de vocês.

Aos meus amigos do Instituto de Física de São Carlos, em especial: Camilo, Edwin, Rodrigo (Gostosa), Anderson, Emerson, Tiago (Tafarel), Pedro, Gustavo, que ajudaram no decorrer das disciplinas de mestrado.

Aos eternos amigos do futebolzinho do fim de semana, Bruno, Éder, Diogo, Murilo, Tucci e Fernando. Ao meu amigo Sérgio, sua amizade é fundamental.

Aos amigos Mariana Aribé e Pedro Trandafilov, que me deram a oportunidade de conhecê-los e criar uma nova amizade que jamais será esquecida. “Sempre ao seu lado”.

Ao Laboratório de Interações Atômicas e ao Grupo de Fotônica pelo suporte para o desenvolvimento do projeto e pelos amigos que lá fiz: Magda, Baca, Jorge, Jader e o Prof. Dr. Cléber Mendonça.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

RESUMO

WETTERICH, C. B. **Uso de imagens de fluorescência para monitoramento da evolução do cancro cítrico.** 2012. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

A doença cancro cítrico é considerada uma das mais importantes doenças da citricultura devido ao seu poder de proliferação nas fazendas, e aos danos causados às plantas e frutos. Os prejuízos causados pela presença da doença são consideravelmente preocupantes, pois as principais medidas de controle pelos órgãos responsáveis envolve a erradicação de plantas infectadas e demais plantas vizinhas, inviabilizando economicamente grandes áreas produtivas. A legislação brasileira exige um extenso protocolo de atividades que necessita ser realizado antes da confirmação do diagnóstico. Atrasos na confirmação do diagnóstico favorecem a proliferação da doença. Assim, qualquer esforço em acelerar esta detecção deve com certeza ter um grande impacto nesta área. Esta é a motivação de nosso trabalho, onde aplicamos a técnica de espectroscopia por imagens de fluorescência em folhas de culturas cítricas com a intenção de avaliar a capacidade de diagnóstico desta técnica em plantas assintomáticas contaminadas no laboratório com cancro cítrico. O objetivo é determinar o instante de tempo mínimo necessário entre a infecção e o diagnóstico preciso da doença. Este estudo foi aplicado para experimentos envolvendo amostras destrutivas e não-destrutivas. Os resultados mostram a possibilidade de aplicar tal técnica na detecção de cancro cítrico.

Palavras-chave: Cancro cítrico. Imagens de fluorescência. Fluorescência da clorofila. PCA. SVM.

ABSTRACT

WETTERICH, C. B. Use of fluorescence imaging for monitoring the evolution of citrus canker. 2012. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The citrus canker disease is considered one of the most important citrus diseases due to its ability to spread on farms, and to damage plants and fruits. The damage, caused by the citrus canker, can be devastating, because the main control actions involve the eradication of infected plants and other plants nearby, causing large economic losses. Brazilian law requires an extensive testing protocol to confirm the diagnosis. Delays in diagnosis tests allows the spread of the disease. Therefore, any effort to accelerate this procedure will have a major impact in this area. This is the motivation of our work, where we apply the fluorescence imaging spectroscopy technique on citrus leaves with the goal to evaluate the diagnostic capability of this technique in asymptomatic plants infected with citrus canker in the laboratory. The goal is to determine the minimum time delay between infection and accurate diagnosis of the disease. This study was applied to experiments involving non-destructive and destructive samples. The results show the possibility of applying this technique in the detection of citrus canker.

Keywords: Citrus canker. Fluorescence images. Chlorophyll fluorescence. PCA. SVM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1 -	Espectros de absorção molar (linha fina), de excitação (linha tracejada) e emissão (linha grossa) da fluorescência induzida por radiação ultravioleta dos principais pigmentos presentes na folha. As clorofilas absorvem na região espectral do azul e do vermelho, sendo estes responsáveis pela coloração verde das folhas.....	36
Figura 2. 2 -	Espectro de absorção dos fotossistemas FSI e FSII, mostrando os picos de máxima absorção.....	37
Figura 2. 3 -	Proporção relativa das clorofilas em cada fotossistema. P680 e P700 representam o comprimento de máxima absorção da luz pelos pigmentos dos fotossistemas.....	38
Figura 3. 1 -	(a) Esquema da montagem do SIF, destacando os principais componentes ópticos como câmera, lentes, roda de filtros e sistema de iluminação. (b) Imagem digital do sistema completo com a excitação em 470 nm ligada.....	46
Figura 3. 2 -	Interface do painel frontal do software de aquisição de imagens de fluorescência.....	47
Figura 3. 3 -	Fluxograma do software de aquisição de imagens de fluorescência para uma amostra com excitações em 470 e 530 nm.....	48
Figura 3. 4 -	Exemplo de imagens espectrais obtidas pelo sistema de imagens de fluorescência (SIF) para uma amostra contaminada com cancro cítrico e utilizando excitação em 470 nm. (a) Imagem digital da amostra apresentando sintomas visíveis da doença. (b) e (c) Imagens espectrais da fluorescência emitida pela amostra em 690 e 740 nm em escala de cinza, respectivamente.....	49
Figura 3. 5 -	Imagem FMI1 para a amostra contaminada com cancro cítrico e excitada em 470 nm.....	51
Figura 3. 6 -	Imagens das diferentes componentes principais para várias doenças. As lesões devido ao cancro são marcantes para as componentes PC2, PC3 e PC4.....	53

Figura 4. 1 -	Imagens digitais de amostras contaminadas com cancro cítrico para os tratamentos com 1, 4, 8 e 12 furos da última semana do experimento.....	58
Figura 4. 2 -	Imagens de fluorescência em 690 nm com excitação em 470 nm para os seguintes tratamentos avaliados: a) ferimento mecânico, b) uma perfuração, c) 4 perfurações, d) 8 perfurações e e) 12 perfurações contendo a suspensão bacteriana. Folhas da espécie <i>Citrus sinensis</i> (“Hamlin”) após cinco semanas da inoculação da bactéria.....	59
Figura 4. 3 -	(a) Imagem em 690 nm para a excitação em 470 nm com a região de interesse selecionada. (b) Imagem binária obtida após o processo de escolha do ROI.....	61
Figura 4. 4 -	(a) Imagem original em 690 nm utilizando excitação em 470 nm. (b) Imagem resultante após o processamento para a seleção do ROI.....	61
Figura 4. 5 -	(a) A configuração 1 da região de interesse é proporcional ao grau de severidade da doença. (b) Na configuração 2 é selecionado somente a região de uma lesão de cancro para os diferentes tratamentos avaliados...	63
Figura 4. 6 -	Imagens das folhas contaminadas com cancro cítrico para a semana 0 (coluna da esquerda) e semana 9 (coluna da direita). A primeira ((a) e (b)) e segunda ((c) e (d)) linha apresentam as imagens espectrais da emissão em 690 nm e em 740 nm, respectivamente. A terceira linha ((e) e (f)) mostra a FMI1 de cada folha após seleção do ROI, enquanto que a última linha ((g) e (h)) apresenta os respectivos histogramas com o ajuste não linear realizado. As imagens (e) e (f) estão normalizadas pela média da área sadia das folhas.....	64
Figura 4. 7 -	Imagem digital de duas lesões de cancro cítrico em uma folha de citros. Destaca-se a região necrosada, e a região além da necrose que ainda apresenta sintomas da infecção. A região além da necrose apresenta uma cor amarelada.....	65
Figura 4. 8 -	Gráficos de PC1 x PC2 para os diferentes tratamentos avaliados: (a) ferimento mecânico, (b) 1 furo, (c) 4 furos, (d) 8 furos e (e) 12 furos contendo a suspensão bacteriana.....	67

Figura 4. 9 -	Gráficos de PC1 x PC2 para os diferentes tratamentos avaliados: (a) fermento mecânico, (b) 1 furo, (c) 4 furos, (d) 8 furos e (e) 12 furos contendo a suspensão bacteriana.....	68
Figura 4. 10 -	Gráfico de PC1 x PC2 para amostras com 12 furos das diferentes excitações.....	69
Figura 4. 11 -	Combinações de PC1 e PC2 para as excitações em 405 e 470 nm para amostras com fermento mecânico (coluna à esquerda) e 1 furo da suspensão bacteriana (coluna à direita).....	70
Figura 4. 12 -	Combinações de PC1 e PC2 para as excitações em 405 e 470 nm para amostras com 4 (coluna à esquerda), 8 (coluna centralizada) e 12 furos (coluna à direita) da suspensão bacteriana.....	71
Figura 4. 13 -	Imagens segmentadas de amostras: (a) sadias e (b) contaminadas.....	73
Figura 4. 14 -	Evolução do cancro cítrico para os diferentes graus de severidade da doença: (a) fermento mecânico, (b) 1 furo, (c) 4 furos, (d) 8 furos e (e) 12 furos.....	74
Figura 4. 15 -	PC1 x PC2 para as configurações da região de interesse e diferentes graus de severidade da doença: (a,b) 4 ferimentos mecânicos, (c,d) 2 furos, (e,f) 4 furos, (g,h) 8 furos e (i,j) 12 furos.....	78
Figura 4. 16 -	Combinações de PC1 e PC2 para as excitações em 405 e 470 nm para amostras com ferimentos mecânicos (coluna à esquerda) e 2 furos (coluna à direita) da suspensão bacteriana.....	79
Figura 4. 17 -	Combinações de PC1 e PC2 para as excitações em 405 e 470 nm para amostras com 4, 8 e 12 furos da suspensão bacteriana.....	80
Figura 4. 18 -	Evolução do cancro cítrico para os diferentes graus de severidade da doença: (a) 4 ferimentos mecânico, (b) 2 furos, (c) 4 furos, (d) 8 furos e (e) 12 furos.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BF	Blue Fluorescence
BGF	Blue-Green Fluorescence
CCD	Charge coupled device
ChlF	Chlorophyll Fluorescence
CVC	Clorose variegada dos citros
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FRF	Far Red Fluorescence
FM	Figura de Mérito
FSI	Fotossistema I
FSII	Fotossistema II
GLRaV-3	Grapevine leafroll-associated virus-3
GLD	Grapevine Leafroll Disease
GF	Green Fluorescence
HLB	Huanglongbing
LED	Light Emitting diode
LIF	Laser Induced Fluorescence
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma reduzida
PLS	Partial Least Squares

PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
RF	Red Fluorescence
ROI	Region of Interest
SIF	Sistema de Imagens de Fluorescência
SAM	Spectral Angle Mapping
SID	Spectral Information Divergence
SFF	Spectral Feature Fitting
SVM	Support Vector Machines
TVM	Tobacco Mosaic Virus

SUMÁRIO

Capítulo 1	Introdução	23
Capítulo 2	Espectroscopia Aplicada em Plantas	29
2.1	ESPECTROSCOPIA DE REFLETÂNCIA E FLUORESCÊNCIA.....	30
2.1.1	Espectroscopia de Refletância	30
2.1.2	Espectroscopia de Fluorescência	34
2.1.2.1	Técnicas e resultados sobre espectroscopia de fluorescência	39
Capítulo 3	Instrumentação e Análise.....	43
3.1	ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA	43
3.1.1	Sistema de Imagens de Fluorescência.....	43
3.1.2	Software para a aquisição de imagens de fluorescência	46
3.1.3	Imagens Espectrais de Fluorescência	50
3.1.4	Técnicas de Análise de Imagens	52
3.1.4.1	PCA – Principal Component Analysis.....	52
3.1.4.2	SVM – Support Vector Machines	54
Capítulo 4	Evolução temporal da contaminação por cancro cítrico através de imagens de fluorescência.....	57
4.1	IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA – MÉTODO DESTRUTIVO	57
4.1.1	Metodologia para a coleta das imagens de fluorescência.....	57
4.1.2	Metodologia no processamento das imagens	60
4.1.2.1	Histogramas	60

4.1.2.1.1	Resultados e Discussões da Análise das imagens por histogramas.....	63
4.1.2.2	Análise das imagens pelo método SVM.....	72
4.2	IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA – MÉTODO NÃO-DESTRUTIVO.....	75
4.2.1	Metodologia para a coleta e processamento das imagens de fluorescência	75
4.2.2	Resultados e discussões	76
4.2.2.1	Análise dos histogramas das imagens pelo método PCA.....	76
4.2.2.2	Análise das imagens pelo método SVM.....	81
4.3	Discussão comparativa dos experimentos e técnicas de análise	83
Capítulo 5 Conclusões.....		86
REFERÊNCIAS		88

Capítulo 1 Introdução

Atualmente o agronegócio tem sido um dos principais setores produtivos de alguns países, inclusive o Brasil. O Brasil é um dos grandes países exportadores de *commodities* agrícolas e insumos do agronegócio. Esses produtos são essenciais para o PIB nacional e destacam o Brasil como um dos países com maior poder de investimentos no agronegócio (1). Evidenciando a importância do agronegócio no país, o valor financeiro exportado em 2009 totalizou cerca de US\$ 65 bilhões, contra uma importação de aproximadamente US\$ 10 bilhões, promovendo um superávit comercial de US\$ 55 bilhões. Se não fosse o agronegócio, a balança comercial brasileira passaria de um superávit de US\$ 24,6 bilhões para um déficit de US\$ 30 bilhões, comprometendo a estabilidade econômica (2).

Inserido no setor do agronegócio, se destaca a citricultura, em especial, a produção de laranjas que fornece a fruta para o consumo *in natura* e para as indústrias produtoras de suco. O Brasil é o maior produtor mundial de suco de laranja, café e cana-de-açúcar, segundo na produção de soja e carne bovina, terceiro em carne de frango e milho e quarto na produção de carne suína (2). A tabela 1.1 evidencia a participação do Brasil na produção e exportação mundial de produtos agrícolas no ano de 2009. A partir da tabela 1.1, nota-se que o país detém mais da metade da produção mundial de suco de laranja e 85% de participação em exportação. Estes resultados foram apresentados em um trabalho publicado em 2010 com o título “O retrato da citricultura brasileira”, onde os autores expõem a participação do Brasil na produção de suco de laranja (2).

No cenário nacional, o estado de São Paulo se destaca como o maior produtor, respondendo por mais de 70% do total produzido no país (3). O último levantamento da safra (2011/2012) paulista de laranja divulgado recentemente pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), indica que a produção comercial de laranja está estimada em 375,743 milhões de caixas de 40,8 kg, superior à colheita da safra anterior em 26,6% que foi de 297,525 milhões de caixas.

Além do estado de São Paulo, o levantamento da Conab mostrou, ainda, os dados da safra de laranja do Triângulo Mineiro. A região vem conquistando cada vez mais espaço na produção nacional. Suas principais vantagens são a proximidade com as indústrias citrícolas de São Paulo, as excelentes condições pluviométricas e a fertilidade do solo (3). Apenas na

região de São Paulo e do Triângulo Mineiro, conhecida como Citrus Belt, o Brasil produz 53% de todo o suco produzido mundialmente (4).

O levantamento apontou, ainda, que houve redução da área de cultivo. Mesmo assim, o aumento da produção foi possível graças às condições favoráveis do clima, a evolução tecnológica das indústrias brasileiras, a disponibilidade hídrica, além do aumento das demandas nacional e internacional, resultando ganhos em produtividade.

Tabela 1.1 - Posição e participação do Brasil na produção e exportação mundial de produtos agrícolas em 2009.

Produto	Produção		Exportação	
	Posição	Participação %	Posição	Participação %
Suco de laranja	1º	56	1º	85
Café	1º	40	1º	32
Carne bovina	2º	16	1º	22
Carne de frango	3º	15	1º	38
Açúcar	1º	22	1º	45
Etanol	2º	35	1º	96
Soja (grão)	2º	27	2º	39
Soja (farelo)	4º	16	2º	25
Soja (óleo)	4º	17	2º	21
Milho	3º	6	2º	9
Carne suína	4º	3	4º	12
Algodão	5º	5	4º	9
Leite	6º	6	7º	1

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira.** Ribeirão Preto: Markestrat: Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 2010 (2).

As causas da redução da área de plantio são basicamente a rotatividade de culturas e a diminuição da produtividade das plantas adultas causada por doenças cítricas. Dentre as principais doenças cítricas destacamos o Cancro Cítrico (5), a Clorose Variegada dos Citros (CVC ou amarelinho) (6) e o Huanglongbing dos citros (HLB ou “Greening”) (5). Essas são as principais doenças responsáveis pela diminuição da produção de frutos cítricos em pomares comerciais e não-comerciais, necessitando de monitoramento constante.

A Clorose Variegada dos Citros (CVC), conhecida como amarelinho, é uma doença causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que atinge somente as laranjeiras. Restrita ao xilema da planta, a bactéria provoca o entupimento dos vasos responsáveis por levar água e nutrientes

da raiz para as folhas e frutos. A produção do pomar afetado cai rapidamente, os frutos ficam duros, pequenos e amadurecem precocemente. A bactéria é transmitida e disseminada nos pomares por insetos vetores. Como ainda não há uma forma específica de combate à *Xylella fastidiosa*, os citricultores devem implantar em seus pomares estratégias de manejo da doença (7).

O “greening” é a doença mais temida entre os produtores de laranja até o momento. A preocupação com a doença se intensifica pela sua alta capacidade de disseminação, sendo todas as variedades comerciais de citros susceptíveis à contaminação (8). O agente causal é uma bactéria que habita o floema da planta hospedeira sendo conhecida como *Candidatus Liberibacter ssp.* Há três variações para esta bactéria, *Candidatus Liberibacter africanus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus* e, a mais recentemente, *Candidatus Liberibacter americanus* que apresenta mais de 93% de similaridade com a asiática e africana (8). No Brasil, os primeiros sintomas de infecção datam de 2004 (5).

As plantas contaminadas têm como sintoma inicial o surgimento de ramos ou galhos, que se destacam pela cor amarela de suas folhas em contraste com a coloração verde das folhas dos ramos não afetados. A bactéria aloja-se no floema, e por ser uma doença que atinge o transporte de seiva, todo o metabolismo da planta pode ser afetado (8). As plantas contaminadas produzem menos frutos; além disso, esses frutos são menores, mais ácidos e produzem menos suco que os frutos de plantas sadias. Em casos severos, inviabilizam economicamente grandes áreas produtivas, sendo necessária a erradicação das plantas para o controle da disseminação da doença.

O cancro cítrico é considerado como uma das mais importantes doenças dentre aquelas que ocorrem nas plantas cultivadas. A doença ocorre nos citros, afetando diversas variedades de importância comercial (9). Acredita-se que sua origem tenha ocorrido na Ásia e a transferência para os demais continentes tenha sido por material infectado. Os primeiros relatos de ocorrência no Brasil datam do final da década de 1950 no estado de São Paulo.

O cancro cítrico principal e mais severo é o cancro tipo A ou cancro cítrico asiático, o qual é causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (10). A bactéria causadora do cancro se espalha de forma fácil e o maior agente dessa disseminação é o próprio homem, por meio do trânsito indiscriminado de pessoas pelos pomares, materiais de colheita e veículos. Os seus sintomas são bem característicos, tais como: lesões locais, circulares com até doze milímetros de diâmetro e necróticas, apresentando ocasionalmente um halo amarelado em volta da necrose; podem ocorrer nas folhas, ramos e frutos (10).

Os danos econômicos causados pela presença da doença são consideravelmente preocupantes, sobretudo por se tratar de uma doença de difícil manejo e que apresenta como principais medidas de controle a erradicação de plantas infectadas e demais plantas vizinhas (9). O atual sistema de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo funciona da seguinte maneira: inspetores credenciados do Fundecitrus fazem a inspeção dos pomares por amostragem e, quando uma planta sintomática é detectada, fazem a varredura de 100% do talhão, inspecionando todas as plantas uma a uma. Caso a contaminação seja inferior a 0,5% do talhão, a erradicação das plantas é feita num raio de 30 m em torno do foco; caso seja igual ou superior a 0,5%, todas as plantas do talhão serão erradicadas (5). Este fato nos motivou a estudar o cancro, uma vez que o diagnóstico precoce minimiza o prejuízo aos produtores.

Uma vez que uma planta é discriminada como infectada uma amostra é enviada a um laboratório credenciado pelo Governo do Estado de São Paulo para confirmar o diagnóstico do cancro cítrico (10). Um protocolo extenso de atividades deve ser executado antes do diagnóstico final. Eventualmente tais atividades aumentam o tempo de resposta do exame (11). A demora no diagnóstico da doença atrasa diretamente a erradicação das plantas contribuindo para a sua proliferação.

Atualmente equipamentos para a detecção do cancro cítrico vêm sendo estudados e desenvolvidos a fim de se aplicar diretamente nas fazendas e obter uma taxa de acerto similar às dos laboratórios credenciados, diminuindo o tempo na confirmação da doença (11). Nos últimos 25 anos, destacam-se as técnicas de espectroscopia de fluorescência que vêm sendo utilizadas significativamente em estudos de plantas e culturas agrícolas (12). A evolução da óptica tem propiciado componentes mais robustos, eficazes e menores, levando ao desenvolvimento de novos sistemas como espectrômetros, e sistemas de imagem que oferecem informação espacial e espectral do sinal emitido pela amostra (13). Tais sistemas já podem ser utilizados fora do laboratório, onde as condições ambientais são menos controladas (13). Essas informações confirmam que é possível propor um método de detecção do cancro cítrico.

A legislação brasileira exige um extenso protocolo de atividades que necessita ser realizado antes da confirmação do diagnóstico. Atrasos na confirmação do diagnóstico favorecem a proliferação da doença. Assim, qualquer esforço em acelerar a detecção do cancro cítrico deve com certeza ter um grande impacto nesta área. Essa é a linha de objetivos deste trabalho, onde propomos aplicar o sistema de imagens de fluorescência (SIF) construído a fim de avaliar a capacidade de diagnóstico da técnica em plantas assintomáticas que foram

infectadas no laboratório com cancro cítrico. Nosso objetivo foi determinar o instante de tempo mínimo necessário entre a infecção e o diagnóstico preciso da doença.

Assim, no capítulo 2 apresentamos uma revisão sobre a aplicação das técnicas espectroscópicas no diagnóstico de doenças em plantas, e em especial em citros. Destacaremos alguns experimentos envolvendo a aplicação da espectroscopia de refletância, mas com ênfase em técnicas de espectroscopia de fluorescência induzida por LASER (LIF, do inglês *Laser Induced Fluorescence*) e de imagens de fluorescência, apresentando o comportamento da fluorescência emitida em amostras como folhas e a forma de análise dos resultados.

No capítulo 3 será tratada a instrumentação utilizada neste trabalho, destacando o sistema de imagens de fluorescência construído e suas principais características, além do software para a aquisição das imagens desenvolvido pelo grupo do IFSC Junior. Também apresentaremos as técnicas que empregamos na análise das imagens de fluorescência, sendo estas: PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*) e SVM (do inglês, *Support Vector Machines*).

No capítulo 4 serão apresentados os resultados obtidos utilizando o sistema de imagens de fluorescência para experimentos com amostras destrutivas e não destrutivas. Aqui se destaca a metodologia empregada na coleta destas imagens, bem como sua metodologia de processamento. Em seguida são apresentados os resultados referentes à análise destas imagens através de duas técnicas: histogramas e SVM. Em relação à primeira técnica, apresentaremos a análise destes histogramas através de um ajuste gaussiano e pelo método de análise PCA. Também serão apresentados os resultados obtidos na aplicação da técnica SVM para o reconhecimento de padrões nestas imagens. Por fim, realizamos uma discussão comparativa entre as técnicas empregadas.

No capítulo 5 serão apresentadas as conclusões obtidas neste trabalho.

Capítulo 2 Espectroscopia Aplicada em Plantas

Este capítulo é dedicado à revisão dos principais métodos e experimentos que envolvem a aplicação de técnicas espectroscópicas no diagnóstico de doenças em plantas em geral, e em especial em citros.

Devemos ressaltar que tais técnicas espectroscópicas não têm como objetivo substituir técnicas bioquímicas de detecção de tais doenças. Atualmente, duas técnicas são utilizadas com maior eficácia para o diagnóstico das doenças, ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) baseada no isolamento e reprodução do patógeno em meio de cultura apropriado, e PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) onde é realizado o sequenciamento do DNA da bactéria e comparado com um banco de dados para a determinação do agente causal (11,13,14).

Em ambas as técnicas, um protocolo extenso de atividades deve ser realizado antes do diagnóstico. As limitações dessas técnicas estão relacionadas à demora e ao trabalho intensivo em laboratório, além de demandar um procedimento elaborado, especialmente durante a preparação da amostra para a obtenção de resultados confiáveis e precisos no diagnóstico das doenças (11). Nas doenças que afetam os citros, especificamente o cancro cítrico e o “greening”, o atraso na confirmação do diagnóstico favorece a proliferação das doenças devido à espera para a erradicação da área contaminada.

Segundo Sankaran e colaboradores (11) as técnicas moleculares poderiam ser utilizadas como ferramentas para garantir a presença das doenças nas plantas, mas não seriam ferramentas viáveis de triagem preliminar para o processamento de um grande número de amostras, devido ao tempo envolvido no processo. Portanto, existe uma demanda pelo desenvolvimento de métodos que apresentem maior rapidez, sensibilidade e seletividade no diagnóstico das doenças.

O desenvolvimento de novas tecnologias para o diagnóstico de doenças em estágios iniciais é importante para a prevenção do aumento de perdas econômicas devido à contaminação de novas plantas. Contudo, antes do desenvolvimento de novas tecnologias, é necessário desenvolver técnicas que detectem os primeiros sinais de estresse nas produções agrícolas (15). Os recentes avanços tecnológicos tem aumentado o potencial de aplicações da interação radiação-tecido para o reconhecimento de alterações no tecido biológico das plantas. Uma destas técnicas, a espectroscopia induzida por laser, vem sendo utilizada como ferramenta de estudo das plantas nas últimas duas décadas (16).

Em vista disto, técnicas espectroscópicas apresentam elevado potencial para a detecção rápida e eficiente de alterações no tecido biológico das plantas. As técnicas estudadas se baseiam em duas propriedades ópticas, refletância e fluorescência. Há duas principais técnicas experimentais, espectroscopia à fibra que apresenta resolução espectral, e espectroscopia por imagens que apresenta resolução espectral e espacial. A seguir, serão abordadas as técnicas de espectroscopia à fibra e por imagens, com ênfase na utilização de imagens de fluorescência para a análise da evolução do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) em plantas assintomáticas.

2.1 ESPECTROSCOPIA DE REFLETÂNCIA E FLUORESCÊNCIA

2.1.1 Espectroscopia de Refletância

As plantas são constituídas de três estruturas principais: a raiz, responsável por absorver do solo os minerais necessários; o caule, cuja função é sustentar e transportar os nutrientes para as folhas e as folhas que são responsáveis pelas funções vitais da planta como respiração, fotossíntese, etc. Por sua vez, a fotossíntese é a reação físico-química mais importante para os seres vivos na Terra. Através desta, os organismos são capazes de utilizar a energia luminosa para converter substâncias simples, como gás carbônico e água, em substâncias complexas que servirão de fonte de energia tanto para animais como para plantas e moléculas estruturais (17).

Em geral, as plantas absorvem a radiação luminosa na região visível do espectro eletromagnético, mais precisamente na faixa entre 400 e 750 nm. A absorção da luz é realizada através de pigmentos que compõe a planta, sendo os principais as clorofilas *a* e *b* e os carotenóides. Além de absorverem a luz, os pigmentos refletem a luz não absorvida em cores diferentes. No caso das clorofilas, estas apresentam máxima absorção na região espectral do azul e do vermelho e refletem na região do verde (13).

No balanço da radiação incidente, absorvida, refletida e transmitida, a refletância tem um papel significativo. A refletância ocorre devido à absorção e espalhamento da luz pela estrutura eletrônica da matéria, e pode informar sobre as condições da superfície ou internas do material. No estudo das plantas, a refletância tem sido utilizada para informar sobre a

variação na concentração de pigmentos, sendo uma ferramenta eficiente na detecção de qualquer alteração do seu estado fisiológico.

Atualmente a análise da refletância no estudo de plantas pode ser realizada através da aplicação da espectroscopia à fibra ou por imagens. O desenvolvimento de ambos os métodos tem permitido a caracterização de várias culturas, conduzindo a detecção de estresse, lesões e doenças nas plantas (13). A espectroscopia à fibra se baseia na análise do sinal óptico emitido em regiões espectrais, através da excitação e coleta do sinal emitido pela amostra por uma ou mais fibras ópticas. A área de detecção na amostra fica delimitada pelo diâmetro da fibra, não permitindo resolução espacial. Neste caso, a aplicação da espectroscopia à fibra em áreas maiores se restringe a realizar várias medidas na região desejada e determinar a média dos espectros coletados (13).

A espectroscopia de refletância, em geral, vem sendo estudada na região do visível e do infravermelho próximo. Estas regiões do espectro eletromagnético são conhecidas por fornecer o máximo de informação sobre os níveis de estresse das plantas, e, portanto, algumas faixas em específico destas bandas são utilizadas para a detecção de doenças em plantas (11). Um estudo de destaque na aplicação da espectroscopia de refletância foi realizado por Balasundaram e colaboradores (18), onde utilizaram um espectrofotômetro na região do visível e infravermelho para a coleta dos espectros de refletância de amostras de toranjas, variedade suscetível ao cancro cítrico. A intenção do estudo foi determinar comprimentos de onda que pudessem ser utilizados para a discriminação do cancro cítrico de outras doenças contidas na casca do fruto. A análise estatística foi realizada sobre os espectros de refletância, permitindo discriminar todas as toranjas contaminadas por cancro cítrico.

Naidu e colaboradores (19) em seu estudo investigaram o potencial da aplicação da espectroscopia de refletância para a discriminação de folhas de videiras (*Vitis vinifera* L.) infectadas e não infectadas pelo vírus GLRaV-3 (*Grapevine leafroll-associated virus-3*), além do desenvolvimento de técnicas não-invasivas para diagnóstico em tempo real no campo da doença. Um espectrômetro portátil foi utilizado para a coleta dos espectros de refletância das folhas destacadas de plantas saudáveis e infectadas pelo vírus GLRaV-3 no intervalo entre 350 e 2500 nm. Diferenças específicas nos índices de vegetação, e no intervalo de comprimento de onda foram observadas entre folhas infectadas e não infectadas nas seguintes regiões do espectro eletromagnético: verde (500 nm), infravermelho próximo (900 nm) e na metade do infravermelho (entre 1600 nm e 2200 nm) (19).

Análises sobre os espectros de refletância foram realizados para classificação das folhas infectadas com e sem sintomas visíveis em comparação com folhas saudáveis. Os

resultados sugerem que diferenças na medida da refletância das folhas em comprimentos de onda específicos possibilitam a discriminação das videiras contaminadas pelo vírus GLRaV-3. A aplicação da técnica de espectroscopia de refletância em videiras é uma ferramenta promissora devido ao seu custo/benefício, além de se tratar de um método não destrutivo para o diagnóstico da doença GLD (*Grapevine Leafroll Disease*) no campo (19).

Huang e Apan (20) examinaram o potencial da análise de hiperespectros para a detecção de sintomas da doença *Sclerotinia* em culturas de aipo. Um espectrômetro portátil foi utilizado para a coleta de espectros de refletância de folhas saudáveis e contaminadas no campo. Este sistema coleta espectros de refletância no intervalo entre 350 a 2500 nm. Os espectros foram analisados segundo modelos de regressão PLS (do inglês, *Partial Least Squares*). Além disto, a primeira e segunda derivadas foram realizadas sob os espectros para testar sua eficácia na diminuição do desvio quadrático médio durante a validação do modelo desenvolvido (20).

A partir destas análises foi possível verificar que o modelo baseado nos espectros de refletância apresenta um desvio quadrático médio menor em relação a primeira e segunda derivadas. Segundo este trabalho, a refletância na região do visível e do infravermelho (400-1300 nm) apresenta capacidade semelhante de detecção dos sintomas da doença comparada com toda a região do espectro (400-2500 nm). Os resultados referentes de validação cruzada mostram que a incidência da doença em aipos pode ser observada utilizando os espectros, e sua primeira e segunda derivadas, com erro variando entre 11-14% (20).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de sistemas ópticos capazes de formar imagens com resolução espectral tem possibilitado maior precisão no diagnóstico de doenças que afetam as culturas agrícolas. As imagens espectrais combinam a técnica de espectroscopia, mas com a formação de imagens digitais, o qual permite a análise de sinais ópticos das amostras através de informação espacial e espectral. Nestes sistemas, o elemento principal é um dispositivo óptico que permite a seleção do comprimento de onda de interesse.

Neste contexto, imagens de refletância na região do visível e/ou do infravermelho permitem a detecção de defeitos e doenças em frutas, além de sintomas de estresses em folhas (21,22). Imagens de refletância estão associadas com as características visuais das amostras, sendo exploradas cores e intensidades advindas destas. Destaca-se a análise de imagens de refletância no estudo de lesões de cancro cítrico em frutas de citros (23,24).

Qin e colaboradores (23) em 2008 investigaram o potencial da utilização da técnica de imagens hiperespectrais para detecção de lesões de cancro cítrico e outras doenças que afetam as cascas de toranjas. Neste estudo utilizaram um sistema portátil para a aquisição de imagens

hiperespectrais constituído por uma unidade de transporte das amostras, uma fonte de excitação, além de um sistema de aquisição de imagens hiperespectrais. Imagens de refletância foram coletadas na região entre 400 e 900 nm de amostras sadias e contaminadas com cancro cítrico, além de outras doenças que afetam a casca das toranjas (23).

As imagens hiperespectrais de refletância foram analisadas segundo o método PCA para a redução da dimensão espectral destas imagens e extração de características importantes que pudessem ser utilizadas na discriminação de amostras com cancro cítrico em relação a amostras sadias e com outras doenças. A partir da aplicação do método PCA, do processamento das imagens e do desenvolvimento de algoritmos de classificação, obteve-se precisão de 93% na discriminação do cancro cítrico. Além disto, identificaram quatro comprimentos de onda (553, 677, 718 e 858 nm) na região do visível e do infravermelho que apresentam melhores características para discriminação das doenças. Identificados estes comprimentos de onda pode-se desenvolver um sistema de imagens multiespectrais para a detecção do cancro em tempo real (23).

Na continuação do trabalho, Qin e colaboradores (24) aplicaram o método de divergência da informação espectral (SID, do inglês *Spectral Information Divergence*) para classificação do cancro cítrico. Este método foi baseado na quantificação de similaridades espectrais utilizando um espectro de referência pré-determinado de cancro cítrico. Neste trabalho a taxa de precisão na classificação do cancro cítrico em relação às demais doenças subiu para 96% (24). Em ambos os trabalhos demonstra-se que a técnica de imagens hiperespectrais de refletância em conjunto com métodos de classificação de imagens (PCA ou SID) pode ser utilizada para discriminar o cancro cítrico das demais doenças que apresentam características similares.

Imagens de refletância têm sido amplamente utilizadas em conjunto com aeronaves e satélites em estudos de sensoriamento remoto do meio ambiente, detecção de deficiências minerais e doenças que afetam as culturas agrícolas (25,26). Lee e colaboradores investigaram a viabilidade da aplicação de imagens hiperespectrais aéreas na detecção do “greening” em culturas de citros. O objetivo do estudo foi identificar o “greening” nas copas das árvores utilizando imagens hiperespectrais, classificando as através das técnicas de mapeamento do ângulo espectral (SAM, do inglês *Spectral Angle Mapping*) e ajuste de características espectrais (SFF, do inglês *Spectral Feature Fitting*). Os autores não obtiveram alta precisão na classificação das copas contaminadas devido a grande variabilidade dos dados (26).

A comparação nestes estudos sempre foi entre amostras doentes e sadias, sendo que nunca se comparou amostras para diferentes doenças. Em geral, doenças diferentes podem

acarretar em mudanças iguais na refletância, sendo assim deficiente em especificidade. Mudanças na concentração de alguns pigmentos podem levar ao mesmo sintoma visual, dificultando o diagnóstico de algumas doenças cítricas. Diagnósticos incorretos devido à incapacidade em discriminar as doenças podem levar a intervenções erradas com sérias consequências econômicas (27).

2.1.2 Espectroscopia de Fluorescência

A técnica da espectroscopia de fluorescência tem apresentado um grande número de aplicações nos mais diversos ramos do conhecimento (11). A aplicação desta técnica na citricultura permite analisar a fluorescência emitida pelos pigmentos da folha e estudar, indiretamente, os estados fotossintéticos da planta e dessa forma identificar a influência das condições ambientais sobre o seu rendimento.

A molécula ao absorver a energia luminosa vai para um estado mais excitado, o qual é mais instável que o estado menos energético, permanecendo por um curto intervalo de tempo neste estado. O excesso de energia acumulada é liberado para que ocorra a transição para um estado mais estável. A energia absorvida pode ser dissipada através de três processos: fluorescência (F), dissipação fotoquímica (Ph) e dissipação não-fotoquímica (D) (30).

A dissipação fotoquímica compreende a conversão da energia luminosa em energia de ligações químicas contida nos produtos finais da fotossíntese e o consumo de energia nos processos metabólicos. A dissipação não-fotoquímica está relacionada principalmente com a conversão da energia luminosa em calor, sendo este um processo de dissipação não-radiativo, enquanto que a re-emissão dos fótons na forma de fluorescência é um processo radiativo (34).

Os três processos de dissipação da energia luminosa pelas moléculas de clorofila são competitivos, ou seja, alterações nas taxas fotossintéticas e na dissipação do calor implicarão em alterações na emissão da fluorescência. Logo, alterações na emissão da fluorescência podem mostrar a ausência ou presença dos processos fotossintéticos. As mudanças no rendimento da fluorescência emitida pelas moléculas de clorofila foram inicialmente observadas por Kautsky em 1960 (35).

Nos estudos científicos da espectroscopia de fluorescência em plantas e culturas agrícolas algumas biomoléculas já foram estudadas. Entre elas se destacam o ácido ferúlico, NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma reduzida), FAD (Flavina

Adenina Dinucleotídeo), rubisco, e clorofilas *a* e *b*. Estas biomoléculas estão presentes na estrutura das folhas e são responsáveis pela absorção da luz do ambiente, além de exercerem outras funções bioquímicas (28).

Os principais pigmentos são as clorofilas *a* e *b* e os carotenóides, pois estão presentes em maior quantidade na estrutura das folhas e consequentemente absorvem maior quantidade de energia, e assim são os mais estudados por espectroscopia de fluorescência. Esses pigmentos são divididos em dois grupos devido à sua funcionalidade, os pigmentos acessórios e o pigmento principal. Os pigmentos acessórios têm a função de absorver a luz do ambiente e entregar a energia para o pigmento principal; esse grupo é constituído pelos pigmentos da clorofila *b* e dos carotenóides. O pigmento principal é a clorofila *a*; ela também absorve luz do ambiente, mas sua principal função é capturar a energia dos pigmentos acessórios e entregá-la aos centros de reação para ocorrência da fotossíntese (13). Os centros de reação da fotossíntese são formados por dois fotossistemas, chamados fotossistema I (FSI) e fotossistema II (FSII).

A figura 2.1 apresenta um conjunto de gráficos adaptado da referência (28) que contém o espectro de absorção molar (linha fina) e emissão (linha grossa) da fluorescência induzida por radiação ultravioleta (UV-350 nm) dos principais pigmentos presentes na folha. A partir do gráfico nota-se que a radiação UV é a principal fonte de radiação para induzir a fluorescência do ácido ferúlico, NADPH, FAD e do rubisco. A fluorescência destes pigmentos ocorre na região entre 400 e 550 nm, enquanto que as clorofilas absorvem fortemente entre 400 e 500 nm (azul-verde) e entre 600 e 700 nm (vermelho). Além disto, é importante notar que as próprias clorofilas reabsorvem a sua fluorescência emitida na região espectral do vermelho (28).

A figura 2.2, adaptada da referência (33), detalha melhor o espectro de absorção dos fotossistemas FSI e FSII. O fotossistema I possui um centro de reação denominado P700, enquanto que o centro de reação do fotossistema II é denominado de P680. É entre os fotossistemas I e II que ocorre o fluxo de elétrons devido à absorção da radiação luminosa (29).

Figura 2. 1 - Espectros de absorção molar (linha fina) e emissão (linha grossa) da fluorescência induzida por radiação ultravioleta dos principais pigmentos presentes na folha. As clorofilas absorvem na região espectral do azul e do vermelho, sendo estes responsáveis pela coloração verde das folhas. Fonte: CEROVIC, Z. G.; SAMSON, G.; MORALES, F.; TREMBLAY, N.; MOYA, I. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie*. v.19, p. 543-578, 1999 (28).

A fluorescência da clorofila é originada através da excitação das moléculas de clorofila *a* e *b* presente nos cloroplastos associados com o fotossistema II (30). As moléculas de clorofila ao absorverem a energia luminosa, sofrem um rearranjo eletrônico em suas camadas eletrônicas para que comportem a energia absorvida. Assim, cada fóton induz a

transferência de um elétron da molécula de um estado menos energético para um mais energético. Ao excitar a amostra, a clorofila *a* fluoresce em duas regiões específicas do espectro. Os picos de emissão estão presentes na região do vermelho 690 e 740 nm (31).

A fluorescência da clorofila *a* é produzida por dois fotossistemas distintos (FSI e FSII), sendo estes centros de reação constituídos de proteínas que estão envolvidos nos estágios iniciais da fotossíntese. O fotossistema I (FSI) possui máxima absorção em 700nm, sendo o pigmento do seu centro de reação chamado de P700, enquanto que o fotossistema II (FSII) possui pico de absorção em 680nm, e o pigmento do seu centro de reação é denominado P680 (32).

Figura 2. 2 - Espectro de absorção dos fotossistemas FSI e FSII, mostrando os picos de máxima absorção.
 Fonte: Lawlor, *Fotossíntese*, third edition, 2001, p. 39 (33).

Os dois fotossistemas (FSI e FSII) são interligados através de uma cadeia transportadora de elétrons. Através da figura 2.3, observa-se que FSI possui relativamente mais clorofila *a* do que clorofila *b*, comparado com FSII. A figura 2.3 representa um esquema da proporção relativa das clorofilas em cada fotossistema (34).

Figura 2.3 - Proporção relativa das clorofilas em cada fotossistema. P680 e P700 representam o comprimento de máxima absorção da luz pelos pigmentos dos fotossistemas. Fonte: DUARTE, Carlos Henrique. Detecção Óptica da Eficiência Quântica da Fotossíntese. 2003. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, p. 40, 2003 (34).

A emissão da fluorescência da clorofila *a* ocorre na região entre 650-800 nm, sendo denominada na literatura de ChlF (do inglês, *Chlorophyll Fluorescence*) (28,36). Esta é dividida em outras duas regiões, a da fluorescência no vermelho (RF, do inglês *Red Fluorescence*) entre 680 nm e 700 nm e que depende da transferência de energia da clorofila para o fotossistema FSII; e a da fluorescência do vermelho distante (FRF, do inglês *Far Red Fluorescence*) entre 730 nm e 750 nm e depende da transferência de energia da clorofila para os fotossistemas FSI e FSII (13).

A excitação ultravioleta em folhas verdes induz duas respostas distintas: a BGF (do inglês, *Blue-Green Fluorescence*) na região entre 400-600 nm, e a ChlF mencionada anteriormente (28,36). As intensidades relativas destes dois tipos de fluorescência são altamente sensíveis às propriedades intrínsecas das folhas e de fatores ambientais. Os espectros de emissão de fluorescência induzido por UV podem ser considerados como uma assinatura revelando o estado fisiológico da planta (28).

O BFG é dividido em duas regiões, a primeira é a região do azul, compreendida no intervalo entre 400 e 500 nm; a fluorescência emitida nesta região é chamada fluorescência do azul (BF, do inglês *Blue Fluorescence*). Os principais pigmentos fluorescentes nessa região são ácido ferúlico, NADP⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma oxidada) e NADPH. A outra banda ocorre na região do verde (GF, do inglês *Green Fluorescence*), compreendida entre 500 e 600 nm. Nesta região vários pigmentos são responsáveis pela fluorescência, sendo as clorofilas e os carotenóides os principais pigmentos absorvedores (13).

A intensidade relativa, obtida entre essas diferentes regiões de fluorescência, fornece informações essenciais para a análise das propriedades das folhas (29). Nestas regiões encontram-se os picos de emissão da fluorescência das folhas; na região do BGF têm-se picos em 440 nm e 520 nm, enquanto que na região da ChlF têm-se picos em 690 nm e outro em 740 nm. Na literatura, a análise dos espectros se dá verificando as mudanças de intensidade dos picos BF, GF, RF e FRF ou ainda compondo razões entre elas. Em geral a RF/FRF é utilizada para estudos sobre a eficiência fotossintética da planta; já a BF/ChlF ou a GF/ChlF são sensíveis aos estresses que as plantas estão sofrendo, especialmente por déficit de minerais (13,28).

2.1.2.1 Técnicas e resultados sobre espectroscopia de fluorescência

Nesta seção iremos abordar brevemente algumas técnicas empregadas e resultados obtidos pela comunidade científica em relação à aplicação da espectroscopia de fluorescência em plantas. São duas as técnicas aqui descritas: espectroscopia de fluorescência à fibra e espectroscopia por imagens.

A literatura científica não apresenta muitos estudos envolvendo a aplicação da espectroscopia de fluorescência em produtos ou culturas cítricas. Dentre esses estudos, destacam-se as publicações do nosso grupo utilizando o método da espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIF) para o diagnóstico de cancro cítrico e estresse hídrico. Marcassa e colaboradores (27) aplicaram a técnica LIF com o objetivo de detectar estresse hídrico e diferenciar o cancro cítrico da clorose variegada dos citros (CVC) em folhas de citros. Para a espectroscopia de fluorescência utilizou-se como fonte de excitação um laser de HeCd em 442 nm e outro de Nd³⁺:YAG em 532 nm. Os espectros coletados das folhas sob condições de estresse hídrico foram analisados através das seguintes razões de fluorescência: RF/FRF, BF/RF e BF/FRF, enquanto que amostras de cancro cítrico e CVC foram analisadas através das seguintes figuras de mérito:

$$FM_1 = \frac{\int_{650}^{800} I(\nu) d\nu}{\int_{547}^{620} I(\nu) d\nu} \quad FM_2 = \frac{\int_{712}^{750} I(\nu) d\nu}{\int_{680}^{712} I(\nu) d\nu} \quad (1)$$

A manifestação do estresse hídrico foi detectada através da variação das razões de fluorescência das folhas em diferentes comprimentos de ondas. A razão de fluorescência RF/FRF apresenta variação significativa, possibilitando observar estresse hídrico através dos espectros de fluorescência. Além disto, as figuras de mérito permitiram discriminar folhas contaminadas com cancro cítrico de folhas saudáveis. Entretanto, neste estudo não foi possível discriminar o cancro cítrico de outras doenças (27).

Na continuação deste estudo, Lins e colaboradores (16) utilizaram um sistema de espectroscopia de fluorescência portátil e coletaram espectros de folhas com sintomas de cancro cítrico, CVC, verrugose, e “greening”. Um laser de 532 nm e 10 mW de potência foi utilizado para a excitação das amostras. Espectros de folhas com sintomas visuais da doença e saudáveis foram coletados para cada planta com o objetivo de minimizar efeitos ambientais nos espectros, como deficiência de minerais e de água. A análise dos espectros, a partir de figuras de mérito, apresenta alta sensibilidade (~90%), mas uma baixa especificidade (~70%) para o diagnóstico do cancro cítrico. Segundo os autores esta baixa especificidade deve-se ao fato da fibra óptica coletar os espectros de fluorescência de uma pequena área da folha. Os autores propõem que os resultados podem ser melhorados através de técnicas de imagens de fluorescência (16).

Belasque e colaboradores (36) utilizaram o mesmo sistema de espectroscopia portátil e monitoraram a fluorescência de folhas de citros durante 60 dias para quatro diferentes condições: folhas sem estresse, folhas com estresse mecânico, folhas contaminadas com cancro cítrico, e folhas doentes e com estresse mecânico. Os espectros foram analisados com base na razão de fluorescência RF/FRF definido pela razão de intensidade de fluorescência em 685 nm e a intensidade de fluorescência em 735 nm. Também utilizaram a figura de mérito (FM) para análise dos espectros. O estudo relatou o potencial da espectroscopia de fluorescência na detecção e discriminação entre amostras doentes e com estresse mecânico (36).

O desenvolvimento de dispositivos ópticos com resolução espectral tem possibilitado maior precisão no diagnóstico de deficiências e doenças em culturas agrícolas. Esta técnica é denominada de espectroscopia por imagens, e permite a análise de sinais ópticos das amostras através de informação espacial e espectral ao mesmo tempo. A vantagem desta técnica está no fato de se obter informação com resolução espectral sobre toda a amostra, enquanto que as técnicas tradicionais de espectroscopia fornecem informação espectral de uma pequena área da amostra.

A espectroscopia por imagens de fluorescência vêm sendo aplicada em estudos sobre a atividade fotossintética das plantas, conteúdo da clorofila nas plantas, monitoramento da qualidade das frutas, e detecção de plantas doentes (21,28). De forma semelhante à espectroscopia, as regiões do espectro eletromagnético frequentemente utilizado em imagens de fluorescência são: azul (440 nm), verde (520-550 nm), vermelho (690 nm), vermelho distante (740 nm) e infravermelho (800 nm) (11,21). As imagens de fluorescência coletadas podem ser analisadas diretamente para cada faixa espectral ou também através de razões de fluorescência das diferentes faixas espectrais.

Imagens de fluorescência emitida pela clorofila são consideradas ferramentas eficientes no monitoramento de doenças em culturas agrícolas (21,37). Chaerle e colaboradores utilizando imagens de fluorescência na região do azul e do verde avaliaram a eficácia da técnica para observar a evolução da infecção pelo vírus mosaico em plantas de tabaco (TVM, do inglês *Tobacco Mosaic Virus*). Imagens de refletância em 550 nm e 800 nm foram coletadas e consideradas como imagens de referência. O sistema desenvolvido permitia a visualização da fluorescência na região do azul e verde com excitação UV, e a fluorescência da clorofila utilizando excitação UV ou azul (37).

Segundo Chaerle e colaboradores (37), há um aumento da fluorescência emitida pela clorofila, e também das regiões do azul e do verde após cerca de 40-55 horas da inoculação do vírus nas plantas de tabaco. As imagens de fluorescência demonstraram uma diferença visível entre as folhas infectadas e não infectadas em um curto intervalo de tempo (50 horas) em comparação com as imagens de referência (14 dias para sintomas visíveis da infecção). O trabalho demonstra o potencial da técnica de imagens de fluorescência para o monitoramento do vírus TVM em plantas de tabaco (37).

Bravo e colaboradores (38) combinaram imagens hiperespectrais entre 450 e 900 nm com imagens de fluorescência para detectar a doença da ferrugem amarela em culturas de trigo. Imagens hiperespectrais de plantas saudáveis e contaminadas foram coletadas utilizando um espectrógrafo. Procedimentos de reconhecimento da folha e normalização espectral, em conjunto com um modelo baseado em discriminação quadrática (QDA) permitiu diferenciar plantas doentes de saudáveis com erro de aproximadamente 10% (38).

Imagens multiespectrais de fluorescência em 450, 550, 690 e 740nm foram coletadas para as mesmas plantas utilizando excitação UV. Segundo os autores, as imagens de fluorescência em 550 e 690 nm permitem claramente distinguir plantas doentes de saudáveis. A análise discriminante quadrática (QDA) foi utilizada para diferenciar as plantas doentes das saudáveis. O método de imagens de fluorescência apresentou precisão menor, cerca de 25%

de erro na discriminação. Entretanto combinando as duas técnicas, imagens de fluorescência e hiperespectrais, o erro de classificação cai para 5%. Este resultado sugere que há potencial para o desenvolvimento de sistemas de detecção baseado em multisensores que podem ser utilizados em sistemas para controle de doenças (38).

Atualmente na literatura não há muitos relatos de publicações sobre imagens espectrais de fluorescência aplicada na citricultura. Recentemente, destaca-se o trabalho de Pereira e colaboradores (39) que aplicaram a técnica de microscopia por imagens de fluorescência para avaliar o “greening” (*Huanglongbing*) em culturas de citros. O estudo investigou a fluorescência emitida por amostras sadias e contaminadas com a bactéria do “greening”, além de avaliar o potencial da técnica para o diagnóstico precoce da infecção causada pela bactéria (39).

As plantas foram medidas mensalmente, e a evolução da bactéria inoculada nas plantas foi monitorada através da técnica RT-qPCR (do inglês, *real-time quantitative PCR*). Na análise dos dados se utilizou um método estatístico, selecionando variáveis dos histogramas de cores. A intensidade de contagem de cores verdes das imagens de fluorescência apresentaram variações menores para as plantas saudáveis em comparação com as doentes. As cores verdes escuro são indicadores de plantas saudáveis, enquanto que as cores claras são indicadores de plantas doentes. O método analítico utilizado foi capaz de diagnosticar as condições de folhas sadias de citros e doentes até o quinto mês após a infecção pela bactéria (39).

As técnicas de imagens de fluorescência são um aperfeiçoamento em relação às técnicas espectroscópicas, pois fornecem informação espectral ao longo de uma área maior. Esta técnica pode ser explorada como uma alternativa para o atual método de diagnóstico de doenças em citros (PCR) (39). As imagens de fluorescência introduzem um novo padrão de análise para discriminação de amostras sadias e doentes, com base em um método não destrutivo, que reduz o tempo e custo de análise e permite obter mais informações do que a inspeção visual realizada por técnicos capacitados.

Capítulo 3 Instrumentação e Análise

Este capítulo é dedicado à instrumentação utilizada neste trabalho. Descreveremos o sistema de imagens de fluorescência baseado em iluminação a LED construído, o software utilizado para a aquisição das imagens, além dos métodos empregados na análise destas.

3.1 ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA

3.1.1 Sistema de Imagens de Fluorescência

O sistema de espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIF) apresenta a desvantagem de analisar uma pequena área da amostra. Os sistemas para espectroscopia de imagem da fluorescência evitam esse problema, pois permite a análise dos sinais ópticos com resolução espacial e espectral ao mesmo tempo, uma vez que forma as imagens escolhendo a banda de radiação que será detectada (13).

O sistema de imagens de fluorescência (SIF) construído neste trabalho tem como principal característica seu fácil manuseio e portabilidade, podendo ser aplicado diretamente no campo através do uso de baterias automotivas convencionais. O SIF é composto por uma câmera CCD científica, um sistema de lentes, uma roda de filtros motorizada com seis posições, quatro filtros ópticos passa-banda, um sistema de iluminação a LEDs, um laptop e uma estrutura metálica para fixar os componentes e as amostras.

Há duas formas de compor imagens espectrais, mantendo o campo de visão fixo e varrendo a detecção espectral ou mantendo a detecção espectral fixa e varrendo o campo de visão. Na primeira técnica é necessária a utilização de um elemento óptico que possibilite a seleção de uma banda espectral para a detecção da fluorescência. Exemplos desses elementos são os filtros ópticos; a seleção pode ser feita eletronicamente através do uso de filtros sintonizáveis, ou mecanicamente, utilizando filtros ópticos tradicionais associados a rodas de filtros. As rodas de filtros selecionam a banda de detecção deslocando os filtros ópticos passa-banda. Na segunda técnica a informação espectral é fornecida por elementos difrativos, espectrógrafos, elementos que dispersam o sinal óptico do campo de visão para a formação de

imagens. Entretanto, para evitar a sobreposição da informação espacial com espectral, é necessário reduzir o campo de visão do sistema, o que implica a necessidade de varrer espacialmente a amostra (40).

Nosso trabalho se concentrou no desenvolvimento de um sistema de imagens de fluorescência baseado em rodas de filtros para a seleção da banda espectral de interesse. Lins em 2009 (13) utilizando um sistema de imagens hiperespectrais verificou quais as melhores bandas de emissão da fluorescência da clorofila. A partir das imagens obtidas foram escolhidos comprimentos de onda em 610, 690 e 740 nm. Além desses, o comprimento de onda em 580 nm foi adicionado, pois a fluorescência nessa região não depende do conteúdo de clorofila presente na amostra (13). Desta forma, o sistema é constituído por quatro filtros ópticos passa-banda, cujos modelos escolhidos foram: FB580-10, FB610-10, FB690-10 e FB740-10 (Thorlabs, EUA) (41). Os filtros apresentam uma largura de banda de 10 nm e uma transmissão típica de 40-55 %. A tabela 3.1 apresenta as principais características ópticas dos filtros fornecidas pelo fabricante.

Tabela 3.1 - Características dos filtros ópticos passa-banda utilizados no sistema de imagem de fluorescência.

Código	Comprimento de Onda Central	Largura da Banda	Transmissão típica dentro da banda	Transmissão fora da banda
FB580-10	580 nm	10 nm	55%	<0,01%
FB610-10	610 nm	10 nm	Entre 50% a 55%	<0,01%
FB690-10	690 nm	10 nm	58%	<0,01%
FB740-10	740 nm	10 nm	Entre 46% a 52%	<0,01%

Fonte: THORLABS. Disponível em: www.thorlabs.com. Acesso em: 07 de dezembro de 2011 (41).

O sistema de iluminação é composto por diodos emissores de luz (LEDs) monocromáticos de alta potência, aproximadamente 200 mW por diodo. Há um total de 16 LEDs divididos em quatro conjuntos. Os conjuntos são formados por LEDs em 365, 405, 470 e 530 nm. Em geral estes LEDs apresentam uma largura de banda entre 5-10 nm, mas para efeitos práticos é quase monocromático para a clorofila, a qual apresenta uma larga banda de absorção (28). Os diodos estão fixados a um suporte metálico com inclinação de 45° para a distribuição homogênea da luz sobre as superfícies das folhas, e são alimentados por uma fonte de tensão. Devido ao alto brilho dos diodos, o suporte metálico também tem como função dissipar o calor dos diodos. Os LEDs em 365 e 405 nm tem máxima eficiência quando são fornecidos 1.2 A, enquanto que para os diodos em 470 e 530 nm são fornecidos 0.7 A.

A câmera CCD utilizada foi uma mvBlueFox 120G (Matrix Vision, Alemanha). Ela possui resolução de 640 x 480 pixels na área ativa do sensor, controle eletrônico de exposição que varia entre 1 a $10^7 \mu\text{s}$ e ganho do sensor de 0 a 30 dB. As imagens formadas são monocromáticas com 8, 10 ou 12 bits por pixels. Também possui comunicação com computadores via USB 2.0 e drivers de captura de imagens para o software LabVIEW[®] (National Instruments, USA).

A roda de filtros utilizada foi o modelo FW102B (Thorlabs, USA) que comporta até seis filtros ópticos. Possui comunicação com computadores via UBS 2.0 que permite controlar e rodar os filtros através do próprio software fornecido pelo fabricante. Além disto, o fabricante fornece drivers que podem ser utilizados para o controle da roda via o software LabVIEW[®] (National Instruments, USA). A lente objetiva utilizada foi a PENTAX TV LENS 6 mm que possui controle manual do foco da imagem e da íris para atender as condições de visualização e iluminação. O foco das imagens uma vez ajustado não é preciso ficar reajustando a cada mudança de amostra.

Além disto, uma estrutura metálica no formato de uma caixa preta escura foi confeccionada para alinhar e fixar os componentes e posicionar as amostras de citros para a formação das imagens espectrais. Todos os componentes acima descritos estão posicionados na parte interna da caixa escura com a intenção de evitar luz externa. O esquema do sistema de imagem de fluorescência é apresentado na figura 3.1.a, e na figura 3.1.b mostramos uma foto digital do sistema completo inclusive com o laptop e a excitação em 470 nm ligada. As amostras das folhas de citros são fixadas na base da caixa através de duas pinças. Após a folha ser posicionada, a caixa é fechada e os LEDs são ligados através de uma fonte de tensão, onde permite o controle da intensidade luminosa. Ao ligarmos os LEDs, a amostra é excitada e a fluorescência das moléculas de clorofila é emitida, sendo as imagens de fluorescência selecionadas pelos filtros ópticos.

Figura 3.1 - (a) Esquema da montagem do SIF, destacando os principais componentes ópticos como câmera, lentes, roda de filtros e sistema de iluminação. (b) Imagem digital do sistema completo com a excitação em 470 nm ligada.

3.1.2 Software para a aquisição de imagens de fluorescência

O software utilizado para a aquisição de imagens espectrais de fluorescência foi desenvolvido no ambiente LabVIEW[®] 8.2 (National Instruments, USA) pelo grupo IFSC Junior. O software permite ajustar através de um laptop o ganho e o tempo de exposição da câmera CCD, selecionar a excitação desejada, controlar a roda de filtros, além de salvar as imagens de fluorescência conforme os filtros são selecionados. As imagens espectrais são armazenadas no formato *Bitmap*.

A figura 3.2 apresenta a interface frontal do programa desenvolvido. O painel frontal do software indica o nome da pasta e caminho em que as imagens e o arquivo TXT de controle dos dados obtidos durante a execução do programa estão sendo salvos. Além disto, informa qual excitação deve estar ligada no momento da aquisição das imagens, a posição atual da roda de filtros ópticos, e a situação inicial da roda e câmera CCD. Ao iniciar, a aquisição das imagens são selecionadas as fontes de excitação que serão utilizadas na aquisição das imagens sadias e contaminadas.

Figura 3. 2 - Interface do painel frontal do software de aquisição de imagens de fluorescência.

O software inicialmente captura as imagens de fluorescência da folha sadia para cada uma das excitações escolhidas. Na próxima etapa é informado o número de amostras em que serão coletadas suas imagens para as diferentes excitações. Em ambas as etapas são realizadas o controle de saturação. Manualmente são ajustados valores de “Ganho” e “Tempo de Exposição” da CCD, para que a câmera não apresente regiões de saturação. Alterações nestes valores podem ser visualizadas instantaneamente na tela do software para seu controle. Tentamos implementar no “software” o ajuste automático do ganho e do tempo de exposição da CCD, mas não obtivemos sucesso devido ao longo tempo necessário para tal ajuste.

Os LEDs em 365, 405 e 530 nm apresentam emissões fracas nas regiões de 580 e 610 nm. Para estas excitações coletam-se apenas as imagens de fluorescência em 690 e 740nm. Para excitação em 470 nm, o sistema coleta imagens de fluorescência em 580, 610, 690 e 740 nm. Assim ao total tem-se 10 imagens por folhas com quatro excitações distintas. Além disso, temos imagens de fluorescência em 690 e 740 nm para folhas sadias da mesma planta para as quatro excitações. Segundo Lins e colaboradores, a normalização de imagens espectrais de amostras contaminadas por imagens de folhas sadias minimiza a influência das condições ambientais sobre a análise (16). As folhas sadias são utilizadas como referência das condições do clima e ambiente sobre as plantas (42).

Um fato relevante é que o ganho de detecção da câmera nas imagens espectrais para as diferentes amostras e excitações não é o mesmo. A solução deste problema é compor razões

entre duas imagens espectrais para excluir a informação do ganho, permitindo comparar resultados de amostras com ganhos diferentes durante a captura das imagens de fluorescência. Automaticamente o software realiza razões das imagens de fluorescência e as salva na pasta da excitação correspondente, finalizando a aquisição das imagens. A figura 3.3 apresenta o fluxograma que o software segue partindo da escolha de duas excitações (470 e 530 nm) e uma amostra. No caso da escolha de excitações em 365 e 405 nm o procedimento realizado pelo software será o mesmo que mostrado para a excitação em 530 nm. Além disto, uma vez realizado o procedimento de aquisição das imagens da folha sadia, o software passa a capturar somente imagens relativas ao número de amostras informado.

Figura 3.3 - Fluxograma do software de aquisição de imagens de fluorescência para uma amostra com excitações em 470 e 530 nm.

A figura 3.4 apresenta um exemplo de imagens espectrais obtidas através do sistema desenvolvido. A amostra contaminada com cancro cítrico apresenta sintomas visuais, como

destacado na imagem digital da amostra (figura 3.4.a). As figuras 3.4.b e 3.4.c apresentam as imagens da fluorescência emitida pela amostra para comprimentos de onda em 690 e 740 nm, respectivamente, revelando a informação espacial e espectral da folha. Neste caso, a excitação utilizada foi a azul em 470 nm, com tempo de exposição de exposição da CCD em 700 ms e ganho da câmera de 7 dB.

Figura 3. 4 - Exemplo de imagens espectrais obtidas pelo sistema de imagens de fluorescência (SIF) para uma amostra contaminada com cancro cítrico e utilizando excitação em 470 nm. (a) Imagem digital da amostra apresentando sintomas visíveis da doença. (b) e (c) Imagens espectrais da fluorescência emitida pela amostra em 690 e 740 nm em escala de cinza, respectivamente.

3.1.3 Imagens Espectrais de Fluorescência

Estudos utilizando espectroscopia de fluorescência induzida a laser (LIF) indicam que os espectros obtidos podem ser analisados através de figuras de mérito (FM) (15,27,36). As figuras de mérito utilizadas foram apresentadas na equação 1. As figuras de mérito relacionam integrais de regiões espectrais de emissão da fluorescência da clorofila, onde $I(\lambda)$ representa a intensidade da fluorescência detectada pelo espectrômetro. Os dados do espectrômetro são valores discretos de intensidade, portanto, a integral de uma região é transformada no somatório de intensidades naquela mesma região, e as figuras de mérito passam a relacionar áreas do espectro (32).

No sistema de espectroscopia por imagem de fluorescência não se tem resolução espectral para a obtenção das figuras de mérito FM, pois o sistema é constituído por filtros ópticos. No entanto, os filtros apresentam uma largura de banda de 10 nm, nos permitindo interpretar como uma integral sobre a curva de transmissão do filtro (43). Portanto, as imagens em 580 nm (IM_1), 610 nm (IM_2), 690 nm (IM_3) e 740 nm (IM_4) podem ser definidas, respectivamente, como:

$$IM_1 = \int_{\text{filtro } 580nm} I(\lambda)d\lambda \quad IM_2 = \int_{\text{filtro } 610nm} I(\lambda)d\lambda \quad (2)$$

$$IM_3 = \int_{\text{filtro } 690nm} I(\lambda)d\lambda \quad IM_4 = \int_{\text{filtro } 740nm} I(\lambda)d\lambda$$

Sendo assim, as figuras de mérito de imagens (FMI) de fluorescência são definidas através da razão das imagens:

$$FMI_1 = \frac{IM_3}{IM_4} \quad , \quad FMI_2 = \frac{IM_2}{IM_3} \quad (3)$$

A figura 3.5 apresenta a razão das imagens espectrais em 690 nm por 740 nm (FMI_1) para a imagem da figura 3.4. Neste caso, a imagem espectral obtida está no padrão de falsas cores. O padrão de falsas cores é utilizado para aumentar o contraste na imagem, permitindo observar a região mais afetada pelo cancro cítrico.

Figura 3. 5 - Imagem FMI_1 para a amostra contaminada com cancro cítrico e excitada em 470 nm.

A partir da razão de imagens de fluorescência iremos acompanhar a evolução do cancro cítrico. Neste trabalho utilizaremos somente a razão de fluorescência FMI_1 , pois está relacionada diretamente com a razão RF/FRF. Segundo a literatura científica, a razão RF/FRF permite estudar os estados fotossintéticos da planta e identificar a influência da doença sobre as amostras (28). A composição de razões de imagens espectrais também exclui a informação do ganho de cada imagem, permitindo comparar resultados de amostras com ganhos diferentes durante a captura destas.

O software utilizado para a aquisição das imagens realiza a razão FMI_1 , bem como a FMI_2 . Entretanto, foi desenvolvida uma rotina computacional no software Matlab[®] (The MathWorks, EUA) para a realização de FMI_1 , e aplicação de algumas técnicas de análise nestas imagens, tais como, histogramas, PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*), e SVM (do inglês, *Support Vector Machines*) para reconhecimento de padrões em imagens. No tpico, técnicas de análise de imagens, são descritas brevemente as técnicas empregadas para a análise das imagens de fluorescência, PCA e SVM. A rotina desenvolvida para a composição da razão FMI_1 e dos histogramas, que servem como base para a aplicação do método PCA, será discutida no tpico de metodologia.

3.1.4 Técnicas de Análise de Imagens

3.1.4.1 PCA – Principal Component Analysis

O PCA é um procedimento matemático que usa uma transformação ortogonal para converter um conjunto de observações de variáveis possivelmente correlacionadas em um conjunto de valores das variáveis não correlacionadas chamadas de componentes principais. O número de componentes principais é igual ou inferior ao número de variáveis originais. Esta transformação é definida de tal forma que o primeiro componente principal tem a máxima variância possível (isto é, representa o máximo da variabilidade dos dados quanto possível), e cada componente sucedendo, por sua vez tem a maior variância possível sob a restrição de que seja ortogonal (não correlacionadas com) as componentes anteriores. PCA é uma técnica estatística muito útil e tem sido utilizado no processamento de imagens e para encontrar características únicas em dados com muitas dimensões (44).

As componentes principais do conjunto de dados de interesse são obtidas através de procedimentos matemáticos que envolvem cálculo de médias, desvios, matriz de covariância, além de determinar autovetores e autovalores desta matriz. Em geral, uma vez que os autovetores são determinados a partir da matriz de covariância, uma nova matriz é criada de forma que o primeiro elemento corresponda ao autovetor com maior autovalor, e assim sucessivamente até que o ultimo elemento da matriz corresponda ao menor autovalor. Desta forma, é possível selecionar as primeiras componentes principais com base na porcentagem de variância acumulada, e descartar as demais sem grande perda de informação.

A análise de componentes principais (PCA) é um método de análise multivariada utilizada para projetar dado n-dimensionais em um espaço de menor dimensão, normalmente duas ou três. Isso é feito através do cálculo de componentes principais obtidas fazendo-se as combinações lineares descritas acima. O agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos denominados *scores*, cujos eixos são as componentes principais (PCs) nos quais os dados são projetados. Os *scores* fornecem a composição das principais componentes em relação às amostras. Devido à relação de ortogonalidade entre as componentes principais é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos de *scores*, e estimar a influência de cada variável sobre as amostras.

Como visto na revisão bibliográfica (capítulo 2), a técnica de análise das principais componentes (PCA) já foi utilizada por Jianwei Qin e colaboradores (23) para identificar características únicas em frutos contaminados com cancro cítrico. Neste trabalho, os autores realizaram imagens de refletância em frutos utilizando um sistema de hiperspectro e aplicaram o PCA nestas imagens para encontrar características únicas ao cancro cítrico. Na figura 3.6 adaptada da referência (23), mostramos os resultados do PCA para várias doenças da referência. As lesões devido ao cancro são marcantes para as componentes PC2, PC3 e PC4.

Figura 3.6 - Imagens das diferentes componentes principais para várias doenças. As lesões devido ao cancro são marcantes para as componentes PC2, PC3 e PC4. Fonte: QIN, J.; BURKS, T. F.; KIM, M. S.; CHAO, K.; RITENOUR, M. A. Citrus canker detection using hyperspectral reflectance imaging and PCA-based image classification method. **Sensing and Instrumentation for food quality and safety**. v.2, n.3, p. 174, 2008 (23).

Em nosso trabalho, a técnica de análise das principais componentes foi aplicada sobre os histogramas obtidos a partir das imagens de fluorescência FMI₁. O software utilizado para

realizar o PCA foi o PLS_Toolbox desenvolvido para a plataforma Matlab® (The MathWorks, EUA). Trata-se de um software com avançadas ferramentas de análise multivariada, interface gráfica simples, e diversos métodos de modelagem incluindo PCA. O PLS_Toolbox permite a seleção das principais componentes de interesse, além de realizar os gráficos de *scores* nestas componentes.

3.1.4.2 SVM – Support Vector Machines

A partir das imagens de fluorescência de amostras com cancro cístico, iremos aplicar outra técnica de análise nestas imagens, utilizando um procedimento matemático para a sua classificação automática. Para isso faremos uso das SVM, o qual é um conceito utilizado em estatística e ciências da computação para um conjunto de métodos de aprendizado supervisionado que relacionam dados e reconhecimento de padrões, utilizando regressão e classificação (45). As SVM constituem uma técnica de aprendizado que vem recebendo crescente atenção da comunidade científica, e com resultados comparáveis e muitas vezes superiores aos obtidos por outros algoritmos de aprendizado, como Redes Neurais Artificiais (RNAs) (46).

As SVM são embasadas pela teoria de aprendizado estatístico, desenvolvida por Vapnik. Essa teoria estabelece uma série de princípios que devem ser seguidos na obtenção de classificadores com boa generalização, definidos como a sua capacidade de prever corretamente a classe de novos dados do mesmo domínio em que o aprendizado ocorreu (47). A SVM padrão é um classificador não-probabilístico binário, ou seja, dada uma entrada a classifica em duas possíveis classes distintas.

As SVM são baseadas no conceito de planos de decisão que definem seus limites. O plano de decisão é definido como um hiperplano que separa um conjunto de objetos que apresenta dados de classes diferentes. Uma SVM cria um plano de n -dimensões para separar pontos n -dimensionais em diferentes classes. Para um novo ponto, a classe é prevista com base em qual lado do plano está o ponto. Um tratamento mais formal sobre SVM pode ser encontrado em (46,47,48).

No início do processo, alimentamos o classificador com dois conjuntos de exemplos de treinamento, cada conjunto marcado como pertencente a uma das duas classes, sadia ou contaminada com cancro cístico. Ou seja, dizemos ao SVM as condições de cada amostra. Um

algoritmo de treinamento SVM constrói um modelo que atribui novos exemplos em uma categoria ou outra. Neste processo de aprendizado o SVM representa os exemplos como pontos no espaço, mapeados de forma que os exemplos das duas categorias distintas são separados o máximo possível. Em seguida, o SVM é aplicado no conjunto de dados que se deseja classificar, e estes serão atribuídos a uma classe ou outra.

Visto que o SVM é um classificador binário, iremos classificar as amostras como sendo positivas ou negativas para o cancro cítrico. Isto nos permitirá acompanhar a evolução da doença em plantas assintomáticas desde a inoculação da bactéria. Devido à complexidade no desenvolvimento de algoritmos que envolvem o reconhecimento de padrões em imagens, estabelecemos uma colaboração científica com o grupo do Prof. Reza Ehsani do Citrus Research and Education Center da Universidade da Flórida. O algoritmo foi desenvolvido pelo seu aluno de doutorado Ratnesh Kumar para o software Matlab[®].

Capítulo 4 Evolução temporal da contaminação por cancro cítrico através de imagens de fluorescência

Neste capítulo apresentamos os experimentos de imagens de fluorescência utilizando o SIF descrito no capítulo 3 para estudar a evolução temporal da contaminação de mudas de citros por cancro cítrico. Inicialmente, discutiremos o primeiro experimento no qual as amostras eram descartadas semanalmente, ou seja, o processo de medição era destrutivo. Em seguida, apresentaremos o experimento onde a coleta de imagens de fluorescência foi realizada sempre para as mesmas folhas durante todo o período de experimento. Por fim discutiremos os resultados obtidos nestes dois experimentos.

4.1 IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA – MÉTODO DESTRUTIVO

Neste experimento nosso objetivo é avaliar a capacidade da técnica de imagens de fluorescência em detectar plantas assintomáticas, sem sintomas visíveis a olho nu, em mudas que foram infectadas com o cancro cítrico. Descreveremos os métodos empregados na análise das imagens de fluorescência, bem como os resultados obtidos. A intenção ao aplicar estes métodos é determinar o instante de tempo mínimo necessário entre a infecção e o diagnóstico preciso da doença.

4.1.1 Metodologia para a coleta das imagens de fluorescência

A capacidade de detecção de folhas assintomáticas já foi avaliada para a técnica de espectroscopia induzida a laser utilizando um espectrômetro portátil à fibra ótica (36). Os resultados indicaram que o uso da espectroscopia pode observar efeitos nas folhas antes do surgimento de sintomas de cancro cítrico a olho nu, servindo assim de motivação para nosso estudo atual. Nosso experimento foi realizado com o sistema de imagens de fluorescência descrito na seção 3.1.1. O experimento foi realizado sob condições de casa de vegetação e

técnicos do Fundecitrus e a aluna de doutorado Maria Cândida Gasparoto da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) auxiliaram e acompanharam o desenvolvimento da pesquisa. No experimento foram utilizadas mudas cítricas das espécies *Citrus reticulata* (“Ponkan”) e *Citrus sinensis* (“Hamlin”). As mudas foram mantidas em recipientes plásticos e podadas, aproximadamente, dois meses antes do início do experimento para que as folhas que fossem utilizadas tivessem a mesma idade na data de inoculação.

As mudas de *Citrus reticulata* (“Ponkan”) e de *Citrus sinensis* (“Hamlin”) foram inoculadas com a bactéria do cancro cítrico *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. A inoculação da bactéria foi preparada através da suspensão de bactérias coletadas de uma cultura de 72 horas de nutriente Agar (NA) em um tampão (buffer) de fosfato (PB). A suspensão foi ajustada espectrofotometricamente para a formação de 10^8 unidades de colônias por mililitro de PB (36).

As inoculações foram realizadas através de ferimentos com agulhas hipodérmicas de 0,55 x 20 mm de diâmetro, previamente mergulhadas na suspensão bacteriana e introduzidas no limbo foliar até atravessar completamente sua espessura. Os tratamentos avaliados foram compostos de folhas submetidas a ferimentos mecânico e ferimentos contendo a suspensão bacteriana, na seguinte escala: i) folhas com somente um ferimento mecânico; ii) folhas com 1, 4, 8 e 12 perfurações de agulha mergulhada na suspensão bacteriana. A figura 4.1 apresenta imagens digitais de amostras contaminadas com cancro cítrico para os tratamentos com 1, 4, 8 e 12 furos da última semana do experimento.

Figura 4. 1 - Imagens digitais de amostras contaminadas com cancro cítrico para os tratamentos com 1, 4, 8 e 12 furos da última semana do experimento.

O aumento do grau de severidade da doença nas folhas tem como objetivo verificar se há a influência da severidade na análise da evolução do cancro cítrico em função do tempo de inoculação da bactéria. A figura 4.2 apresenta imagens de fluorescência em 690 nm com excitação em 470 nm para os tratamentos avaliados após cinco semanas da inoculação da bactéria.

As imagens de fluorescência foram coletadas semanalmente durante 9 semanas, totalizando 66 dias. No primeiro dia (dia zero) houve a inoculação da suspensão bacteriana, coletando-se somente imagens de 28 amostras de citros sadias. Nos demais dias de coleta capturamos imagens de fluorescência para 2 grupos com amostras de Ponkan e 2 grupos com amostras de Hamlin. A primeira coleta das imagens de fluorescência foi realizada um dia após a inoculação da bactéria, sendo considerado como *semana 0* em nossa análise. Os grupos de análise eram constituídos por seis amostras, sendo estas: i) amostra de folha sadia, ii) amostra com ferimento mecânico e iii) amostras com 1, 4, 8 e 12 perfurações da suspensão bacteriana. Sendo assim, coletávamos imagens de fluorescência para um total de 24 amostras por semana para excitações em 365, 405, 470 e 530 nm. As folhas após a coleta das imagens de fluorescência eram descartadas pelos técnicos do Fundecitrus. Segundo Lins e colaboradores (15) a análise de amostras de variedades diferentes não altera significativamente os resultados. Sendo assim, neste trabalho as imagens de fluorescência coletadas das mudas de citrus Ponkan e Hamlin irão constituir um único grupo de análise.

Figura 4. 2 - Imagens de fluorescência em 690 nm com excitação em 470 nm para os seguintes tratamentos avaliados: a) ferimento mecânico, b) uma perfuração, c) 4 perfurações, d) 8 perfurações e e) 12 perfurações contendo a suspensão bacteriana. Folhas da espécie *Citrus sinensis* ("Hamlin") após cinco semanas da inoculação da bactéria.

Através da figura 4.2, nota-se que as imagens de fluorescência apresentam um círculo na região externa da amostra devido ao sistema de lentes, além de pinças para a fixação das folhas. Utilizando o software Matlab[®] observamos que os valores de pixels nesta região externa e nas pinças poderiam contribuir em nossa análise da evolução do cancro cítrico. Sendo assim, desenvolvemos um algoritmo no próprio Matlab[®] para a eliminação destes componentes presentes nas imagens.

4.1.2 Metodologia no processamento das imagens

Neste trabalho, utilizamos duas técnicas para a análise das imagens de fluorescência. Primeiramente a análise destas imagens foi realizada através de histogramas, pois como se nota na figura 4.2 as imagens apresentam fluorescência distinta em torno das lesões, sendo a princípio um bom método para análise. Entretanto, nossa análise a partir de histogramas não apresentou resultados satisfatórios quanto à evolução do cancro cítrico nas amostras. Sendo assim, resolvemos aplicar a técnica SVM que tem como base o reconhecimento de padrões em imagens a fim de classificar as amostras como positivas ou negativas para a doença.

A seguir será apresentado o algoritmo desenvolvido para a eliminação dos componentes presentes nas imagens (pinças e círculos) e elaboração dos histogramas das imagens, bem como os resultados e discussões obtidos. Posteriormente serão apresentados os resultados obtidos pela técnica de análises SVM.

4.1.2.1 Histogramas

A eliminação das componentes indesejáveis nas imagens das folhas devido ao nosso sistema é fundamental para que não ocorra a influência destes em nossas análises a respeito da evolução do cancro cítrico. A rotina desenvolvida no Matlab[®] tem como base para a eliminação dos ruídos o uso de ferramentas de seleção da região de interesse (ROI, do inglês *Region of Interest*) das imagens. O ROI é a área de uma imagem onde se deseja filtrar ou realizar alguma operação, sendo definido através da criação de uma máscara binária. A seleção da região de interesse é realizada manualmente. A imagem binária criada é do mesmo

tamanho que a imagem original que se deseja processar, mas com valores de pixels iguais a 1 para a região do ROI e iguais a 0 para a região externa ao ROI. O Matlab[®] permite a seleção de diferentes formas geométricas para a composição do ROI. Neste trabalho utilizamos a geometria de um retângulo para a composição da imagem binária. A figura 4.3 apresenta a imagem em 690 nm para a excitação em 470 nm com a região de interesse selecionada, e a imagem binária obtida após a escolha do ROI.

Figura 4. 3 - (a) Imagem em 690 nm para a excitação em 470 nm com a região de interesse selecionada. (b) Imagem binária obtida após o processo de escolha do ROI.

A imagem binária obtida após a escolha do ROI é denominada também de máscara binária. Através de uma simples operação de multiplicação da imagem original com a máscara, obtêm-se a imagem final da região selecionada. Como as imagens são consideradas matrizes, a multiplicação é realizada entres valores de pixels das mesmas coordenadas de cada imagem. A imagem resultante já não possui mais as pinças e o círculo antes mencionado, restando somente a região afetada pelos tratamentos propostos. A figura 4.4 apresenta a imagem em 690 nm para a excitação em 470 nm, e a imagem resultante após seu processamento.

Figura 4. 4 - (a) Imagem original em 690 nm utilizando excitação em 470 nm. (b) Imagem resultante após o processamento para a seleção do ROI.

A região de interesse é selecionada a partir das imagens de fluorescência em 690 nm e excitação em 470 nm devido a sua melhor resolução. Com o ROI determinado, o algoritmo realiza a razão da imagem de fluorescência em 690 por 740 nm, criando assim a imagem FMI_1 . Após este processo a imagem máscara é aplicada na figura de mérito FMI_1 . A vantagem ao se utilizar esta ferramenta é que uma vez criada a imagem máscara para a imagem em 690 nm e excitação em 470 nm, esta também pode ser utilizada nas imagens FMI_1 das excitações em 365, 405 e 530 nm.

As imagens FMI_1 são normalizadas pela média de valores de pixels da área sadia da própria folha em análise. A rotina desenvolvida no Matlab[®] permite a seleção de uma região sadia utilizando procedimento semelhante ao descrito para eliminação da pinça e círculo, e escolha do ROI da área contaminada. A normalização destas imagens pela média dos valores de pixels da área sadia da folha minimiza a influência das condições ambientais sobre a análise (16). A área sadia selecionada apresenta sempre a mesma dimensão em todos os tratamentos avaliados.

Após a normalização pela região sadia, a rotina realiza os histogramas. Neste caso, os histogramas são normalizados pelas respectivas áreas dos ROI's a fim de minimizar também a influência das diferentes áreas dos tratamentos avaliados. As áreas são obtidas a partir da imagem máscara, onde somamos todos os valores de pixels iguais a um. Os histogramas estão definidos no intervalo de pixels entre 0-7 com passo de 0.01. Neste algoritmo desenvolvido são realizados histogramas de cinco imagens diferentes de FMI_1 , salvando os no formato adequado para a análise no software Origin.

Nas imagens de FMI_1 são aplicados dois tipos de configurações na região de interesse para a obtenção dos histogramas. A primeira configuração (configuração 1) é proporcional ao grau de severidade da doença, ou seja, varia conforme o número de furos na amostra. Na segunda configuração (configuração 2) é selecionado somente a região de uma lesão de cancro para os diferentes tratamentos avaliados. O tamanho do ROI é padronizado pela a última semana do experimento. As regiões de interesse apresentam tamanhos diferentes para cada tratamento avaliado. A figura 4.5 apresenta os dois tipos de configurações utilizados para a seleção da região de interesse para as imagens em 690 nm e excitação 470 nm.

Figura 4.5 - (a) A configuração 1 da região de interesse é proporcional ao grau de severidade da doença. (b) Na configuração 2 é selecionado somente a região de uma lesão de cancro para os diferentes tratamentos avaliados.

Neste trabalho optamos por processar as imagens capturadas a fim de obter a imagem FMI_1 (RF/FRF) e utilizando alguns métodos de análise apresentar uma análise quantitativa dos resultados. Na seção a seguir apresentaremos os resultados obtidos para a análise das imagens através de histogramas.

4.1.2.1.1 Resultados e Discussões da Análise das imagens por histogramas

A figura 4.6 contém as imagens de uma folha infectada pela bactéria do cancro cítrico contendo 12 furos para a semana inicial do experimento (semana 0) e a semana final (semana 9). Para cada uma das folhas, temos a imagem espectral da emissão em 690 nm (Figuras 4.6.a, 4.6.b), em 740 nm (Figuras 4.6.c, 4.6.d), a imagem FMI_1 após o processamento para seleção do ROI utilizado a configuração 1 (Figuras 4.6.e, 4.6.f), além dos respectivos histogramas referentes a essa região de interesse com o ajuste não linear realizado (Figuras 4.6.g, 4.6.h). As imagens espectrais e FMI_1 são apresentadas em escala de cinza. As demais amostras apresentam comportamento similar à mostrada na figura 4.6.

Os histogramas realizados sobre as imagens FMI_1 (figura 4.6.e e 4.6.f) deveriam apresentar uma frequência alta de valores de pixels iguais à zero, devido a máscara aplicada nestas figuras. Entretanto, a escala do histograma não seria sensível para valores de pixels com frequência menor. Sendo assim, estes valores foram eliminados dos histogramas sem perda de informação a respeito da doença.

Nos histogramas das figuras 4.6.g e 4.6.h realizamos o ajuste não linear através de uma função gaussiana. Nota-se que a figura 4.6.g apresenta as características necessárias para realizar este ajuste, enquanto que a figura 4.6.h não há simetria suficiente para dizermos que se trata de uma função gaussiana. Sendo assim, em ambos os histogramas o ajuste foi realizado através de uma função que continha duas gaussianas a fim de verificar a evolução do cancro cítrico em plantas assintomáticas. O ajuste não linear está inserido nas próprias figuras 4.6.g e 4.6.h em vermelho.

A partir de parâmetros do ajuste não linear tais como, posição central das gaussianas no eixo x (xc_1 e xc_2) e larguras (w_1 e w_2), pretendíamos acompanhar a evolução do cancro cítrico. Acreditávamos que a evolução do cancro cítrico modificaria o histograma, sendo observada sua mudança através do deslocamento dos parâmetros xc_1 e xc_2 e larguras das gaussianas. Além disto, surgiria outro pico devido à evolução da região infectada, mas não necrosada, onde nota-se claramente através das figuras 4.6.e e 4.6.f a diferença de fluorescência em torno da lesão. A figura 4.7 exemplifica a região mencionada.

Figura 4. 7 - Imagem digital de duas lesões de cancro cítrico em uma folha de citros. Destaca-se a região necrosada, e a região além da necrose que ainda apresenta sintomas da infecção. A região além da necrose apresenta uma cor amarelada. FONTE: LINS, E. C. C. C. Espectroscopia da Fluorescência na Citricultura. 2009. 116 f. Tese (Doutorado em Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 58, 2009 (13).

Contudo, a técnica proposta de análise a partir de ajustes não lineares nos histogramas não permitiu inferir nada a respeito da evolução do cancro cítrico. Sendo assim, resolvemos aplicar o método de análise por PCA descrito no tópico 3.1.4 a fim de acompanhar a manifestação da doença.

O método de análise das principais componentes foi aplicado sobre os histogramas em função do tempo de inoculação da bactéria para seus diferentes graus de severidade. As semanas são representadas por quatro pontos distintos, pois se referem aos grupos de amostras de Ponkan e Hamlin.

Inicialmente, o PCA foi aplicado nos histogramas obtidos a partir das imagens FMI₁, cuja seleção da região de interesse utilizamos a configuração 1. Padronizamos o tamanho do ROI segundo a última semana do experimento conforme o grau de evolução da doença. O software utilizado para a aplicação do método PCA foi o PLS_Toolbox desenvolvido para a plataforma Matlab[®] (The MathWorks, EUA). Após a aplicação do PCA obtivemos as principais componentes, sendo exportadas e analisadas no software Origin. Contudo, analisamos somente as duas principais componentes, PC1 e PC2, com base na porcentagem de variância acumulada, e descartamos as demais sem grande perda de informação. A figura 4.8 apresenta os gráficos de PC1 x PC2 conforme os tratamentos avaliados.

A partir dos gráficos de PC1 x PC2 da figura 4.8, observamos inicialmente que para o caso de amostras avaliadas para ferimento mecânico os pontos estão agrupados na origem. De fato, tal resultado obtido está de acordo com o previsto, pois não há evolução do ferimento mecânico nas amostras. Para os tratamentos avaliados com 1, 4, 8 e 12 perfurações de agulha mergulhada na suspensão bacteriana nota-se que o aumento da severidade da doença nas folhas contribui para a padronização do comportamento dos dados. Este fato é claramente observado nas figuras 4.8.b, 4.8.c, 4.8.d e 4.8.e; a análise de amostras com 1 e 4 furos (figuras 4.8.b e 4.8.c) não apresentam comportamento definido, enquanto que a análise de amostras com 8 e 12 furos (figuras 4.8.d e 4.8.e) apresentam característica linear conforme o aumento do tempo de inoculação da bactéria do cancro cítrico. Entretanto, não há uma regularidade nesta evolução, ou seja, o comportamento linear observado não apresenta uma sequência definida.

Figura 4. 8 - Gráficos de PC1 x PC2 para os diferentes tratamentos avaliados: (a) fermento mecânico, (b) 1 furo, (c) 4 furos, (d) 8 furos e (e) 12 furos contendo a suspensão bacteriana.

Tais resultados para estas amostras devem ser uma provável consequência de estarmos analisando diferentes imagens de folhas com cancro cítrico ao longo das semanas. A possível solução, neste caso, seria coletar imagens de fluorescência sempre das mesmas amostras durante todo o período do experimento. Este procedimento foi realizado em um experimento não destrutivo.

Além de aplicarmos a análise por PCA nos histogramas para a configuração 1 da região de interesse das imagens, também utilizamos a segunda configuração. Neste caso, selecionamos somente a região de uma lesão de cancro para os diferentes tratamentos avaliados a fim de reduzir a presença de tecido sadio na análise (figura 4.5.b). Analogamente, o ROI também foi padronizado segundo a última semana do experimento. A figura 4.9 apresenta os gráficos de PC1 x PC2 para a configuração 2 da região de interesse para os diferentes tratamentos avaliados.

Figura 4.9 - Gráficos de PC1 x PC2 para os diferentes tratamentos avaliados: (a) ferimento mecânico, (b) 1 furo, (c) 4 furos, (d) 8 furos e (e) 12 furos contendo a suspensão bacteriana.

Através dos gráficos de PC1 x PC2 da figura 4.9 nota-se que esta segunda configuração da região de interesse não apresenta diferenças significativas em relação à

configuração escolhida na elaboração dos gráficos de PC1 x PC2 da figura 4.8. Analogamente observa-se que para as amostras avaliadas com fermento mecânico os pontos estão agrupados origem, enquanto que para os tratamentos avaliados com 1, 4, 8 e 12 perfurações de agulha mergulhada na suspensão bacteriana, o aumento da severidade da doença nas folhas não contribui para a padronização do comportamento dos dados.

Em ambas as configurações da região de interesse das amostras, as informações obtidas pelos gráficos de PC1 x PC2 não são suficientes para avaliar e determinar o instante de tempo mínimo necessário entre a infecção e o diagnóstico preciso da doença. Estes gráficos foram elaborados segundo os histogramas obtidos a partir das imagens de FMI₁ para a excitação em 470 nm. A fim de verificar quais as melhores excitações para se aplicar o método PCA, elaboramos os histogramas das amostras com 12 furos para a última semana do experimento utilizando a configuração 2 do ROI e aplicamos o PCA nestes dados. A figura 4.10 apresenta o gráfico de PC1 x PC2 para as amostras com 12 furos para todas as excitações. Este gráfico foi realizado pelo software PLS_Toolbox.

Figura 4. 10 - Gráfico de PC1 x PC2 para amostras com 12 furos das diferentes excitações.

A partir da figura 4.10 podemos observar que as excitações em 405 e 470 nm são as que apresentam menor dispersão dos dados, estando seus pontos mais agrupados. Nas demais excitações, 365 e 530 nm, há uma maior dispersão dos pontos. Este resultado também foi observado para amostras com 4 e 8 perfurações da agulha mergulhada na suspensão bacteriana. Sendo assim, a análise por PCA em nossos experimentos irá se restringir somente a aplicar o método para as excitações em 405 e 470 nm. Determinada as melhores excitações e utilizando a configuração 2 para a seleção da região de interesse, combinamos as principais

componentes (PC1 e PC2) destas excitações com o objetivo de refinar nossos resultados. A figura 4.11 apresenta as combinações de PC1 e PC2 para as excitações em 405 e 470 nm para amostras com fermento mecânico e 1 furo da suspensão bacteriana.

Figura 4. 11 - Combinações de PC1 e PC2 para as excitações em 405 e 470 nm para amostras com fermento mecânico (coluna à esquerda) e 1 furo da suspensão bacteriana (coluna à direita).

A fim de completar a combinação das principais componentes para as excitações em 405 e 470 nm, a figura 4.12 apresenta as combinações para os tratamentos com 4, 8 e 12 furos.

Figura 4. 12 - Combinações de PC1 e PC2 para as excitações em 405 e 470 nm para amostras com 4 (coluna à esquerda), 8 (coluna centralizada) e 12 furos (coluna à direita) da suspensão bacteriana.

Devido ao número de gráficos da figura 4.12 a legenda não foi inserida, entretanto, esta é igual à utilizada na figura 4.11. O eixo x dos gráficos representa uma das duas principais componentes obtidas para a excitação em 405 nm, enquanto que no eixo y temos as componentes principais para a excitação em 470 nm.

A partir dos gráficos das figuras 4.11 e 4.12 observa-se que as combinações das principais componentes para amostras avaliadas com ferimento mecânico nos levam novamente a questão do agrupamento dos pontos em torno da região central. Este resultado, como já mencionado, está de acordo com o previsto, pois não há evolução do ferimento mecânico nas amostras. Para os demais tratamentos avaliados, a combinação das principais componentes para as excitações em 405 e 470 nm, não permite afirmar nada a respeito da evolução do cancro cítrico nas folhas.

Tal fato deve ser uma provável consequência de estarmos analisando diferentes imagens de amostras de cancro cítrico ao longo das semanas. A possível solução, neste caso, seria coletar imagens de fluorescência sempre das mesmas amostras durante todo o período do experimento.

A priori o método de análise por PCA não apresenta resultados significativos em relação à análise da evolução do cancro cítrico para este experimento proposto, onde as amostras são descartadas a cada medida realizada. Como mencionado, nota-se um comportamento linear, mas não uma sequência bem definida. Sendo assim, empregamos a técnica de análise por reconhecimento de padrões em imagens, SVM, para as medidas deste experimento. Na seção seguinte, iremos aplicar o método de análise por SVM descrito no tópico 3.1.4 em nossas imagens de fluorescência a fim de acompanhar a manifestação da doença.

4.1.2.2 Análise das imagens pelo método SVM

A análise pelo método SVM foi aplicada sobre imagens de fluorescência em 690 nm e excitação 530 nm devido às características de textura presentes nestas imagens. As imagens selecionadas para a classificação passam inicialmente por uma etapa de segmentação a fim de excluir a parte das pinças, selecionando a região de interesse. Após esta etapa, temos imagens retangulares contendo os pixels da região de interesse. Estas imagens possuem tamanhos

diferentes conforme o grau de severidade da doença. A figura 4.13 apresenta imagens segmentadas de amostras sadias e com cancro cítrico.

Figura 4. 13 - Imagens segmentadas de amostras: (a) sadias e (b) contaminadas.

No início do processo alimentamos o classificador com dois conjuntos de exemplos de treinamento, cada conjunto marcado como pertencente a uma das duas classes, sadia ou contaminada com cancro cítrico. A classe de amostras sadias é composta por 28 imagens segmentadas de folhas sem a inoculação da bactéria, enquanto que a classe de amostras contaminadas com cancro cítrico é composta por 12 imagens de fluorescência da última semana do experimento para os seguintes graus de severidade da doença: i) 4 furos, ii) 8 furos e iii) 12 furos.

Um algoritmo de treinamento SVM constrói um modelo que atribui novos exemplos em uma categoria ou outra. Neste processo de aprendizado o SVM representa os exemplos como pontos no espaço, mapeados de forma que os exemplos das duas categorias distintas são separados o máximo possível. Em seguida, o SVM é aplicado no conjunto de dados que se deseja classificar, e estes serão atribuídos a uma classe ou outra. Nesta etapa, alimentamos o classificador novamente, mas desta vez com as imagens de fluorescência segmentadas para cada grau de severidade e cada semana que desejamos classificar e também com as amostras sadias. Visto que o SVM é um classificador binário, classificamos as amostras como sendo positivas ou negativas para o cancro cítrico. A figura 4.14 apresenta a evolução da doença para os diferentes tratamentos avaliados.

Figura 4. 14 - Evolução do cancro cítrico para os diferentes graus de severidade da doença: (a) ferimento mecânico, (b) 1 furo, (c) 4 furos, (d) 8 furos e (e) 12 furos.

A partir da figura 4.14 nota-se o método de análise SVM classifica as amostras com ferimento mecânico como ausente para a doença cancro cítrico. Dentre as quatro amostras analisadas por semana nenhuma apresentam características positivas para cancro. De fato este resultado está coerente, pois as amostras com ferimento mecânico não alteram a concentração de moléculas de clorofila *a* nas folhas (36).

Nos demais tratamentos avaliados, as amostras com 1 furo da suspensão bacteriana (figura 4.14.b) apresentam evolução da doença após quatro semanas da inoculação das bactérias. Para os tratamentos com 4, 8 e 12 furos a manifestação da doença ocorre em média após 3 a 5 semanas de inoculação da bactéria. Vale destacar que o número pequeno de amostras por semana leva a uma flutuação significativa dos dados.

Além disto, nota-se que para as últimas semanas do experimento, a maioria das amostras em análise são classificadas pelo método SVM como positivas para cancro cítrico (figuras 4.14.c, 4.14.d, 4.14.e). O aumento do tempo de inoculação da bactéria nas amostras aumenta a região necrosada e a perda da concentração de clorofila possibilitando classificá-las como positivas para cancro ao comparar com os exemplos de treinamento. As folhas doentes apresentam sintomas visuais da doença (tecido necrosado e perda de clorofila) entre 2 a 4 semanas após a inoculação da bactéria.

O método de análise SVM aplicada nas imagens de fluorescência é uma ferramenta eficiente para se determinar o instante de tempo mínimo necessário entre a infecção e o diagnóstico preciso da doença. Os resultados discutidos para esta técnica são satisfatórios ao acompanhar a evolução do cancro cítrico em plantas assintomáticas, sendo que a evolução é determinada no mesmo intervalo de tempo em que se observam os sintomas visuais da doença. Na seção seguinte iremos apresentar os resultados obtidos para o método não-destrutivo das amostras contaminadas.

4.2 IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA – MÉTODO NÃO-DESTRUTIVO

Neste experimento repetiremos o procedimento adotado anteriormente com a diferença que coletaremos as imagens de fluorescência para as mesmas folhas durante seu período de realização.

4.2.1 Metodologia para a coleta e processamento das imagens de fluorescência

O procedimento adotado para a coleta das imagens de fluorescência para o método não-destrutivo é análogo ao descrito na seção 4.1. Neste método utilizamos mudas cítricas da espécie *Citrus limonia* (“Limão Cravo”). As mudas foram mantidas em tubos plásticos sobre um suporte com água e em ambientes com incidência da luz solar. Estes cuidados foram realizados com a intenção de manter as folhas com suas principais características ao longo do experimento. Os tratamentos avaliados foram: i) folhas com 4 ferimentos mecânico; ii) folhas com 2, 4, 8 e 12 perfurações de agulha mergulhada na suspensão bacteriana.

As imagens de fluorescência foram coletadas semanalmente durante 10 semanas, totalizando 70 dias. No primeiro dia (dia zero) houve a inoculação da suspensão bacteriana, coletando-se somente imagens de 30 amostras de citros sadias. Nos demais dias de coleta capturamos imagens de fluorescência para 5 grupos com amostras de Limão Cravo. A primeira coleta das imagens de fluorescência foi realizada uma semana após a inoculação da bactéria, sendo considerado como *semana 1* em nossa análise. Os grupos de análise eram

constituídos por seis amostras, sendo estas: i) amostra de folha sadia, ii) amostra com ferimentos mecânicos e iii) amostras com 2, 4, 8 e 12 perfurações da suspensão bacteriana.

Neste experimento a bactéria do cancro cítrico foi inoculada em duas folhas por muda conforme o grau de severidade de interesse. Sendo assim, coletávamos imagens de fluorescência para um total de 60 amostras por semana para excitações em 365, 405, 470 e 530 nm, divididos em folha 1 e folha 2. Diferentemente do experimento anterior, a coleta das imagens de fluorescência foi realizada sempre para as mesmas amostras, além também de manter o mesmo grupo de estudo, Limão Cravo. As imagens de fluorescência foram coletadas em ambiente sem a influência de luz externa, pois neste caso, não foi possível manter a porta do SIF fechada.

Em relação à metodologia empregada para o processamento das imagens, mantivemos o mesmo procedimento realizado no experimento com amostras destrutivas a fim de comparar os resultados. Novamente realizamos os histogramas das imagens de fluorescência FMI_1 para as duas configurações da região de interesse. Conforme visto no experimento anterior, a análise da evolução do cancro cítrico a partir de parâmetros obtidos de um ajuste gaussiano nos histogramas não possibilita de fato inferir nada a respeito da evolução da doença. Sendo assim, neste experimento iremos discutir somente os resultados obtidos da análise dos histogramas por PCA e também da aplicação do método SVM nas imagens.

4.2.2 Resultados e discussões

4.2.2.1 Análise dos histogramas das imagens pelo método PCA

O método de análise das principais componentes foi aplicado sobre os histogramas obtidos a partir das imagens de fluorescência FMI_1 . Devido à ausência de simetria dos furos nas amostras a análise por PCA foi realizada sob cada grupo para a configuração 1 da região de interesse das imagens, pois não foi possível padronizar o ROI para os cinco grupos conforme os diferentes graus de severidade da doença. Ao contrário do experimento anterior, cada semana é representada por um único ponto, pois se refere ao grupo de amostras de Limão Cravo em estudo.

No caso da configuração 2, na qual selecionamos somente a região de uma lesão de cancro para os diferentes tratamentos avaliados, o PCA foi aplicado sobre os histogramas dos 5 grupos de amostras. Neste caso, cada semana é representada por cinco pontos distintos, pois se referem aos grupos de amostras de Limão Cravo. Esta análise também se aplica a folha 2 contaminada com cancro cítrico.

Neste tópico, iremos apresentar somente os resultados referentes à folha 1, pois são similares aos obtidos para a folha 2. Para a primeira configuração do ROI os resultados serão apresentados somente para um único grupo. Como estamos analisando a mesma espécie de citros sob condições de nutrientes e iluminação semelhantes, diferenças significativas não são observadas entre grupos e folhas. Novamente, analisamos somente as duas principais componentes, PC1 e PC2, com base na porcentagem de variância acumulada. A figura 4.15 apresenta os gráficos de PC1 x PC2 para as duas configurações da região de interesse e também conforme os tratamentos avaliados.

A partir dos gráficos de PC1 x PC2 para o primeiro tipo de configuração da região de interesse observamos que os pontos estão dispersos e o aumento do grau de severidade da doença nas amostras não contribui para uma padronização do comportamento destes. No caso das amostras com estresse mecânico deveria haver uma menor dispersão dos dados, pois não ocorre o aumento destes ferimentos com o decorrer do experimento. O gráfico referente a 8 furos (figura 4.15.g) da suspensão bacteriana do cancro até apresenta um comportamento linear, mas é difícil de se afirmar algo pois não há uma sequência definida conforme o aumento do tempo de inoculação do cancro cítrico.

No caso da segunda configuração da região de interesse as amostras avaliadas para ferimento mecânico (figura 4.15.b) apresentam pontos mais agrupados na região central do gráfico. Como já mencionado, tal resultado obtido está de acordo com o previsto, pois não há evolução do estresse mecânico nas amostras. Para os tratamentos avaliados com 2, 4, 8 e 12 furos (figuras 4.15.d, 4.15.f, 4.15.h, 4.15.j) contendo a suspensão bacteriana nota-se novamente que aumento do grau de severidade da doença nas amostras não contribui para uma padronização do comportamento. O tratamento com 8 furos (figura 4.15.h) para esta configuração apresenta uma tendência linear, mas analogamente a primeira configuração não há uma sequência definida que possibilite determinar o instante mínimo da manifestação da doença.

Figura 4.15 - PC1 x PC2 para as configurações da região de interesse e diferentes graus de severidade da doença: (a,b) 4 ferimentos mecânicos, (c,d) 2 furos, (e,f) 4 furos, (g,h) 8 furos e (i,j) 12 furos.

Em ambas as configurações da região de interesse as informações obtidas através dos gráficos não são suficientes para avaliar e determinar o instante de tempo mínimo necessário entre a infecção e o diagnóstico da doença. Os gráficos da figura 4.15 foram elaborados segundo histogramas das imagens FMI_1 para excitação em 470 nm. Como verificado na seção 4.1.2.1.1, a excitação em 405 nm também é interessante para se aplicar a análise por PCA. Sendo assim, combinamos as duas principais componentes destas excitações com o objetivo de refinar nossos resultados. Nesta análise utilizamos a configuração 2 para a seleção da região de interesse. A figura 4.16 apresenta as combinações de PC1 e PC2 destas excitações para amostras com estresse mecânico e 2 furos da suspensão bacteriana.

Figura 4.16 - Combinações de PC1 e PC2 para as excitações em 405 e 470 nm para amostras com ferimentos mecânicos (coluna à esquerda) e 2 furos (coluna à direita) da suspensão bacteriana.

A fim de completar nossa combinação das principais componentes para as excitações em 405 e 470 nm, a figura 4.17 apresenta as combinações para os tratamentos com 4, 8 e 12 furos.

Figura 4. 17 - Combinações de PC1 e PC2 para as excitações em 405 e 470 nm para amostras com 4, 8 e 12 furos da suspensão bacteriana.

Devido ao número de gráficos da figura 4.17 a legenda não foi inserida, entretanto, esta é igual à utilizada na figura 4.16. A partir dos gráficos das figuras 4.16 e 4.17 observa-se

que as combinações das principais componentes para amostras avaliadas com estresse mecânico nos leva novamente ao fato de os pontos estarem centralizados na origem. Este resultado, como já mencionado, está de acordo com o previsto, pois não há evolução do ferimento mecânico nas amostras. Para os demais tratamentos avaliados, nota-se que não há um padrão no comportamento dos pontos conforme o aumento do grau de severidade da doença. As combinações das componentes principais para 2, 4, 8 e 12 furos mostram claramente uma dependência dos pontos na região central.

A aplicação da análise por PCA nestes dois experimentos, método destrutivo e não-destrutivo, propostos para acompanhar a evolução do cancro cítrico em plantas assintomáticas nos mostra que o tipo de seleção do ROI não influencia na aplicação do método PCA, ou seja, não há diferenças significativas nos resultados conforme a escolha da região de interesse. Outro resultado é o fato de que a análise por PCA aplicado diretamente sobre os histogramas das imagens de fluorescência não permite verificar a evolução da doença como esperado. Independente da análise de amostras destrutivas ou não-destrutivas, o PCA aplicado nos histogramas não é uma ferramenta eficiente para o acompanhamento do cancro cítrico.

A seção seguinte apresenta os resultados obtidos para a técnica SVM aplicada sobre amostras não-destrutivas a fim de analisar a evolução da doença

4.2.2.2 Análise das imagens pelo método SVM

O procedimento para a análise das imagens de fluorescência pelo método SVM é igual ao aplicado no experimento com amostras destrutivas. O método foi aplicado sobre as imagens de fluorescência em 690 nm e excitação em 530 nm. A diferença em relação ao experimento destrutivo é o número de amostras utilizado para alimentar o classificador com os dois conjuntos de exemplos de treinamento. Neste caso, a classe de amostras sadias é composta por 30 imagens segmentadas de amostras sem a inoculação da bactéria, enquanto que a classe de amostras contaminadas com cancro cítrico é composta por 10 imagens de fluorescência da última semana do experimento para os seguintes graus de severidade da doença: i) 8 furos e ii) 12 furos. Esta análise foi aplicada para a folha 1 e folha 2 deste experimento.

A figura 4.18 apresenta a evolução da doença para os diferentes tratamentos avaliados considerando cada ponto como o número de amostras positivas para cancro cítrico das duas folhas inoculadas com a bactéria por muda.

Figura 4. 18 - Evolução do cancro cítrico para os diferentes graus de severidade da doença: (a) 4 ferimentos mecânico, (b) 2 furos, (c) 4 furos, (d) 8 furos e (e) 12 furos.

A partir da figura 4.18 nota-se o método de análise SVM classifica as amostras com ferimento mecânico como positivas para a doença cancro cítrico. De fato não sabemos a explicação para este resultado, mas acreditamos que o número de ferimentos mecânicos (quatro) possa ter influenciado o SVM em sua classificação. Além disto, a idade das folhas também podem influenciar na classificação, uma vez que estas amostras são mais novas em relação ao experimento destrutivo. Visualmente não verificamos evolução nestes ferimentos e nem características de contaminação pelo cancro cítrico.

Os tratamentos de amostras com 2 furos da suspensão bacteriana (figura 4.18.b) apresentam evolução significativa da doença após quatro semanas da inoculação das bactérias. Para os tratamentos com 4 e 8 furos (figuras 4.18.c e 4.18.d) a manifestação da doença ocorre em média após 5 semanas da inoculação da bactéria apesar da significativa flutuação observada. No caso de amostras com 12 furos (figuras 4.18.e) a manifestação da doença ocorre entre 3 a 4 semanas após a inoculação da bactéria.

Em relação à análise por SVM para as amostras do experimento não-destrutivo nota-se que as curvas de evolução da doença (figura 4.18) crescem de forma gradativa enquanto no experimento destrutivo (figura 4.14) observa-se que a classificação das amostras como contaminadas ocorre de forma direta. Tal resultado é uma possível consequência de estarmos analisando as mesmas amostras no decorrer do experimento. Novamente nota-se que para as últimas semanas do experimento, a maioria das amostras em análise são classificadas pelo método SVM como positivas para cancro cítrico. O aumento do tempo de inoculação da bactéria nas amostras aumenta a região necrosada e a perda da concentração de clorofila possibilitando classificar as amostras como positivas para cancro ao comparar com os exemplos de treinamento. Vale ressaltar que o número pequeno de amostras leva a uma flutuação significativa dos dados.

As folhas contaminadas da variedade Limão Cravo apresentam sintomas visuais da doença (tecido necrosado e perda de clorofila) entre 3 a 4 semanas após a inoculação da bactéria. Em relação às amostras de Ponkan e Hamlin o aparecimento dos sintomas visuais da doença ocorreu, aproximadamente, uma semana depois com lesões pequenas e de crescimento lento. Este atraso no aparecimento dos sintomas quando comparado ao experimento anterior, possivelmente, deve-se ao fato das temperaturas médias menores dos dias compreendidos entre a inoculação da bactéria e surgimento dos sintomas. A coleta das imagens de fluorescência do experimento destrutivo se iniciou no fim do verão, enquanto que o experimento não-destrutivo iniciamos na metade do inverno.

Na seção seguinte iremos realizar uma breve discussão apresentando e comparando os resultados obtidos para a análise das imagens de fluorescência a partir de histogramas e pelo método SVM.

4.3 Discussão comparativa dos experimentos e técnicas de análise

A análise das imagens de fluorescência através de histogramas não permitiu verificar a evolução da doença que se observa visualmente no decorrer dos experimentos. Através do ajuste não linear nestes histogramas por uma função com duas gaussianas pretendíamos acompanhar a evolução da doença através de parâmetros deste ajuste, tais como, posição central das gaussianas no eixo x (xc_1 e xc_2) e larguras (w_1 e w_2). Acreditávamos que a

evolução do cancro cítrico modificaria o histograma, sendo observada sua mudança através do deslocamento dos parâmetros xc_1 e xc_2 e também no aumento da largura da gaussiana. Além disto, surgiria outro pico devido ao aumento da região infectada (região amarelada), mas não necrosada. Contudo, os parâmetros obtidos pelo ajuste gaussiano nos histogramas não nos permitiu inferir nada a respeito da evolução do cancro cítrico.

A técnica de análise PCA foi aplicada sobre estes histogramas a fim de tentar verificar a evolução da doença. A aplicação deste método nos dois experimentos propostos para acompanhar a evolução do cancro cítrico em plantas assintomáticas nos mostra que o tipo de seleção da região de interesse (ROI) não influencia na aplicação do PCA, ou seja, não há diferenças significativas nos resultados conforme a escolha da região de interesse. Também determinamos quais excitações são interessantes para a análise por PCA. Verificamos que as excitações em 405 e 470 nm podem contribuir de forma mais significativa na análise das amostras.

Outro resultado é o fato de que a análise por PCA aplicado diretamente sobre os histogramas das imagens de fluorescência não permite verificar a evolução da doença como esperado. Independente da análise de amostras destrutivas ou não-destrutivas, o PCA aplicado nos histogramas não é uma ferramenta eficiente para o acompanhamento do cancro cítrico. Acreditamos que a solução seja aplicar diretamente esta análise nas imagens de fluorescência. Estudos envolvendo a aplicação de PCA em imagens já foi realizado por Qin e colaboradores em 2008 na análise de imagens hiperespectrais de refletância de amostras com cancro cítrico (23). É provável que somente o estudo e aplicação desta técnica em imagens possam ser considerados como parte do trabalho para o doutoramento de um aluno, por isso optou-se por não aprofundar os estudos desta técnica em imagens no momento.

Por fim, utilizamos a análise pelo método SVM sobre as imagens de fluorescência das amostras com diferentes graus de severidade de cancro cítrico. Como visto, o método SVM classifica as amostras sob estresse mecânico para o experimento com amostras destrutivas como ausente para a doença cancro cítrico, enquanto que para o experimento com amostras não-destrutivas algumas são classificadas como positivas para cancro cítrico. De fato o resultado obtido para o primeiro experimento está coerente, pois amostras com estresse mecânico não alteram a concentração de moléculas de clorofila nas folhas (36). No caso do segundo experimento não sabemos ao certo a explicação para este resultado, mas acreditamos que o número de ferimentos mecânicos (quatro) possa ter influenciado o SVM em sua classificação.

Em relação aos demais tratamentos avaliados, as curvas de evolução da doença para o experimento não-destrutivo crescem de forma gradativa (figura 4.18) enquanto que para o experimento destrutivo nota-se que a classificação das amostras como contaminadas ocorre de forma direta (figura 4.14). Tal resultado é uma possível consequência de estarmos analisando amostras iguais no decorrer do experimento. Em ambos os experimentos também observamos que para as últimas semanas, a maioria das amostras em análise são classificadas pelo método SVM como positivas para cancro cítrico.

As folhas contaminadas da variedade Limão Cravo apresentaram sintomas visuais da doença (tecido necrosado e perda de clorofila) entre 3 a 4 semanas após a inoculação da bactéria. Em relação às amostras de Ponkan e Hamlin o aparecimento dos sintomas visuais da doença ocorreu, aproximadamente, uma semana depois com lesões pequenas e de crescimento lento. Em ambos os experimentos, os resultados discutidos para a técnica SVM são satisfatórios ao acompanhar a evolução do cancro cítrico em plantas assintomáticas, sendo possível determinar o início da manifestação da doença. Estudos ainda devem ser realizados para entender e sanar os problemas observados com os resultados obtidos para amostras sob estresse mecânico no experimento não-destrutivo.

Capítulo 5 – Conclusões

Inicialmente, aprendemos que as melhores excitações para a aplicação da técnica de PCA são as excitações em 405 e 470 nm. Tal fato está de acordo com a literatura (27). Estas duas excitações representam uma das regiões do espectro onde as clorofilas absorvem fortemente (400 – 500 nm), como mostrado na figura 2.1. Nesta região, nota-se que as clorofilas *a* e *b* e os carotenóides apresentam uma absorção molar significativa, especialmente para a clorofila *a* (28). Em relação às excitações em 365 e 530 nm a absorção molar é baixa. Apesar dos LEDs e filtros ópticos que compõem nosso SIF apresentarem uma largura de banda significativa à conclusão obtida sobre as melhores excitações é igual ao apresentado pela literatura. No futuro, utilizaremos estas duas excitações em nosso sistema no estudo de alterações da emissão da fluorescência das clorofilas por doenças que afetem os citros.

A análise das imagens por histogramas nos obriga a usar regiões de interesse, e nossos resultados mostram que a forma que definimos ROI não altera a análise. Mas devemos ressaltar que ainda não sabemos lidar com a parte sadia das amostras que permanece nas imagens mesmo após a seleção do ROI. De qualquer forma, não fomos capazes de obter resultados encorajadores com a utilização dos histogramas. Através de análises preliminares das imagens de fluorescência no início deste trabalho, esperávamos a aplicação da técnica PCA apresentaria resultados significativos. Acreditamos que uma possível solução será aplicar diretamente a análise por PCA nas imagens de fluorescência. Estudos envolvendo a aplicação de PCA em imagens já foi realizado por Qin e colaboradores em 2008 na análise de imagens hiperespectrais de refletância de amostras com cancro cítrico (23). Um dos motivos que nos levou a não aplicar a análise por PCA em imagens durante o desenvolver do projeto foi o curto período de tempo para seu estudo e implementação.

Acreditamos que outras técnicas de análise de imagens possam ser utilizadas em nossas imagens de fluorescência, como por exemplo, a SVM. De nossos resultados não é claro qual método, destrutivo ou não-destrutivo das amostras, é melhor. As curvas de evolução da doença para o experimento não-destrutivo crescem de forma gradativa enquanto que para o experimento destrutivo ocorre de forma direta, apresentando saltos. Este fato não evidencia qual resultado é mais coerente devido aos vários parâmetros que foram alterados de forma não controlada, tais como, idade das folhas e números de furos nas amostras; não permitindo comparar de forma eficaz os dois experimentos.

Acreditamos que no futuro a roda de filtros ópticos, utilizada neste sistema atual, será substituída por um filtro variável que permitirá varrer continuamente o espectro de fluorescência entre 400 e 750 nm em intervalos de 10 nm. Esperamos ser capazes de identificar bandas de fluorescência específicas para as principais doenças que afetam os citros. Além disso, nosso atual sistema é composto por LEDs que apresentam bandas fracas de emissão indesejáveis em outros comprimentos de onda de interesse. Sendo assim, na continuidade deste trabalho utilizaremos filtros ópticos específicos para cada excitação a fim de barrar estas bandas, fazendo com que sua luz seja mais monocromática. Além disso, talvez acrescentemos polarizadores para investigar imagens de fluorescência em função do ângulo de polarização (49). No caso de não obtermos imagens de fluorescência inequívocas para as principais doenças com o uso do filtro variável, novamente voltamos à questão principal deste trabalho: a análise destas imagens. Assim, o estudo de técnicas de reconhecimento de padrões em imagens se faz necessário para a obtenção de características únicas que possam distinguir as doenças.

REFERÊNCIAS

- 1 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Intercâmbio comercial do agronegócio**: principais mercados de destino. Brasília, DF., 2011.
- 2 NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat: Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 2010.
- 3 ARAÚJO, L. G. **Cresce produção de laranja em São Paulo**. Disponível em: < <http://www.portalmercadoaberto.com.br/blogs-categoria-det?post=3468>>. Acesso em: 24 jan. 2012.
- 4 Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. **Produção de laranja e suco**. Disponível em: < <http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/setor/producao-192415-1.asp>>. Acesso em: 24 jan. 2012.
- 5 FIGUEIREDO, M. G.; BARROS, A. L. M; FRIZZONE, J. A; BELASQUE JUNIOR, J. Dano econômico evitado pelo controle de doenças na citricultura paulista. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47, 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SOBER, 2009.
- 6 ROSSETTI, V. **Clorose variegada dos citros**. Disponível em: < http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=44>. Acesso em: 24 jan. 2012.
- 7 Agência de Defesa e Inspeção Agropecuária de Alagoas. **Clorose variegada dos citros (CVC)**. Disponível em: <<http://www.defesaagropecuaria.al.gov.br/sanidade-vegetal/clorose-variegada-dos-citros-cvc>>. Acesso em: 24 jan. 2012.
- 8 MILORI, Débora. **A citricultura em risco – o pesadelo da Greening**. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/103543.htm>>. Acesso em: 24 jan. 2012.
- 9 AMARAL, A. M. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Comunicado Técnico, 86**, Brasília, DF., 2003.
- 10 MANUAL de cancro cítrico. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/PageFlip/pageflip.aspx?idPage=66>>. Acesso em: 24 jan. 2012.

11 SANKARAN, S.; MISHRA, A.; EHSANI, R.; DAVIS, C. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. **Computers and Electronics in Agriculture**. v.72, n.1, p. 1-13, 2010.

12 BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P.; BAKER, N. R.; OQUIST, G.; SCHREIBER, U.; LECHNER, E. G. Chlorophyll Fluorescence as a Probe of the Photosynthetic Competence of Leaves in the Field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, v. 3, n. 4, p. 497-514, 1989.

13 LINS, E. C. C. C. **Espectroscopia da fluorescência na citricultura**. 2009. 116 f. Tese (Doutorado em Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

14 GASPAROTO, M. C. G. **Relações entre espectroscopia de fluorescência, fotossíntese e severidade do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

15 LINS, E. C.; BELASQUE JUNIOR, J.; MARCASSA, L. G. Detection of citrus canker in citrus plants using laser induced fluorescence spectroscopy. **Precision Agriculture**. v.10, n.4, p. 319-330, 2009.

16 LINS, E. C.; BELASQUE JUNIOR, J.; MARCASSA, L. G. Optical fiber laser induced fluorescence spectroscopy as a citrus canker diagnostic. **Applied Optics**. v.49, n.4, p. 663-667, 2010.

17 LINS, E. C. C. C. **Técnicas ópticas para a análise da manifestação do estresse hídrico em laranjeiras**. 2005. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2005.

18 BALASUNDARAM, D.; BURKS, T.; BULANON, D.; SCHUBERT, T.; LEE, W. Spectral reflectance characteristics of citrus canker and other peel conditions of grapefruit. **Postharvest Biology and Technology**. v.51, n.2, p. 220-226, 2009.

19 NAIDU, R. A.; PERRY, E. M.; PIERCE, F. J.; MEKURIA, T. The potential of spectral reflectance technique for the detection of Grapevine leafroll-associated virus-3 in two red-berried wine grape cultivars. **Computers and Electronics in Agriculture**. v.66, n.1, p. 38-45, 2009.

- 20 HUANG, J. F.; APAN, A. Detection of Sclerotinia rot disease on celery using hiperespectral data and partial least squares regression. **Journal of Spatial Science**. v.51, n.2, p. 129-142, 2006.
- 21 LENK, S.; CHAERLE, L.; PFUNDEL, E. E.; LANGSDORF, G.; HAGENBEEK, D.; LICHTENTHALER, H. K.; VAN DER STRAETEN, D.; BUSCHMANN, C. Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications. **Journal of Experimental Botany**. v.58, n.4, p. 807-814, 2007.
- 22 CHEN, Y.; CHAO, K.; KIM, M. S. Machine vision technology for agricultural applications. **Computers and electronics in agriculture**. v.36, n.2, p. 173-191, 2002.
- 23 QIN, J.; BURKS, T. F.; KIM, M. S.; CHAO, K.; RITENOUR, M. A. Citrus canker detection using hyperspectral reflectance imaging and PCA-based image classification method. **Sensing and Instrumentation for food quality and safety**. v.2, n.3, p. 168-177, 2008.
- 24 QIN, J.; BURKS, T. F.; KIM, M. S.; RITENOUR, M. A.; BONN, W. G. Detection of citrus canker using hyperspectral reflectance imaging with spectral information divergence. **Journal of Food Engineering**. v.93, n.2, p. 183-191, 2009.
- 25 CLOUTIS, E. A. Hyperspectral geological remote sensing: evaluation of analytical techniques. **International Journal of Remote Sensing**. v.17, n.12, p. 2215-2242, 1996.
- 26 LEE, W. S.; EHSANI, R.; ALBRIGO, L. G. Citrus greening disease (Huanglongbing) detection using aerial hyperspectral imaging. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PRECISION AGRICULTURE, 9, 2008, Denver, Colorado, **Proceedings...** Denver, Colorado: ISPA, 2008.
- 27 MARCASSA, L. G.; GASPAROTO, M. C. G.; BELASQUE JUNIOR., J.; LINS, E. C.; DIAS NUNES, F.; BAGNATO, V. S. Fluorescence spectroscopy applied to orange trees. **Laser Physics**. v.16, n. 5, p. 884-888, 2006.
- 28 CEROVIC, Z. G.; SAMSON, G.; MORALES, F.; TREMBLAY, N.; MOYA, I. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. **Agronomie**. v.19, n. 7, p. 543-578, 1999.
- 29 SCHAEFER, Silvia. **Fotossíntese**. Disponível em:
<http://www.biologados.com.br/botanica/fisiologia_vegetal/fotossintese.htm>. Acesso em: 22 nov. 2011.

- 30 TERCENIO, J. C. C. **Detecção precoce da morte súbita dos citros usando fluorescência.** 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2006.
- 31 MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p.659-668, 2000.
- 32 LINS, E. C. C. C. **Técnicas ópticas para a análise da manifestação do estresse hídrico em laranjeiras.** 2005. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2005.
- 33 LAWLOR, D. W. **Photosynthesis.** 3. ed. New York: BIOS Scientific Publishers Ltd.,2001.
- 34 DUARTE, Carlos Henrique. **Detecção óptica da eficiência quântica da fotossíntese.** 2003. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2003.
- 35 GOVINDJEE. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. **Australian Journal of Plant Physiology Botany**, v. 22, n. 2, p.131-160, 1995.
- 36 BELASQUE JUNIOR., J.; GASPAROTO, M. C. G.; MARCASSA, L. G. Detection of mechanical and disease stresses in citrus plants by fluorescence spectroscopy. **Applied Optics.** v. 47, n. 11, p. 1922-1926, 2008.
- 37 CHAERLE, L.; LENK, S.; HAGENBEEK, D.; BUSCHMANN, C.; VAN DER STRAETEN, D.; Multicolor fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. **Journal of Plant Physiology.** v. 164, n. 3, p. 253-262, 2007.
- 38 BRAVO, C.; MOSHOU, D.; OBERTI, R.; WEST, J.; MCCARTNEY, A.; BODRIA, L.; RAMON, H. Foliar disease in the field using optical sensor fusion. **Agricultural Engineering International: the CIGR Journal of Scientific Research and Development.** v. 6, p. 1-14, 2004. Manuscript FP 04008.
- 39 PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P, PEREIRA-FILHO, E. R.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. T.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ÁUSTA, J. Fluorescence images combined to statistical test for fingerprint of citrus plants after bacterial infection. **Analytical Methods.** v. 3, n.3, p. 552-556, 2011.

40 LINS, E. C. C. C; MARCASSA, L. G. Construção e caracterização de um sistema de imagens hiperespectrais. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**. v. 25, n. 2, p. 67-74, 2009.

41 THORLABS. Disponível em: <www.thorlabs.com>. Acesso em: 07 Dec 2011.

42 ZHANG, M.; LIU, X.; O'NEILL, M. Spectral discrimination of *Phytophthora infestans* infection on tomatoes based on principal component and cluster analysis. **International Journal of Remote Sensing**. v. 23, n.6, p. 1095-1107, 2002.

43 WETTERICH, C. B.; BELASQUE JUNIOR., J.; MARCASSA, L. G. Fluorescence imaging spectroscopy applied to citrus diseases. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PRECISION AGRICULTURE. 10, 2010, Denver, Colorado. **Proceedings...**Denver, Colorado: ISPA, 2010.

44 JOLLIFFE, I. T. **Principal component analysis**. New York: Springer-Verlag, 2002.

45 SCHOLKOPF, B.; SMOLA, A. J. **A short introduction to learning with kernels**. Berlin/Heidelberg: Springer, 2003, p. 41-64.

46 LORENA, A. C.; CARVALHO, A. C. P. L. F. Uma introdução às support vector machines. **RITA**. v. 14, n. 2, p. 43-67, 2007.

47 VAPNIK, V. N. **The nature of statistical learning theory**. New York: Springer-Verlag, 1995.

48 BURGESS, C. J. C. A Tutorial on support vector machines for pattern recognition. **Data Mining and Knowledge Discovery**. v. 2, n. 2, p. 121–167, 1998.

49 SANKARAN, S.; EHSANI, R.; ETXEBERRIA, E. Mid-infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing (greening) in citrus leaves. **Talanta**. v. 83, n.2, p. 574–581, 2010.