UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ANIELLE COELHO RANULFI

Utilização de técnicas espectroscópicas no estudo e caracterização
de doenças em citros:
HLB (greening) e cancro cítrico

São Carlos
2014

ANIELLE COELHO RANULFI

Utilização de técnicas espectroscópicas no estudo e caracterização de
doenças em citros:
HLB (greening) e cancro cítrico

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 Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos/SP

2014

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)

Ranulfi, Anielle Coelho

Utilização de técnicas espectroscópicas no estudo e caracterização de doenças em citros: HLB (greening) e cancro cítrico / Anielle Coelho Ranulfi; orientadora Debora Marcondes Bastos Pereira Milori - versão corrigida -- São Carlos, 2014.
137 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

1. Citros. 2. Diagnóstico. 3. HLB. 4. Greening. 5. Cancro cítrico. I. Milori, Debora Marcondes Bastos Pereira, orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão,
que não mediram e não medem esforços para permitir que eu alcance os meus sonhos
mais loucos, que me suportaram e me deram suporte nos períodos mais complicados e me
ofereceram o colo quando o que eu precisei foi paz.

Dedico ainda ao meu parceiro, amigo, conselheiro e namorado Renan,
que com muita paciência e carinho fez com que este trabalho árduo não fosse tão dolorido,
que me ensinou muito, que compartilhou dúvidas e ideias, e despertou em mim um gosto
imenso por essa ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus Pai...

...por ter me confiado a vida, e com ela o dom da sabedoria. Por me fazer forte e capaz, paciente e apaixonada pela ciência!

Agradeço aos meus pais Luiz Antônio e Maria José...

...pela oportunidade dada e todo empenho dispendido para que mais este sonho se tornasse real. Por todo suporte e atenção a mim dedicados. Pela confiança no meu sucesso!

Agradeço ao meu irmão Guilherme...

...pela disposição em me ouvir, pela força mesmo de longe, por vibrar comigo durante as vitórias e apoiar quando as coisas não aconteciam como o previsto. Também pelas caronas nos finais de semana quando o que mais queríamos era voltar para casa!

Agradeço a todos os meus familiares: tios, tias, primos e avós...

...por estarem sempre por perto nos meus pensamentos e no coração, pela paz transmitida e orações realizadas durante o trajeto quando o que eu mais precisava era calma. Por todo desejo de sucesso sempre!

Agradeço aos meus amigos de longe Patrícia, Ana Livia, Martins e Elisangela...

...pela alegria de sempre, pelas longas conversas, pelos momentos de diversão necessários ao longo da caminhada e pela certeza de que eu venceria mais essa batalha. Por simplesmente existirem em minha vida!

Agradeço ao meu companheiro, amigo e amor Renan Romano...

...por estar comigo em quase todos os momentos dessa trajetória, por ouvir meus desabafos, por me trazer calma, por todos os conselhos dados, por aprender a programar e programar pra me ajudar, pelas leituras e correções sem fim, e por todo cuidado a mim dedicado. Por sua dose diária de compreensão, amor e carinho!

Agradeço à minha orientadora Débora Milori...

...por confiar a mim este trabalho, por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos, pelo sorriso e prontidão sempre, e pelas palavras de ânimo e incentivo nos momentos que eu deixei de acreditar. Por ser meu exemplo de profissional!

Agradeço aos meus mais novos amigos e companheiros de trabalho: Jéssica Thaíse, Thiago Massaiti, Marina França, Michelle Mendes, Danielle Carolina, Gabriela Rabello, Ilcemara Fachinni, Alfredo Xavier, Cléber Hilário, Ivan Perazoli, Amanda Tadini, Noemi Veiga, Elaine Pereira, Camila Carvalho, Lilian Martelli...

...pela colaboração e boa vontade sempre que precisei, pela companhia de todos os dias, pelo cafezinho no meio da tarde que geralmente terminava em boas ideias, pelas discussões sadias que resultaram em novos rumos para os trabalhos realizados pelo grupo, pelas experiências transmitidas, pela disposição em ouvir, pela gana de aprender. Obrigada por compartilharem comigo a maior parte do meu tempo durante o período de mestrado. Que venha o doutorado e que seja ao lado de vocês!

Agradeço aos pós-doutorandos e demais pesquisadores da Embrapa instrumentação: Aida, Gustavo, Aline, Bruno, Jader, Michelle, Marcelo, Ednaldo, Paulino, Cinthia...

...pela paciência em me ouvir e sanar as minhas dúvidas mais banais, por serem os responsáveis por grande parte do conhecimento e experiência que eu tenho hoje em relação ao trabalho, por todo apoio e incentivo nas horas mais difíceis e de muita correria, e pelas correções sem fim realizadas com muito cuidado e dedicação!

Agradeço às minhas companheiras de casa Mariana Bunoro, Jacqueline Brito, Bárbara Leocárdio, Juliana Schnetzler, Juliane Manzine e Kamila Silva...

...por tornarem a minha volta pra casa mais feliz depois de um dia de trabalho cansativo e nem sempre cheio de boas notícias. Em especial à Mari, por me acolher no momento em que eu mais precisei na minha volta a São Carlos!

Agradeço à Citrosuco, nas pessoas do Helton e do André...

...por todo apoio à nossa pesquisa, pelo esforço em conseguir as amostras necessárias e pela responsabilidade e seriedade demonstrada ao longo de todo o projeto. Por tornarem possível a execução deste trabalho!

Agradeço à Embrapa Instrumentação...

... por toda infraestrutura fornecida, pelo auxílio dos técnicos e de todos os funcionários.

Agradeço ao Instituto de Física de São Carlos...

...por todo apoio intelectual e financeiro, pelas aulas ministradas e por ser parte da conquista deste título!

Agradeço à CAPES...

...pelo suporte financeiro e pela concessão da bolsa nestes dois anos de muito trabalho e estudo!

*"Eu não sou tão forte quanto eu previa, nem tão fraca quanto eu temia.
Não tenho o passo rápido como eu gostaria, nem paraliso como poderia.
Aprendi a me equilibrar nos extremos.
Se não tenho o direito de escolher todos os acontecimentos, me posiciono de
acordo com os fatos.
No final, o que me move não é forte o suficiente pra me derrubar, mas é intenso
o bastante pra me fazer ir além."*

Fernanda Gaona

RESUMO

RANULFI, A. C. **Utilização de técnicas espectroscópicas no estudo e caracterização de doenças em citros: HLB (greening) e cancro cítrico.** 2014. 137p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Com clima diversificado e terras férteis, o Brasil tem vocação natural para o desenvolvimento agropecuário e todas as suas vertentes. Assim, o agronegócio é hoje a principal locomotiva da economia brasileira, representando cerca de um terço do nosso Produto Interno Bruto (PIB). Nesse contexto, o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do planeta, com destaque para a produção de laranjas. Particularmente, o país lidera a produção mundial de suco de laranja e conta com uma participação de 85% nas exportações deste produto. Porém, um dos principais fatores atuais que restringem os lucros e a expansão da citricultura é o controle fitossanitário. Atualmente, dentre as principais doenças podemos destacar o HLB e o cancro cítrico. Ambas, doenças bacterianas que não têm cura, comprometem a produção e desenvolvimento da fruta e levam à morte da árvore. Dessa maneira, o monitoramento destas é fundamental para evitar danos aos frutos e a necessidade da erradicação de plantações inteiras. O presente trabalho avaliou o emprego das técnicas de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS) e Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Laser (LIBS) como forma de diagnóstico destas doenças, se apresentando como uma alternativa às inspeções visuais e ao PCR utilizados atualmente. Para isso, folhas de citros *in natura* provenientes de plantas sadias, com HLB ou com cancro foram amostradas e medidas com ambos os sistemas. Através do sistema LIFS foi realizado um estudo de precocidade no diagnóstico do HLB. Este sistema fotônico pôde detectar a doença até 21 meses antes do aparecimento dos primeiros sintomas visuais. Foram utilizados classificadores sazonais, criados a partir de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) e conjuntos de calibração previamente avaliados. Quanto ao cancro cítrico e o sistema LIFS, taxas de acerto superiores a 90% foram alcançadas nos melhores casos de validação cruzada dos dados. A diferenciação do cancro e do HLB também foi possível pela mesma técnica ao avaliar um conjunto pequeno de dados, que atingiu uma taxa de acerto de 82%. Através dos espectros obtidos pelo sistema LIBS, avaliou-se as variações nutricionais causadas na planta devido à doença. Por meio de tais variações e métodos de PLSR foi construído um modelo para o diagnóstico de HLB alcançando taxas de acerto da ordem de 75%. Em relação ao cancro cítrico e o sistema LIBS, um estudo preliminar foi realizado, e uma taxa de acerto superior a 90% foi atingida. Por fim, os resultados corroboraram com a ideia inicial de se realizar o diagnóstico do HLB e do cancro cítrico através de técnicas fotônicas. Dentre outras vantagens estas permitem uma análise rápida, *in loco*, sem a necessidade de preparo de amostra. Além disso, para o HLB, as técnicas fotônicas demonstraram menor sensibilidade à distribuição não homogênea da doença, quando comparada com a técnica de referência (qPCR).

Palavras-chave: Citros. Diagnóstico. HLB. Greening. Cancro cítrico. Espectroscopia de fluorescência induzida por laser. Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser.

ABSTRACT

RANULFI, A. C. Employing spectroscopic techniques in the study and characterization of citrus diseases: HLB (greening) and citrus canker. 2014. 137 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

The diverse climate and fertile soils make Brazil a country with a natural vocation for agricultural development. Thus, agribusiness is now the main locomotive of the Brazilian economy, accounting for about one-third of our Gross Domestic Product (GDP). In this context, Brazil is the third largest fruit producer in the world, with emphasis on the orange production. Particularly, the country leads the world production of orange juice, and with a stake of 85% in exports of this product. However, one of the main factors that restrict current profits and the expansion of citrus production is phytosanitary control. Currently, among the major diseases we highlight the HLB (Greening) and Citrus Canker, two bacterial diseases that have no cure and affect production and fruit development. Therefore, monitoring is essential to prevent damage to the fruits and the complete eradication of infected orchards. The present study evaluated the use of Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy (LIFS) and Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) techniques as alternative diagnostic methods to visual inspection and PCR technique, currently used. For that, citrus leaves from healthy, HLB or citrus canker infected plants, were sampled and measured with both systems. Through LIFS system, a study of the HLB early diagnosis was done. This photonic system could detect the disease up to 21 months before the tree show the visual symptoms. Seasonal classifiers were used, which were designed from Partial Least Square Regression (PLSR) methods and calibration database previously acquired. Regarding citrus canker and LIFS system, success rates higher than 90% were achieved in the best cases. The differentiation between citrus canker and HLB was also possible using the same technique reaching a success rate around 82%. Through the spectrum obtained by LIBS system, it was evaluated the nutritional variations caused in the plant due to HLB, and based on these data, the diagnosis was done. The average success rate was 75%, which was achieved by PLSR model. Regarding on citrus canker and LIBS system, a preliminary study was carried out and a success rate greater than 90% was achieved. Finally, the results corroborated with the use of photonic techniques for the HLB and citrus canker diagnosis. Among other advantages, they allow rapid analysis, *in loco* and without the need of sample preparation. In addition, for the HLB, photonics techniques showed lower sensitivity to the non-homogeneous distribution of the disease when compared with the reference technique (qPCR).

Keywords: Citrus. Diagnosis. HLB. Greening. Citrus canker. Laser induced fluorescence spectroscopy. Laser induced breakdown spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 – Evolução da balança comercial brasileira e da balança comercial do agronegócio de 1989 à 2013..... 24
- Figura 1.2 – Incidência de HLB e Cancro Cítrico nas regiões produtoras de citros. Para o HLB a contaminação é dada em porcentagem de plantas sintomáticas encontradas. E para o Cancro Cítrico, é dada em porcentagem de talhões contaminados..... 27
- Figura 2.1 – Em a) *Diaphorina citri* adulto se alimentando em uma planta hospedeira e ainda ninfas do inseto (de coloração amarelada) que se alimentam de folhas e galhos jovens, normalmente onde os ovos são colocados. Em branco tem-se o exsudato ceroso do psíldeo do citros. Em b) micrografia eletrônica da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. habitando o floema de uma árvore de citros doente, com HLB. 30
- Figura 2.2 – Exemplos de sintomas gerais do HLB. Em a) nota-se o amarelecimento geral do ramo doente, contrastando com o verde do restante do galho. Em b) uma folha apresentando o mosqueado assimétrico característico da doença. As nervuras com aspecto de cortiça estão destacadas em c). A árvore com intensa desfolha e queda de frutos devido ao HLB é mostrada na foto d). Em e) nota-se o fruto doente, deformado, com albedo espesso e sementes abortadas. Em f) à esquerda um fruto saudável e à direita um fruto doente, mais ressecado, e sem o pedúnculo que mantém o fruto ligado à árvore, devido à distribuição irregular de nutrientes..... 31
- Figura 2.3 – Sintomas de Cancro Cítrico em a) folhas e frutos, e em b) o detalhe da lesão com o halo amarelado e o encharcamento ao redor do tecido necrosado. Em c) tem-se uma micrografia eletrônica de varredura de uma folha com bactérias *Xanthomonas citri citri* entrando na câmara estomática. A foto em d) mostra uma árvore de laranja doce infectada com cancro cítrico e apresentando queda de frutos devido à doença..... 33
- Figura 2.4 – Ciclo do Cancro Cítrico no campo. 1) Chuva, irrigação ou orvalho induzem a exsudação de pus bacteriano das lesões para a superfície da planta. 2) Região lesionada da folha: uma erupção, formada por células hiperplásticas cercadas de um sulco central de células mortas; 3) Ocorrência de chuvas subsequentes provocam respingos de água contendo bactérias, que são então disseminadas pelo vento. 4) A chuva e o vento transportam o inóculo para as plantas ainda saudáveis. 5) Essa água contaminada pode causar a congestão do tecido foliar, formando uma camada fina entre a superfície da planta e o mesófilo por meio do estômato, promovendo a infecção. 6) Lesões já formadas em folhas, frutos e ramos jovens; mais

susceptíveis à doença. 7) Desfolha, poda ou outra atividade que possa causar ferimentos à planta, e/ou a transmissão mecânica da bactéria podem levar à infecção. 8) Ferimentos abrem os tecidos do mesófilo para infecção direta.34

Figura 2.5 – Árvore contaminada com o Cancro Cítrico após ter sido queimada na tentativa de controlar a disseminação da doença em campo. As duas árvores vizinhas também foram eliminadas como forma de precaução.35

Figura 3.1 – Spin nos estados fundamental e excitados. A diferença entre uma molécula no estado fundamental e no estado excitado está no fato de os elétrons serem diamagnéticos no estado fundamental e paramagnéticos no estado excitado. Essa diferença no estado do spin faz com que a transição singleto para tripleto (ou tripleto para singleto) seja mais improvável do que as transições do tipo singleto-singleto, já que a primeira envolve uma mudança no estado eletrônico. Em vermelho está o spin *up* e em azul o spin *down*.42

Figura 3.2 – Espectro eletromagnético. Destaque para o intervalo da luz visível.42

Figura 3.3 – Diagrama de Jablonski. As setas apontando para cima, em violeta e azul representam a energia absorvida pelo sistema. Em laranja é possível notar as relaxações vibracionais. A conversão interna e externa está indicada pela seta preta tracejada. A seta preta contínua, também na diagonal, indica o cruzamento intersistema, que envolve estados excitados singleto e tripleto. Em verde, está representado o decaimento referente à fluorescência, e em vermelho, o decaimento da fosforescência.43

Figura 3.4 – Estrutura das moléculas de clorofila *a* e *b*. Na sua estrutura básica observa-se uma porfirina, com um magnésio no centro, e um quinto anel pirrólico conferindo à estrutura ainda mais rigidez e um grande número de elétrons. As setas indicam os radicais que diferenciam a clorofila *a* da clorofila *b*.45

Figura 3.5 – Esquema contendo os principais componentes de um aparato de espectroscopia de fluorescência. Uma fonte de luz com ampla faixa espectral para excitação da amostra incide em um monocromador para a seleção do comprimento de onda de excitação, e a luz selecionada incide na amostra, que responde com a fluorescência. Além da fluorescência é possível captar a reflexão da luz usada na excitação, e para eliminar esta influência, antes chegar ao monocromador de emissão a luz passa por um filtro. Feito isso, a luz proveniente da fluorescência da amostra atinge o detector, que está ligado a um computador dedicado à aquisição e análise dos dados.46

Figura 3.6 – Esquema do aparato geral envolvido no funcionamento da técnica LIBS mostrando os seus principais componentes.47

Figura 3.7 – Diagrama mostrando os principais eventos que envolvem uma medida LIBS.	48
Figura 3.8 – Importantes períodos de tempo após a formação do plasma durante o qual ocorre a predominância de diferentes espécies. Na figura t_d representa o tempo de delay, ou seja, o tempo entre a formação do plasma e o início da observação das emissões; e t_b representa o tempo durante o qual as emissões são monitoradas.	50
Figura 3.9 – Esquema representando os típicos processos radiativos que ocorrem no plasma. 1) livre – livre (transição no contínuo); 2) ligado – ligado (linha de transição); 3) livre – ligado (transição no contínuo); 4) ionização a partir de um estado excitado; e 5) ionização a partir do estado fundamental.	51
Figura 4.1 – Disposição de parte do conjunto de árvores do “entorno”.	56
Figura 4.2 - Esquema simplificado do sistema LIFS montado no Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação. Como fonte luz para excitação da amostra é usado um laser. Este induz a fluorescência da amostra, que é então captada e conduzida por uma fibra óptica até um espectrômetro. Este por sua vez, está ligado a um computador e um software dedicado para a aquisição e análise dos dados.	59
Figura 4.3 - Exemplo do momento de uma medida utilizando o sistema LIFS-561nm na face abaxial de uma folha de laranja doce.	60
Figura 4.4 – Esquema temporal das aquisições LIBS.	61
Figura 4.5 - Foto do equipamento LIBS2500 – Ocean Optics. À esquerda está a câmara de ablação, no centro observa-se a fonte do laser de Nd:YAG, e à direita, o conjunto dos sete espectrômetros interligados e seus respectivos cabos de fibra óptica.	62
Figura 4.6 - À esquerda demonstração de como a folha foi dobrada após eliminação da nervura central. À direita, folha posicionada no porta amostra pronta para aquisição dos espectros de LIBS.	63
Figura 4.7 - Espectro LIBS característico de uma folha de citros, e em destaque cada uma das janelas espectrais.	63
Figura 4.8 – Região do primeiro espectrômetro com a identificação de alguns picos nele presentes.	64
Figura 5.1 – Espectros de fluorescência médios típicos de cada uma das três classes envolvidas no estudo do HLB.	71
Figura 5.2 – Espectros de absorção da luz por alguns dos pigmentos presentes nos cloroplastos. A linha tracejada em vermelho destaca o comprimento de onda de 405 nm utilizado nas análises desta etapa.	73

Figura 5.3 - Dados médios mensais de pluviosidade e temperatura do local onde as amostras foram coletadas.	74
Figura 5.4 – PCA-3D do conjunto de amostras envolvidas nos classificadores de época chuvosa (acima) e de época de seca (abaixo) nos quais se pode notar a separação das classes envolvidas.	76
Figura 5.5 – Gráfico de evolução da incidência do HLB nas árvores do “entorno” acompanhadas e diagnosticadas pelo sistema LIFS-405 em comparação com a curva de infestação do pomar estudado, cujo diagnóstico foi feito através das inspeções visuais em campo.	82
Figura 5.6 – Gráficos dos espectros médios característicos das classes de folhas estudadas através do sistema de fluorescência. Acima, espectros obtidos pelo sistema LIFS-405, e abaixo os espectros adquiridos pelo sistema LIFS-561.	84
Figura 5.7 – Gráfico de correlação das áreas dos picos de Titânio em 334,94 nm e 336,13 nm.	90
Figura 5.8 - Gráfico de correlação das áreas dos picos de Silício em 288,16 nm e Sódio em 309,27 nm.	91
Figura 5.9 - Espectro de LIBS característico de cada uma das classes em estudo. Em destaque pelas linhas pontilhadas encontram-se as divisões dos sete espectrômetros que compõem o equipamento LIBS 2500.	92
Figura 5.10 - À esquerda, taxa de acerto em função do número de componentes utilizados no classificador via PLSR. E à direita, RMSE em função do número de componentes utilizados no classificador via PLSR. Ao correlacionar ambos os dados, chegou-se ao número ideal de 20 componentes para os estudos com os dados de um espectro completo de LIBS.	93
Figura 5.11 - Gráfico do p-valor fornecido pelo Teste t na comparação Saud x HLB_Sint, e junto o espectro médio da classe Saudável e da classe HLB_Sintomática para facilitar a identificação e verificar o comportamento dos picos.	97
Figura 5.12 - Picos do Carbono presentes no espectro LIBS de folhas de citros e resultados do Teste t a que foram submetidos os dados.	98
Figura 5.13 - Picos de Magnésio presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e ainda o p-valor, resultado do Teste t aplicado.	100
Figura 5.14 – Pico de Silício presente no espectro LIBS de folhas de citros Saudáveis e HLB-Sintomáticas, e resultado do p-valor após aplicação do Teste t.	101

Figura 5.15 - Pico de Alumínio presente no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e resultado do p-valor obtido após aplicar o Teste t.....	102
Figura 5.16 - Picos de Sódio presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e ainda o p-valor, resultado do Teste t aplicado.	103
Figura 5.17 - Picos de Cobre presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e ainda o p-valor, resultado do Teste t aplicado. Em destaque encontram-se as regiões de cruzamento entre as intensidades dos espectros médios.....	104
Figura 5.18 - Picos de Titânio presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e o p-valor, resultado do Teste t aplicado.....	105
Figura 5.19 - Pico de Ferro presente no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e resultado do p-valor obtido após aplicar o Teste t.....	106
Figura 5.20 - Picos de Potássio presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e o p-valor, resultado do Teste t aplicado.....	107
Figura 5.21 - Picos de Cálcio presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e o p-valor, resultado do Teste t aplicado.....	107
Figura 5.22 - Espectro de LIBS característico de cada uma das classes em estudo.....	117
Figura 5.23 - Análise de componentes principais (PCA) evidenciando a possibilidade de separação entre as diferentes classes das doenças em estudo. O primeiro PCA é apresentado em duas dimensões e o segundo em três.....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Posição e participação mundial do Brasil na produção e exportação de produtos agrícolas no ano de 2009.....	24
Tabela 4.1 - Parâmetros para os sistemas LIFS.....	60
Tabela 4.2 - Intervalo espectral referente a cada um dos sete mini-espectrômetros do equipamento LIBS2500 (Ocean Optics).....	61
Tabela 4.3 - Classes que foram comparadas segundo o Teste t aplicado nos dados de intensidade dos espectros LIBS.	67
Tabela 5.1 – Matrizes de confusão para validação dos classificadores de épocas chuvosas e de seca construídos.....	77
Tabela 5.2 – Diagnóstico mensal das plantas do conjunto do “entorno” feito através dos classificadores sazonais implementados. Em azul, a árvore central que apresentou sintomas de HLB e foi erradicada no início do estudo; em vermelho destaca-se a planta que foi diagnosticada como doente, apresentando 3 ou mais folhas diagnosticadas como tal; em amarelo as árvores dadas como suspeitas por apresentarem uma ou duas folhas diagnosticadas como doente durante a classificação; com um X em preto identificamos a árvore que apresentou os sintomas da doença e foi erradicada, e também o mês quando isso aconteceu; o X em azul claro identifica os meses em que foi realizado o teste de PCR de todas as 40 plantas, e também discrimina aquelas plantas cujo resultado do teste foi positivo para a presença da bactéria causadora do HLB.....	78
Tabela 5.3 - Mapa final de infestação segundo diagnóstico realizado pelos classificadores sazonais criados.....	81
Tabela 5.4 - Matrizes de confusão da validação cruzada dos classificadores à esquerda, e da validação com conjunto externo à direita para ambos os sistemas de fluorescência estudados.....	86
Tabela 5.5 – Matriz de confusão obtida na diferenciação do HLB e do cancro cítrico para os dois sistemas ópticos em avaliação.	87
Tabela 5.6 - Taxa de acerto global do classificador obtida por meio da validação cruzada em relação à mediana e à média para cada um dos sete espectrômetros – dados sem nenhum tratamento prévio. Em destaque os dois melhores desempenhos.	94
Tabela 5.7 - Taxa de acerto global do classificador obtida por meio da validação cruzada em relação à mediana e à média das amostras para cada um	

dos sete espectrômetros - dados normalizados por espectrômetro. Em destaque os dois melhores desempenhos.	95
Tabela 5.8 - Picos identificados no espectro LIBS, e seus respectivos comprimentos de onda, intensidade relativa, coeficiente de Einstein, energia dos níveis de transição e configuração eletrônica, que apresentaram diferença estatística significativa entre os dados através das análises do p-valor obtidos por meio do Teste t.	109
Tabela 5.9 – Matriz de confusão da validação cruzada em dez grupos realizada com o conjunto selecionado pela técnica LIFS para os estudos preliminares com a técnica LIBS. Para este caso, 81,2% das instâncias foram classificadas corretamente.	111
Tabela 5.10 – Taxa de acerto obtida durante a validação cruzada em 10 grupos dos classificadores implementados a cada mês de medidas.	112
Tabela 5.11 - Taxa de acerto global do classificador para Cancro Cítrico obtida por meio da validação cruzada em relação à mediana e à média para cada um dos sete espectrômetros – dados sem nenhum tratamento prévio. Em destaque os melhores desempenhos.	118
Tabela 5.12 - Taxa de acerto global do classificador obtida por meio da validação cruzada em relação à mediana e à média das amostras para cada um dos sete espectrômetros - dados normalizados por espectrômetro. Em destaque os melhores desempenhos.	119
Tabela 5.13 – Matrizes de confusão das combinações Cravo X Valência e Cravo X Pêra, na tentativa de diagnóstico do Cancro Cítrico.	120
Tabela 5.14 – Matriz de confusão contendo a porcentagem de acerto para cada uma das cinco classes estudadas.	120

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	A IMPORTÂNCIA DO AGRONEGÓCIO PARA O BRASIL	23
1.2	A IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO DE LARANJA NO BRASIL.....	24
1.3	LARANJA E SUCO DE LARANJA: PROJEÇÕES.....	25
1.4	O PROBLEMA DAS DOENÇAS	26
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	<i>HUANGLONGBING (HLB) OU CITROS GREENING</i>	29
2.2	CANCRO CÍTRICO	32
2.3	REAÇÕES DAS PLANTAS A ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS	36
2.4	TÉCNICAS FOTÔNICAS E SUAS APLICAÇÕES NA AGRICULTURA.....	37
3	FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	41
3.1	TÉCNICAS FOTÔNICAS: PRINCÍPIOS	41
3.1.1	<i>Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS)</i>	41
3.1.2	<i>Espectroscopia de Emissão de Plasma Induzido por Laser (LIBS)</i>	46
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	AMOSTRAS	55
4.1.1	<i>Conjunto para o estudo do HLB</i>	55
4.1.2	<i>Conjunto para o estudo do Cancro Cítrico e distinção entre doenças</i>	56
4.1.3	<i>Preparo das amostras</i>	56
4.2	TESTE DE qPCR	57
4.3	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER.....	58
4.4	ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR LASER.....	60
4.4.1	<i>Identificação das linhas de emissão dos espectros LIBS</i>	63
4.5	TRATAMENTO DOS DADOS	64
4.5.1	<i>LIFS</i>	64
4.5.2	<i>LIBS</i>	66
4.5.3	<i>Classificadores via regressão</i>	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	71
5.1	LIFS	71
5.1.1	<i>HLB</i>	71
5.1.2	<i>CANCRO CÍTRICO</i>	83
5.2	LIBS	88
5.2.1	<i>HLB</i>	88
5.2.2	<i>CANCRO CÍTRICO</i>	116
6	CONCLUSÃO	123
	REFERÊNCIAS	127

1 INTRODUÇÃO

1.1 A IMPORTÂNCIA DO AGRONEGÓCIO PARA O BRASIL

Com um clima diversificado, chuvas regulares, energia solar abundante e grande parte de toda a água doce disponível no planeta, o Brasil tem cerca de 70 milhões de hectares de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade. (1) Esses fatores fazem do país um lugar de vocação natural para a agropecuária e todos os negócios relacionados à suas cadeias produtivas. O desenvolvimento científico-tecnológico e a modernização da atividade rural, conseguidos através de pesquisas e da expansão da indústria de máquinas e implementos, contribuíram muito para que o país atingisse o patamar de uma das mais respeitáveis plataformas mundiais do agronegócio. O agronegócio é hoje a principal locomotiva da economia brasileira. (2)

O valor financeiro exportado pelo agronegócio em 2013 foi recorde, e totalizou cerca de US\$ 99,97 bilhões (aumento de 4,3% em relação a 2012), contra uma importação que cresceu 4% atingindo aproximadamente US\$ 17,06 bilhões, promovendo um superávit de US\$ 82,91 bilhões, ressaltando a importância estratégica do setor. Se não fosse o agronegócio, a balança comercial brasileira passaria de um superávit de US\$ 2,56 bilhões para um déficit de US\$ 80,35 bilhões, o que comprometeria a estabilidade econômica e o real segundo dados da Secretaria de Comércio Exterior (SECEX) e do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC). (3) A figura 1.1 demonstra a evolução da balança comercial brasileira e do agronegócio nos últimos vinte e quatro anos, destacando a importância do setor atualmente. (4)

Figura 1.1 – Evolução da balança comercial brasileira e da balança comercial do agronegócio de 1989 à 2013.

Fonte: CONAB (4).

1.2 A IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO DE LARANJA NO BRASIL

O Brasil é um dos principais fornecedores de produtos agropecuários para o mundo segundo dados divulgados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). A tabela 1.1 traz um ranking brasileiro de suas principais produções e exportações no setor segundo dados divulgados em 2010. (5)

Tabela 1.1 – Posição e participação mundial do Brasil na produção e exportação de produtos agrícolas no ano de 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

Fonte: NEVES; 2010 (5). A partir de dados do GV Agro (6) e USDA (7).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo. Nesse contexto, destaca-se a produção de laranjas brasileira, com 16,36 milhões de toneladas em 2012/2013 e deve

aumentar em torno de 8% em 2013/2014, segundo a USDA, (8) atingindo 17,75 milhões de toneladas, impulsionada por elevada produtividade e clima favorável. (9)

A safra de 2014/2015 deve alcançar 317 milhões de caixas, segundo estimativas da Associação Nacional de Exportadores de Sucos Cítricos (CitrusBR), um crescimento de aproximadamente 10% em relação à safra 2013/2014 estimada em 284,9 milhões de caixas. (10) Em um período de 20 anos, o Cinturão Citrícola Brasileiro¹ aumentou sua produção de caixas de laranja em mais de 45%, enquanto sua concorrente, a região da Flórida, teve sua produção reduzida em 9%. (5) O que explica tais reduções é, não apenas os fatores climáticos, mas também o investimento brasileiro em pesquisa e tecnologia e o aumento dos nossos pomares, que acabaram por tornar a nossa produção mais competitiva.

É com o suco de laranja que o país confirma sua liderança. De cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos no Brasil. Em nenhuma outra *commodity*², o país tem expressividade semelhante. A força da indústria brasileira de suco de laranja não está só nas exportações. O seu caráter empreendedor impulsionou, na década de 1990, o surgimento das primeiras agroindústrias brasileiras a atuarem em solos estrangeiros, o que fortaleceu ainda mais a sua posição competitiva frente ao cenário internacional. Apenas no Cinturão Citrícola, o Brasil produz 53% de todo o suco de laranja produzido no mundo. (5) Atualmente, a produção brasileira de suco de laranja deve crescer cerca de 18% na safra de 2013/2014 com melhora no rendimento. Ainda segundo dados do USDA, a exportação brasileira de suco deve superar a produção, fazendo com que os estoques caiam, acompanhando o ritmo dos embarques. Já a produção de suco de laranja dos Estados Unidos deve cair cerca de 12%, principalmente devido a perdas com HLB na Flórida. (9)

1.3 LARANJA E SUCO DE LARANJA: PROJEÇÕES

A produção de laranja deve alcançar mais de 20,2 milhões de toneladas na safra 2013/2014 e atingir 23,8 milhões de toneladas em 2023. Essa variação corresponde a uma taxa anual de crescimento de 1,7%. A área colhida com laranja deve expandir-se nos próximos anos, dos atuais 811 mil para 906 mil hectares em 2023 com uma taxa de 1% ao ano. O Brasil deve exportar 2,6 milhões de toneladas de suco de laranja no final do período das projeções. (11)

¹ Região formada pelo estado de São Paulo e sul de Minas Gerais.

² Palavra originária da língua inglesa que significa mercadoria. É um termo genérico para definir produtos de base (frequentemente utilizadas como insumos na produção de outros bens e serviços), homogêneos, de alto consumo, pouca industrialização, produzido e comercializado por diversas empresas, com qualidade quase uniforme e cujo preço é controlado por bolsas internacionais.

1.4 O PROBLEMA DAS DOENÇAS

Os principais fatores atuais que limitam os lucros e a expansão da citricultura são as restrições comerciais na forma de barreiras ao comércio, e principalmente, problemas fitossanitários. Atualmente, as plantações de frutas cítricas podem ser acometidas por uma variedade enorme de doenças e pragas. O monitoramento destas é fundamental para evitar danos aos frutos, e a necessidade de erradicação de plantações inteiras.

Adotando um rendimento médio de duas caixas de laranja por árvore estima-se que o Cancro Cítrico, a CVC, a Morte Súbita e o Greening, ou *Huanglongbing* (HLB), foram responsáveis por uma redução anual de cerca de 78 milhões de caixas, que, comparadas com os 317 milhões de caixas colhidas na safra 2009/10, representam uma diminuição de safra da ordem de 20%. (5) O HLB é a mais recente e destrutiva doença bacteriana dos citros no Brasil, e a que causa grande preocupação aos citricultores pela velocidade com que a doença se espalha. Surgiu na Ásia há mais de cem anos, e foi identificado pela primeira vez no Brasil em 2004, na região de Araraquara – São Paulo. Já o Cancro Cítrico, também uma doença bacteriana, causa queda prematura das folhas e frutos, depreciação da qualidade de produção pela presença de lesões nos frutos, e restrição da comercialização da produção para áreas livres da doença. Também teve origem na Ásia e chegou ao Brasil em 1957, quando foi constatada nos estados de São Paulo e Paraná. (12)

Atualmente, o manejo adotado para uma tentativa de controle do HLB são pulverizações para controle do inseto vetor, erradicação de árvores doentes e plantio de mudas certificadas. As árvores doentes são identificadas através de inspeções visuais frequentes na fazenda na busca por sintomas da doença. Para o diagnóstico da doença usualmente é utilizada a técnica PCR (Reação em Cadeia Polimerase), usada para confirmação da presença da bactéria em campo. (13–15) Porém, trata-se de uma técnica cara, cujo resultado pode demorar dias, e é inviável do ponto de vista prático e econômico para ser aplicado em toda plantação.

Para prevenir o aparecimento do Cancro Cítrico também são feitas inspeções visuais frequentes e bem mais cuidadosas do que as realizadas para o HLB, uma vez que os sintomas são menos visíveis; é realizado ainda o plantio de mudas sadias certificadas, desenvolvidas em viveiros telados; todo o material de colheita é cuidadosamente manipulado; e também é feito o plantio de quebra ventos para evitar a ação do vento e poeira sobre o pomar. Quando uma planta é identificada com sintomas, o procedimento é eliminá-la do pomar para que se evite dessa maneira a permanência do inóculo no campo. No estado de São Paulo está em

vigor uma Resolução³ que obriga a eliminação das árvores contaminadas, que devem ser queimadas no local, e pulverização das demais plantas de citros abrangidas pelo raio perifocal de no mínimo 30 metros, medido a partir da planta contaminada (e eliminada), com calda cúprica na concentração de 0,1% de cobre metálico, repetindo a pulverização a cada brotação.

Apesar destes esforços, dados de incidência das duas doenças mostram crescimento alarmante, como é possível notar no gráfico da figura 1.2 em que se encontram representados os dados dos levantamentos amostrais realizados pelo Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS). (16) Só no estado de São Paulo, maior região produtora de laranja do país, dados da Coordenadoria de Defesa Agropecuária apontam que durante o segundo semestre de 2013 3,5 milhões de plantas com sintomas de HLB foram eliminadas, assim como ocorreu com 70,7 mil plantas com sintomas de cancro. Os maiores índices de eliminação de plantas com HLB encontram-se nas regiões dos Escritórios de Defesa Agropecuária (EDAs) de Limeira (4,8%), Ribeirão Preto (4,7%), Araraquara (2,9%), Jaú (2,8%), Jaboticabal (2,4%), São José da Boa Vista (2,3%), e Mogi Mirim (2%). Para o cancro cítrico, as regiões dos EDAs com maior porcentagem de plantas eliminadas estão em General Salgado (1%), Jales (0,32%), Lins (0,07%), Barretos (0,05%) e Catanduva (0,05%). (17)

Figura 1.2 – Incidência de HLB e Cancro Cítrico nas regiões produtoras de citros. Para o HLB a contaminação é dada em porcentagem de plantas sintomáticas encontradas. E para o Cancro Cítrico, é dada em porcentagem de talhões contaminados.

Fonte: Elaborada pela autora. A partir de dados do FUNDECITRUS (16).

Diante do exposto, é possível observar a gravidade e distribuição espacial das doenças que acometem os pomares, a baixa eficiência no controle do desenvolvimento de tais doenças

³ Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, Resolução SAA – 147, de 31/10/2013. Disponível em: < <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=981> >

bacterianas, que se propagam com velocidade assustadora, e por fim a necessidade de meios de diagnóstico precoce, já que não existe a cura para determinadas doenças. Cada doença ou estresse biótico sofrido pela planta leva a alterações específicas no metabolismo da mesma, que por sua vez, acarretam em alterações químicas em seus órgãos. Tais alterações podem, por fim, ser detectadas pela aplicação de técnicas espectroscópicas adequadas e, assim realizadas a caracterização e diagnóstico da doença.

Desta forma, este trabalho vem continuar estudos propostos pelo grupo do Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação, São Carlos – SP, que viabiliza esforços na busca e desenvolvimento de equipamentos alternativos para diagnóstico de doenças do citros, baseados nos princípios da biofotônica. Nele, foram usadas as seguintes técnicas fotônicas: Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser, do inglês *Laser-induced Fluorescence Spectroscopy* (LIFS), e Espectroscopia de Emissão Óptica de Plasma Induzido por Laser, do inglês *Laser-induced Breakdown Spectroscopy* (LIBS). Estas foram empregadas na medida de folhas de citros doentes (HLB), sintomáticas e assintomáticas, e também de folhas saudáveis. Para o Cancro Cítrico os resultados foram obtidos também por meio da medida de folhas das mesmas classes acima citadas para um estudo preliminar da doença. Para todos os casos não houve necessidade de preparo de amostra, sendo os dados adquiridos nas folhas *in natura*. Foi verificada a potencialidade das técnicas como forma de diagnóstico das doenças, e também como forma de investigação e identificação das principais consequências metabólicas das doenças na planta. Para as tentativas de diagnóstico, foi realizada a indução de classificadores via Regressão por Mínimos Quadrados Parciais, do inglês *Partial Least Square Regression* (PLSR), metodologia proposta por Frank e colaboradores, (18) e empregada por Cardinali. (19,20) Por meio da técnica LIFS, foi verificada ainda a capacidade de diagnóstico precoce do HLB em um estudo com árvores em campo acompanhadas por um longo período. A técnica LIBS foi aplicada para investigações mais aprofundadas da composição elementar das folhas de plantas doentes com HLB e plantas saudáveis, e verificando as variações tentou-se compreender melhor a doença e fazer o diagnóstico através destes dados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HUANGLONGBING (HLB) OU CITROS GREENING

Existem indícios de que o HLB se originou no sul da China por volta de 1890, final do século 19. (21) Foi inicialmente conhecida como *Huanglongbing*, a “doença do dragão amarelo” pelos sintomas de mosqueado amarelado que surgiam nas folhas. A partir daí, começou a aparecer ao redor do globo nos países produtores de citros como Filipinas (1921), sul da África (1929) e Indonésia (1940). Nas Américas os relatos são que a doença atingiu o Brasil em 2004 e a Flórida no ano seguinte. (22)

O primeiro caso da doença no Brasil apareceu na região de Araraquara, estado de São Paulo, e foi este o primeiro caso do continente americano. (22) Atualmente está presente nos principais parques citrícolas do país, presente nos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais, e causando grandes preocupações aos citricultores. O HLB é causado por uma bactéria, a *Candidatus Liberibacter asiaticus*, assim denominada por ter aparecido na Ásia. Na África, a espécie patogênica é a *Candidatus Liberibacter africanus*. (23) Uma terceira espécie encontrada no Brasil foi denominada *Candidatus Liberibacter americanus*. (24) Apesar disso, no Brasil prevalece a forma asiática. (25) A bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. habita os vasos do floema das plantas doentes, impedindo a circulação da seiva elaborada, prejudicando o desenvolvimento da mesma, e podendo leva-la à morte (figura 2.1-a). O período de incubação do HLB depende de vários fatores como condições edafoclimáticas ⁴ (principalmente temperatura), idade e genótipo da planta hospedeira, concentração bacteriana na transmissão, espécie de *Ca. Liberibacter*, da época do ano, entre outros. (26,27)

A transmissão da bactéria se dá por um psíldeo (inseto vetor), conhecido por *Diaphorina citri* (figura 2.1-b). O tamanho deste inseto adulto pode variar de 2,7 a 3,3 mm de comprimento. Suas asas possuem manchas marrons (28) e a coloração do abdômen pode variar de cinza a amarelo, passando por tons de azul/verde. (29) Os adultos se alimentam em galhos jovens e em folhas em qualquer estágio de desenvolvimento. Eles diferem de outros insetos por seus corpos formarem ângulos de 45 graus com a folha/galho. (28) Se alimentam através de uma peça bucal, chamada de estilete, que é inserida na planta para sugar a seiva

⁴ A expressão condições edafoclimáticas se refere a características definidas através de fatores do meio, tais como o clima, o relevo, a temperatura, a umidade do ar, a radiação, o tipo de solo, o vento, a composição atmosférica e a pluviosidade.

elaborada do floema, local onde habitam as bactérias causadoras do HLB. (30) Assim as bactérias causadoras do HLB são inoculadas pelo inseto via saliva.

Figura 2.1 – Em a) *Diaphorina citri* adulto se alimentando em uma planta hospedeira e ainda ninfas do inseto (de coloração amarelada) que se alimentam de folhas e galhos jovens, normalmente onde os ovos são colocados. Em branco tem-se o exsudato ceroso do psíldeo do citros. Em b) micrografia eletrônica da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. habitando o floema de uma árvore de citros doente, com HLB.

Fonte: a) WARNERT (31). b) BRLANSKY; ROGERS (32).

O sintoma inicial do HLB aparece, frequentemente, em um ramo ou galho, que apresenta folhas de coloração amarelada ou mosqueadas⁵, contrastando com a cor verde do restante da planta, que não se encontra afetada (figura 2.2-a,b). Pode atingir tanto plantas jovens quanto plantas adultas. (25) Em alguns casos pode ser observado o engrossamento e clareamento das nervuras da folha, que ficam com aspecto de cortiça (figura 2.2-c). Conforme a doença evolui, observa-se intensa desfolha dos ramos afetados, podem surgir novos brotos, mas as folhas são pequenas, amareladas e voltadas para cima, e os sintomas aparecem em outros ramos da planta, tomando toda a copa, evoluindo para a seca e morte de ponteiros como mostra a figura 2.2-d. (33) O fruto de plantas contaminadas apresenta-se deformado e assimétrico, devido a diferenças de maturação entre as diversas partes internas, e permanece verde mesmo após amadurecimento, daí o nome Greening. (33) O albedo (parte branca da casca), em alguns casos, apresenta uma espessura maior, se comparada a frutos normais. É comum ocorrer redução no tamanho dos frutos e intensa queda. As sementes, geralmente, apresentam-se abortadas, de coloração escura, pequenas e com má formação (figura 2.2-e). (34)

Finalmente, quando toda a copa da planta é atingida pela doença, ocorre a morte desta.

⁵ Manchas irregulares no limbo foliar, alternado gradativamente entre o verde e o amarelo. (33)

Figura 2.2 – Exemplos de sintomas gerais do HLB. Em a) nota-se o amarelecimento geral do ramo doente, contrastando com o verde do restante do galho. Em b) uma folha apresentando o mosqueado assimétrico característico da doença. As nervuras com aspecto de cortiça estão destacadas em c). A árvore com intensa desfolha e queda de frutos devido ao HLB é mostrada na foto d). Em e) nota-se o fruto doente, deformado, com albedo espesso e sementes abortadas. Em f) à esquerda um fruto saudável e à direita um fruto doente, mais ressecado, e sem o pedúnculo que mantém o fruto ligado à árvore, devido à distribuição irregular de nutrientes.

Fonte: a) FILHO e CARLOS (34). b) Elaborada pela autora. c) FUNDECITRUS (33). d) SOUTHWEST (35). e) Elaborada pela autora. f) Elaborada pela autora.

Atualmente no Brasil, a principal forma de manejo do HLB é a realização de inspeções visuais frequentes no pomar, principalmente entre os meses de fevereiro e setembro em que os sintomas estão mais aparentes facilitando a detecção. A vistoria é realizada por pessoas treinadas ao reconhecimento dos sintomas iniciais da doença, e pode ser realizada a pé ou em

plataformas. Ao encontrar plantas doentes no pomar, estas devem ser eliminadas. Porém, antes da erradicação, é altamente recomendada a pulverização com inseticidas para evitar que insetos contaminados migrem e transmitam a doença para plantas saudáveis durante a operação de arranquio das árvores. O monitoramento e controle da *Diaphorina citri* devem ser realizados concomitantemente por meio de pulverizações com inseticidas em todo pomar, e ainda colocação de armadilhas adesivas. Outra importante forma de manejo é a aquisição de mudas saudáveis para plantio, produzidas em viveiros telados e certificados. (33)

Os sintomas do HLB podem facilmente ser confundidos com deficiências nutricionais como de zinco, manganês, magnésio ou cobre. Este fator somado a fatores intrínsecos de uma inspeção humana (subjetividade e inferência por cansaço e estresses ambientais) podem gerar a ocorrência de escapes nas inspeções visuais, fazendo com que árvores doentes sejam mantidas no campo. Além disso, o período de latência da doença é bastante longo, ou seja, uma árvore pode permanecer doente no campo sem manifestar sintomas durante anos, servindo como fonte de inóculo e foco de espalhamento da doença.

O método analítico mais usado para a confirmação/diagnóstico da doença é a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR, do inglês *quantitative Polymerase Chain Reaction*). O qPCR é uma técnica baseada na amplificação do ADN (Ácido Desoxirribonucleico, ou DNA, do inglês *Deoxyribonucleic acid*) da bactéria causadora da doença. (30-31) Porém, como a distribuição da bactéria ao longo de toda copa da planta não é uniforme, a técnica também é falha, e não 100% conclusiva. Além disso, a utilização do qPCR na construção de mapas de infestação é uma prática inviável, tanto economicamente quanto pelo tempo que consome a sua execução para se aplicar em uma plantação inteira. Alguns estudos têm sido conduzidos na busca por métodos alternativos de diagnóstico desta e outras doenças, (19,38–40), que permitam medidas em larga escala.

2.2 CANCRO CÍTRICO

Existem evidências de que o cancro cítrico apareceu pela primeira vez em áreas tropicais da Ásia entre 1827 e 1831, como sul da China, Indonésia e Índia, região em que o citros se originou. (41) No Brasil, relatam que o primeiro caso ocorreu em 1957, na região de Presidente Prudente, estado de São Paulo. (12) Atualmente, a doença ocorre em mais de trinta países na Ásia, ilhas dos oceanos Pacífico e Índico, América do Sul e Estados Unidos. (42)

Causado pela bactéria *Xanthomonas citri citri* (*Xcc*), o Cancro Cítrico ataca todas as variedades e espécies de citros, havendo apenas variação quanto à susceptibilidade. Atualmente, constitui-se numa das mais graves doenças da citricultura, pois não existem medidas capazes de eliminá-la completamente do pomar. (43) Milhões de dólares são gastos anualmente em todo o mundo na prevenção, quarentena, programas de erradicação e controle da doença. O impacto no comércio é devastador, já que as restrições interestaduais e internacionais impedem o transporte e comercialização de frutos originários de áreas infestadas. (42)

A doença manifesta-se por lesões em folhas, frutos e ramos, e quando as condições são altamente favoráveis à infecção estas provocam desfolhamento, morte descendente e aborto de frutos (figura 2.3-a,d). As lesões se iniciam como pequenas pontuações e atingem de 2 a 10 mm de diâmetro e se tornam visíveis cerca de 7 a 10 dias após a infecção. Uma das principais características é o halo amarelado ao redor da lesão foliar, e um encharcamento ao redor do tecido necrosado (figura 2.3-b). Em galhos e frutos os sintomas são semelhantes. Nos galhos, as lesões não apresentam a clorose ao redor da ferida, e a doença pode levar ao perecimento dos mesmos. Quando isso não acontece, as lesões e, conseqüentemente, as bactérias, podem permanecer ali por muitos anos. Nos frutos, as lesões podem ser profundas, atingindo seu interior, provocando o apodrecimento, e ainda pode provocar a queda prematura dos mesmos. (44)

Figura 2.3 – Sintomas de Cancro Cítrico em a) folhas e frutos, e em b) o detalhe da lesão com o halo amarelado e o encharcamento ao redor do tecido necrosado. Em c) tem-se uma micrografia eletrônica de varredura de uma folha com bactérias *Xanthomonas citri citri* entrando na câmara estomática. A foto em d) mostra uma árvore de laranja doce infectada com cancro cítrico e apresentando queda de frutos devido à doença.

Fonte: GOTTFWALD; GRAHAM; e SCHUBERT (44).

Semelhante a outros agentes bacterianos, a chuva com vento é o principal mecanismo de dispersão a curta e média distância. (40-41) A bactéria se propaga em lesões nas folhas, frutos e ramos, e se houver umidade livre sobre as lesões, as bactérias podem escoar para tal umidade e desta forma ser dispersa, até atingir outras plantas e nelas se desenvolverem, já que

a umidade ajuda na penetração da bactéria através dos poros estomáticos ou feridas (lesões) feitas por espinhos ou até mesmo insetos (figura 2.3-c). (47) A longa distância, o principal mecanismo é o movimento humano de materiais ou amostras de plantas doentes, ou uso de equipamentos contaminados por exposição a outras árvores doentes, por exemplo, máquinas e tratores. (44) A figura 2.4 apresenta um esquema do ciclo da doença.

Quando a disseminação da doença ocorre na presença de minadoras (*Phyllocnistis citrella*, ou lagarta mineira), ocorre um agravamento na infestação do pomar. As lagartas se alimentam da epiderme imediatamente abaixo da cutícula foliar, aumentando enormemente a quantidade de lesões nas folhas, e consequentemente a produção de inóculo e o potencial para infecções a maiores distâncias.

Figura 2.4 – Ciclo do Cancro Cítrico no campo. 1) Chuva, irrigação ou orvalho induzem a exsudação de pus bacteriano das lesões para a superfície da planta. 2) Região lesionada da folha: uma erupção, formada por células hiperplásticas cercadas de um sulco central de células mortas; 3) Ocorrência de chuvas subsequentes provocam respingos de água contendo bactérias, que são então disseminadas pelo vento. 4) A chuva e o vento transportam o inóculo para as plantas ainda saudáveis. 5) Essa água contaminada pode causar a congestão do tecido foliar, formando uma camada fina entre a superfície da planta e o mesófilo por meio do estômato, promovendo a infecção. 6) Lesões já formadas em folhas, frutos e ramos jovens; mais susceptíveis à doença. 7) Desfolha, poda ou outra atividade que possa causar ferimentos à planta, e/ou a transmissão mecânica da bactéria podem levar à infecção. 8) Ferimentos abrem os tecidos do mesófilo para infecção direta.

Fonte: Adaptado de GOTTWALD, GRAHAM; SCHUBERT. (44)

A principal forma de diagnóstico da doença são as inspeções visuais, já que os sintomas são bem característicos, realizadas por pessoal treinado, e de forma mais lenta do que as inspeções de HLB. Como medida de controle são erradicados e queimados os pés que apresentarem os sintomas da doença, e as árvores suspeitas em um raio de 30 metros devem ter especial atenção (figura 2.5). Como já mencionado, em São Paulo, segundo uma Resolução recente, tais árvores suspeitas devem ser pulverizadas com calda cúprica na concentração de 0,1% de cobre metálico, repetindo a cada brotação. Além disso, o citricultor deverá realizar no mínimo uma vistoria trimestral em todas as plantas de citros da propriedade, como o objetivo de identificar e eliminar plantas que apresentem sintomas do cancro cítrico. Todo o material usado na erradicação e que circula pelos talhões, tais como enxadas, máquinas e implementos, deve ser desinfetado. A aquisição de mudas certificadas e saudáveis, o plantio de quebra ventos, o controle do minador do citros e o uso de bactericidas cúpricos também são medidas de manejo atualmente adotadas. (48)

Figura 2.5 – Árvore contaminada com o Cancro Cítrico após ter sido queimada na tentativa de controlar a disseminação da doença em campo. As duas árvores vizinhas também foram eliminadas como forma de precaução.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar das medidas tomadas, a incidência do cancro cítrico vem crescendo no Brasil. A inspeção visual é ineficiente, e a disseminação da doença naturalmente inevitável. De acordo com o Fundecitrus, o cancro cítrico apresentou um crescimento de 893% na incidência da doença de 2009 a 2012. E de 2011 para 2012, a incidência aumentou cerca de 39%. (49)

2.3 REAÇÕES DAS PLANTAS A ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS

As plantas passam constantemente por diversas situações de estresses e conseguem modular a resposta de defesa para superá-las, e poder retornar ao metabolismo normal. (50) Para isso, as plantas produzem uma variedade imensa de compostos orgânicos em diferentes rotas metabólicas. O metabolismo primário é o nome dado ao conjunto de processos que desempenham papel fundamental na planta, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos, e ainda, estão distribuídos universalmente nos vegetais, como é o caso dos aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, carboidratos e a clorofila. (51) Já os compostos que não possuem uma distribuição universal, e que parecem não ter função direta no crescimento e desenvolvimento da planta, como possuem os metabólitos primários, são originados pelo metabolismo secundário. Estes podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos nitrogenados. As funções dos metabólitos secundários estão sendo elucidadas aos poucos, e atualmente é conhecido que eles possuem papel importante na reação das plantas a estresses bióticos (causados por proliferação de patógenos, ação por herbívoros etc.) e abióticos (causados por fatores físicos e químicos, como altas e baixas temperaturas, deficiências nutricionais, poluições ambientais, contaminações por metais pesados, e falta de água (estresse hídrico)). (52) Assim protegem as plantas contra herbívoros e organismos patogênicos, agem como atrativos para os animais polinizadores e atuam como agentes na competição planta-planta e na simbiose planta-microrganismo; e ainda, tem ação protetora relacionada às mudanças de temperatura, quantidade de água disponível, níveis de luz, exposição à radiação ultravioleta (UV) e à falta de nutrientes minerais.

Estudos anteriores demonstram que existem variações tanto nos metabólitos primários, como nos metabólitos secundários, no caso de uma planta estar sob um determinado estresse, ou seja, estresses bióticos ou abióticos modificam consideravelmente a composição química e a quantidade de pigmentos das folhas das plantas, alterando seu desempenho fotossintético. (52–58) Dessa forma, busca-se através das técnicas fotônicas identificar e caracterizar as variações que ocorrem nas plantas doentes, diferenciando-as das folhas de plantas saudáveis, com a intenção específica de se buscar o diagnóstico de algumas das doenças dos citros.

2.4 TÉCNICAS FOTÔNICAS E SUAS APLICAÇÕES NA AGRICULTURA

A fluorescência é um fenômeno ótico de emissão de luz por um substrato que absorveu fótons do ambiente (59) ou da fonte que a excita, e para isso geralmente utiliza-se lasers e lâmpadas. A fluorescência ocorre tipicamente em estruturas rígidas, cadeias fechadas e com ligações duplas. A falta de rigidez, como a de moléculas com cadeias lineares e longas, aumenta a taxa de relaxação vibracional. A rigidez de compostos aromáticos garante que a energia da radiação incidente não seja perdida completamente em relaxações vibracionais (decaimentos não-radiativos), (59) o que aumenta a chance de emissão da radiação. Assim, existem inúmeras aplicações da técnica nas mais diferentes áreas. Tem vasta aplicação no estudo da estrutura molecular de compostos orgânicos, em biotecnologia e monitoramento ambiental, em diagnósticos médicos, sequenciamento de DNA, entre outros. No setor agrícola a técnica vem sendo estudada quanto ao empregado nos mais diversos fins, tais como na avaliação do grau de humificação da matéria orgânica em solos (60–62) e assim, mapeamento de regiões ou setores agrícolas. É uma técnica não invasiva, que requer pouco preparo de amostra e demonstra alta sensibilidade a alterações físicas e químicas do material a ser analisado.

Segundo Buschmann, (54) a fluorescência da vegetação terrestre consiste quase exclusivamente da fluorescência das folhas. As folhas por sua vez, possuem quatro bandas de fluorescência: uma no vermelho (próximo a 690 nm) e outra no infravermelho (próximo a 740 nm), correspondente à fluorescência da clorofila, e outras duas bandas largas na região do azul (430-450 nm) e verde (520-530 nm), correspondendo às emissões de ácidos cinâmicos, ácidos p-cumáricos e ácidos ferrúlicos (metabólitos secundários). (63) Doenças, estresses ou outras alterações podem levar a variações nas concentrações dos pigmentos e metabólitos na planta, e estas podem ser detectadas pela técnica fotônica de fluorescência. (64)

No que concerne à aplicação no setor agrícola, o Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação possui ampla experiência na utilização da técnica de fluorescência foliar para diferentes finalidades, como na diferenciação das combinações de copa e porta-enxerto de citros (65) e diagnóstico de doenças, (20,55,66). Milori e colaboradores (65) alcançaram nos melhores casos algo em torno de 100% de acerto na diferenciação de mudas de diferentes combinações de copas e porta-enxertos de laranja doce. No caso do diagnóstico de estresse em plantas a técnica se mostrou promissora em diversos estudos realizados. (52,54,63,67)

Em um estudo com mudas, Venâncio (66) demonstrou resultados promissores utilizando da espectroscopia de fluorescência induzida por laser com excitação em 561 nm, conseguindo o diagnóstico precoce do HLB em aproximadamente 60% das mudas a partir do terceiro mês após a inoculação. O sistema utilizado foi o desenvolvido no Laboratório de Óptica e Lasers da Embrapa Instrumentação, o mesmo equipamento que utilizamos para dar sequência à pesquisa, e que se encontra na patente internacional *WO2010069017-A1*. (68). Em um estudo anterior, realizado no mesmo laboratório, Zaghi e colaboradores (55) conseguiram com índices acima de 93% de acerto a diferenciação das doenças HLB Sintomática e Assintomática, Morte Súbita do Citros, Declínio e folhas saudas, de diferentes combinações de copa e porta-enxerto utilizando a espectroscopia de fluorescência induzida por laser aliada ao método quimiométrico de Análise de componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) demonstrando a sensibilidade da técnica. Índice este superior ao alcançado por Terêncio em 2006, (64-65) 83% de acerto, utilizando do mesmo sistema na tentativa de detecção de plantas com Morte Súbita do Citros.

Em um trabalho subsequente, Cardinali (20) analisou, através do equipamento também desenvolvido no próprio Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação, com emissão em 405 nm, os espectros de fluorescência de folhas saudas, doentes com HLB-sintomáticas, doentes com HLB-assintomáticas e folhas de árvores com a doença Clorose Variegada do Citros; a taxa de acerto médio do classificador utilizado foi de 90%, com desvio padrão de 7%. A classe sadia apresentou maior taxa de acerto e seus erros ocorreram apenas com HLB-assintomática. Importante ressaltar também que não houve confusões entre HLB-sintomática e CVC com saudas, reforçando a robustez da classe.

LIBS é uma técnica espectroscópica usada para determinar a composição elementar e está em uma crescente na área científica. É um método de espectroscopia de emissão atômica que utiliza um plasma gerado por laser como fonte de energia para vaporizar, atomizar e excitar a amostra. (71) Com o resfriamento do plasma, os elétrons excitados retornam aos seus estados fundamentais liberando a energia absorvida na forma de radiação eletromagnética, cujas frequências são características de cada espécie excitada. A identificação dos átomos presentes na amostra se dá pela identificação das linhas de emissão, que constam na literatura. (72,73) Dentre as características potenciais da técnica LIBS para o estudo com plantas, é possível citar: o fato de viabilizar o mapeamento das folhas em diferentes posições, permitir análises elementares em amostras *in natura*, possibilitar a análise de praticamente todos os elementos presentes na tabela periódica, requerer pouco ou nenhum preparo de amostra, o que

proporciona rapidez e acarreta em menor custo das análises, (74) e ainda, o fato de a configuração do sistema viabilizar a portabilidade de equipamentos para medidas *in loco*.

Em um estudo realizado em 2010, Pereira e Milori (75) ressaltam a importância da avaliação da composição mineral das plantas para compreender o HLB, e utilizam da Fluorescência de Raio-X e ferramentas quimiométricas para identificação de alguns elementos essenciais para a diferenciação de três classes de plantas: Sadias, HLB Sintomáticas e HLB Assintomáticas. O modelo reforçou a evidência de que as plantas infectadas pelo HLB sofrem alterações em seus macro e micronutrientes, e ainda, demonstra a possibilidade de prever a fase de infecção através da composição mineral. Desta forma, em um novo experimento, utilizando de inoculação controlada da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em mudas de laranja doce de copa Valência e porta enxerto Swingle, Pereira e colaboradores (38) verificaram que os dados de LIBS, também em conjunto com o uso de ferramentas quimiométricas, foram extremamente eficazes na investigação da composição mineral e orgânica de plantas saudáveis e doentes - atestadas pela técnica de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR, do inglês *quantitative Polymerase Chain Reaction*), demonstrando a importância e robustez da técnica. Um modelo de classificador criado utilizando tais dados alcançou uma taxa de 97% de acerto na predição da doença. Neste trabalho, buscou-se ir a fundo às análises elementares das amostras de folhas saudáveis, e com HLB sintomática e assintomática, a fim de compreender melhor as variações nos macro e micronutrientes devido à doença, já verificados anteriormente. Classificadores envolvendo uma nova classe, o cancro cítrico, também foram criados buscando novos métodos de diagnóstico para doenças dos citros.

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 TÉCNICAS FOTÔNICAS: PRINCÍPIOS

A palavra fotônica vem do grego “photos”, que significa luz. É um campo que teve início com a invenção do laser em 1960, e foi se desenvolvendo com outras criações, como o laser de diodo em 1970, a transmissão de informações por fibras ópticas no século 20, entre outras. (76) Atualmente, fotônica é considerada a área da ciência que trata do desenvolvimento e aplicações da luz, desde o infravermelho até ultravioleta. No cotidiano é possível encontrar exemplos de fotônica em sistemas bastante consolidados, como: aparelhos de DVD, leitores ópticos de supermercados, displays, equipamentos oftálmicos, lasers para tratamento dermatológico, etc. Em função do seu caráter multidisciplinar a fotônica atualmente se divide em seis grandes áreas: Tecnologia da Informação e Telecomunicações, Saúde e Ciências da Vida – Biofotônica, Sensores Ópticos, Iluminação, Energia e Displays, Sistemas Ópticos na Indústria, Segurança Nacional e Defesa, e a Fabricação de sistemas e componentes ópticos.

Nesta seção serão apresentados os princípios básicos das técnicas fotônicas que serão utilizadas ao longo deste trabalho: Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser e a Espectroscopia de Emissão Óptica de Plasma Induzido por Laser.

3.1.1 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER (LIFS)

Fisicamente os fótons absorvidos pela estrutura eletrônica elevam a energia da molécula a estados quânticos excitados. Para a molécula excitada atingir o estado fundamental ela deve dissipar a energia absorvida por processos de decaimento radiativo e/ou não-radiativo. O processo de decaimento não-radiativo é aquele no qual a energia em excesso é liberada por relaxações vibracionais das moléculas, (77) e acontecem muito mais rapidamente devido às colisões entre elas ($10^{-11} - 10^{-13}$ segundos). Quando ocorre emissão de radiação pela matéria o fenômeno é chamado de luminescência. Esta é, por sua vez, dividida formalmente em duas categorias: a fluorescência e a fosforescência, que ocorrem dependendo da natureza do estado excitado. A fluorescência ocorre a partir de estados excitados do tipo singleto, estado em que o spin dos elétrons se encontra anti-paralelo, ou seja, um spin *up* e um spin *down*, como se pode notar na ilustração da figura 3.1. Já a fosforescência ocorre a partir de estados excitados

do tipo tripleto, estado em que o spin dos elétrons se encontra paralelo, ou seja, ambos spin *up* ou ambos spin *down* (figura 3.1).

Figura 3.1 – Spin nos estados fundamental e excitados. A diferença entre uma molécula no estado fundamental e no estado excitado está no fato de os elétrons serem diamagnéticos no estado fundamental e paramagnéticos no estado excitado. Essa diferença no estado do spin faz com que a transição singleto para tripleto (ou tripleto para singleto) seja mais improvável do que as transições do tipo singleto-singleto, já que a primeira envolve uma mudança no estado eletrônico. Em vermelho está o spin *up* e em azul o spin *down*.

Fonte: CHEMWIKI. (78)

A espectroscopia eletrônica ocorre na região que vai do ultravioleta ao infravermelho próximo, passando pelo visível, regiões que podem ser observadas no espectro eletromagnético da figura 3.2.

Figura 3.2 – Espectro eletromagnético. Destaque para o intervalo da luz visível.

Fonte: ROHDEN (79).

A teoria quântica mostra que a energia das moléculas é quantizada em certos valores, e estes dependem da diferença de energia entre os níveis eletrônicos envolvidos na transição. A energia é dada pela Lei de Planck, e expressa pela equação $E = h\nu = hc/\lambda$; em que E é a energia, h a constante de Planck, c a velocidade da luz, ν e λ a frequência e o comprimento de

onda do fóton, respectivamente. Quando ocorre uma transição eletrônica, a molécula deve, portanto, absorver ou emitir a diferença de energia, de acordo com a seguinte relação:

$$\Delta E = E_f - E_i = h\nu \quad \text{Equação (1)}$$

onde E_f e E_i são respectivamente as energias dos estados eletrônicos final e inicial.

A figura 3.3 mostra um típico diagrama de Jablonski, em que o estado fundamental singlete, e o primeiro e segundo estado excitado singlete estão designados, respectivamente, por S_0 , S_1 e S_2 . Nestes, os fluoróforos podem existir em diferentes níveis de energia vibracionais, designados por 0, 1, 2... . O estado eletrônico tripleto está representado por T_1 . As transições entre os estados foram retratadas em setas verticais. (59)

Figura 3.3 – Diagrama de Jablonski. As setas apontando para cima, em violeta e azul representam a energia absorvida pelo sistema. Em laranja é possível notar as relaxações vibracionais. A conversão interna e externa está indicada pela seta preta tracejada. A seta preta contínua, também na diagonal, indica o cruzamento intersistema, que envolve estados excitados singlete e tripleto. Em verde, está representado o decaimento referente à fluorescência, e em vermelho, o decaimento da fosforescência.

Fonte: Elaborada pela autora.

O processo de **absorção** de energia ocorre muito rapidamente, com transições tipicamente da ordem de 10^{-15} s, um tempo muito pequeno para deslocamentos do núcleo de acordo com o que diz o Princípio de Franck-Condon, assim a transição mais provável é aquela que não envolve a mudança das coordenadas nucleares e é representada pela seta completamente vertical na ilustração da figura 3.3. Após o processo de absorção, podem então ocorrer diversos processos, descritos também na figura 3.3. Por exemplo, o fluoróforo

excitado em algum nível eletrônico mais alto (por exemplo, S_1 ou S_2), pode diminuir sua energia sobre decaimentos não radiativos, ou seja, energia dissipada em vibrações moleculares. (59) Colisões de moléculas com as espécies excitadas e o solvente levam a uma rápida transferência de energia e um pequeno aumento da temperatura do solvente. Estes processos de **relaxação vibracional** são muito rápidos, chegando a durar 10^{-12} s ou menos.

Se após o processo de relaxação descrito acima, o fluoróforo ainda possuir energia o suficiente para migrar para outro estado excitado S_1 , ele o faz por **conversão interna**, um processo intermolecular de uma molécula que passa para um estado eletrônico mais baixo sem a emissão de radiação e sem mudança no estado de spin. Assim, pode acontecer entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade (singleto-singleto ou tripleto-tripletto). A conversão interna é mais eficiente quando dois níveis de energia eletrônicos são próximos o suficiente para que seus níveis de energia vibracionais possam se sobrepor, como mostrado na figura 3.3 entre S_1 e S_2 . Também entre os níveis S_0 e S_1 pode ocorrer a conversão interna, porém é menos provável e menos entendida até o momento. (78)

O processo de **conversão externa** envolve a interação e a transferência de energia entre os estados excitados e o solvente ou soluto. Baixas temperaturas e uma alta viscosidade levam, portanto, a uma maior fluorescência, pois reduzem o número de colisões entre as moléculas, e desta forma, retardam as perdas energéticas por esta via. (78)

O retorno ao estado fundamental a partir do mais baixo nível vibracional do estado excitado S_1 , sem variação do spin total ($\Delta S=0$), é uma transição permitida por dipolo elétrico e acontece a uma taxa de mais ou menos 10^{-8} s^{-1} . A este tipo de transição radiativa chamamos **fluorescência**. (59) Apenas para lembrar, as regras de seleção que determinam as transições permitidas por dipolo elétrico são $\Delta l = \pm 1$, $\Delta m = 0, \pm 1$ e $\Delta s = 0$, a partir da qual a transição acima foi justificada.

Moléculas no estado S_1 podem também fazer uma conversão para primeiro estado tripleto T_1 . E a conversão de S_1 para T_1 é chamada de **cruzamento intersistema** e ocorre com variação no valor do spin total da molécula ($\Delta S=1$). Emissões a partir de T_1 para o fundamental são proibidas por dipolo elétrico pelas regras de seleção quânticas, mas podem ocorrer via interações do tipo quadrupolar elétrica ($\Delta S=0$), resultando em decaimento radiativo lento, da ordem de segundos a milissegundos, e neste caso denominam-se **fosforescência**. (59)

A fluorescência em compostos orgânicos ocorre usualmente em sistemas cíclicos rígidos e com duplas ligações. A molécula de clorofila, que absorve nas regiões do azul e vermelho e

fluoresce no vermelho e infravermelho, é formada basicamente por uma porfirina contendo no seu centro um íon Mg. Ela possui um quinto anel adicional à estrutura básica das porfirinas de quatro anéis pirrólicos, contendo um grande número de duplas ligações em um sistema conjugado, sendo tais ligações alternadamente simples e duplas, possuindo muitos elétrons que podem tomar parte na absorção da luz. A estrutura da molécula de clorofila está ilustrada na figura 3.4.

Figura 3.4 – Estrutura das moléculas de clorofila *a* e *b*. Na sua estrutura básica observa-se uma porfirina, com um magnésio no centro, e um quinto anel pirrólico conferindo à estrutura ainda mais rigidez e um grande número de elétrons. As setas indicam os radicais que diferenciam a clorofila *a* da clorofila *b*.

Fonte: MARTINEZ (80).

De modo geral, um equipamento de espectroscopia de fluorescência consiste basicamente de uma fonte de luz com uma ampla faixa espectral para excitação da amostra, um monocromador para seleção do comprimento de onda de excitação, um monocromador para medir a luz emitida pela amostra, um filtro para reduzir a entrada de luz da excitação no monocromador de emissão, um detector de luz, e por fim, um computador com software dedicado para a aquisição e análise dos dados. Na espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS) no lugar de uma fonte de luz e um monocromador de excitação se utiliza um laser. Nesta configuração se perde o grau de liberdade de variação do comprimento de onda de excitação, mas é possível aumentar a intensidade de luz excitando a amostra em comprimentos de onda onde a absorção de luz é mais efetiva para observação da fluorescência

desejada. A figura 3.5 mostra um esquema simplificado de um aparato de espectroscopia de fluorescência.

Figura 3.5 – Esquema contendo os principais componentes de um aparato de espectroscopia de fluorescência. Uma fonte de luz com ampla faixa espectral para excitação da amostra incide em um monocromador para a seleção do comprimento de onda de excitação, e a luz selecionada incide na amostra, que responde com a fluorescência. Além da fluorescência é possível captar a reflexão da luz usada na excitação, e para eliminar esta influência, antes chegar ao monocromador de emissão a luz passa por um filtro. Feito isso, a luz proveniente da fluorescência da amostra atinge o detector, que está ligado a um computador dedicado à aquisição e análise dos dados.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.2 ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO DE PLASMA INDUZIDO POR LASER (LIBS)

Após a criação do laser, em 1960, foi desenvolvido o laser pulsado, que pode operar em dois modos: *Q-switching* e *mode-locking*. O *Q-switching*, é também conhecido por “pulso gigante”, por ser um pulso com energia de pico elevada. Portanto, este tem a capacidade de produzir altas densidades de energia, quando focalizado, a partir de um pulso único, de duração suficiente para se iniciar uma ruptura óptica (“*breakdown*”) e gerar um plasma que possa ser aproveitado e estudado. A partir daí deu-se o nascimento da técnica LIBS, que nos anos subsequentes teve seus métodos desenvolvidos e aplicados nas mais diversas análises. (71) A técnica tem crescido muito nas últimas três décadas e, mais recentemente, foi possível assistir o emprego da mesma em um sistema embarcado no *Curiosity Rover*, um equipamento desenvolvido pelo grupo *Chem Cam* e pela NASA (*National Aeronautics and Space Administration*), que faz análises de forma remota em solos do planeta Marte. (81–83)

A técnica emprega lasers pulsados de alta energia que são focalizados na superfície da amostra, de modo a gerar um plasma, que ao se resfriar emite luz a partir de íons, átomos e moléculas. Uma porção da luz gerada pelo plasma é coletada e direcionada a um espectrômetro por meio de fibras ópticas. Este por sua vez, tem como função difratar a luz emitida pelos analitos excitados no plasma, e enviar a um detector, que grava os sinais emitidos por este. Tais sinais são processados via meios eletrônicos e os resultados mostrados

por um computador. (76) Sabendo então que cada elemento químico possui uma configuração única de níveis de energia, o espectro de emissão obtido será também único e referente a cada um dos elementos presentes na amostra, permitindo sua caracterização multielementar. Um esquema básico dos aparatos envolvidos no funcionamento da técnica é mostrado na figura 3.6 a seguir.

Figura 3.6 – Esquema do aparato geral envolvido no funcionamento da técnica LIBS mostrando os seus principais componentes.

Fonte: Adaptado do livro de CREMERS; RADZIEMSKY (76).

LIBS é, portanto, uma técnica bastante atrativa quando comparada com outras de análise elementar devido à rapidez das análises e à simplicidade do aparato que envolve aquisições desse tipo. Porém, os processos físicos e químicos envolvidos não são nada simples. (76) Primeiramente, o processo de ablação é governado por diversos mecanismos não lineares. Uma vez que o raio laser é focalizado sobre a superfície da amostra, uma porção deixa a superfície amostral na forma de elétrons, íons, átomos e moléculas, cada uma em um processo separado no tempo e espaço. (84)

Para simplificar, o processo de ablação será dividido em três etapas principais: Absorção da luz, quebra de ligações (*breakdown*) e ignição do plasma; Expansão e resfriamento do plasma; e ejeção e condensação de partículas, e que estão ilustradas no diagrama da figura 3.7. Na primeira etapa, durante a absorção da luz e as quebras de ligações, são dois os principais mecanismos de absorção de fótons. O primeiro deles é conhecido como **Inverso de bremsstrahlung**. Quando os elétrons livres são desacelerados no campo Coulombiano dos íons, eles emitem fótons em um fenômeno denominado *bremsstrahlung*. Porém, na presença de um campo eletromagnético externo, os elétrons livres absorvem permanentemente fótons provenientes do campo do laser, e em média, as absorções excedem as emissões, fazendo com

que os elétrons acelerem e o plasma es quente, e aí se tem o efeito inverso de bremsstrahlung. (85) Este é resultado de colisões elétron-íon no plasma e depende do comprimento de onda (λ^3). O segundo mecanismo de absorção de fótons é conhecido como **fotoionização**. Este envolve a absorção de fótons por átomos ou íons, que então perdem um ou mais elétrons. A combinação destes dois mecanismos determina as propriedades do plasma.

Além disso, os mecanismos e as propriedades do plasma são fortemente dependentes da irradiância (potência/área) e também do tempo de duração do pulso. A irradiância precisa ser alta o suficiente para que o plasma seja formado durante a porção inicial do pulso e absorva uma fração substancial dos fótons do laser durante a parte restante do pulso, e este limiar foi medido por diversos grupos, e um deles chegou a valores no intervalo de $0,3GW/cm^2$ e $0,8GW/cm^2$. (86) Para um laser com pulsos de nanosegundos, como o usado nos experimentos conduzidos neste trabalho, a parte final deste pode ainda ser absorvida pelo plasma induzido pelo mesmo pulso de laser, efeito que se denomina **blindagem do plasma**, e que influencia não só no quanto da parte sólida é convertida em vapor, como também nas propriedades do próprio vapor. (84)

Figura 3.7 – Diagrama mostrando os principais eventos que envolvem uma medida LIBS.

Fonte: Adaptado de MIZIOLEK; PALLESCHI; SCHECHTER (71).

Em seguida, ocorre a expansão do plasma, basicamente governada pelas propriedades iniciais do plasma, pela quantidade de energia acoplada no volume, pelo tamanho do feixe de laser e pelo meio em que ocorre. A energia acumulada no plasma por meio da absorção de fótons leva à expansão da matéria ablacionada no gás ambiente, dando origem a uma onda de

choque. A passagem da onda de choque leva ao aquecimento do gás ambiente e à formação de elétrons livres. Assim, a camada de gás que encontra-se imediatamente atrás da onda de choque se torna capaz de absorver fótons do laser, sendo portanto excitado e ionizado, dando origem a um novo reservatório de plasma, que por sua vez, empurra a frente da onda de choque e alimenta o processo. (87) Então, a densidade eletrônica e a temperatura do plasma diminuem conforme ele se expande, e a compreensão de como isso ocorre é essencial para otimização das medidas com LIBS, pois é nesta fase (resfriamento) que aparecem as linhas discretas de emissão atômicas e iônicas. Por fim, o plasma, ao resfriar, se condensa.

Pelo fato do plasma ter origem em um laser pulsado, o espectro resultante evolui rapidamente no tempo, (71) o que está esquematicamente representado na figura 3.8. Assim, em um primeiro momento as emissões são dominadas por uma luz branca originada pela emissão de elétrons acelerados. Durante todo o tempo existem as emissões no contínuo, porém à medida que o plasma resfria, ocorre a diminuição da densidade de elétrons, as emissões no contínuo diminuem e as emissões iônicas e atômicas começam a ocorrer e se sobressaem no espectro. Na figura 3.8 é possível observar esta diminuição da intensidade das emissões no contínuo com o tempo. O símbolo t_d representa o tempo de atraso, contado a partir do início do pulso de laser, a partir do qual será aberta a janela para aquisição do sinal, e t_b representa a duração temporal dessa janela. Devido à resolução temporal das emissões do plasma é possível ajustar o tempo de atraso e a janela de aquisição de modo a captar de forma mais intensa e predominante o sinal das emissões que se deseja observar. (71,76)

Figura 3.8 – Importantes períodos de tempo após a formação do plasma durante o qual ocorre a predominância de diferentes espécies. Na figura t_d representa o tempo de delay, ou seja, o tempo entre a formação do plasma e o início da observação das emissões; e t_b representa o tempo durante o qual as emissões são monitoradas.

Fonte: Adaptado de MIZIOLEK; PALLESCHI; SCHECHTER (71).

A figura 3.9 apresenta esquematicamente os típicos processos de emissão de radiação que ocorrem no plasma. O primeiro e o terceiro deles são responsáveis pelo contínuo. A transição designada como 1), livre – livre, ocorre devido ao efeito de *bremsstrahlung*, (76) e é conhecida como radiação do tipo livre – livre já que se origina em partículas carregadas, e que permanecem livres tanto antes quanto após as interações. Já a transição seguinte, livre – ligado, indicada por 3), ocorre devido às recombinações. Estas acontecem quando um elétron livre é capturado por um íon, e emite um fóton ao perder energia cinética. (74-75)

Figura 3.9 – Esquema representando os típicos processos radiativos que ocorrem no plasma. 1) livre – livre (transição no contínuo); 2) ligado – ligado (linha de transição); 3) livre – ligado (transição no contínuo); 4) ionização a partir de um estado excitado; e 5) ionização a partir do estado fundamental.

Fonte: Adaptado de CREMERS; RADZIEMSKY (76).

Quando ocorrem transições entre estados ligados, como a que acontece na transição 2) apresentada na figura acima, há a perda de energia na forma de um fóton, que é característica da diferença energética entre os dois níveis de energia envolvidos. Assim, a frequência da linha espectral resultante da transição entre dois níveis de energia é dado por $h\nu_{12} = E_2 - E_1$, em que h é a constante de Planck, ν a frequência, E_1 a energia do estado final e E_2 a energia do estado inicial. (71) A este tipo de emissão chamamos de espontânea. A probabilidade de ocorrência dessa transição por segundo é dada pelo Coeficiente de Einstein para emissão espontânea, conhecido pelo símbolo A_{21} , e é uma propriedade intrínseca do átomo.

Assim, a espectroscopia envolve a interação da radiação eletromagnética com átomos e moléculas, e para certos tipos de interação estes podem ser aproximados por dipolos elétricos, possuindo então momento de dipolo. É por fim, o momento de dipolo que interage com o campo elétrico da radiação. Se o modo de oscilação e o campo elétrico possuem mesma frequência e fase, pode ocorrer transferência de energia para as espécies químicas, e a transição espectroscópica pode ocorrer. Assim, o momento de dipolo indica se esta pode ocorrer, e as regras de seleção apontam quais são experimentalmente observáveis. Vale lembrar que as transições proibidas pelas aproximações de dipolo podem aparecer nas radiações de quadrupolo ou de dipolo magnético. (71)

A intensidade das linhas de emissão depende de dois fatores. O primeiro deles diz respeito às propriedades intrínsecas do átomo, e o segundo fator se refere às condições de excitação,

ou seja, se o meio é fino opticamente (o que ocorre a baixas concentrações do vapor), diminuindo as chances de ocorrência de reabsorção. O perfil das linhas também depende de alguns fatores e dentre eles, dois são predominantes. Pode ocorrer o alargamento das linhas devido ao Efeito *Doppler* (perfil gaussiano), que surge devido ao movimento dos átomos que estão emitindo os fótons, e cujo efeito é intensificado com aumento da temperatura. E ainda se tem o alargamento *Stark* (perfil lorentziano), causado pela ação de um campo elétrico externo. Neste caso, o campo a que o plasma está sujeito é devido à presença dos íons no mesmo, e a perturbação deste campo elétrico nos átomos provoca o desdobramento nos níveis de energia deste (em inglês, *splitting* e *shifting*). (71) Assim, se torna possível a visualização de não apenas uma, mas um número maior de linhas de emissão, dependendo da resolução do espectrômetro a ser usado.

Para uma análise qualitativa, como a realizada neste estudo, uma das principais etapas de desenvolvimento do trabalho é a identificação das linhas de emissão. Herrera e colaboradores (88) alertam que esta etapa envolve inúmeras tomadas de decisão e grande conhecimento e experiência. Durante a identificação, é importante checar a presença de linhas persistentes no espectro, e que se referem às linhas que continuam presentes no espectro de emissão mesmo a baixas concentrações do elemento em questão. (71) Existem tabelas e base de dados que contém este tipo de dado, como a base de dados do NIST (72) usada neste trabalho como referência e que será apresentada em uma próxima seção. A intensidade das linhas é proporcional à concentração dos elementos na amostra medida, porém, para análises quantitativas, é muito importante a calibração do sistema através de medidas prévias de amostras de concentrações variadas e conhecidas para uma maior certeza das análises.

Uma das grandes vantagens do sistema LIBS é sua configuração simples. Tal vantagem possibilita a portabilidade do sistema para o desenvolvimento de equipamentos que possam fazer medidas *in locu*. Além disso, não necessita grande preparo ou manipulação da amostra, proporcionando rapidez e menor custo das análises. A técnica não gera resíduos químicos, o que contribui para práticas sustentáveis na agricultura, uma grande preocupação atual. Com LIBS é possível analisar amostras nos estados sólido, líquido e gasoso, e ainda, através de uma única medida é possível detectar todos os elementos de maneira simultânea, já que no caso do equipamento utilizado neste trabalho a faixa espectral de cobertura é grande (~189 a 966 nm).

Uma das limitações da técnica está na dificuldade de detectar elementos com baixas concentrações na amostra que se pretende analisar. Apesar disso, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas no tema, e é grande e crescente o número de artigos que vem sendo

publicados na tentativa de aplicação da técnica nas mais diferentes áreas. No setor agrícola a técnica LIBS foi empregada na análise e caracterização de solos (89–91) e também na análise de amostras de plantas, (74,92–94) porém estes trabalhos não apontaram para a tentativa de fazer diagnóstico de doenças, como buscamos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

4.1.1 CONJUNTO PARA O ESTUDO DO HLB

As amostras de folhas para o estudo do HLB foram coletadas de laranjeiras adultas da combinação de Valência, enxertadas em citrumelo Swingle, coletadas de árvores cultivadas em campo, enviadas pelo Grupo Terral e oriundas da Fazenda Citrícola, situada na cidade de Gavião Peixoto - SP. Três conjuntos de árvores foram avaliados no campo para extração de folhas: árvores sadias, árvores infectadas com HLB, e árvores com alta probabilidade de infecção com HLB. As amostras foram recebidas mensalmente, de acordo com as inspeções regulares que ocorreram na fazenda no período de estudo, e foram coletadas pelas equipes de inspeção treinadas e que prestam serviço na própria fazenda. De cada árvore foram coletadas em média cinco folhas, à meia altura e ao redor da planta.

As folhas de árvores contaminadas foram divididas em HLB-Sintomática, ou seja, folhas que apresentavam sintomas visíveis da doença, e HLB-Assintomática, folhas que foram retiradas de uma planta que manifestou os sintomas do HLB, porém de ramos que não apresentaram os sintomas. As plantas sadias utilizadas, por sua vez, não apresentavam qualquer deficiência nutricional e estavam localizadas em talhões de baixa infestação de doenças e pragas. Ao conjunto que conta com as classes de folhas: HLB-Sintomática, HLB-Assintomática e Sadia foi dado o nome de **conjunto de calibração**. As folhas de árvores com alta probabilidade de serem contaminadas com HLB vieram de quarenta árvores presentes no campo que se encontram ao redor de cinco árvores que já foram eliminadas por estarem comprovadamente contaminadas com HLB devido ao aparecimento dos sintomas visuais da doença, como mostra a figura 4.1. Assim, devido à proximidade com as plantas HLB sintomáticas, essas árvores foram previamente escolhidas e acompanhadas mensalmente desde Maio/2011. A este conjunto de 200 folhas (mensais) foi dado o nome de conjunto do “**entorno**” por analogia à localização das mesmas, e por motivo de simplicidade na referência a essas amostras daqui em diante.

Figura 4.1 – Disposição de parte do conjunto de árvores do “entorno”.

Fonte: Elaborada pela autora.

O conjunto de calibração foi usado para a construção de classificadores, e avaliação das técnicas espectroscópicas em estudo em relação à capacidade de diagnose e obtenção de informações sobre a doença (análise de nutrientes). O conjunto de amostras do “entorno” foram usadas para um estudo de capacidade de diagnóstico precoce pelo sistema LIFS-405, que será descrito na seção 4.2.

4.1.2 CONJUNTO PARA O ESTUDO DO CANCRO CÍTRICO E DISTINÇÃO ENTRE DOENÇAS

As amostras de cancro cítrico foram folhas coletadas de laranjeiras adultas, com aproximadamente oito anos, e de três combinações diferentes: Valência enxertada em Limão Cravo; Valência enxertada em Laranja Caipira; e Pêra enxertada em Limão Cravo. Estas amostras também foram provenientes de árvores cultivadas em campo na região de Araraquara. Para as duas últimas combinações também foram recebidas algumas amostras de HLB para que fosse possível comparar dados e verificar a distinção das duas doenças.

4.1.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

Todas as folhas, tanto do conjunto de HLB quanto do conjunto de cancro cítrico, foram limpas com algodão umedecido em água destilada, secas com algodão e embaladas em saquinhos plásticos devidamente identificados, previamente às medidas. Depois de limpas, a fim de evitar a degradação das amostras no período entre medidas, estas foram armazenadas em geladeira a aproximadamente 4°C. Todas as análises foram realizadas em até 10 dias após a coleta das amostras.

4.2 TESTE DE qPCR

O PCR é uma técnica que envolve a síntese de um fragmento específico de DNA a partir de *primers forward* e *reverse*, que agem como sítios de iniciação para a Polimerase (enzima termoestável) e, portanto definem a região do DNA que será copiada e amplificada. Os *primers* são complementares a regiões de sequências conhecidas e ocorre na presença de quatro deoxinucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e condições específicas. O PCR ocorre em três etapas. A primeira delas é a desnaturação (*melting*), que consiste na separação da dupla fita de DNA; a segunda é o anelamento, etapa também denominada de hibridização, em que ocorre a ligação dos *primers* à fita simples de DNA; e por fim, a extensão, fase em que ocorre a polimerização da fita. Estas etapas ocorrem em ciclos de alternância de temperaturas, e por isso, faz necessário o uso de uma enzima termoestável para a polimerização.

A qPCR é uma técnica mais sensível, pois envolve a captação contínua do sinal de fluorescência emitido após um ou mais ciclos de reações. Em síntese, o método se utiliza da atividade da Polimerase no sentido 5' → 3' para a clivagem de uma sonda que foi hibridizada ao DNA alvo, durante a fase de extensão da PCR. A sonda por sua vez, é marcada com corantes fluorescentes, o *reporter*, que emite fluorescência, e o *quencher*, que capta a fluorescência e libera apenas quando a sonda é clivada. Ou seja, se não houver amplificação, não ocorre a clivagem da sonda e a fluorescência do *reporter* fica presa ao *quencher*, que acaba dissipando essa energia em uma forma não quantificável pelo sistema de captação. (34)

Para o conjunto de plantas do “entorno” foram executados 10 teste de RT-qPCR de Maio/2011 a Maio/2013. A extração do DNA foi realizada pelo método descrito por Murray e Thompson. (95) O DNA total foi extraído a partir de 100 mg (peso fresco) de nervura e pecíolo, utilizando brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB, do inglês *cetyltrimethyl ammonium bromide*). O DNA foi então eluído em 60 µL de solução tampão (1:10 de Tris-EDTA 1 mol/L, 20 µg/µL de RNase A), e sua concentração e qualidade foram analisadas por eletroforese em gel de agarose e também pelo espectrofotômetro no ultravioleta visível NanoDrop™ 8000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Denmark). A concentração de DNA final foi padronizada em 10 ng/µL.

Os *primers* e sondas usados para o qPCR foram baseados na sequência referente à porção 16S do RNA ribossômico de *Ca. Liberibacter asiaticus*. Os *primers forward* e *reverse* foram respectivamente, AS-84F 5'-TCACCGGCAGTCCCTATAAAAGT-3' e AS-180R 5'-GGGTTAAGTCCCGCAACGA-3' e a sonda AS-NED-MGB-111T 5'-

ACATCTAGGTAAAAACC-3' como descrito por Coletta Filho e colaboradores. (96) Para o ensaio de qPCR otimizado foi necessário 0,8 μM de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), 0,2 μM de sonda para *Ca. Liberibacter asiaticus*, *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 4 μL de DNA molde padrão (10 ng/ μL), 1X *Eukaryotic 18S rRNA Endogenous control* (Applied Biosystems) como um controle interno para a normalização da quantidade de DNA total de cada reação, e água Milli-Q para um volume final de 20 μL . O protocolo de amplificação rápida correu por 20 s a 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificação (3 s a 95 °C e 30 s a 60 °C). A amplificação, aquisição de dados e análise de dados foram feitos com o ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems), utilizando o software de detecção de sequência (versão 1.4).

Para os casos em que não ocorre a amplificação, ou seja, se o teste foi negativo, nada se pode concluir sobre a contaminação da planta, pois a amplificação pode não ter ocorrido devido a uma baixa concentração da bactéria na amostra utilizada, já que o HLB é uma doença que se desenvolve de forma não homogênea na planta. Além disso, com tais limitações a infecção pode não ser detectada logo no início, permitindo a presença de inóculos da doença no campo. Isso sem contar da complexidade de execução do protocolo para execução do teste de PCR, o árduo preparo de amostra e grandes possibilidades de contaminações durante os procedimentos.

4.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER

Para as medidas com LIFS, foram utilizados dois equipamentos portáteis, desenvolvidos no próprio Laboratório de Óptica e Lasers da Embrapa Instrumentação. Ambos os equipamentos possuem o mesmo aparato, com diferença nos comprimentos de onda de excitação dos lasers. A figura 4.2 a seguir traz um esquema simplificado do sistema LIFS montado no Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação.

Figura 4.2 - Esquema simplificado do sistema LIFS montado no Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação. Como fonte luz para excitação da amostra é usado um laser. Este induz a fluorescência da amostra, que é então captada e conduzida por uma fibra óptica até um espectrômetro. Este por sua vez, está ligado a um computador e um software dedicado para a aquisição e análise dos dados.

Fonte: Adaptado de JUHA (97).

Os sistemas são compostos por um laser de diodo Coherent, sendo um modelo Cube com excitação em 405 nm e 20 mW de potência, e o outro no modelo Compass com excitação em 561 nm com 8 mW de potência; um espectrômetro USB2000-Ocean Optics, que resolve o espectro de emissão proveniente da amostra (faixa espectral de 194 a 894 nm, e de 500 a 1200 nm, respectivamente); um sistema de fibras ópticas (sendo 6 fibras para excitação da amostra e 1 fibra para coletar a emissão), que guiam o laser da fonte à amostra e coleta a emissão; um filtro óptico ajustável, colocado entre a amostra e o espectrômetro de modo a reduzir a intensidade da luz refletida do laser na amostra; sistema de refrigeração; e um software de aquisição e análises de dados. Através deste software, denominado “Diagnóstico” foi feito o pré tratamento dos dados, ou seja, a correção da linha de base dos espectros, a retirada dos off sets e ainda, a normalização pela área, para que em uma etapa posterior fosse possível fazer as tentativas de classificação das amostras. As medidas foram efetuadas nas folhas *in natura*, na face abaxial, posição inferior direita e evitando-se a nervura central, como podemos observar na figura 4.3. Por simplicidade, trataremos os dois sistemas como LIFS-405 e LIFS-561, para diferenciar os comprimentos de onda de excitação dos lasers e a faixa espectral dos espectrômetros.

Figura 4.3 - Exemplo do momento de uma medida utilizando o sistema LIFS-561nm na face abaxial de uma folha de laranja doce.

Fonte: Elaborada pela autora (Crédito da foto: Flávio Ubiali).

Para aquisição dos espectros o sistema foi mantido com alguns parâmetros fixos, que constam na tabela 4-1, a seguir. O boxcar é um parâmetro de suavização do espectro. Assim, o valor deste parâmetro designa o número de pontos de comprimento de onda maiores e menores do que o ponto central, que serão utilizados para realização da média das intensidades e, substituirão a intensidade do ponto central. A temperatura da sala foi mantida próxima aos 23°C.

Tabela 4.1: Parâmetros para os sistemas LIFS.

	LIFS-405	LIFS-561
Tempo de integração (ms)	60	2
Número de Médias	20	20
Boxcar	2	2

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR LASER

A composição mineral das folhas também foi estudada a fim de verificar variações nos macro e micronutrientes da planta, e tentar relacioná-los com a presença ou ausência do patógeno na busca do diagnóstico. Para isso, foram realizadas medidas nas folhas *in natura* de citros por meio de um sistema LIBS comercial. O modelo do equipamento empregado em tais medidas foi um LIBS2500, cuja fabricante é a empresa Ocean Optics (figura 4.5). Este equipamento é composto por um *Q-switched* laser de Nd:YAG, com emissão no comprimento de onda de 1064 nm, em pulsos de 10 ns. O sistema de detecção é formado por um conjunto

de sete espectrômetros de alta resolução, que englobam a faixa espectral de 189 a 966 nm, com resolução óptica em torno de 0,1 nm e detector CCD (Charge-coupled device). Na tabela 4-2 é possível verificar o intervalo espectral compreendido por cada um dos espectrômetros presentes no sistema experimental.

Tabela 4.2 - Intervalo espectral referente a cada um dos sete mini-espectrômetros do equipamento LIBS2500 (Ocean Optics).

Espectrômetro	Intervalo espectral
Espectrômetro 1	188,8 a 292,6 nm
Espectrômetro 2	292,6 a 384,4 nm
Espectrômetro 3	384,4 a 507,1 nm
Espectrômetro 4	507,1 a 618,3 nm
Espectrômetro 5	618,3 e 716,1nm
Espectrômetro 6	716,1 a 800,2 nm
Espectrômetro 7	800,2 a 966,2 nm

Fonte: Elaborada pela autora.

Os parâmetros experimentais utilizados para as medidas foram: *delay time* ou tempo de atraso, isto é, tempo entre o tiro do laser e o início da aquisição, de 2,5 μs ; e a energia do laser foi mantida máxima e em torno de 50 mJ. O laser foi focalizado sobre a amostra e a fluência foi avaliada em torno de $1200 \text{ J}/\text{cm}^2$. Antes de gerar o plasma de avaliação, é feito um disparo para a limpeza da amostra (*clean shot count*). O tempo de integração de aquisição das medidas foi em torno de 1 ms. O número de médias utilizado foi três. A figura 4.4 traz o esquema temporal ilustrado.

Figura 4.4 – Esquema temporal das aquisições LIBS.

Fonte: Elaborado pela autora.

As medidas foram realizadas em atmosfera ambiente e o software de aquisição de dados foi OOIBase32, também comercializado pela Ocean Optics. A figura 4.5 traz a foto do equipamento LIBS 2500 – Ocean Optics que foi usado para aquisição dos espectros LIBS.

Figura 4.5 - Foto do equipamento LIBS2500 – Ocean Optics. À esquerda está a câmara de ablação, no centro observa-se a fonte do laser de Nd:YAG, e à direita, o conjunto dos sete espectrômetros interligados e seus respectivos cabos de fibra óptica.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por ser uma técnica destrutiva, LIBS foi a última das técnicas utilizadas na análise das amostras. A incisão feita é muito pequena, da ordem de 50 μm , e a perda de massa é da ordem de 20 μg . Sabendo que a medida na maioria das vezes perfura a primeira face da folha e, desta forma existia a possibilidade da excitação de elementos presentes no próprio porta-amostra, o que não é interessante, foi permitido que mais de uma superfície da folha estivesse disponível para ablação.

As medidas foram realizadas na face abaxial da folha. Para isso, primeiramente removeu-se a nervura central da mesma, a fim de eliminar as dificuldades para manter plana a superfície de medidas. Após este procedimento, a folha foi dobrada duas vezes e colocada no porta-amostra, como mostra a figura 4.6. O porta-amostra foi cuidadosamente projetado para que, após as duas dobraduras, a superfície da folha fique exatamente na altura do ponto focal do laser. A distância entre a amostra e as lentes coletoras era de aproximadamente 7 mm. As posições dos tiros nas folhas foram feitas de forma aleatória na região demarcada pelo porta-amostra, de aproximadamente 1 cm^2 . Foram obtidos 10 espectros por folha, de modo a minimizar problemas com relação à heterogeneidade da amostra, já que a quantidade de material analisado pela técnica é baixa e provém de uma região muito pequena da mesma.

Figura 4.6 - À esquerda demonstração de como a folha foi dobrada após eliminação da nervura central. À direita, folha posicionada no porta amostra pronta para aquisição dos espectros de LIBS.

Fonte: Elaborada pela autora.

O espectro típico das folhas de citros obtido com LIBS no sistema experimental descrito encontra-se ilustrado na figura 4.7 a seguir. Os traços verticais que cortam o espectro dividem cada uma das sete janelas espectrais do sistema.

Figura 4.7 - Espectro LIBS característico de uma folha de citros, e em destaque cada uma das janelas espectrais.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAS DE EMISSÃO DOS ESPECTROS LIBS

A identificação dos picos é uma etapa crucial do processo de análise dos elementos. (98) A determinação das linhas de emissão dos elementos foi feita, neste caso, através da base de dados do NIST (72) e para isso foi dedicado um longo tempo, já que a classificação de cada um dos picos envolve inúmeras possibilidades e diversos parâmetros a serem considerados. Para obtenção dos resultados mais prováveis usamos como filtro os seguintes parâmetros que melhor se adequam ao sistema LIBS descrito acima:

- ❖ Linhas: Apenas com comprimentos de onda observáveis
- ❖ Comprimento de onda no: Vácuo (<185 nm) Ar (>185 nm)
- ❖ Tipo da transição: Apenas transições permitidas

Informações como a resolução do sistema experimental e o tipo de amostra a ser analisada, ou seja, se os elementos que possivelmente poderiam estar emitindo naquela região são condizentes com uma amostra de folha de laranja *in natura*, foram levados em consideração no momento da designação de um pico. O coeficiente de Einstein, a Intensidade relativa entre os picos, a ocorrência ou não de linhas fortes e/ou persistentes, são parâmetros calculados e fornecidos pela própria base de dados do NIST, referentes a cada uma das linhas de emissão, e também estes foram considerados na determinação das linhas presentes no espectro LIBS. Na figura 4.8 é possível observar, apenas para ilustrar, a primeira janela espectral com alguns de seus picos devidamente identificados.

Figura 4.8 – Região do primeiro espectrômetro com a identificação de alguns picos nele presentes.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 TRATAMENTO DOS DADOS

4.5.1 LIFS

4.5.1.1 AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO PRECOCE DO HLB

As amostras do conjunto de HLB foram medidas pelo sistema LIFS-405 e os espectros obtidos foram pré tratados de forma a corrigir o *offset*. Para isso foi calculada a média das

intensidades no intervalo de 425 a 430 nm, e este valor foi subtraído de todo intervalo espectral. Em seguida, os espectros foram normalizados pela área e os valores de intensidade relativa foram usados para as análises posteriores.

A primeira parte dos estudos com HLB envolveu a análise dos conjuntos de calibração medidos, objetivando a construção de um classificador via PLSR, robusto e eficiente o bastante no diagnóstico da doença. Para a construção dos modelos de classificação, cuja metodologia está descrita na seção 5.6.5, foi utilizado o software livre Weka 3.6. (99)

Na segunda parte do estudo, após a construção dos classificadores, estes foram empregados no julgamento das plantas do “entorno”. Para isso, os espectros obtidos mensalmente foram avaliados e cada uma das árvores classificadas como doentes ou saudáveis. O critério usado para a designação doente/saudável para uma planta foi: apresentar ao menos três, das cinco folhas medidas, classificadas como doentes pelo sistema LIFS-405. Se as árvores apresentassem uma ou duas folhas, das cinco, classificadas como doentes, a árvore foi considerada suspeita. O método de referência usado para comparação da técnica neste estudo foi o teste de RT-qPCR. Assim, logo após as medidas com o sistema de fluorescência, por alguns meses, o DNA das folhas foram extraídos e enviados ao Laboratório de Biotecnologia do “Centro Apta Citros Sylvio Moreira”, onde os testes foram realizados para confirmar a sanidade das amostras durante o estudo.

4.5.1.2 ANÁLISE DO CONJUNTO PARA O ESTUDO DO CANCRO CÍTRICO E DIFERENCIAÇÃO ENTRE DOENÇAS

Os espectros das amostras de cancro foram obtidos por meio de ambos os equipamentos, LIFS-405 e LIFS-561, a fim de verificar o desempenho de cada um deles. Os espectros obtidos pelo sistema LIFS-405 foram pré-tratados como descrito na seção 4.5.1.1. Já para os espectros adquiridos pelo sistema LIFS-561 a correção do *offset* foi feita subtraindo-se a média das intensidades compreendidas entre 1050 a 1070 nm de cada ponto do espectro obtido, compreendido entre 600 e 1140 nm. E como no caso anterior, os espectros foram normalizados pela área e os valores de intensidade relativa foram usados para a construção de classificadores (ver seção 4.5.3).

Dessa maneira foi possível analisar a capacidade de diagnóstico do cancro cítrico por meio desta técnica e também, a capacidade de distinção em relação ao HLB.

4.5.2 LIBS

4.5.2.1 HLB

Para a seleção do conjunto de folhas das três classes foram usados os espectros LIFS-405 das mesmas amostras, tratados como descrito no item 4.6.1, uma vez que o LIFS é uma técnica cuja eficácia no diagnóstico do HLB foi demonstrada em um trabalho anterior. (20) Desta forma, o LIFS foi usado como referência para o estudo inicial da mesma doença usando a técnica LIBS. Inicialmente tinha-se o conjunto de calibração completo referente ao mês de Maio/2013. Com os dados do LIFS-405 para este conjunto, montou-se um classificador via Regressão pelo método dos mínimos quadrados parciais, e a partir dele fomos excluindo as amostras que apresentavam uma classificação errada na validação cruzada dos dados. A classificação via regressão pelo método dos mínimos quadrados parciais foi repetida até que o conjunto final apresentasse 100% de acerto na validação cruzada e até que todas as classes contassem com um mesmo número de amostras. Desta forma, chegou-se a um conjunto com 39 amostras (folhas) de cada uma das três classes: HLB Sintomática (HLB_Sint), HLB Assintomática (HLB_Assint) e Saudável (Saud).

Depois de selecionadas as amostras mais características de cada uma das três classes segundo a técnica LIFS, foram obtidos os espectros LIBS das mesmas amostras. Assim, com maior certeza da qualidade dos dados do conjunto escolhido, foi iniciado o tratamento dos mesmos na busca das informações que o LIBS pode trazer a respeito do HLB, objetivando a construção de classificadores capazes de distinguir com taxas de acerto elevadas, uma planta doente de uma planta saudável.

Com este conjunto foram testadas diferentes maneiras de pré-tratamento dos dados para construção de um classificador:

- ❖ Dados sem tratamento: espectros de LIBS foram usados sem nenhum preparo ou manipulação;
- ❖ Espectros normalizados pela área total do espectro: cada intensidade do espectro de LIBS foi dividida pela área contabilizada abaixo do espectro, compreendido entre 188.89 nm e 966.22 nm;
- ❖ Espectro normalizado pela área de cada uma das sete janelas dos espectrômetros: as intensidades correspondentes à janela 1 do espectrômetro foram divididas pela área calculada abaixo da própria curva da janela 1, as intensidades correspondentes

à janela 2 do espectrômetro foram divididas pela área calculada abaixo do espectro referente a esta mesma janela, e assim até o sétimo espectrômetro.

Para cada um dos pré-tratamentos anteriores, verificamos a influência do cálculo da:

- ❖ Média por amostra; ou da
- ❖ Mediana por amostra, ponto a ponto do espectro, já que foram adquiridos 10 espectros por folha.

Todos estes processamentos foram realizados por meio de rotinas no software *Matlab 2012*.

Após as análises anteriores, a fim de verificar a influência de cada ponto do espectro na designação de uma amostra como doente ou saudável, utilizou-se o teste estatístico de hipótese Teste t. Para isso, aplicamos o Teste t ponto a ponto do espectro, assumindo o seguinte:

- ❖ Hipótese nula: Não existe diferença estatística significativa entre as médias dos dois grupos de dados comparados ($H_0: \mu_x = \mu_y$);
- ❖ e Hipótese alternativa: Existe diferença estatística significativa entre as médias dos dois grupos de dados comparados ($H_A: \mu_x \neq \mu_y$);
- ❖ Teste bilateral com nível de significância de 5%;
- ❖ Não homogeneidade da variância;
- ❖ Normalidade dos dados.

E assim, observamos o p-valor, um dos parâmetros fornecidos pelo teste, a fim de verificar ou não a evidência de diferença estatística significativa entre os dados. Quando o p-valor apresentava-se menor do que 0,05 existe a evidência de diferença estatística significativa entre os dados; e quanto menor o p-valor, menor a probabilidade de que a diferença apresentada seja decorrente do acaso, reforçando a evidência da diferença. Desta forma, as classes foram analisadas duas a duas para execução do teste, segundo a tabela 4-3.

Tabela 4.3 - Classes que foram comparadas segundo o Teste t aplicado nos dados de intensidade dos espectros LIBS.

Saudável x HLB_Sintomática
Saudável x HLB_Assintomática
HLB_Sintomática x HLB_Assintomática

Fonte: Elaborada pela autora.

Feito isso, o p-valor foi analisado cuidadosamente ponto a ponto ao longo de toda região espectral do LIBS. Através deste teste foi possível verificar e selecionar os picos de emissão

dos elementos que mais contribuem para a diferenciação da doença, permitindo melhor compreensão da mesma.

Uma vez encontrados os picos que apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as classes, a linha de base de cada um deles foi extraída, e realizada a aproximação do perfil do pico por uma curva lorentziana, a partir da qual foi determinada a área de cada um dos picos. Os valores de área calculados dos mesmos passaram por uma nova filtragem. Ou seja, foi aplicado o Teste de Tukey a fim de comparar a variância média dos dados de área para cada uma das três classes em estudo. Em seguida, as áreas dos picos que não apresentaram diferença estatística verificada pelo parâmetro p-valor em ao menos um dos três grupos de comparação (Saud x HLB_Sint; Saud x HLB_Assint e HLB_Sint x HLB_Assint) tiveram os picos excluídos das análises.

Então, com os valores de área dos picos previamente selecionados por ambos os Testes estatísticos foi realizada a indução de um novo classificador, com custo computacional reduzido, e utilizando de informações mais consistentes de acordo com a sensibilidade proporcionada pela técnica.

Por fim, para demonstrar a reprodutibilidade dos dados e das informações adquiridas, outros conjuntos de dados foram pré-tratados de acordo com a melhor técnica selecionada, e os mesmos picos foram usados para o desenvolvimento de classificadores e verificado o desempenho dos mesmos.

4.5.2.2 ANÁLISES INICIAIS: CANCRO CÍTRICO

Para estas análises iniciais foram usadas as amostras de laranja doce da combinação de Valência enxertada em Laranja Caipira retirada de árvores cultivadas em campo, coletadas em duas etapas e de duas árvores diferentes.

Assim como para as amostras de HLB, foram realizadas dez medidas por amostra, a partir das quais se verificou a influência do cálculo da média e da mediana por amostra. Previamente realizou-se a exclusão de *outliers* a fim de minimizar erros e excluir possíveis medidas erradas ou mal executadas. Em seguida, na tentativa de verificar a capacidade de discriminação entre as classes, e de analisar a influência dos dados nessa discriminação, foram executados um total de seis pré-tratamentos, os mesmos já descritos anteriormente para o caso do HLB. São eles:

- ❖ Dados sem tratamento;
- ❖ Espectros normalizados pela área total do espectro;

❖ Espectro normalizado pela área de cada uma das sete janelas do espectrômetro;

E ainda, o cálculo da média e da mediana por amostra, ponto a ponto do espectro, para cada um dos pré-tratamentos anteriores.

Todos estes processamentos foram realizados por meio das rotinas usadas para as análises de HLB, no software *Matlab 2012*, adaptadas para o caso do cancro cítrico.

Em seguida, os dados de intensidade obtidos e devidamente tratados foram usados na indução de classificadores via regressão por mínimos quadrados parciais, e cujas taxas de acerto foram verificadas para se ter uma ideia da possibilidade de distinção entre as classes estudadas.

Para este estudo não houve tempo hábil e nem número suficiente de amostras para análises mais aprofundadas da doença como as observações feitas para o HLB em relação à composição e variação nutricional das folhas que a técnica possibilita.

4.5.3 CLASSIFICADORES VIA REGRESSÃO

A capacidade de discriminação entre as classes em estudo através da construção de classificadores via regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR), que associa as classes nominais à números, usando um processo de binarização e em seguida, aplica funções para definição de cada classe. Este método foi proposto por Frank e colaboradores (18) e encontra-se bem explicado e utilizado por Cardinali. (20)

Para indução dos classificadores utilizamos o *software* livre Weka 3.6, amplamente utilizado em quimiometria. (99) Primeiramente, para construção dos classificadores foi necessário estabelecer um conjunto denominado Treino para calibração do modelo de regressão, e um conjunto que chamamos de Teste para validação do modelo gerado. Assim, através da validação cruzada verificamos a capacidade de generalização do modelo de predição. Ou seja, o conjunto de dados total é dividido em n grupos, o sistema utiliza $n - 1$ grupos para a geração do modelo, e em seguida testa o modelo no grupo que ficou de fora da construção do modelo, e assim, verifica o desempenho deste através da análise de parâmetros como taxa global de acerto na classificação, curva ROC, entre outros fornecidos pelo próprio software utilizado. Na sequência, o grupo de teste é reintegrado ao grupo, e um novo grupo de teste é retirado, até que todos os grupos sejam usados uma vez como conjunto Teste. É possível ainda que essa divisão dos grupos aleatória seja feita diversas vezes para execução da validação cruzada. Assim, ao final teremos diversos resultados que melhor representam a situação real do conjunto.

Desta forma, foi executada a validação cruzada aleatória 10 vezes com 10 grupos, e ainda variando o número de componentes, de forma que fosse possível comparar a acurácia da execução para cada número de componentes, e assim definir qual o número de componentes era melhor trabalhar. Tal definição foi feita pela observação de qual número de componentes o conjunto apresentava maior taxa de acerto e menor erro quadrático médio (RMSE, acrônimo do inglês *Root Mean Squared Error*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 LIFS

5.1.1 HLB

Um espectro típico de cada uma das classes envolvidas neste estudo, obtido através das medidas com o sistema LIFS-405, encontra-se ilustrado na figura 5.1, e em cada um deles é possível observar as diferentes bandas de fluorescência. A primeira delas referente às emissões no azul-verde, entre 450 e 600 nm, e as outras duas bandas na região do vermelho-infravermelho, entre 650 e 780 nm aproximadamente.

Figura 5.1 – Espectros de fluorescência médios típicos de cada uma das três classes envolvidas no estudo do HLB.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os grandes responsáveis pela primeira grande banda de fluorescência são os metabólitos secundários, que dão grande contribuição na diferenciação da doença, já que os valores de intensidade relativa de cada um dos espectros completos foram os dados usados para construção e validação dos classificadores. Como exemplo de metabólitos secundários pode-se citar os ácidos ferrúlicos e os ácidos p-cumáricos. O primeiro é o precursor da umbeliferona, uma cumarina, e o segundo por sua vez, dá origem, em uma das vias

metabólicas, aos flavonoides. A fluorescência da cumarina umbeliferona, e dos flavonoides hesperidina e narigina foram estudados e demonstrados por Cardinali. (20) A maioria destes compostos está relacionada com os mecanismos de defesa das plantas e ação contra a presença de patógenos, como fungos e bactérias. Assim, a associação destes fatores pode ser uma indicativa da presença de HLB.

A segunda banda de fluorescência observada corresponde, à temperatura ambiente, principalmente à fluorescência das moléculas de clorofila *a*, e às emissões referentes ao fotossistema⁶ II, com pico em 690nm. A terceira banda de fluorescência, com pico em 740 nm, corresponde principalmente à fluorescência do fotossistema II, à emissão da clorofila *a* devido à reabsorção (já que as emissões em 690 nm são também absorvidas por ela) e, nesse caso, também há uma contribuição do fotossistema I à fluorescência (que contribui com 30-35% da fluorescência referente aos fotossistemas I e II) (100). Esta terceira banda é geralmente menos intensa no espectro porque, a luz com baixo comprimento de onda, como é o caso do comprimento de onda de excitação empregado neste estudo (405 nm), é rapidamente absorvida pelos carotenoides e clorofilas (figura 5.2) disponíveis nos cloroplastos presentes na camada superficial da folha, e sendo assim, a maior parte da fluorescência emitida pelas clorofilas precisa percorrer um curto caminho para deixar a folha. Dessa maneira, apenas uma pequena parte dessa fluorescência é reabsorvida, não havendo uma inversão dos picos em 690 e 740 nm, como notaremos mais adiante no caso do sistema LIFS-561. (101)

Nos espectros de folhas HLB-Sintomáticas é possível notar uma diminuição da intensidade do pico em 740 nm quando comparados com os espectros de folhas Saudáveis, e isto ocorre devido a uma diminuição na concentração de clorofila, que pode ser notado pelo sintoma visível de clorose nas mesmas, corroborando com o estudo de Kancheva e colaboradores, (67). Assim, quanto menor a quantidade de clorofila disponível, menor a reabsorção das emissões no pico em 690 nm, provocando um ligeiro aumento deste pico, e uma diminuição do pico em 740nm. A variação em 740 nm também pode ser devido a uma baixa eficiência na transferência de energia do fotossistema II para o fotossistema I, já que se encontram prejudicados pela doença, e dessa forma, prejudicam a absorção e emissão dos próprios fotossistemas.

⁶ Fotossistemas são complexos proteicos envolvidos no processo de fotossíntese.

Figura 5.2 – Espectros de absorção da luz por alguns dos pigmentos presentes nos cloroplastos. A linha tracejada em vermelho destaca o comprimento de onda de 405 nm utilizado nas análises desta etapa.

Fonte: Adaptado de AUSTINPRICE2012 (102).

Pode-se notar pela figura 5.2 que a clorofila *b* absorve muito pouco em 405 nm, e assim, a sua contribuição para o espectro de fluorescência deve ser baixa. Além disso, à temperatura ambiente e em condições fisiológicas, a energia absorvida pela clorofila *b* é rápida e eficientemente transferida para a clorofila *a*. (103) Em condições normais, a fluorescência é emitida predominantemente (~90%) pelos complexos de clorofila presentes no fotossistema II (que contém a maior parte dos pigmentos acessórios das plantas). Porém, de modo geral, apenas de 2-5% da energia absorvida por um fotossistema é dissipada em fluorescência. (104) O restante da energia é dissipado em calor e vibrações. (52)

As plantas têm a capacidade de preservar suas funções vitais mesmo sob grande variação das condições ambientais. Estas grandes variações provocam mudanças na planta a nível celular, em resposta a tais estresses (bióticos ou abióticos), mudanças estas que podem afetar o espectro de emissão de fluorescência de uma folha de citros. (52) O estresse pode, ainda, alterar a quantidade de luz (energia) absorvida, que é usada na fotossíntese, e também a indução de fluorescência da clorofila e dos fotossistemas em geral. Dessa maneira, estudos recentes mostraram que a fluorescência induzida por laser é uma ferramenta não invasiva capaz de detectar estresse hídrico em plantas de citros. (91-92)

Sendo assim, ao iniciar os estudos com os classificadores, decidimos separar os dados dos conjuntos de calibração medidos, de acordo com a variação da pluviosidade e temperatura, para que estes não fossem, portanto, fatores que pudessem influenciar ou interferir no diagnóstico das plantas. A variação na quantidade de chuvas e temperatura pode ser observada na figura 5.3 para os meses do experimento. Assim, de Maio/2011 a Maio/2013, os meses de Abril a Setembro amostraram o conjunto de calibração da **época de seca**, e as folhas

recebidas entre os meses de Outubro e Março amostraram o conjunto de calibração da **época de chuvas**, divisão baseada também na ocorrência ao longo dos anos para a região.

Figura 5.3 - Dados médios mensais de pluviosidade e temperatura do local onde as amostras foram coletadas.

Fonte: Elaborada pela autora (Dados cedidos pela Fazenda Citrícola).

A partir da divisão acima estabelecida, foi dado início à construção dos classificadores, que deveriam conter uma quantidade representativa de amostras de cada uma das três classes (HLB Sintomática, HLB Assintomática e Saudáveis), essa quantidade de amostras deveria ser balanceada, ou seja, cada classe deve contar com o mesmo número de amostras representativas, e ainda, tais amostras deveriam ser aquelas que melhor caracterizassem as classes. Para isso, com cada um dos conjuntos, seca e chuva, realizou-se uma validação cruzada em 10 *folds*, a partir de 10 componentes do PLSR (previamente definidos conforme análise de taxas de acerto e RMSE descritos na seção de materiais e métodos) e foram avaliados os acertos na classificação de cada uma das amostras envolvidas. Assim, as amostras que estavam sendo classificadas erroneamente nos conjuntos, eram eliminadas a cada interação, ou seja, a validação cruzada do conjunto inicial era executada, verificava-se os acertos, as amostras classificadas erradas eram excluídas do classificador e em seguida todo procedimento era repetido. Isso foi feito até que os classificadores de seca e chuva estivessem balanceados e apresentando 100% de acerto na validação cruzada dos dados.

Por fim, o classificador de épocas chuvosas contou com um total de 900 folhas, sendo 300 folhas de cada uma das classes, e o classificador de períodos secos contou com 1290 amostras, ou seja, 430 amostras de cada classe. Assim, cada classificador ficou com diferente número de amostras. Isto ocorreu porque nos meses com poucas chuvas a quantidade de árvores identificadas como doentes no campo era bem maior do que o número de árvores identificadas como doentes por HLB, pelas equipes de inspeção, na época de muita chuva. Ao que parece, as plantas conseguem reagir melhor enquanto no período chuvoso, em que poucas delas apresentam os sintomas do HLB. Já no período que passam por um estresse hídrico e de baixas temperaturas, a planta parece estar mais sensível, já que além de reagir contra a presença do patógeno também precisa manter suas demais funções controladas devido aos estresses abióticos que também está enfrentando, o que sugere uma justificativa para maior manifestação dos sintomas.

A fim de demonstrar as diferenças entre as classes presentes nos dois classificadores construídos, empregamos o teste de PCA em três dimensões. A figura 5.4 mostra as classes bem separadas, com uma pequena confusão entre HLB Assintomática e as folhas Saudáveis. Esta confusão já era esperada, já que a doença se desenvolve de forma não homogênea na planta e algumas das folhas assintomáticas ainda podem estar em um estágio muito inicial de reação contra a presença do patógeno. É interessante também observar o comportamento intermediário da classe HLB Assintomática, que se encontra entre a classe Saudável e a HLB Sintomática na distribuição dos *clusters* no PCA-3D.

Figura 5.4 – PCA-3D do conjunto de amostras envolvidas nos classificadores de época chuvosa (acima) e de época de seca (abaixo) nos quais se pode notar a separação das classes envolvidas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Construídos os classificadores, havia a necessidade de validá-los ainda, antes de empregá-los para classificar as amostras mensais do conjunto do “entorno”. Para tanto, os conjuntos de calibração cujos espectros foram adquiridos de junho/2013 a fevereiro/2014 foram usados para a validação. Também estas amostras foram então divididas de forma sazonal, usando os mesmos critérios usados na divisão em relação aos classificadores e, portanto um conjunto contendo 300 amostras (100 amostras de cada classe) foi empregado na validação do classificador para épocas chuvosas, e um segundo conjunto, contendo 225 amostras de folhas (75 folhas de cada uma das classes) foi usado na validação do classificador de períodos secos. O classificador de chuva apresentou um acerto global de 90% na validação do conjunto também de chuva. Ao tentar classificar o conjunto de validação de seca, o acerto do classificador caiu para 56%. Já o classificador de seca ao ser validado com o conjunto

também de seca apresentou um acerto de 85%, e quando com o conjunto de chuva, caiu para 66%. A matriz de confusão para as validações podem ser vistas na tabela 5-1.

Tabela 5.1 – Matrizes de confusão para validação dos classificadores de épocas chuvosas e de seca construídos.

Matriz de confusão: Validação Classificador Chuva				
Classe nominal	Classificada como	Saudável	HLB Sintomática	HLB Assintomática
Saudável		83%	5%	12%
HLB Sintomática		4%	92%	4%
HLB Assintomática		10%	5%	85%
Matriz de confusão: Validação Classificador Seca				
Classe nominal	Classificada como	Saudável	HLB Sintomática	HLB Assintomática
Saudável		82,7%	1,3%	16%
HLB Sintomática		1,3%	98,7%	0
HLB Assintomática		25,3%	1,3%	73,3%

Fonte: Elaborada pela autora.

Depois de construídos e validados com taxas superiores a 85%, os classificadores foram empregados na avaliação do diagnóstico precoce das árvores do conjunto do “entorno”. Sabendo que para cada árvore foram avaliadas cinco folhas, foram consideradas doentes aquelas que apresentaram ao menos três, das cinco folhas, diagnosticadas como doente; as árvores que apresentaram apenas uma ou duas folhas, das cinco totais, classificadas como doentes, a árvore foi considerada Suspeita, e dessa maneira ficou marcada para que fosse avaliada mais cuidadosamente pelas equipes de inspeção nos meses seguintes. Foram consideradas saudáveis aquelas árvores que apresentaram as cinco folhas medidas classificadas como saudável. Esse acompanhamento foi feito mensalmente, e os resultados de classificação para as árvores constituintes do conjunto do “entorno” estão na tabela 5-2.

Tabela 5.2 – Diagnóstico mensal das plantas do conjunto do “entorno” feito através dos classificadores sazonais implementados. Em azul, a árvore central que apresentou sintomas de HLB e foi erradicada no início do estudo; em vermelho destaca-se a planta que foi diagnosticada como doente, apresentando 3 ou mais folhas diagnosticadas como tal; em amarelo as árvores dadas como suspeitas por apresentarem uma ou duas folhas diagnosticadas como doente durante a classificação; com um X em preto identificamos a árvore que apresentou os sintomas da doença e foi erradicada, e também o mês quando isso aconteceu; o X em azul claro identifica os meses em que foi realizado o teste de PCR de todas as 40 plantas, e também discrimina aquelas plantas cujo resultado do teste foi positivo para a presença da bactéria causadora do HLB.

<i>Legenda</i>	Árvore central	Árvore Doente	Árvore Suspeita	Apresentou Sintomas	Testadas PCR
	<i>Em torno Planta A</i>	<i>Em torno Planta B</i>	<i>Em torno Planta C</i>	<i>Em torno Planta D</i>	<i>Em torno Planta E</i>
<i>Mai/2011</i>					
<i>Jun/2011</i>					
<i>Jul/2011</i>					
<i>Ago/2011</i>					
<i>Set/2011</i>					
<i>Out/2011</i>					
<i>Nov/2011</i>					
<i>Dez/2011</i>					
<i>Jan/2012</i>					
<i>Fev/2012</i>					

(Continua)

(Continuação)

Tabela 5.2 – Diagnóstico mensal das plantas do conjunto do “entorno” feito através dos classificadores sazonais implementados. Em azul, a árvore central que apresentou sintomas de HLB e foi erradicada no início do estudo; em vermelho destaca-se a planta que foi diagnosticada como doente, apresentando 3 ou mais folhas diagnosticadas como tal; em amarelo as árvores dadas como suspeitas por apresentarem uma ou duas folhas diagnosticadas como doente durante a classificação; com um X em preto identificamos a árvore que apresentou os sintomas da doença e foi erradicada, e também o mês quando isso aconteceu; o X em azul claro identifica os meses em que foi realizado o teste de PCR de todas as 40 plantas, e também discrimina aquelas plantas cujo resultado do teste foi positivo para a presença da bactéria causadora do HLB.

Mar/2012					
Abr/2012					
Mar/2012					
Jun/2012					
Jul/2012					
Ago/2012					
Set/2012					
Out/2012					
Nov/2012					
Dez/2012					
Jan/2013					

(Continua)

(Conclusão)

Tabela 5.2 – Diagnóstico mensal das plantas do conjunto do “entorno” feito através dos classificadores sazonais implementados. Em azul, a árvore central que apresentou sintomas de HLB e foi erradicada no início do estudo; em vermelho destaca-se a planta que foi diagnosticada como doente, apresentando 3 ou mais folhas diagnosticadas como tal; em amarelo as árvores dadas como suspeitas por apresentarem uma ou duas folhas diagnosticadas como doente durante a classificação; com um X em preto identificamos a árvore que apresentou os sintomas da doença e foi erradicada, e também o mês quando isso aconteceu; o X em azul claro identifica os meses em que foi realizado o teste de PCR de todas as 40 plantas, e também discrimina aquelas plantas cujo resultado do teste foi positivo para a presença da bactéria causadora do HLB.

Fev/2013					
Mar/2013					
Abr/2013					
Mai/2013					

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando os dados obtidos foi possível notar a alta capacidade de diagnóstico das plantas em relação ao HLB, e principalmente verificar uma periodicidade de manifestação da doença, mesmo em fase assintomática. Assim, existiram meses em que o número de plantas diagnosticadas foi grande, e também podemos notar o diagnóstico de apenas plantas saudáveis em alguns outros meses. Dessa maneira, é possível inferir a alta capacidade de reabilitação da planta em determinados períodos, camuflando toda e qualquer alteração química que a doença possa estar causando nela. Tais mudanças podem estar sim associadas de alguma maneira ao excesso ou falta de chuvas, e aumento ou decréscimo da temperatura quando comparamos com os dados existentes no gráfico da figura 5.3.

Dentre o conjunto de árvores do “entorno”, uma chamou a atenção porque apresentou os sintomas do HLB, devidamente identificada pelas equipes de inspeção, durante o experimento, o que ocorreu em Março/2013. É importante observar que o sistema LIFS-405 a vinha diagnosticando como suspeita ou como doente desde Junho/2011, em quase todos os meses em que foi possível realizar o diagnóstico de algumas plantas. A exceção foi o mês de Julho/2012, em que ela não foi diagnosticada, porém, foi um mês em que pouquíssimas

plantas o foram, e um mês em que apenas uma delas foi detectada como doente, segundo o critério adotado.

As plantas do “entorno” foram ainda acompanhadas por teste de qPCR, já que é esta a técnica de referência atualmente para a confirmação da presença do patógeno. Durante os vinte e cinco meses do estudo, 10 exames foram realizados por meio desta técnica. Destes dez, em apenas três deles pelo menos uma das plantas apresentou diagnóstico positivo para a presença da bactéria causadora do HLB, ou seja, em 30% dos testes. Já em relação às medidas com o sistema LIFS-405, em 52% das análises pelo menos uma planta foi diagnosticada como doente. E de acordo com a passagem dos meses, visualizando a tabela anterior, ainda que com lacunas no diagnóstico de alguns meses, é possível verificar a evolução da doença no pomar.

Se os critérios adotados anteriormente para designar uma planta como doente, suspeita ou saudável, forem adotados e carregados para os meses seguintes, ou seja, uma vez diagnosticada como doente, doente a partir daquele mês, e uma vez considerada suspeita, esse diagnóstico fosse carregado para os meses seguintes, das 40 árvores avaliadas, em 25 meses, 38 delas foram diagnosticadas como infectadas por HLB pelo sistema LIFS-405 de diagnóstico, e apenas duas ainda não tiveram o diagnóstico confirmado de doente, porém encontravam-se sob observação em campo até o final dos estudos como árvores suspeitas de estarem contaminadas. E desta forma, no último mês de análises o mapa seria o representado na tabela 5-3, segundo a legenda da tabela 5-2.

Tabela 5.3 - Mapa final de infestação segundo diagnóstico realizado pelos classificadores sazonais criados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma curva de infestação do pomar em estudo, por meio da detecção por inspeção visual feita na fazenda mensalmente, pode ser observada na figura 5.5. Nela, foi apresentada também a curva de infestação das árvores acompanhadas por meio do sistema LIFS-405, em que foi possível observar uma curva de crescimento bastante acelerado, o que já era esperado, já que estamos avaliando árvores com alta probabilidade de infecção. Os resultados obtidos corroboram com um estudo realizado por Costa e Guilhoto publicado em 2012 (107) que demonstram a importância e os impactos econômicos da eliminação do HLB por meio do diagnóstico precoce. Este estudo mostrou que o estado de São Paulo, maior produtor de

laranjas do país, poderá ter todas as suas árvores do parque citrícola infectadas com HLB até 2016 já que a doença segue uma tendência de crescimento exponencial, como também foi possível notar neste trabalho através da detecção pelo sistema óptico LIFS-405.

Figura 5.5 – Gráfico de evolução da incidência do HLB nas árvores do “entorno” acompanhadas e diagnosticadas pelo sistema LIFS-405 em comparação com a curva de infestação do pomar estudado, cujo diagnóstico foi feito através das inspeções visuais em campo.

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com o sistema LIFS-405, a árvore que manifestou os sintomas foi diagnosticada como infectada por HLB pela primeira vez em Julho/2011, ou seja, 21 meses antes de aparecerem os primeiros sintomas visuais. Ao observar mais cuidadosamente os resultados dos testes de qPCR foi constatado que em sete dos dez testes executados, o resultado foi negativo para a presença da bactéria nas amostras, e em três deles o teste foi inconclusivo.

Seguindo o mesmo critério, em apenas treze plantas, das quarenta analisadas, o resultado foi positivo para a infecção da bactéria pelo teste de qPCR. Das treze plantas consideradas doentes pelo teste de qPCR, dez também foram diagnosticadas pelo sistema LIFS-405 alguns meses antes da técnica de referência acusar a doença, e duas delas foram diagnosticadas pelo sistema óptico no mesmo mês em que os resultados foram positivos para o qPCR. Em apenas um caso a técnica fotônica proposta não conseguiu diagnosticar com sucesso o HLB antes da técnica de referência, se usado o critério proposto de observar ao menos três folhas diagnosticadas como doentes, porém, esta mesma planta já vinha sendo alertada como suspeita pelo sistema LIFS-405 desde Junho/2011.

Para as vinte e seis plantas restantes o teste de qPCR foi inconclusivo até agora para todos os dez testes realizados. Com a técnica de fluorescência dessas vinte e seis plantas, dezessete foram diagnosticadas como doentes desde 2011, seis desde 2012, uma desde 2013 e apenas duas delas permanecem sendo diagnosticadas como saudáveis no campo. Todas as árvores do “entorno” continuaram sendo monitoradas em campo, exceto aquela que já apresentou os sintomas visuais e foi erradicada. Dessa maneira, novas medidas foram feitas com a finalidade de continuar o estudo, conseguir melhores resultados e corroborar com os que foram obtidos até agora, reforçando o potencial da técnica LIFS como método de diagnóstico em plantações de citros.

Quanto ao teste de qPCR, pode-se dizer que é regular, uma vez que demonstrou alta dependência à distribuição não homogênea da bactéria na planta, não sendo capaz de realizar o diagnóstico da mesma com sucesso. Além dos outros problemas já citados e relacionados ao alto custo do exame, preparo de amostra bastante trabalhoso, suscetibilidade à contaminação, tempo necessário para a realização dos ensaios, entre outros. Já o sistema LIFS-405 demonstrou uma dependência menor nesse sentido, já que, por exemplo, em relação à planta que apresentou os sintomas de HLB, este sistema a diagnosticou como doente três vezes, enquanto o qPCR não foi capaz de atestar a planta como doente em nenhum dos testes realizados.

Assim, o sistema LIFS-405 demonstrou um grande potencial como uma ferramenta alternativa para o diagnóstico precoce do HLB em citros, ajudando no controle da propagação da doença no campo. Além disso, a técnica é simples, e a medida é muito rápida, durando apenas alguns segundos, o que permite a construção de mapas e um acompanhamento e controle por parte do produtor, auxiliando-o nas tomadas de decisões.

5.1.2 *CANCRO CÍTRICO*

Os espectros médios característicos de cada uma das classes estudadas, e para cada um dos dois equipamentos com os quais estes foram adquiridos, encontram-se na figura 5.6.

Figura 5.6 – Gráficos dos espectros médios característicos das classes de folhas estudadas através do sistema de fluorescência. Acima, espectros obtidos pelo sistema LIFS-405, e abaixo os espectros adquiridos pelo sistema LIFS-561.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando os gráficos é possível notar ligeiras diferenças entre as classes assintomáticas de ambas as doenças e a classe saudável, um resultado esperado, tendo em vista que este é o

nosso maior desafio atualmente. A classe HLB Sintomática destoa das demais, e desta maneira é a mais bem definida delas. É importante lembrar, que as medidas realizadas nas folhas de Cancro Sintomáticas foram localizadas fora das lesões causadas pela doença. Assim, foram consideradas amostra sintomáticas de cancro folhas que apresentavam as lesões características da doença, porém os espectros foram adquiridos de regiões que não continham a lesão. Este é um aspecto que pode causar confusão, tendo em vista que alguns autores consideram essas regiões como assintomáticas, o que não é o caso.

O espectro de fluorescência do sistema LIFS-405 já foi explorado anteriormente, porém, o do sistema LIFS-561 ainda não. Nele podemos observar as bandas de fluorescência características da clorofila com máximos em aproximadamente 685-690 nm e 735-740 nm. Com a excitação em 561 nm, de maior comprimento de onda e, portanto, menos energética do que a excitação com 405 nm, é possível observar contribuições de fluorescência de camadas mais profundas da folha. O resultado disso é uma atenuação da banda com máximo em 690 nm quando comparado com o espectro de fluorescência com excitação em 405 nm devido ao efeito de reabsorção. (108) Quando comparamos o comportamento do espectro das amostras HLB Sintomáticas com as demais, todas adquiridas pelo sistema LIFS-561, verificamos uma inversão no comportamento dos máximos de fluorescência. Isso ocorre justamente pelo efeito de reabsorção, ou seja, quanto maior a quantidade de clorofila presente na folha, maior o efeito de reabsorção e, portanto maior a intensidade de emissão de fluorescência em 740 nm. Da mesma forma, se a concentração de clorofila é baixa, o que ocorre nas folhas HLB Sintomáticas, menor é a reabsorção, o que resulta em um aumento na intensidade de fluorescência em 690 nm e uma diminuição das emissões em 740 nm, justificando o comportamento destoante dessa classe de amostras.

Os dados de intensidade como os vistos acima foram utilizados como dados de entrada para a construção de classificadores via PLSR. Os conjuntos foram separados por combinação, já que a técnica é sensível às diferentes combinações de copa e porta-enxerto de citros, (65) e por equipamento utilizado nas aquisições. Assim, para o conjunto da combinação Valência enxertada em Cravo, com o número de componentes otimizado em 10 de acordo com as taxas de acerto e RMSE, o acerto do classificador após a validação cruzada em 10 *folds* foi de 86,7% para o sistema LIFS-405. Para o mesmo conjunto, que contou com 15 amostras de cada classe, o acerto foi de 82,2% quando medido pelo sistema LIFS-561. Já para a combinação Valência enxertada em Caipira, os acertos foram de 73,3% e 76,7% para, respectivamente o sistema LIFS-405 e LIFS-561, e o número total de amostras desse conjunto foi 45. E por fim, os acertos para a combinação de Pêra enxertada em Limão Cravo (45

amostras no total) foram de 91,1% para o LIFS-405 e 88,9% para o sistema LIFS-561. Na maioria dos casos o sistema LIFS-405 teve desempenho superior ao do sistema LIFS-561, o que pode ser justificado pela primeira banda de fluorescência referente à emissão dos metabólitos secundários. Para este último caso, combinação Pêra X Cravo, a matriz de confusão está na tabela 5-4, e ainda, usando estes dois classificadores construídos, foi feita a validação dos mesmos e cujos resultados podem ser vistos na mesma tabela. Vale lembrar que os acertos mencionados anteriormente desconsideram a confusão entre classe sintomática e assintomática.

Tabela 5.4 - Matrizes de confusão da validação cruzada dos classificadores à esquerda, e da validação com conjunto externo à direita para ambos os sistemas de fluorescência estudados.

Sistema LIFS-405							
Classificador				Validação			
Classificada como Classe nominal	<i>Saudável</i>	<i>Cancro Sintomática</i>	<i>Cancro Assintomática</i>	<i>Saudável</i>	<i>Cancro Sintomática</i>	<i>Cancro Assintomática</i>	
Saudável	86,7%	0%	13,3%	87,8%	6,1%	6,1%	
Cancro Sintomática	0%	86,7%	13,3%	-	-	-	
Cancro Assintomática	13,3%	33,3%	53,4%	25,7%	22,9%	51,4%	

Sistema LIFS-561							
Classificador				Validação			
Classificada como Classe nominal	<i>Saudável</i>	<i>Cancro Sintomática</i>	<i>Cancro Assintomática</i>	<i>Saudável</i>	<i>Cancro Sintomática</i>	<i>Cancro Assintomática</i>	
Saudável	80%	6,7%	13,3%	79,4%	8,8%	11,8%	
Cancro Sintomática	6,7%	80%	13,3%	-	-	-	
Cancro Assintomática	6,7%	20%	73,3%	28,6%	20%	51,4%	

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao analisar os dados da tabela acima, verificamos a alta capacidade de diferenciação entre as classes, mesmo que com discretas diferenças notadas entre as médias dos espectros ilustrados. O desempenho dos equipamentos foi bastante semelhante para este estudo, com um acerto um pouco superior do sistema LIFS-405 em relação ao LIFS-561, o que pode ser

devido à contribuição da banda de fluorescência devido aos metabólitos secundários, na região das emissões no azul-verde.

O pior dos casos ocorreu em relação à classe Cancro Assintomática, com taxas de acerto que chegaram a apenas 53%. Essa confusão já era, de alguma forma, esperada, pois as amostras assintomáticas podem ter sido retiradas de ramos da árvore que não manifestaram reações contra a presença da doença até o momento do arranque das folhas, já que esta se manifesta de maneira local e irregular.

Foi avaliada ainda a capacidade de diferenciação entre as doenças HLB e Cancro Cítrico por esta técnica. Para isso, foi construído um classificador que continha as classes Cancro Sintomática, HLB Sintomática e Saudáveis, e foi avaliada a taxa de acerto deste. A taxa de acerto para o caso do sistema LIFS-405 foi de 82,2%, a mesma taxa alcançada para o sistema LIFS-561. Cada um dos conjuntos contou com 45 amostras, sendo 15 de cada classe. As matrizes de confusão para ambos os casos encontram-se na tabela 5-5.

Tabela 5.5 – Matriz de confusão obtida na diferenciação do HLB e do cancro cítrico para os dois sistemas ópticos em avaliação.

Classificada como Classe nominal	Sistema LIFS-405			Sistema LIFS-561		
	<i>Saudável</i>	<i>HLB Sintomática</i>	<i>Cancro Sintomática</i>	<i>Saudável</i>	<i>HLB Sintomática</i>	<i>Cancro Sintomática</i>
Saudável	86,7%	0%	13,3%	86,7%	0%	13,3%
HLB Sintomática	0%	86,7%	13,3%	0%	73,3%	26,7%
Cancro Sintomática	20%	6,7%	73,3%	6,7%	6,7%	86,7%

Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa maneira, ficou evidente a capacidade de distinção entre as doenças. Os resultados encontrados foram promissores, porém pouco conclusivos, devido à pequena amostragem abordada. Assim, para a confirmação dos resultados e implementação da técnica como uma alternativa para o diagnóstico do Cancro Cítrico, HLB e até outras doenças, deve ser melhor explorado, de forma a abranger um número maior de plantas, de área estudada, e por fim de amostras, para que assim a técnica seja representativa o suficiente para o uso em larga escala. A confiança do equipamento depende muito dessa representatividade e por fim de futuros estudos na área.

Ao envolver também as classes Cancro Assintomática e HLB Assintomática no estudo anterior, verificamos uma queda grande na taxa de acerto que chegou a mais ou menos 63% para os dois sistemas ópticos. Uma queda já esperada já que foram introduzidas as classes

com a maior dificuldade de distinção, e que caracterizam o maior desafio para os pesquisadores e citricultores. Tendo em vista que as amostras de cancro cítrico são de difícil acesso, medidas deverão ser tomadas para que se viabilizem meios de obtenção de amostras de plantas contaminadas para que os estudos possam seguir, realizando um maior número de medidas e análises para otimização da técnica.

5.2 LIBS

5.2.1 HLB

5.2.1.1 DETERMINAÇÃO DOS PICOS

Inicialmente, cada um dos picos que aparecem no espectro LIBS característico das folhas de citros foram cuidadosamente analisados, em busca do comprimento de onda de emissão em que se localiza a posição de máxima intensidade do pico. Tais comprimentos de onda de emissão determinados a partir do nosso espectro LIBS foram comparados com as possibilidades apresentadas na base de dados do NIST, (72) configurada com os parâmetros já citados na seção de Material e Métodos. Vale ressaltar que a resolução experimental do espectrômetro utilizado é de 0,1 nm, considerada relativamente baixa para espectroscopias atômicas, e é aplicável a sistemas portáteis, o que torna bastante difícil a designação de um determinado pico com alta confiança, já que a precisão da linha de emissão de um pico na base de dados pode estar na terceira ou quarta casa decimal. E dessa maneira, dentro do intervalo do erro temos diversas possibilidades para classificação de um pico. Assim, algumas etapas de filtragem e eliminação de possibilidades tiveram que ser aplicadas. Estas se encontram enumeradas a seguir:

- i. Verificação da existência de determinados elementos na amostra em estudo. Feito isso, elementos cuja probabilidade de estarem presentes em folhas de citros era baixa ou inexistente foram descartados;
- ii. As possibilidades restantes foram analisadas em relação à existência de elementos com o mesmo nível de transição. E com isso, a possibilidade da existência de multipletos;
- iii. Foi observada a probabilidade de transição, dada pelo coeficiente de Einstein de emissão espontânea, indicado por A_{ki} , e que representa a probabilidade por unidade de tempo de que a transição ocorra de forma espontânea. Quanto maior se

apresenta tal coeficiente, maior a probabilidade da linha de emissão ser do elemento em questão. E nesta etapa, mais algumas possibilidades foram eliminadas.

- iv. Ainda assim, após esses processos de filtragem e análise, alguns picos ainda apresentavam duas ou mais possibilidades de elementos para classificação. Para estreitar ainda mais as opções existentes, foram analisadas as linhas fortes e persistentes dos elementos possíveis para cada pico. (71) Para cada elemento químico existe uma tabela, na base de dados do NIST, de linhas fortes tanto para átomos neutros como para átomos uma vez ionizados, e cujos dados espectroscópicos se referem à mistura isotrópica de ocorrência natural deste elemento. Assim, foi verificada a existência de linhas fortes nos comprimentos de onda em que existiam dúvidas quanto à classificação dos elementos, e para cada um dos possíveis elementos. Desta forma, a existência de linha forte para um determinado elemento A, e inexistência para um elemento B, aumentava a evidência de classificação da linha como sendo A. As linhas persistentes foram analisadas concomitantemente às linhas fortes. Sabendo que o número de linhas observáveis de um determinado elemento é reduzido com a diminuição da concentração deste elemento em relação a outras substâncias na amostra, às linhas que permanecem no espectro mesmo tendo a concentração deste elemento reduzida, são chamadas de persistentes ou sensíveis. E através de mais essas duas análises, de linhas fortes e/ou persistentes, diminuiu-se ainda mais as possibilidades na determinação das linhas de emissão.
- v. Para não restar dúvidas, por fim, foi calculada a correlação de Pearson das áreas de todos os picos de interesse encontrados, e destacadas as correlações superiores a 0,7. Desta forma, foi possível aumentar as evidências de classificação para alguns picos, cujos exemplos seguem abaixo.

No caso dos picos de Titânio em 334,94 e 336, 13 nm, que apresentaram alta correlação entre si (figura 5.7), a presença de linhas fortes e persistentes nestes comprimentos de onda, foi definitivo para que se confirmasse a existência das linhas do elemento nos espectros das folhas de citros.

Figura 5.7 – Gráfico de correlação das áreas dos picos de Titânio em 334,94 nm e 336,13 nm.

Fonte: Elaborado pela autora.

Outro exemplo que podemos citar é o pico existente em 370,66 nm, que inicialmente foi classificado como Mn I ou Ca II. Neste comprimento de onda existe uma linha forte e persistente para o cálcio, e o mesmo não ocorre para o manganês. Somado a este resultado, tal pico apresentou correlação superior a 0,9 com as áreas de outras 16 linhas de Cálcio, sendo possível constatar que este pico trata-se realmente de Ca II.

Outro caso interessante ocorreu com as linhas de Silício em 288,16 nm e Sódio em 309,27 nm. Em 288,16 nm há uma linha persistente e a mais intensa de todas as linhas do Silício (Si I). E em 309,27 nm, existe uma linha forte e persistente do Sódio (Na II). As duas linhas citadas apresentaram 0,9 de correlação entre elas, como é possível observar no gráfico da figura 5.8 a seguir. Porém, apesar deste resultado, foi verificado que não existem linhas de Silício em 309,27 nm que poderiam estar interferindo na intensidade da linha de Sódio. O inverso ocorre, ou seja, existe uma linha de sódio em 288,12 nm que pode estar interferindo ou sobrepondo os efeitos na linha de Silício. Tal fato faz pensar que pode haver a interferência de um elemento no outro, ou simplesmente, os dois elementos tem variação semelhante na planta, e causam o mesmo efeito nas áreas dos picos dos seus respectivos elementos.

Figura 5.8 - Gráfico de correlação das áreas dos picos de Silício em 288,16 nm e Sódio em 309,27 nm.

Fonte: Elaborado pela autora.

E para finalizar, em 373,71 nm temos uma linha classificada inicialmente como Ferro, e realmente temos uma linha forte e persistente de Fe I nessa região. Porém, temos também uma linha forte de Ca II em 373,69 nm. Observou-se que esta linha de emissão apresentou correlação alta com grande parte das linhas de Cálcio. Assim, é possível concluir que, a linha observada em 373 nm pode ser uma sobreposição de linhas, de Fe I e Ca II, já que tais elementos coexistem na nossa amostra.

Linhas pouco intensas, e que não apresentaram boa correlação com as demais linhas deste mesmo elemento foram excluídas das análises para evitar confusões futuras quanto à determinação das áreas dos picos, e ainda quanto à classificação de uma determinada amostra. Como exemplo deste caso, podemos citar as linhas de Ca I em 430,25 nm, 431,87 nm, 443,5 nm e 643,91 nm.

5.2.1.2 ANÁLISES INICIAIS

A partir do conjunto de 39 folhas de cada classe, selecionadas pelo método mais bem consolidado LIFS em um conjunto com 100% de acerto na validação cruzada em 10 grupos, obteve-se um espectro médio, típico de LIBS, de cada uma das três classes: Saudável, HLB-Sintomática e HLB-Assintomática, que é mostrado na figura 5.9. Neste gráfico é possível observar ainda linhas pontilhadas que dividem o espectro em sete partes de diferentes tamanhos e que correspondem, portanto às sete janelas referentes aos sete mini espectrômetros que compõe o equipamento LIBS. Os sete intervalos de comprimento de onda

correspondente a cada espectrômetro encontram-se indicados na tabela 4-2. Como cada espectro é composto por 13745 pontos fica difícil à visualização das diferenças entre as classes sem nenhuma ampliação dos dados.

Figura 5.9 - Espectro de LIBS característico de cada uma das classes em estudo. Em destaque pelas linhas pontilhadas encontram-se as divisões dos sete espectrômetros que compõem o equipamento LIBS 2500.

Fonte: Elaborado pela autora.

Antes de qualquer manipulação do conjunto de dados selecionado foi executada uma rotina prévia para a exclusão de *outliers*, isto é, eliminação de espectros adquiridos que por algum motivo estejam fora dos padrões esperados, por exemplo, pouco ou excessivamente intensos. Essa exclusão foi realizada de forma automática e baseada no produto escalar entre dois vetores. Assim, os dados de intensidade cada um dos 10 espectros adquiridos por amostra, foram alocados em um vetor n -dimensional, que será chamado de $\vec{y}_i$, com i variando de 1 a 10. O mesmo foi feito com a média dos mesmos 10 espectros, vetor que se denominou $\vec{y}_{\text{médio}}$. A partir do produto escalar $(\vec{y}_i \cdot \vec{y}_{\text{médio}})$, obteve-se o valor análogo ao de cosseno de θ_i , exposto na Equação (2). Assim, sabendo que quanto mais próximo de 1 o valor do cosseno, mais semelhantes são os vetores, valores de cosseno menores que 0,9985 caracterizaram um *outlier* e foram excluídos dos passos seguintes.

$$\cos \theta_i = \frac{\vec{y_i} \cdot \vec{y_{médio}}}{\sqrt{y_i^2 + y_{médio}^2}} \quad \text{Equação (2)}$$

Feito isso, usando todos os dados de intensidade que compõem o espectro LIBS foi executada a validação cruzada aleatória em 10 grupos, variando o número de componentes usados pelo PLS. Desta forma, foi possível observar com qual número de componentes era alcançado o maior número de acerto, e então fixar o número de componentes daqui em diante para as análises que empregam o espectro todo de LIBS como dado de entrada.

A figura 5.10 mostra a evolução da Taxa de acerto do classificador em relação ao número de componentes, e também o decréscimo do RMSE com a variação do número de componentes. E assim, notou-se que para 20 componentes o classificador apresentava o desejável, maior taxa de acerto e menor RMSE.

Figura 5.10 - À esquerda, taxa de acerto em função do número de componentes utilizados no classificador via PLSR. E à direita, RMSE em função do número de componentes utilizados no classificador via PLSR. Ao correlacionar ambos os dados, chegou-se ao número ideal de 20 componentes para os estudos com os dados de um espectro completo de LIBS.

Fonte: Elaborado pela autora.

Feito isso, o número de componentes foi fixado em 20 para que fosse possível a construção de classificadores diversos que pudessem ter seus dados comparados entre si. Testamos, portanto diferentes pré-tratamentos dos espectros LIBS que serão descritos a seguir.

❖ *Pré-tratamento 1:*

O primeiro pré-tratamento foi simplesmente usar os dados crus do espectro, sem nenhum tipo de manipulação ou normalização dos mesmos. Foi feita esta análise tanto calculando a

média como calculando a mediana dos dados por amostra para verificar qual o melhor desempenho dos classificadores. Com esta análise observou-se uma taxa de acerto global do classificador de 84,6154% e 89,7436% usando a mediana e a média dos dados, respectivamente.

Também sem o prévio tratamento, os dados de intensidade de cada espectrômetro foram usados de forma isolada para a classificação e verificação da taxa de acerto global por meio da validação cruzada. Isso foi feito na tentativa de identificar quais as regiões do espectro obtido possuem melhores informações quanto à diferenciação das classes, e futuramente checar a possibilidade de barateamento de um equipamento LIBS desenvolvido com a finalidade de usar apenas as informações mais relevantes em relação ao HLB para então diagnosticá-lo. A tabela 5-6 a seguir, mostra o acerto do classificador em relação à mediana e à média para cada um dos sete espectrômetros.

Tabela 5.6 - Taxa de acerto global do classificador obtida por meio da validação cruzada em relação à mediana e à média para cada um dos sete espectrômetros – dados sem nenhum tratamento prévio. Em destaque os dois melhores desempenhos.

Intervalos de análise	Taxas de Acerto (%)	
	<i>Mediana</i>	<i>Média</i>
Espectrômetro 1	60,6838	65,8120
Espectrômetro 2	82,0513	81,1966
Espectrômetro 3	83,7607	87,1795
Espectrômetro 4	81,1966	86,3248
Espectrômetro 5	82,0513	85,4701
Espectrômetro 6	79,4872	82,9060
Espectrômetro 7	74,3590	76,9231

Fonte: Elaborada pela autora.

Feito isso, foi possível notar que os espectrômetros 3 e 4 apresentaram os melhores desempenhos, e que a média teve acerto superior à mediana.

❖ *Pré-tratamento 2:*

Em seguida, os mesmos dados foram usados para verificar o desempenho dos classificadores via PLSR usando como pré-tratamento a normalização do espectro pela área total dele mesmo. Assim, foi calculada a área abaixo do espectro e, cada ponto de intensidade foi dividido por este valor. A taxa de acerto global para este caso foi de 82,0513% e 88,8889%, para a mediana e média das amostras, respectivamente.

❖ *Pré-tratamento 3:*

Outro método de pré-tratamento testado foi a normalização dos dados por espectrômetro. Ou seja, os dados foram divididos nas sete janelas dos espectrômetros, e os dados de intensidade de cada janela foi dividido pela área total da própria janela. A normalização foi feita separadamente, porém a classificação usando os dados do espectro todo também foi analisada. Assim, a taxa de acerto global nesse caso foi de 82,0513% para a mediana por amostra e 88,8889% para a média, como no caso anterior. Porém, neste caso existiu novamente a possibilidade de fazer a análise por espectrômetro, e assim foi feito. A tabela 5-7 mostra as taxas de acerto global para cada um dos espectrômetros.

Tabela 5.7 - Taxa de acerto global do classificador obtida por meio da validação cruzada em relação à mediana e à média das amostras para cada um dos sete espectrômetros - dados normalizados por espectrômetro. Em destaque os dois melhores desempenhos.

Intervalos de análise	Taxas de Acerto (%)	
	<i>Mediana</i>	<i>Média</i>
Espectrômetro 1	67,5214	68,3761
Espectrômetro 2	80,3419	82,9060
Espectrômetro 3	83,7607	87,1795
Espectrômetro 4	83,7607	88,8889
Espectrômetro 5	79,4872	84,6154
Espectrômetro 6	78,6325	83,7607
Espectrômetro 7	72,6496	75,2137

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, observamos que como no primeiro caso, os melhores resultados de classificação apareceram nos espectrômetros 3 e 4.

Tendo em vista que a normalização dos dados é bastante importante para que seja diminuída a influência da radiação de fundo, ou contínuo, e reduzir incertezas no sinal devido a flutuações da energia do laser; a partir dos resultados bastante similares obtidos acima, se optou por trabalhar com a média das amostras normalizadas pela área de cada espectrômetro, como discorrido no último caso de pré-tratamento. (109) Assim, usando os dados pré-tratados dessa maneira, foi iniciada uma investigação mais profunda do espectro, que envolve a busca por quais os picos, ou elementos, que mais apresentem diferenças em suas intensidades, evidenciando as mudanças químicas, relacionadas ao metabolismo que podem estar ocorrendo na planta devido à presença da doença.

5.2.1.3 *FILTRANDO DADOS: APLICAÇÃO DO TESTE T*

O Teste t, com nível de significância de 5%, foi empregado ponto a ponto ao longo de todo o espectro LIBS previamente tratado, comparando as classes duas a duas, como descrito na seção Material e Métodos. Assim, para cada um dos 13745 pontos do espectro, foi obtido 2 p-valores. Um referente à comparação Saud x HLB_Sint, e outro referente à Saud x HLB_Assint, já que o mais interessante para o estudo é como diferenciar folhas saudáveis de folhas doentes, sintomáticas ou assintomáticas. Desta forma, foi possível filtrar a quantidade enorme de dados que tem um espectro LIBS, e obter quais as regiões de maior interesse na discriminação das classes de acordo com o teste. A partir daqui serão feitas as análises do parâmetro p-valor ao longo de todo o espectro.

5.2.1.3.1 *COMPARAÇÃO SAUDÁVEL X HLB_SINTOMÁTICA*

Na figura 5.11 observa-se o espectro médio da classe Saudável e da classe HLB_Sintomática, plotados para auxiliar na identificação da região do espectro em que é verificada ou não a diferença entre essas duas classes. Sobreposto ao gráfico da figura 5.11 está o p-valor da comparação Saud x HLB_Sint (em cinza claro). Vale lembrar que p-valores inferiores a 5% demonstram diferença estatística significativa entre as classes em estudo e quanto menor o p-valor, menor a chance dessa diferença ser decorrente do acaso. O eixo vertical esquerdo do gráfico mostra a escala do p-valor, limitada a 0,05, já que este corresponde ao intervalo de interesse. O eixo vertical direito do gráfico apresenta a intensidade do espectro normalizado de LIBS, nas condições acima descritas, em unidades arbitrárias de medida.

Figura 5.11 - Gráfico do p-valor fornecido pelo Teste t na comparação Saud x HLB_Sint, e junto o espectro médio da classe Saudável e da classe HLB_Sintomática para facilitar a identificação e verificar o comportamento dos picos.

Fonte: Elaborado pela autora.

Como o gráfico da acima é muito rico em informações, e o que se busca são maiores detalhes na investigação dos picos que apresentam ou não diferenças entre as classes, nos gráficos das figuras a seguir serão apresentadas ampliações de alguns picos presentes no espectro. Os picos serão organizados e apresentados por elemento químico, e logo na sequência, serão discutidos os casos de maior relevância.

❖ *Carbono:***Figura 5.1** - Picos do Carbono presentes no espectro LIBS de folhas de citros e resultados do Teste t a que foram submetidos os dados.

Fonte: Elaborado pela autora.

No caso do Carbono, foram encontrados, no total, três picos passíveis de serem analisados, referentes às linhas de emissão em 193,03 nm, 229,69 nm e 247,86 nm. A linha em 193 nm apresentou diferença estatística apenas na linha de base próxima ao pico, e não apresentou diferenças significativas no próprio pico, comportamento semelhante ao que se nota na emissão em 247 nm. Além disso, a linha de Carbono em 193 nm se encontra no início da primeira janela do espectrômetro, ou seja, em uma região onde o ganho do desté é variável e não linear o que pode prejudicar as análises em relação a este elemento. Outro fato importante é a possibilidade de saturação desta linha devido à quantidade de Carbono presente na amostra. Assim, essa linha não foi utilizada nas próximas análises.

O pico em 229 nm teve um comportamento ligeiramente diferente, já que o p-valor indicou ligeira diferença estatística no próprio pico, com valor alto, porém ainda menor do que o limiar de 5%, e indicou também diferença na linha de base próxima ao pico, com p-valores próximos de zero. Assim, ao observar o comportamento das médias na figura 5.12, se pode verificar que este pico também não traz muitas informações quanto às diferenças buscadas entre as classes, além disso, é um pico referente às emissões do Carbono duas vezes ionizado, difícil de ocorrer já que envolve uma alta energia. Por tais motivos, também foi excluído das próximas etapas de análise.

Em relação ao pico encontrado em 247 nm, ilustrado na figura 5.12-b), foi verificado que exatamente na intensidade máxima do pico não há diferença estatística significativa, porém, estas foram encontradas na linha de base próximas a ele. Este pico, em alguns casos aparece interferido por Ferro. Porém, não conseguimos visualizar nenhuma outra linha de Ferro neste espectrômetro que possa dar um indicativo de que a linha de Carbono esteja sendo interferida por este elemento. Além do que, as linhas de ferro próximas a ele não são persistentes, são pouco intensas, e devido a baixa concentração deste elemento encontrada em plantas estas podem não ser verificadas nesta região. Assim, neste caso não há interferência que possa prejudicar a análise.

Assim, as linhas de emissão do carbono presentes no espectro foram avaliadas, e apesar de nenhuma delas apresentar comportamento satisfatório em relação ao teste estatístico escolhido, o pico em 247,86 nm, referente à linha mais intensa do C I segundo o NIST, foi selecionado para as próximas análises devido à importância desse elemento para as plantas.

❖ *Magnésio:*

Quanto ao magnésio, foram encontrados cinco picos bem comportados no espectro de emissão LIBS, que podem ser observados na figura 5.13. Ainda na figura 5.13-a), outras duas regiões denotadas como “ombros” são indicadas. Comportamentos assim podem ser explicados pela sobreposição das intensidades dos picos presentes em regiões muito próximas, devido à insuficiente resolução espectral do sistema experimental usado. Nesse caso, trata-se de outras duas linhas de emissão de Mg II, a primeira em 279,08 nm, e a segunda em 279,80 nm.

Figura 5.13 - Picos de Magnésio presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e ainda o p-valor, resultado do Teste t aplicado.

Fonte: Elaborado pela autora.

Assim, é possível notar que os picos em 279,55 nm e 280,27 nm, referentes ao Mg II, estão em uma região de elevação do espectro, que pode ser justificada pelo número de linhas de emissão presentes no intervalo analisado e pela baixa resolução espectral. Além disso, estes dois picos de Mg II podem estar sofrendo o efeito de reabsorção, dificultando a visualização das diferenças entre as classes. Porém, ainda assim pelo Teste t se verifica diferenças estatísticas na linha de base próxima aos picos, que apresentou p-valores de 0,0006 e 0,00012, respectivamente em 278,22 nm e 281,71 nm; mesmo caso observado para o carbono. Dessa maneira, corrigindo a linha de base para comparação das intensidades seria possível observar diferenças estatísticas nas intensidades máximas dos picos.

Para o caso do pico de Mg I, em 285,217 nm, a diferença estatística se apresenta exatamente no pico ($p\text{-valor} = 4,33 \cdot 10^{-5}$) e fica fácil ver que é um pico que pode ajudar na

diferenciação entre as classes. O mesmo acontece com os picos de Mg I em 517,27 nm e 518,36 nm, com p-valores da ordem de 10^{-4} .

❖ *Silício:*

Foi identificado no espectro LIBS das folhas de citros um pico em 288,16 nm, uma linha persistente e muito intensa do elemento silício. Por esse motivo, talvez, seja possível observar apenas tal linha de emissão com o sistema experimental empregado. Porém, nessa mesma região existe uma linha de sódio, em 288,11 que pode estar interferindo na intensidade do pico de silício, como foi comentado na seção anterior, em que foi discutida a determinação das linhas. Exatamente na intensidade máxima do pico o p-valor foi da ordem de 10^{-4} , enquanto na linha base do pico os p-valores foram de 0,04. Assim, sabendo que o silício é absorvido pelas raízes das plantas e transportado pelo vaso xilema até as folhas, onde apresenta importante papel estrutural e ainda confere aumento de resistência ao acamamento⁷, (110) o pico foi corrigido e as informações dele usadas nas análises seguintes.

Figura 5.14 – Pico de Silício presente no espectro LIBS de folhas de citros Saudáveis e HLB-Sintomáticas, e resultado do p-valor após aplicação do Teste t.

Fonte: Elaborado pela autora.

⁷ Ato de acamar, ou seja, fazer pender ao nível do chão, por ventania.

❖ *Alumínio:*

Figura 5.15 - Pico de Alumínio presente no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e resultado do p-valor obtido após aplicar o Teste t.

Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação ao alumínio foi identificado um pico no espectro LIBS das folhas de citros em 308,21 nm. Apesar da baixa intensidade, como esperado já que o alumínio é um metal tóxico às plantas em maiores quantidades, o pico apresentou diferença estatística com p-valor da ordem de 10^{-4} , e foi utilizado nas análises posteriores.

❖ Sódio:

Figura 5.16 - Picos de Sódio presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e ainda o p-valor, resultado do Teste t aplicado.

Fonte: Elaborado pela autora.

Ao analisar os casos de picos de sódio presentes no espectro LIBS foram observados três casos que se encontram ilustrados na figura 5.16. No gráfico da figura 5.16-a), fica evidenciada a ocorrência da diferença estatística significativa entre as classes pelo baixo p-valor obtido através do teste de hipótese aplicado, que foi da ordem de 10^{-5} em 309,27 nm. Para os outros picos de Na encontrados, 588,982 nm e 589,59 nm, a diferença estatística não foi tão acentuada ou inexistente. O p-valor calculado foi inferior a 0,05 apenas nas bases do pico 589 nm e estes são de aproximadamente 0,03. Assim, para o sódio foi selecionado o pico em 309 nm para a próxima etapa das análises.

Uma possível justificativa para a ocorrência de diferenças significativas entre as classes no pico de emissão iônica e não observar esta mesma diferença nos picos de emissão atômica pode estar no fato de que as linhas de 588 e 589 do Sódio ser muito fortes, persistentes, com alta probabilidade e elevada concentração no plasma. Tais fatores levam a um efeito de reabsorção e saturação intenso, e o que pode ser notado é um ligeiro alargamento da linha, dificultando a diferenciação das classes através da intensidade dessas linhas.

❖ *Cobre:*

Figura 5.17 - Picos de Cobre presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e ainda o p-valor, resultado do Teste t aplicado. Em destaque encontram-se as regiões de cruzamento entre as intensidades dos espectros médios.

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com o gráfico da figura 5.17, para o elemento cobre foram encontrados dois picos com intensidades suficientes para análise: o primeiro deles em 324,75 nm, e o segundo em 327,40 nm. De acordo com o Teste t, as regiões de linha de base dos picos ilustrados acima também apresentaram p-valores muito baixos. Porém, após uma análise mais cuidadosa das regiões destacadas no gráfico da figura 5.17, verificou-se um cruzamento das intensidades dos espectros médios, o que chama atenção para possíveis diferenças maiores entre as classes após correção nas linhas de base.

❖ *Titânio:*

Figura 5.18 - Picos de Titânio presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e o p-valor, resultado do Teste t aplicado.

Fonte: Elaborado pela autora.

Três picos de titânio foram identificados no espectro LIBS das folhas de citros: 334,94 nm, 336,12 nm e 336,26 nm, todos eles referentes à primeira ionização do titânio. Calculado o p-valor no Teste t, os três apresentaram diferença estatística significativa entre as duas classes. Assim, dentre os picos identificados o que apresentou maior intensidade relativa foi o de 334,94 nm e, portanto, foi usado para as demais análises, eliminando possíveis erros no cálculo das áreas dos demais picos, já que estes possuem intensidades da mesma ordem de grandeza do background do espectro. Vale ressaltar que o pico selecionado (334,94 nm) pode estar sendo interferido por um pico de Ca I em 335,02 nm. No entanto, a resolução do espectrômetro utilizado não é suficiente para definir e identificar qual elemento se refere o pico visualizado em tal região do espectro.

❖ *Ferro:*

Figura 5.19 - Pico de Ferro presente no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e resultado do p-valor obtido após aplicar o Teste t.

Fonte: Elaborado pela autora.

No caso do ferro, foi possível identificar dois picos. O primeiro deles em 373,48 nm e o segundo em 373,71 nm, que pode estar sendo interferido por uma linha de Cálcio bastante intensa em 373,69. Em ambos os picos foi possível constatar p-valores inferiores a 0,05, porém, como a intensidade do primeiro é muito pequena, optou-se por utilizar apenas a linha em 373,71 nm para as demais análises. Como ilustrado no gráfico da figura 5.19 o p-valor nesta linha de emissão é da ordem de 10^{-10} , ou seja, apresentou diferença estatística significativa entre as intensidades das classes Saudável e HLB_Sintomática, com baixíssima probabilidade de esta diferença advir do acaso.

❖ *Potássio:*

Outro elemento encontrado nas folhas de citros foi o Potássio. E nesse caso foram identificados dois picos de grande intensidade, que correspondem ao dubleto de potássio (figura 5.20).

Figura 5.20 - Picos de Potássio presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e o p-valor, resultado do Teste t aplicado.

Fonte: Elaborado pela autora.

Ambos os picos apresentaram diferença estatística significativa entre as classes Saudável e HLB_Sintomática, com p-valores da ordem de 10^{-4} e possuem intensidades consideráveis, não havendo a necessidade de descartar nenhum deles. O principal critério adotado para a manutenção dos dois picos para as demais análises foi o baixo p-valor na intensidade máxima deles, e um p-valor alto, apesar de ainda menor do que 0,05, na linha de base próxima aos picos.

❖ Cálcio:

Figura 5.21 - Picos de Cálcio presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e o p-valor, resultado do Teste t aplicado.

(Continua)

(Continuação)

Figura 5.21 - Picos de Cálcio presentes no espectro LIBS de folhas de citros saudáveis e HLB_Sintomáticas, e o p-valor, resultado do Teste t aplicado

Fonte: Elaborado pela autora.

O elemento cálcio foi o que apresentou o maior destaque, uma vez que ele está presente em grande parte do espectro LIBS sendo possível identificar diversos picos desse elemento. Além disso, vale destacar que em todos eles foi observada diferença estatística significativa entre as classes e grande parte destes foi selecionada para a construção de classificadores. Oito dos picos encontrados estão representados na figura 5.21, e foram observados p-valores da ordem de até 10^{-14} , como é o caso do pico em 422,67 nm, um pico bem definido e bastante característico do cálcio. Os picos que não foram usados para classificação foram aqueles que apesar de ainda apresentarem diferenças estatísticas significativas, as intensidades dos mesmos eram da mesma ordem dos ruídos do sistema experimental, o que poderia prejudicar e confundir as análises.

5.2.1.3.2 COMPARAÇÃO SAUDÁVEL X HLB_ASSINTOMÁTICA

As mesmas análises, linha de emissão por linha de emissão, comparando os p-valores, foi feita em relação às Saudáveis e HLB_Assintomáticas. E assim, foi possível notar que também estas apresentaram diferenças significativas para grande parte dos picos que foram identificados anteriormente. Com exceção dos picos de Titânio (em 334,9 nm, 336,1212 nm e 336,2643 nm) e alguns picos de Cálcio (como por exemplo, a região entre 428 e 430 nm; 558 e 559 nm; 610 e 612 nm), os demais picos analisados apresentaram diferença estatística significativa ou no próprio pico, ou no contínuo próximo a ele, caso que também ocorreu nas comparações Saudável e HLB_Sintomática.

Um dado interessante que ocorreu no caso das assintomáticas e que merece atenção foi o fato de que os picos de cálcio apresentaram-se, em média, mais intensos nas amostras assintomáticas do que nas amostras saudáveis. Talvez a doença leve a um acúmulo de cálcio na sua fase assintomática por motivo de defesa da planta, possibilidade que será discutida posteriormente.

Assim, foram selecionados os picos presentes no espectro em que, ao menos em uma das análises anteriores, foi verificada diferença estatística significativa pelo Teste t aplicado. Os picos selecionados para as análises seguintes foram os que constam na Tabela 5-8 a seguir:

Tabela 5.8 - Picos identificados no espectro LIBS, e seus respectivos comprimentos de onda, intensidade relativa, coeficiente de Einstein, energia dos níveis de transição e configuração eletrônica, que apresentaram diferença estatística significativa entre os dados através das análises do p-valor obtidos por meio do Teste t.

Elemento	Compr. de onda-ar (nm)	Intens Rel.	Aki (s ⁻¹)	Energia nível inferior (cm ⁻¹)	Energia nível superior (cm ⁻¹)	Nível Inferior	Nível Superior
C I*	247,856	800	2,80E+07	21 648,01	- 61 981,82	2s ² 2p ²	2s ² 2p3s
Mg II*	279,5528	13	2,60E+08	0	- 35 760,88	2p ⁶ 3s	2p ⁶ 3p
Mg II*	280,2704	12	2,57E+08	0	- 35 669,31	2p ⁶ 3s	2p ⁶ 3p
Mg I*	285,2127	50	4,91E+08	0	- 35 051,264	2p ⁶ 3s ²	3s3p
Si I*	288,1579	1000	2,17E+06	6 298,850	- 40 991,884	3s ² 3p ²	3s ² 3p4s
Mn I*	308,133	50	3,06E+06	17 568,48	- 50 012,50	3d ⁶ (⁵ D)4s	3d ⁵ (⁴ P)4s4p(³ P°)
Na II*	309,2731	550	2,09E+08	264 924,32	- 297 248,82	2s ² 2p ⁵ 3s	2s ² 2p ⁵ 3p
Ca II*	315,887	170	3,10E+08	25 191,51	- 56 839,25	3p ⁶ 4p	3p ⁶ 4d
Ca II*	317,933	180	3,60E+08	25 414,40	- 56 858,46	3p ⁶ 4p	3p ⁶ 4d
Cu I**	324,7537	10000	1,39E+08	0	- 30 783,686	4s	4p
Cu I**	327,3954	10000	1,37E+08	0	- 30 535,302	4s	4p
Ti II*	334,94023	8600	1,68E+08	393,4459	- 30 240,9396	3d ² (³ F)4s	3d ² (³ F)4p

(Continua)

(Continuação)

Tabela 5.8 - Picos identificados no espectro LIBS, e seus respectivos comprimentos de onda, intensidade relativa, coeficiente de Einstein, energia dos níveis de transição e configuração eletrônica, que apresentaram diferença estatística significativa entre os dados através das análises do p-valor obtidos por meio do Teste t.

Ca II*	370,603	170	8,80E+07	25 191,51	- 52 166,93	$3p^64p$	$3p^65s$
Fe I*	373,71313	-	1,41E+07	415,933	- 27 166,820	$3d^64s^2$	$3d^6(^5D)4s4p(^3P^o)$
Ca II*	393,366	230	1,47E+08	0	- 25 414,40	$3p^64s$	$3p^64p$
Ca II*	396,847	220	1,40E+07	0	- 25 191,51	$3p^64s$	$3p^64p$
Ca I*	422,673	50	2,18E+08	0	- 23 652,304	$3p^64s^2$	$3p^64s4p$
Ca I*	445,478	30	8,70E+07	15 315,943	- 37 757,449	$3p^64s4p$	$3p^64s4d$
Mg I*	517,26843	44	3,37E+07	21 870,464	- 41 197,403	$3s3p$	$3s4s$
Mg I*	518,34	45	5,61E+07	21 911,178	- 41 197,403	$3s3p$	$3s4s$
Ca I*	526,5556	24	4,40E+07	20 349,260	- 39 335,322	$3p^63d4s$	$3p^63d4p$
Ca I*	527,027	25	5,00E+07	20 371,000	- 39 340,080	$3p^63d4s$	$3p^63d4p$
Ca I*	558,876	27	4,90E+07	20 371,000	- 38 259,124	$3p^63d4s$	$3p^63d4p$
Ca I*	559,447	26	3,80E+07	20 349,260	- 38 219,118	$3p^63d4s$	$3p^63d4p$
Ca I*	559,849	25	4,30E+07	20 335,360	- 38 192,392	$3p^63d4s$	$3p^63d4p$
Ca I*	610,272	27	9,60E+06	15 157,901	- 31 539,495	$3p^64s4p$	$3p^64s5s$
Ca I*	612,222	29	2,87E+07	15 210,063	- 31 539,495	$3p^64s4p$	$3p^64s5s$
Ca I*	646,257	34	4,70E+07	20 349,260	- 35 818,713	$3p^63d4s$	$3p^63d4p$
Ca I**	732,6145	33	2,94E+07	23 652,304	- 37 298,287	$4s4p$	$4s4d$
K I*	766,4899	25	3,80E+07	0	- 13 042,896027	$3p^64s$	$3p^64p$
K I*	769,89645	24	3,75E+07	0	- 12 985,185724	$3p^64s$	$3p^64p$
Ca I*	854,209	170	9,90E+06	13 710,88	- 25 414,40	$3p^63d$	$3p^64p$

Fonte: *Base de dados do NIST. (72)

**Base de dados construída a partir dos arquivos de dados atômicos de Kurucz CD-Rom 23. (73)

5.2.1.4 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS ÁREAS (ANOVA)

Nesta etapa, os trinta e dois picos listados na tabela 5-8 tiveram suas linhas de base extraídas, bem como foi realizada a aproximação dos picos por um perfil lorentziano, a partir do qual se obteve a área da curva de cada um dos picos e para cada uma das amostras. Assim, para cada uma das áreas referentes às linhas de emissão identificadas foi realizado a Análise de Variância de um fator (One Way ANOVA) dos valores de área calculados para comparação das médias dos três estágios da doença em estudo. A análise de variância de um fator é um procedimento usado para comparar três ou mais grupos em relação a um fator, no caso, a sanidade da planta. Para isso, previamente foram verificados os três pressupostos do teste a ser aplicado (Pressuposto da Independência, da homogeneidade da variância e o da normalidade dos dados dos conjuntos envolvidos). Feito isso, ao saber que existia alguma diferença estatística significativa entre dados, analisamos o resultado dos p-valores fornecido pelo teste de Tukey, um teste de comparação de médias, que identifica qual, ou quais grupos diferem entre si, estatisticamente, e com qual magnitude isso acontece.

Assim como no caso do Teste t, também usamos os resultados desta etapa como um filtro. Desta forma, os picos que não apresentaram diferença estatística significativa entre as áreas foram excluídos. Isso ocorreu com os picos de Carbono em 247,86 nm e Magnésio em 517,27 nm.

5.2.1.5 CLASSIFICAÇÃO DAS PLANTAS EM RELAÇÃO ÀS VARIAÇÕES NUTRICIONAIS EM ÁRVORES SAUDÁVEIS E DOENTES COM HLB

Nesta etapa, através dos valores de área obtidos para os picos citados anteriormente, foram realizadas dez validações cruzadas aleatórias em dez grupos para a determinação do número de componentes a ser usada na implementação e validação de classificadores baseados na composição elementar das folhas de citros, detectáveis pelo sistema experimental usado. Assim como realizado na seção 1.5.1.2, variando o número de componentes e verificando concomitantemente a taxa de acerto e o erro quadrático médio, chegou-se para o conjunto base acima estudado em quatorze componentes.

Dessa maneira, ainda para o conjunto selecionado de Maio/2013 foi obtida uma taxa de acerto de 85,5% na validação cruzada usando catorze componentes, conforme previamente determinado, e considerando que a confusão entre folhas HLB-Assintomáticas e HLB-Sintomáticas não se trata de um erro. A matriz de confusão para este caso está retratada na tabela 5-9 abaixo.

Tabela 5.9 – Matriz de confusão da validação cruzada em dez grupos realizada com o conjunto selecionado pela técnica LIFS para os estudos preliminares com a técnica LIBS. Para este caso, 81,2% das instâncias foram classificadas corretamente.

Classificada como Classe nominal	Saudável	HLB-Sintomática	HLB-Assintomática
Saudável	76,9%	10,3%	12,8%
HLB-Sintomática	5,1%	92,3%	2,6%
HLB-Assintomática	15,3%	10,3%	74,4%

Fonte: Elaborada pela autora.

As taxas de acerto durante a validação cruzada em dez grupos para outros conjuntos, usando a área de cada um dos trinta picos selecionados de forma a melhor distinguirem a sanidade da planta em relação ao HLB, encontram-se listadas na tabela 5-10. Vale lembrar que cada conjunto se refere a um grupo de folhas recebido e medido em um determinado mês.

Tabela 5.10 – Taxa de acerto obtida durante a validação cruzada em 10 grupos dos classificadores implementados a cada mês de medidas.

Taxa de acerto (Validação Cruzada)	
Conjunto 1	76,0%
Conjunto 2	75,5%
Conjunto 3	79,3%
Conjunto 4	60,6%
Conjunto 5	71,2%

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, foi possível verificar que para a maioria dos conjuntos a variação nutricional foi suficiente para diferenciar folhas de plantas doentes de folhas de plantas saudáveis. Como o estudo foi feito baseado no diagnóstico por folha, não é possível dizer a respeito do diagnóstico por planta. Para isso, cabe um novo estudo de amostragem para melhor delinear as condições para assumir uma planta como doente com HLB, ou saudável, já que se trata de uma doença que se desenvolve de maneira não homogênea, e cujos sintomas aparecem de forma irregular na árvore. O conjunto 4 apresentou um comportamento inferior aos demais, o que ocorreu para outras análises desenvolvidas com este conjunto. Assim, de maneira geral o conjunto não estava bom para as análises o que pode ter ocorrido devido a algum problema durante a coleta das amostras naquele mês, como por exemplo o não respeito ao protocolo durante o procedimento.

5.2.1.6 *VARIAÇÕES NUTRICIONAIS EM PLANTAS DE CITROS: UMA TENTATIVA DE COMPREENSÃO DO HLB*

Através das medidas com a técnica LIBS foi possível verificar as variações de diferentes elementos nas folhas de plantas doentes e plantas saudáveis de forma qualitativa, e ainda ter uma ideia quantitativa dessas alterações pela observação das médias das classes.

Em relação ao Carbono foi possível notar pouca ou nenhuma variação. O que pode ser justificado pelo fato de ser um macro nutriente, ou seja, é usado em quantidades extremas. Além disso, apesar de a quantidade de moléculas de clorofila diminuir contribuindo para uma diminuição da quantidade de carbono nas folhas de plantas doentes, ocorre um acúmulo de seiva elaborada, constituída por açúcares, na própria folha devido ao entupimento do vaso floemático das mesmas, o que não permite a variação da quantidade de carbono, já que as moléculas de açúcar são formadas basicamente por Carbono, Hidrogênio e Oxigênio.

Estes três elementos, Oxigênio, Hidrogênio e Carbono, são obtidos por meio do dióxido de carbono atmosférico e água, e representam cerca de 90-96% da matéria seca das plantas. (111) Desta maneira, variações no Carbono podem ser dificilmente notadas pela técnica já que efeitos de saturação da linha podem ocorrer e mascarar a diferença desse elemento entre as classes, se esta existir.

O Hidrogênio, Nitrogênio e o Oxigênio são elementos que constam no espectro LIBS, porém, por estarem presentes em grandes quantidades na atmosfera ambiente, não foram usados nas análises realizadas.

O Potássio, outro elemento identificado e analisado por meio dos espectros LIBS, é também um macro nutriente e, portanto, requerido em grandes quantidades pela planta. Em relação às observações feitas nos espectros adquiridos, o Potássio varia muito pouco quando comparadas as classes estudadas, e podemos atribuir tal fato à grande quantidade do elemento necessária à planta. Este elemento é bastante móvel na planta e é responsável por uma diversidade de funções fisiológicas básicas tais como: formação de açúcares e amido, síntese de proteínas, crescimento e divisão celular, e ainda a neutralização de ácidos orgânicos. Além disso, ajuda no crescimento do fruto, bem como melhora seu sabor e cor. (112) É ainda conhecido por estar envolvido de alguma maneira com quase todas as funções da planta. E um fato bastante curioso, o Potássio melhora a saúde da planta e aumenta a resistência dela a doenças. (112) Quando a planta se depara com uma deficiência de Potássio, é possível observar sintomas como uma mudança de cor das folhas maduras de verde para verde claro a amarelo, o crescimento é retardado, e frutos e sementes apresentam-se deformados. Sintomas como os que também são notados em uma planta com HLB, ou seja, a deficiência de potássio pode levar ao agravamento da doença. (112)

Já o Magnésio e o Cálcio são nutrientes secundários e, nestas análises foram encontradas diferenças entre as classes. O Magnésio é o centro da molécula de clorofila e portanto, está envolvido na via fotossintética da planta. É conhecido que os níveis de clorofila em uma planta doente com HLB caem, e desta forma, afetam a concentração do Magnésio na mesma. Além disso, está ligado à ativação de diversas enzimas e é um dos grandes responsáveis pela translocação do Fósforo na planta. O principal sintoma da deficiência de Magnésio é a clorose, que se inicia na ponta das folhas maduras, e ainda a queda prematura de frutos. (111)

O Cálcio, elemento que mais variou entre as classes de folhas estudadas, apresentando-se sempre em menor quantidade nas folhas sintomáticas, é necessário para o correto desenvolvimento da planta, principalmente em relação ao crescimento das raízes. É muito importante como constituinte das paredes celulares por formar compostos que a fortalecem, e

ainda, é necessário para a manutenção da estabilidade dos cromossomos e divisão celular. Neutraliza ácidos orgânicos, regula a síntese de proteínas e retarda o processo de envelhecimento da planta. (112) O íon Cálcio tem se mostrado importante como segundo mensageiro em muitas rotas de sinalização em plantas, incluindo rotas que envolvem a resposta à herbivoria. (113) Estudos vêm sendo realizados em plantas de citros a fim de verificar a influência do Cálcio na recuperação de plantas com HLB. Ahmad e colaboradores (114) mostraram que aplicações foliares de Cálcio, associado a micronutrientes como Cobre e Zinco, podem retardar a incidência e severidade da doença, e ainda aumentar discretamente a produção de frutos e o teor de sólidos solúveis (quantidade de açúcares totais). O Cálcio é um elemento imóvel na planta, e sua deficiência pode prejudicar a fixação da mesma ao solo, além de causar sintomas como o desvanecimento da clorofila ao longo das margens da folha e também na nervura central, espessamento e perda de vigor das folhas, mantendo-as pequenas, queda excessiva das folhas e diminuição da produção de frutos, pode apresentar ainda o perecimento de galhos inteiros, e os frutos podem se apresentar disformes, com baixo teor de suco e alto teor de ácidos e sólidos solúveis. (115)

Em relação ao Cobre, outro elemento que apresentou variações nas análises elementares por meio dos espectros LIBS, é possível inferir que a diminuição dele nas folhas das plantas doentes pode ocorrer devido à diminuição das taxas fotossintéticas já que tem papel importante tanto na fotossíntese, como na formação da clorofila. É um elemento que também está envolvido em diversos sistemas enzimáticos, regula uma série de processos bioquímicos e tem função importante no metabolismo das raízes, assim como o Cálcio. (112) A deficiência de cobre pode apresentar dentre outros sintomas a ocorrência de frutos pequenos, de cor clara e teor consideravelmente reduzido de sólidos solúveis, ácidos e vitaminas. (116)

O Zinco é um micronutriente de mobilidade moderada na planta, cujas linhas de emissão não constaram nas análises dos espectros LIBS, e tem por principais funções compor diversos sistemas enzimáticos, estando indiretamente envolvido com o metabolismo do carbono, a regulação do equilíbrio entre dióxido de carbono, água e ácido carbônico; é essencial para a formação da clorofila e funcionamento normal da fotossíntese, e ainda melhora e regula a captação de água na planta, que devido à doença é prejudicada na planta. O tratamento com Zinco também ganhou destaque na pesquisa de Ahmad e colaboradores, (114) já que foi o grande responsável por, juntamente com o Cálcio, promover uma melhora nutricional de maneira geral nas folhas das plantas doentes. Neste estudo foi constatado ainda que as aplicações dos micronutrientes associados ao Cálcio não funcionam para plantas com sintomas em estágio avançado do HLB, mas todas aquelas com sintomas de leve a moderado

responderam muito bem aos tratamentos e apresentaram uma melhora significativa, podendo permanecer produtivas ao longo de um tempo maior.

Outros nutrientes como o Silício, o Ferro e o Sódio, tem papel importante para o desenvolvimento saudável de uma planta. Assim, em citros, podemos citar o silício como um nutriente cujas principais funções são a melhoria do desequilíbrio nutricional na planta, a redução da toxicidade em relação a alguns metais, melhoria das propriedades mecânicas dos tecidos e ainda, aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos. (117) Assim, estudos mostraram que plantas saudáveis têm quantidades maiores de Silício nas folhas de plantas saudáveis do que folhas de plantas doentes, e ainda que a porcentagem de Silício em uma folha aumenta com a idade da mesma e o nível desta concentração pode estar relacionado a estresses bióticos. (118) Além disso, o Silício vem mostrando resultados positivos em estudos envolvendo o controle de pragas, por ação direta ou indireta, como demonstrado por Rodrigues e colaboradores (110). Dessa maneira, o Silício de fato pode ser um elemento indicativo de sanidade da planta em relação ao HLB, colaborando para o diagnóstico precoce.

Quanto ao Ferro, é sabida sua importância na catálise da produção da clorofila e no auxílio nos sistemas fotossintético e respiratório. (112) A deficiência desse elemento pode causar sintomas, tais como, folhas cloróticas, menores, finas e frágeis, cuja queda se dá de maneira precoce, o volume da copa é diminuído, os frutos se apresentam pequenos, com reduzido teor de sólidos solúveis, aumento da acidez e de rendimento reduzido. (119)

O Alumínio, que apresentou apenas uma linha pouco intensa, porém persistente no espectro LIBS é normalmente apontado como tóxico para as plantas. Mas, é encontrado em quantidades muito baixa nas mesmas, principalmente nas folhas, já que ele se move muito vagarosamente até as partes mais altas da planta. Assim, estudos apontam que a maioria das plantas contém não mais do que 0,2 mg/g de massa seca de Alumínio, (120) uma quantidade muito pequena, porém detectável pelo sistema LIBS usado para a análise.

Shen e colaboradores (121) mostraram em um estudo recente que aplicações foliares de inseticidas e nutrientes podem, em longo prazo, melhorar a prática agrícola em regiões onde existem poucas árvores infectadas com HLB, pois os inseticidas podem ajudar a diminuir a diversidade de bactérias endofíticas em folhas de citros enquanto as aplicações de nutrientes podem induzir resistência sistêmica e/ou resistência sistêmica adquirida, minimizando a concentração da bactéria causadora da doença, bem como o aparecimento dos sintomas e melhorando o crescimento foliar após ao menos três anos de aplicações seriadas. Estudos como este e como os apresentados por Ahmad e colaboradores (114) são controversos, já que a manutenção de uma árvore sabidamente doente em campo significa a manutenção de fonte

de inóculo da doença em campo, podendo esta servir para a disseminação da bactéria causadora do HLB. Desta forma, o presente trabalho propõe técnicas para auxiliar no diagnóstico e então, eliminar as plantas diagnosticadas o mais rápido possível, de modo que a longo prazo seja possível o controle total da doença e recuperação da produtividade.

De maneira geral e simples, as plantas contaminadas com HLB apresentam o entupimento do floema, vaso que conduz a seiva elaborada das folhas ao restante da planta. Se este sistema apresenta um impedimento, a seiva elaborada deixa de atingir a raiz da planta, levando à morte da mesma depois de longo tempo. Com a morte lenta da raiz, deixa de ocorrer a absorção de água e sais minerais do solo, necessários às atividades da planta, o que levará à morte da árvore. Além disso, também é prejudicada a circulação do que se denomina seiva bruta, da raiz até as folhas. Isto ocorre inicialmente no ramo em que a bactéria encontra-se alojada, pois a ascensão da seiva bruta depende da perda de água pela transpiração e fotossíntese, e como estes mecanismos são afetados pela doença, é possível observar o início do aparecimento dos sintomas do HLB.

Assim, o conjunto de deficiências nutricionais observadas, decorrentes da ação do HLB, são a causa dos sintomas hoje observados nas plantas doentes e cujas características são buscadas pelas equipes de inspeção campo. Desta forma, a análise dos espectros LIBS que nos trazem uma informação elementar da constituição das folhas de citros, pode auxiliar em futuras análises nutricionais e compreensão de rotas metabólicas nos citros, como também no diagnóstico e compreensão do HLB. Como se trata de uma técnica rápida, sem necessidade de grande preparo de amostra (já que a análise pode ser feita no material *in natura*), não gera resíduos químicos possibilitando práticas sustentáveis na agricultura, entre outras vantagens, as análises podem ser feitas em outras partes da planta, bem como em outras culturas, permitindo novas investigações e focando em novos problemas, pragas ou doenças.

5.2.2 *CANCRO CÍTRICO*

As análises iniciais foram realizadas a partir do conjunto de folhas recebido no mês de Abril de 2013, formado por 60 folhas com Cancro apresentando os sintomas, 66 folhas de árvores doentes, porém sem apresentar os sintomas, e 62 folhas de árvores saudáveis cultivadas em campo. As folhas eram todas Valência enxertadas em Laranja Caipira. Abaixo segue para ilustração um espectro LIBS médio de cada uma das três classes acima descritas (figura 5.22).

Figura 5.22 - Espectro de LIBS característico de cada uma das classes em estudo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Assim como feito com os gráficos obtidos para o HLB, antes de qualquer manipulação do conjunto de dados selecionado, foi executada uma rotina prévia para a exclusão de *outliers*. Feito isso, foi realizada a validação cruzada em 10 folds na indução de classificadores via regressão por mínimos quadrados parciais com 20 componentes usando todos, ou parcialmente, os dados de intensidade que compõem o espectro LIBS, dependendo do pré-tratamento adotado para cada caso. Testamos, portanto os mesmos pré-tratamentos usados previamente com os espectros LIBS para os conjuntos de HLB.

❖ *Pré-tratamento 1:*

Neste pré-tratamento, vale lembrar que foram usados os dados crus do espectro, sem nenhum tipo de manipulação ou normalização dos mesmos. Para a média observou-se uma taxa de acerto do classificador de 95,2128% e para a mediana 92,0213%, usando os dados de intensidade do espectro LIBS completo como entrada para a indução do classificador.

Em seguida, foram avaliadas as taxas de acerto quando os dados de entrada foram as intensidades dos espectrômetros individualmente. A tabela a seguir mostra os resultados em relação à mediana e a média para cada um dos sete espectrômetros.

Também sem o prévio tratamento, os dados de intensidade de cada espectrômetro foram usados de forma isolada para a classificação e verificação da taxa de acerto global por meio

da validação cruzada. Isso foi feito na tentativa de identificar quais as regiões do espectro obtido possuem melhores informações quanto à diferenciação das classes, e futuramente checar a possibilidade de barateamento de um equipamento LIBS desenvolvido com a finalidade de usar apenas as informações mais relevantes em relação ao HLB para então diagnosticá-lo. A tabela 5-11 a seguir, mostra o acerto do classificador em relação à mediana e à média para cada um dos sete espectrômetros.

Tabela 5.11 - Taxa de acerto global do classificador para Cancro Cítrico obtida por meio da validação cruzada em relação à mediana e à média para cada um dos sete espectrômetros – dados sem nenhum tratamento prévio. Em destaque os melhores desempenhos.

Intervalos de análise	Taxas de Acerto (%)	
	<i>Mediana</i>	<i>Média</i>
Espectrômetro 1	75,0	83,5106
Espectrômetro 2	71,8085	73,4043
Espectrômetro 3	77,6596	81,9149
Espectrômetro 4	81,383	93,617
Espectrômetro 5	73,9362	83,5106
Espectrômetro 6	78,1915	85,6383
Espectrômetro 7	72,3404	80,3191

Fonte: Elaborada pela autora.

Feito isso, foi possível notar que os espectrômetros 4 e 6 apresentaram os melhores desempenhos, e que a média teve acerto relativamente superior à mediana.

❖ *Pré-tratamento 2:*

Nesta etapa, os mesmos dados foram usados para verificar o desempenho dos classificadores via PLSR usando como pré-tratamento a normalização do espectro pela área total dele mesmo, conforme já explicado para o caso anterior. A taxa de acerto global para este caso foi de 92,5532% e 95,7447%, para a mediana e média das amostras, respectivamente. Neste caso também não foi feita a análise por espectrômetro, já que não faz sentido usar apenas os dados de intensidade de uma única janela na classificação se para a normalização dos mesmos existe a necessidade dos dados do espectro completo.

❖ *Pré-tratamento 3:*

O terceiro pré-tratamento testado foi a normalização dos dados por espectrômetro. A taxa de acerto global foi de 93,617% para a mediana por amostra e 96,8085% para a média, quando usamos o espectro todo na tentativa de classificação. Neste caso temos a possibilidade de fazer a análise por espectrômetro, e a tabela 5-12 mostra as taxas de acerto para cada um dos espectrômetros.

Tabela 5.12 - Taxa de acerto global do classificador obtida por meio da validação cruzada em relação à mediana e à média das amostras para cada um dos sete espectrômetros - dados normalizados por espectrômetro. Em destaque os melhores desempenhos.

Intervalos de análise	Taxas de Acerto (%)	
	<i>Mediana</i>	<i>Média</i>
Espectrômetro 1	77,6596	84,0426
Espectrômetro 2	76,5957	74,4681
Espectrômetro 3	76,5957	82,9787
Espectrômetro 4	88,8298	93,0851
Espectrômetro 5	72,3404	83,5106
Espectrômetro 6	77,6596	85,1064
Espectrômetro 7	72,8723	80,3191

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, observamos que como no primeiro caso, os melhores resultados de classificação apareceram nos espectrômetros 4 e 6. Desta maneira, como no caso do HLB, sabendo da importância da normalização dos dados, se optou por trabalhar com as amostras normalizadas pela área de cada espectrômetro, como ocorrido no pré-tratamento 3. Além disso, verificando as baixas diferenças apresentadas em geral, entre as taxas de acerto em relação à média e à mediana, e ainda, sabendo que de acordo com a teoria estatística quando se usa um grande número de amostras a distribuição amostral tende a uma distribuição normal, optou-se então pelo uso da média à mediana.

Na tentativa de diagnóstico somente em relação ao cancro, usando o espectro todo como entrada para a indução de um classificador via PLSR, obtivemos as seguintes matrizes de confusão, que constam na tabela a seguir, para a validação cruzada em 10 *folds* em relação às demais combinações de copa e porta-enxerto em estudo (tabela 5-13).

Tabela 5.13 – Matrizes de confusão das combinações Cravo X Valência e Cravo X Pêra, na tentativa de diagnóstico do Cancro Cítrico.

Matriz de confusão: Cravo X Valência			
Saudável	Cancro Sintomática	Cancro Assintomática	Classificada como
			Classe nominal
86,7%	6,7%	6,7%	Saudável
26,7%	53,3%	20,0%	Cancro Sintomática
25,0%	12,5%	62,5%	Cancro Assintomática
Matriz de confusão: Cravo X Pêra			
Saudável	Cancro Sintomática	Cancro Assintomática	Classificada como
			Classe nominal
86,7%	6,7%	6,7%	Saudável
0	100%	0	Cancro Sintomática
6,7%	13,3%	80,0%	Cancro Assintomática

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, foi possível observar taxas de acerto globais dos classificadores de 78,3% para o caso do conjunto de Valência enxertadas em limoeiro Cravo, e uma taxa de acerto de 93,3% para o segundo caso, da combinação Pêra sobre Cravo. Um resultado bastante promissor em relação ao diagnóstico por meio desta técnica, e que demonstra possibilidades de maior compreensão da doença em relação à variação da composição elementar das folhas quando se comparam árvores saudáveis e árvores doentes.

Foi analisada ainda a capacidade de diferenciação do cancro cítrico e do HLB por meio desta técnica e através dos mesmos tratamentos de dados. Ao considerar apenas folhas sintomáticas das duas doenças e folhas saudáveis para a construção do classificador, as taxas de acerto foram de 97,2% para o conjunto de Abril, da combinação Valência enxertada em Laranja Caipira, e de 97,8% para o conjunto da combinação Pêra enxertada em Cravo.

Ao considerar as cinco classes em estudo para avaliar o classificador, foi obtido uma taxa de acerto global de 98,9%, e a matriz de confusão pode ser vista a seguir (tabela 5-14).

Tabela 5.14 – Matriz de confusão contendo a porcentagem de acerto para cada uma das cinco classes estudadas.

Matriz de confusão: Caipira X Valência					
Saudável	HLB Sintomática	HLB Assintomática	Cancro Sintomática	Cancro Assintomática	Classificada como
					Classe nominal
100%	0	0	0	0	Saudável
2,8%	97,2%	0	0	0	HLB Sintomática
0	0	100%	0	0	HLB Assintomática
2,5%	0	0	97,5%	0	Cancro Sintomática
0	0	0	0	100%	Cancro Assintomática

Fonte: Elaborada pela autora.

Para ilustrar esse resultado, foi feito ainda um teste de PCA em duas e três dimensões usando o *software* MatLab 2012 (figura 5.23).

Figura 5.23 - Análise de componentes principais (PCA) evidenciando a possibilidade de separação entre as diferentes classes das doenças em estudo. O primeiro PCA é apresentado em duas dimensões e o segundo em três.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando os PCAs acima, se nota uma boa separação das classes estudadas. Ocorrem confusões discretas entre as classes HLB-Sintomático e Cancro Sintomático, e Cancro Assintomático e Saudável. O Cancro Assintomático fica em uma classe intermediária entre as Saudáveis e Cancro Sintomáticas, conforme esperado, já que a doença está em fase inicial na

planta, que ainda está visualmente saudável. Já a classe HLB-Sintomática é bem definida, assim como observamos também com os espectros do sistema LIFS.

Dessa maneira, com estes estudos preliminares em relação ao diagnóstico do cancro cítrico podemos notar um grande potencial na técnica como uma forma alternativa de diagnóstico.

6 CONCLUSÃO

Por meio dos estudos desenvolvidos neste trabalho ficou evidente a potencialidade de ambas as técnicas fotônicas no diagnóstico e melhor entendimento do HLB e do cancro cítrico. Através delas, fica fácil perceber a existência de alterações químicas nas folhas e, portanto, nas árvores como um todo ao reagirem contra a presença do patógeno.

Por meio da técnica LIFS foi possível explorar o diagnóstico precoce do HLB usando excitação em 405 nm, anteriormente estudada por Cardinali (2012) e na qual ficou demonstrada sua superioridade no diagnóstico quando comparado com a excitação em 561 nm. Vale lembrar que a excitação neste comprimento de onda permite uma emissão em praticamente toda região do visível, que envolve emissões de metabólitos secundários, grandes responsáveis pelo sistema de defesa das plantas, e também as emissões referentes à clorofila na região do vermelho e infravermelho.

O estudo de precocidade foi longo, com duração de dois anos, para que os resultados dessem melhor confiabilidade ao sistema e ao diagnóstico a ser realizado. Dessa maneira, adotando critérios rígidos para designar uma planta como doente ou saudável, e uma margem de erro para chamar uma planta de suspeita, foi possível verificar a capacidade de diagnóstico do sistema LIFS-405. Com ele, uma das plantas que acabou manifestando os sintomas da doença posteriormente, foi detectada com 21 meses de antecedência ao aparecimento destes. Este resultado contraria o período de latência da doença que se acreditava ser de 6 a 12 meses. Este estudo também apontou as limitações da técnica, já que em diversos meses nenhuma planta foi identificada pelas medidas com o sistema LIFS-405, mesmo tendo sido apontada como doente ou suspeita em meses anteriores. Assim, é preciso muita cautela ao se iniciar as medidas com o equipamento avaliado, já que são necessárias novas análises quanto à época em que este diagnóstico é possível e confiável, e ainda são necessárias avaliações da amostragem necessária para um laudo conclusivo.

Em relação ao cancro cítrico, os sistemas LIFS-405 e LIFS-561 foram avaliados, e ambos apresentaram bons resultados quanto ao diagnóstico, sendo os resultados superiores a 70% em relação às taxas de acerto, chegando a 90%, dependendo da combinação da fruta envolvida na classificação. A grande maioria das confusões na classificação envolveram as classes cancro assintomática e saudável, já que a diferenciação entre estas duas classes é um desafio enorme, pois se trata de uma doença que se desenvolve de maneira local na planta. Ou seja, ao atingir a árvore e encontrar um ambiente favorável, a bactéria começa a se proliferar ali, e pode

demorar um tempo para que o restante da planta altere seu metabolismo e apresente características de uma planta doente, mesmo em fase assintomática.

Ainda em relação ao cancro e à técnica LIFS, foi verificada a diferenciação do HLB e do cancro cítrico, o que foi possível com taxas de acerto superiores a 80%. Para uma confirmação deste resultado novas medidas devem ser efetuadas com um número maior de amostras, e também para diferentes combinações de copa e porta-enxerto de citros. Além disso, outras investigações deste tipo devem ser executadas para avaliar a possibilidade de confusão entre duas ou mais doenças do citros, como as análises realizadas por Cardinali (20) entre HLB e CVC. Confusões entre deficiências nutricionais que causam os mesmos sintomas visuais de doenças como o HLB, também devem ser analisadas cuidadosamente.

A técnica LIBS demonstrou ter grande potencial no diagnóstico do HLB e do cancro cítrico. Taxas de acerto superiores a 80% foram alcançadas no diagnóstico do HLB e taxas superiores a 90% foram alcançadas para o caso do cancro. Vale lembrar que para este último caso o número de amostras investigadas foi reduzido, necessitando novas medidas para confirmação dos resultados. Além do uso do espectro LIBS de forma geral para o diagnóstico, foi possível demonstrar o potencial da técnica para investigações mais aprofundadas em relação à composição elementar das folhas, e associar a sanidade da mesma a tais variações nutricionais. Focando nos elementos que apresentaram maiores variações, e usando tais dados para classificação, foram atingidas taxas de acerto próximas a 80% na validação cruzada dos dados.

O potencial da técnica LIBS para novas investigações em relação a doenças dos citros é indiscutível. Informações quantitativas da composição foliar também podem e devem ser analisadas futuramente através de medidas para calibrar o sistema experimental. Dados como estes são bastante ricos em informações, e podem ajudar nas investigações e confirmações de sintomas visuais, diagnóstico precoce de doenças, ou simplesmente no auxílio ao uso correto e sem desperdício, de nutrientes.

As técnicas acima mencionadas são robustas e pouco complexas no que diz respeito à instrumentação, permitindo o desenvolvimento de equipamentos portáteis para análises em campo, de forma rápida e eficaz, sem a necessidade de árduo e demorado preparo de amostras, e sem a produção de resíduos químicos, o que contribui grandemente para práticas sustentáveis na agricultura, uma extrema preocupação dos dias atuais. A aplicação em larga escala das técnicas poderá, de certa forma, facilitar o produtor no manejo diário, e contribuir para uma tomada de decisão mais rápida, o que pode fazer toda diferença para eliminação das

doenças no pomar. Devido a características tão interessantes como estas, o emprego das técnicas fotônicas podem ainda alcançar outras culturas e ajudar no manejo de outras doenças.

O emprego de novas técnicas fotônicas, tais como Fluorescência Resolvida no Tempo, LIBS com Duplo Pulso, Imagens de Fluorescência, Imagens Hiperespectrais, entre outros, também pode colaborar e corroborar com os estudos desenvolvidos por este trabalho. A fim de aperfeiçoar os resultados obtidos, um estudo sobre diferentes métodos de classificação também podem ser de grande importância, já que diferentes técnicas e diferentes tipos de resultados podem requerer diferentes tratamentos quanto aos métodos de classificação.

Além disso, um estudo de amostragem deve ser conduzido futuramente para que, cada vez com maior credibilidade, se possa fazer o diagnóstico por árvore avaliada. Nessa linha, em relação aos dados do estudo de precocidade com HLB, adotando outros critérios, os resultados obtidos podem ser diferentes, ou seja, o mapa da doença poderá mudar ligeiramente.

Por fim, este estudo abre possibilidades para muitos novos outros, na busca incessante por soluções e facilitações no campo que tragam benefícios e se adequem às necessidades atuais relacionadas à sustentabilidade ambiental.

REFERÊNCIAS

- 1 BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA). 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201402_1.shtm>. Acesso em: 24 março 2014
- 2 AGRONEGÓCIO, o que é?. 2004. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/pagina/o-que-e>>. Acesso em: 2 maio 2014.
- 3 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio. **Balança comercial do agronegócio**: dezembro/2013. Brasília, 2013. 6 p. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/NOTA Dezembro - 2013.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/NOTA%20Dezembro%20-%202013.pdf)>. Acesso em: 2 maio 2014.
- 4 BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. **0609 A** - balanço comercial do agronegócio - 1989 - 2013. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/detalhe.php?c=33482&t=2#this>>. Acesso em: 28 maio 2014.
- 5 NEVES, M.F. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 2010. Disponível em: <http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/Apresentacao_Marcos_Fava_evento_valor.pdf>. Acesso em 30 abr. 2014.
- 6 CENTRO de Agronegócio da Fundação Getúlio Vargas. Disponível em: <<http://gvagro.fgv.br/>>. Acesso em: 28 maio 2014.
- 7 UNITED STATES. Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>>. Acesso em: 28 maio 2014.
- 8 UNITED STATES. Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **Citrus**: world markets and trade: january/2014. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Acesso em: 2 maio 2014.
- 9 PRODUÇÃO mundial de laranjas deve aumentar 5% em 2013/2014. 28 jan. 2014. Disponível em: <<http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2014/01/producao-mundial-de-laranjas-deve-aumentar-5-em-2013-2014-4402452.html>>. Acesso em: 25 mar. 2014.
- 10 BRASIL deve produzir 317 milhões de caixas de citrus na safra 2014/2015. 10 fev. 2014. Disponível em: <<http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2014/02/brasil-deve-produzir-317-milhoes-de-caixas-de-citrus-na-safra-2014-2015-4415581.html>>. Acesso em: 25 mar. 2014.
- 11 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do agronegócio**: Brasil 2012/2013 a 2022/2023. 4. ed. Brasília, 2013. 96 p.
- 12 BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, n. 6, p. 101–111, 1957.

- 13 LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 1, p. 104-115, 2006.
- 14 DO CARMO TEIXEIRA, D.; LUC DANET, J.; EVEILLARD, S.; CRISTINA MARTINS, E.; DE JESUS JUNIOR, W. C.; TAKAO YAMAMOTO, P.; APARECIDO LOPES, S.; BEOZZO BASSANEZI, R.; JULIANO AYRES, A.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” *Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n. 3, p. 173–179, 2005.
- 15 JAGOEIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. PCR detection of the two “*Candidatus*” *Liberobacter* species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, n. 1, p. 43–50, 1996.
- 16 FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). **Levantamentos**. 2013. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos>>. Acesso em: 26 mar. 2014.
- 17 SÃO PAULO (Estado). Defesa Agropecuária. **Greening e cancro**: índice das inspeções do 2º semestre de 2013 em São Paulo. 2014. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/noticias/index.php?action=integra&cod=797>>. Acesso em: 26 mar. 2014.
- 18 FRANK, E.; WANG, Y.; INGLIS, S.; HOLMES, G.; WITTEN, I.H. Using model trees for classification. **Machine Learning**, v. 32, n. 1, p. 63–76, 1998.
- 19 CARDINALI, M. C. B.; VILLAS BOAS, P. R.; MILORI, D. M. B. P.; FERREIRA, E. J.; FRANÇA E SILVA, M.; MACHADO, M. A.; BELLETE, B. S.; DA SILVA, M. F. G. F. Infrared spectroscopy: a potential tool in huanglongbing and citrus variegated chlorosis diagnosis. **Talanta**, v. 91,n. 1, p. 1–6, 2012.
- 20 CARDINALI, M. C. B. **Diagnóstico de Huanglongbing (HLB) em citros utilizando técnicas fotônicas**. 2012. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 21 ZHAO, X.Y. Citrus yellow shoot disease (Huanglongbing) - a review. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1981, Tokyo, Japan. **Proceedings...** Tokyo, Japan: ISC, 1981. p. 466–469. v.1
- 22 GRACA, J. V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 109–136, 1991.
- 23 GARNIER, M.; JAGOEIX-EVEILLARD, S.; CRONJE, P. R.; LE ROUX, H. F.; BOVÉ, J. M. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. proposal of “*Candidatus Liberibacter africanus subsp. capensis*”. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2119–2125, 2000.
- 24 TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J. L.; DA COSTA, P. I.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. “*Candidatus Liberibacter americanus*”, associated with citrus

huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1857–1862, 2005.

25 SANTOS FILHO, H. P.; BARBOSA, F. F. L.; DO NASCIMENTO, A. S. Greening, a mais grave e destrutiva doença dos citros: nova ameaça à citricultura. **Produto em Foco: citrus**. 2009. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/Citros_31.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2014.

26 BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7–37, 2006

27 GOTTWALD, T.; GRAÇA, J. DA; BASSANEZI, R. B. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, p. 1–36, 2007. doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/66180000/Gottwaldetal._2007HLB-Thepathogenanditsimpact.PlantHealthProgress.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2014.

28 HALL, D. G.; RICHARDSON, M. L.; AMMAR, E.; HALBERT, S. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 146, n. 2, p. 207–223, 2013.

29 WENNINGER, E. J.; HALL, D. G. Daily and seasonal patterns in abdominal color in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, n. 3, p. 585–592, 2008.

30 BONANI, J. P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M. P.; APPEZZATO-DAGLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, n. 1, p. 35–49, 2010.

31 WARNERT, J. E. New resource for growers and homeowners waging Asian citrus psyllid battle. **ANR News Releases**. 2014. Disponível em: <<http://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=11209>>. Acesso em: 28 maio 2014.

32 BRLANSKY, R. H.; ROGERS, M. E. Citrus huanglongbing: understanding the vector-pathogen interaction for disease management. 2007. doi: 10.1094/APSnetFeature-2007-1207.

33 FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). **Doenças e pragas: greening**. 2014. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening/10>>. Acesso em: 27 mar 2014.

34 COLETTA FILHO, H. D.; CARLOS, E. F. Ferramentas para diagnóstico de huanglongbing e detecção de agentes associados: dos sintomas aos ensaios de laboratório. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 2, p. 129–143, 2010.

35 WATER MATTERS BLOG. Southwest Florida water management district. Disponível em: <<http://www.swfwmd.state.fl.us/blog/index.php?pagenum=9>>. Acesso em: 28 maio 2014.

- 36 GOTTWALD, T.R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 119–139, 2010.
- 37 CHIYAKA, C.; SINGER, B.H.; HALBERT, S. E.; MORRIS, J G.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Modeling huanglongbing transmission within a citrus tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 30, p. 12213–12218, 2012.
- 38 PEREIRA, F.M.V.; MILORI, D.M.B.P.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. DE S. T.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ASTÚA, J. Evaluation of the effects of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on inoculated citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics tools. **Talanta**, v. 83, n. 2, p. 351–356, 2010.
- 39 PEREIRA, F.M.V.; MILORI, D.M.B.P.; PEREIRA-FILHO, E. R.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. DE S. T.; CARDINALI, M. C. DO B.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ASTÚA, J. Laser-induced fluorescence imaging method to monitor citrus greening disease. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 79, n. 1, p. 90–93, 2011.
- 40 PEREIRA, F.M.V.; MILORI, D.M.B.P.; PEREIRA-FILHO, E. R.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. DE S. T.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ASTÚA, J. Fluorescence images combined to statistic test for fingerprinting of citrus plants after bacterial infection. **Analytical Methods**, v. 3, n. 3, p. 552, 2011.
- 41 DAS, A. K. Citrus canker - a review. **Journal of Applied Horticulture.**, v. 5, n. 1, p. 52–60, 2003.
- 42 GOTTWALD, T.R. Citrus canker. **The Plant Health Instructor**, 2000. doi: 10.1094/PHI-I-2000-1002-01 00.
- 43 FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). **Cancro cítrico**: manual técnico. 2008. 12 p. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/greening/lnk_cancro_ctr/downloads/cancro-citrico.pdf>. Acesso em: 20 maio 2014.
- 44 GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; SCHUBERT, T. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, 2002. doi: 10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.
- 45 GOTTWALD, T.R.; MCGUIRE, R.G.; GARRAN, S. Asiatic citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, v. 78, n. 6, p. 739–745, 1988.
- 46 GOTTWALD, T.; TIMMER, L. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Tropical Agriculture**, v. 72, n. 3, p. 194–201, 1995.
- 47 GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2004.

48 FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). Doenças e pragas: cancro cítrico. 2014. Disponível em: < <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7> >. Acesso em: 02 abr. 2014.

49 FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS) Incidência de cancro cítrico aumenta 39% no estado de São Paulo. 07 Dez 2012. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/incidencia-de-cancro-citrico-aumenta-39-no-estado-de-sao-paulo/13>>. Acesso em: 12 maio 2014.

50 SOARES, A.M. S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica - ciencias agrárias e biológicas**, v. 1, n. 1, p. 9–19, 2007.

51 PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 26 p. Disponível em: <<http://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf?PHPSESSID=e32d8df36f08f86ef80010a253f33762>>. Acesso em: 20 maio 2014.

52 ROHÁČEK, K.; SOUKUPOVÁ, J.; BARTÁK, M. Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress. In: SCHOEFS, B. (Ed.). **Plant cell compartments - selected topics**. Kerala, India: Research Signpost, 2008. cap. 3. p. 41–104.

53 HSIAO, T.C. Plant responses to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 24, p. 519–570, 1973.

54 BUSCHMANN, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. **Photosynthesis Research**, v. 92, n. 2, p. 261–71, 2007.

55 ZAGHI, A. F. **Diagnóstico de doenças de citros utilizando espectroscopia de fluorescência**. 2008. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

56 ACHOR, D.S.; ETXEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S.Y.; CHUNG, K.R.; ALBRIGO, L.G. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. **Plant Pathology Journal**, v. 9, n. 2, p. 56–64, 2010.

57 FAN, J.; CHEN, C.; BRLANSKY, R. H.; GMITTER JR., F. G.; LI, Z.G. Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with “*Candidatus liberibacter asiaticus*.” **Plant Pathology**, v. 59, n. 6, p. 1037–1043, 2010.

58 RIBEIRO, A.B.; ABDELNUR, P.V.; GARCIA, C. F.; BELINI, A.; SEVERINO, V. G. P.; DA SILVA, M. F. DAS G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DE CARVALHO, S. A.; DE SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. Chemical characterization of *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* and the effect of some isolated compounds on the growth of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7815–7822, 2008.

59 LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. Baltimore, USA: Springer Science+Business Media, LLC, 2006. 954 p.

- 60 MILORI, D.M.B.P.; MARTIN-NETO, L.; GALETI, H. V. A.; PÉREZ, M. G.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; SALTON, J. Índice de humificação obtido através da fluorescência induzida por laser. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 7, 2004. 17 p. Disponível em: < http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPDIA/10445/1/BPD07_2004.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2014.
- 61 TIVET, F.; MORAES SÁ, J.C. DE; LAL, R.; MILORI, D. M. B. P.; BRIEDIS, C.; LETOURMY, P.; PINHEIRO, L. A.; BORSZOWSKI, P. R.; DA CRUZ HARTMAN, D. Assessing humification and organic C compounds by laser-induced fluorescence and FTIR spectroscopies under conventional and no-till management in Brazilian Oxisols. **Geoderma**, v. 207-208, n. 1, p. 71–81, 2013.
- 62 MILORI, D.M.B.P.; GALETI, H.V.A.; MARTIN-NETO, L.; DIECKOW, J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; BAYER, C.; SALTON, J. Organic matter study of whole soil samples using laser-induced fluorescence spectroscopy. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, n. 1, p. 57-63, 2006.
- 63 LICHTENTHALER, H.K.; MIEHE, J.A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 8, p. 316–320, 1997.
- 64 MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.
- 65 MILORI, D.M.B.P.; RAYNAUD, M.; VILLAS-BOAS, P. R.; VENÂNCIO, A. L.; MOUNIER, S.; BASSANEZI, R. B.; REDON, R. Identification of citrus varieties using laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS). **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 95, p. 11–18, 2013.
- 66 VENÂNCIO, A. L. **Avaliação da precocidade do diagnóstico do greening por técnicas de fluorescência**. 2010. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- 67 KANCHEVA, R. H., BORISOVA, D. S., ILIEV, I. T. Chlorophyll fluorescence as a plant stress indicator. In: PROCEEDINGS OF THE NATIONAL CONFERENCE, 5., 2008, Moscow. **Proceedings...** Moscow: Azbuka-2000 LTd., 2008, v. 5, p. 301–306.
- 68 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Debora Marcondes Bastos Pereira Milori et al. **Method, apparatus and system for diagnosis of stresses and diseases in higher plants**. US 2012/0123681 A1, 17 may 2012.
- 69 TERÊNCIO, J. C. C. **Deteção precoce da morte súbita dos citros usando fluorescência**. 2006. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006
- 70 TERÊNCIO, J.C.C.; MILORI, D.M.B.P.; JORGE, L. A. C.; MARTIN NETO, L. . Diagnóstico da morte súbita dos citros (MSC) utilizando fluorescência das folhas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 15, 2006. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/31587/1/BPD152006.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

- 71 MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V.; SCHECHTER, I. **Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): fundamental and applications**. New York: Cambridge University Press, 2006. 640 p.
- 72 KRAMIDA, A.; RALCHENKO, Y.; READER, J.; NIST ASD Team. **National Institute of Standards and Technology (NIST) Atomic Spectra Database (ver. 5.1)**. 2013. Disponível em: < http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html >. Acesso em: 06 maio 2014.
- 73 SMITH, P. L.; HEISE, C.; ESMOND, J. R.; KURUCZ, R. L. **Atomic spectral line database**: built from atomic data files from R.L.Kurucz'cd-rom 23. 2003. Disponível em: <<http://www.pmp.uni-hannover.de/cgi-bin/ssi/test/kurucz/sekur.html>>. Acesso em: 08 mar. 2014.
- 74 POUZAR, M., ČERNOHORSKÝ, T., PRŮŠOVÁ, M., PROKOPČÁKOVÁ, P., KREJČOVÁ, A. LIBS analysis of crop plants. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 7, p. 953, 2009.
- 75 PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P. Investigation of the stages of citrus greening disease using micro synchrotron radiation X-ray fluorescence in association with chemometric tools. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 3, p. 351-355, 2010.
- 76 CREMERS, D. A.; RADZIEMSKI, L. J. **Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2013. 407 p.
- 77 ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Físico-Química**. 9 ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 2004. v. 2. 459 p.
- 78 ELECTRONIC spectroscopy: theory. UC Davis Chemwiki. Disponível em: <http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy%3A_Theory>. Acesso em: 27 maio 2014.
- 79 ROHDEN, A. Colorimetria: transformando teoria em resultados - parte 1. **Flexo magazine**. Disponível em: <<http://flexomagazine.blogspot.com.br/2010/09/colorimetria-transformando-teoria-em.html>>. Acesso em: 28 maio 2014.
- 80 MARTINEZ, M. Clorofila. **InfoEscola**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/plantas/clorofila>>. Acesso em: 28 maio 2014.
- 81 KNIGHT, A. K.; SCHERBARTH, N. L.; CREMERS, D. A.; FERRIS, M. J. Characterization of laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for application to space exploration. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 3, p. 331-340, 2000.
- 82 SALLÉ, B.; LACOUR, J. L.; VORS, E.; FICHET, P.; MAURICE, S.; CREMERS, D. A.; WIENS, R. C. Laser-induced breakdown spectroscopy for Mars surface analysis: capabilities at stand-off distances and detection of chlorine and sulfur elements. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, v. 59, n. 9, p. 1413-1422, 2004.

- 83 ARP, Z.A.; CREMERS, D.A.; WIENS, R. C.; WAYNE, D. M.; SALLÉ, B.; MAURICE, S. Analysis of water ice and water ice/soil mixtures using laser-induced breakdown spectroscopy: application to Mars polar exploration. **Applied Spectroscopy**, v. 58, n. 8, p. 897–909, 2004.
- 84 SINGH, J. P.; THAKUR, S. N. **Laser induced breakdown spectroscopy**. Amsterdam: Elsevier, 2007. 427 p.
- 85 MOLL, M.; SCHLANGES, M.; BORNATH, T.; KRAINOV, V. P. Inverse bremsstrahlung heating beyond the first Born approximation for dense plasmas in laser fields. **New Journal of Physics**, v. 14, n. 6, p. 065010, 2012.
- 86 CRISTOFORETTI, G.; LEGNAIOLI, S.; PALLESCHI, V.; TOGNONI, E.; BENEDETTI, P. A. Observation of different mass removal regimes during the laser ablation of an aluminium target in air. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 23, n. 11, p. 1518-1528, 2008.
- 87 TOGNONI, E.; CRISTOFORETTI, G. Basic mechanisms of signal enhancement in ns double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy in gas environment. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 2014. doi: 10.1039/c4ja00033a. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2014/ja/c4ja00033a>>. Acesso em: 10 jun. 2014.
- 88 HERRERA, K. K.; TOGNONI, E.; GORNUSHKIN, I. B.; OMENETTO, N.; SMITH, B. W.; WINEFORDNER, J. D. Comparative study of two standard-free approaches in laser-induced breakdown spectroscopy as applied to the quantitative analysis of aluminum alloy standards under vacuum conditions. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 4, p. 426, 2009.
- 89 FERREIRA, E. C.; MILORI, D. M. B. P.; FERREIRA, E. J.; DOS SANTOS, L. M.; MARTIN-NETO, L.; NOGUEIRA, A. R. de A. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for multielemental determination in soils under sewage sludge application. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 435–40, 2011.
- 90 MILORI, D. M. B. P.; SEGNINI, A.; DA SILVA, W. T. L.; POSADAS, A.; MARES, V.; QUIROZ, R.; MARTIN-NETO, L. **Emerging techniques for soil carbon measurements**. 2011. Disponível em: <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/10279/ccafs-wp-02-soil_carbon_measurement.pdf?sequence=5>. Acesso em: 20 maio 2014.
- 91 LI, X.; ZHOU, W.; LI, K.; QIAN, H.; REN, Z. Laser ablation fast pulse discharge plasma spectroscopy analysis of Pb, Mg and Sn in soil. **Optics Communications**, v. 285, n. 1, p. 54–58, 2012.
- 92 SAMEK, O.; LAMBERT, J.; HERGENRÖDER, R.; LIŠKA, M.; KAISER, J.; NOVOTNÝ, K.; KUKHLEVSKY, S. Femtosecond laser spectrochemical analysis of plant samples. **Laser Physics Letters**, v. 3, n. 1, p. 21–25, 2006.
- 93 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.

- 94 SANTOS, D.; NUNES, L. C.; DE CARVALHO, G. G. A.; GOMES, M. da S.; DE SOUZA, P. F.; LEME, F. de O.; DOS SANTOS, L. G. C.; KRUG, F. J. Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: a review. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, v. 71-72, p. 3–13, 2012.
- 95 MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321–4325, 1980.
- 96 COLETTA-FILHO, H. D., CARLOS, E. F., ALVES, K. C. S., PEREIRA, M. A. R., BOSCARIOL-CAMARGO, R. L., SOUZA, A. A. de, MACHADO, M. A. In planta multiplication and graft transmission of “Candidatus Liberibacter asiaticus” revealed by Real-Time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, n. 1, p. 53–60, 2009.
- 97 JUHA, T. Optics research: applied optics. **Tampere University of Technology**. Disponível em: <http://www.tut.fi/en/about-tut/departments/physics/research/optics/research-projects/applied-optics/index.htm>. Acesso em: 28 maio 2014.
- 98 TOGNONI, E.; CRISTOFORETTI, G.; LEGNAIOLI, S.; PALLESCHI, V. Calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy: state of the art. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, v. 65, n. 1, p. 1–14, 2010.
- 99 WITTEN, I.H.; FRANK, E. **Data Mining: practical machine learning tools and techniques**. 2nd ed. San Francisco: Morgan Kaufmann Publishers, 2005. 483 p.
- 100 PEDRÓS, R.; MOYA, I.; GOULAS, Y.; JACQUEMOUD, S. Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. **Photochemical & Photobiological Sciences: official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 7, n. 4, p. 498–502, 2008.
- 101 BUSCHMANN, C.; LICHTENTHALER, H.K. Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 152, n. 2-3, p. 297–314, 1998.
- 102 AUSTINPRICE2012. Light absorption in chloroplast. Disponível em: <http://www.glogster.com/austinprice2012/light-absorption-in-chloroplast/g-6ksfuqsdki8i206c2tmc1a0>. Acesso em: 28 maio 2014.
- 103 PAPAGEORGIOU, G. Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. In: GOVINDJEE (Ed.). **Bioenergetics of Photosynthesis**. London: Academic Press, Inc., 1975. p. 52-115.
- 104 GOVINDJEE; GOVINDJEE, R. Introduction to photosynthesis. In: GOVINDJEE (Ed.). **Bioenergetics of Photosynthesis**. London: Academic Press, Inc., 1975. p. 1-50
- 105 MARCASSA, L. G.; GASPAROTO, M. C. G.; BELASQUE, 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.

- 106 BELASQUE, 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.
- 107 COSTA, C. C. da; GUILHOTO, J. J. M. Impactos econômicos do sistema de detecção e eliminação precoce de citros com huanglogbing. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 9, n. 3, p. 347–368, 2012.
- 108 AGATI, G. Response of the in vivo chlorophyll fluorescence spectrum to environmental factors and laser excitation wavelength. **Pure and Applied Optics: journal of the european optical society part a**, v. 7, n. 4, p. 797–807, 1998.
- 109 WANG, Z.; LI, L.; WEST, L.; LI, Z.; NI, W. A spectrum standardization approach for laser-induced breakdown spectroscopy measurements. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, v. 68, p. 58–64, 2012.
- 110 RODRIGUES, F. D. Á.; OLIVEIRA, L. A. DE; KORNDÖRFER, A. P.; KORNDÖRFER, G. H. Silício: um elemento benéfico e importante para as plantas. **Informações Agronômicas**, v. 134, p. 14–20, 2011.
- 111 RUTEC: technical manual. The plant nutrients. 14 p. Disponível em: <<http://www.rutec.com/main.html>>. Acesso em: 27 maio 2014.
- 112 ZEKRI, M.; OBREZA, T.A. Plant nutrients for citrus trees. **University of Florida - IFAS Extension**. p. 1–5, 2012. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/SS/SS41900.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2014.
- 113 HOWE, G. A; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 41–66, 2008.
- 114 AHMAD, K.; SIJAM, K.; HASHIM, H.; ROSLI, Z.; ABDU, A. Field assessment of calcium, copper and zinc ions on plant recovery and disease severity following infection of Huanglongbing (HLB) disease. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 28, p. 4967–4979, 2011.
- 115 ZEKRI, M.; OBREZA, T.A. Macronutrient deficiencies in citrus: calcium, magnesium and sulfur. **University of Florida - IFAS Extension**. 2012. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/SS/SS42100.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2014.
- 116 ZEKRI, M.; OBREZA, T.A. Micronutrient deficiencies in citrus: boron, copper, and molybdenum. **University of Florida - IFAS Extension**. 2012. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/SS/SS42200.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2014
- 117 BALAKHNINA, T.; BORKOWSKA, A. Effects of silicon on plant resistance to environmental stresses: review. **International Agrophysics**, v. 27, n. 2, p. 225–232, 2013.
- 118 MATICHENKOV, V.; CALVERT, D.; SNYDER, G. Silicon fertilizers for citrus in Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 112, p. 5–8, 1999. Disponível em: <<http://empaeg.com/UserFiles/File45661.pdf>>. Acesso em 20 maio 2014.

- 119 ZEKRI, M.; OBREZA, T.A. Micronutrient deficiencies in citrus: iron, zinc, and manganese. **University of Florida - IFAS Extension**. 2012. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/SS/SS42300.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2014.
- 120 MOSSOR-PIETRASZEWSKA, T. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 3, p. 673–686, 2001.
- 121 SHEN, W.; CEVALLOS-CEVALLOS, J.M.; NUNES DA ROCHA, U.; AREVALO, H. A.; STANSLY, P. A.; ROBERTS, P. D.; BRUGGEN, A. H. C. Relation between plant nutrition, hormones, insecticide applications, bacterial endophytes, and Candidatus Liberibacter Ct values in citrus trees infected with Huanglongbing. **European Journal of Plant Pathology**, v. 137, n. 4, p. 727–742, 2013.