

ANDRÉ LEONARDO VENÂNCIO

# **Avaliação da precocidade do diagnóstico do greening por técnicas de fluorescência**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Filosofia, Ciências e  
Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências

Área de Concentração: Física  
Aplicada à Medicina e Biologia

Orientadora: Dra. Débora  
Marcondes Bastos Pereira Milori

Ribeirão Preto  
2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Nome: VENÂNCIO, André Leonardo

Título: **Avaliação da precocidade do diagnóstico do greening por técnicas de fluorescência**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Este trabalho é um andar adicional do edifício de minha vida. Sua construção só se tornou possível graças aos firmes alicerces construídos há muito tempo. Dedico-o, portanto, aos meus queridos pais, Valmir e Leny, que lançaram esses alicerces e continuam contribuindo para aprimorar a firmeza e a beleza do edifício.

## **Agradecimentos**

À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq pelo financiamento dos experimentos realizados.

Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC pela frutífera parceria nesta pesquisa. Em especial, à Juliana Freitas-Astúa e à Polyana Martins por seu papel fundamental para o sucesso da pesquisa e pela disposição a compartilhar seus conhecimentos.

Aos colaboradores que atuam diretamente na produção citrícola, com destaque para Helton de Leão e Carolina Bussola, da Citrosuco, pelo fornecimento de amostras e pelo muito que nos ensinaram. E também para José Bellotte, gerente do grupo Louis Dreyfus Commodities, por tudo isso e por ter nos levado a ver de perto a realidade de uma fazenda em luta contra o greening.

Ao PPG-FAMB pelas muitas oportunidades oferecidas para o crescimento acadêmico e pessoal. Em especial, aos professores Alexandre Martinez, Marcelo Mulato e Adelaide de Almeida, bem como à secretária Nilza Marino, por terem me ajudado tão pacientemente sempre que precisei deles.

Aos colegas alunos e ex-alunos do PPG-FAMB, sobretudo a Leandro Rizzi, Jacyana Fonseca e Felipe Benette Marques, velho amigo, por terem me prestado auxílio quando tive necessidade.

Aos estudantes que gentilmente me hospedaram em Ribeirão Preto: Leandro, Anderson e Murilo, que dividiram comigo seu quarto. E ao rev. Ubiratan e sua esposa Eliane, pelo inesquecível gesto de hospitalidade em favor de um completo desconhecido.

À Embrapa Instrumentação Agropecuária pelas instalações, pelo ambiente de trabalho estimulante e caloroso e pelo muito que aprendi ali desde meu ingresso como estagiário. Em especial aos funcionários Ednaldo Ferreira, Mariana Carneiro, Sandra Gouvêa e Valentim Monzane pelos diversos auxílios prestados em momentos de necessidade.

Aos estagiários, pós-graduandos e pós-doutorandos que labutam ou labutaram comigo no Laboratório de Óptica e Lasers da Embrapa Instrumentação Agropecuária: Ana Flávia, Cleber, Robson, Edilene, Daniel Souza, Gabriel, Ingrid, Fabíola, Marcelo, Camila, Carlos, Mariana, Marina e Thaís. Pela amizade de cada um e pelos indispensáveis e incontáveis auxílios, pequenos ou grandes.

À Débora, orientadora e amiga, por tudo o que me ensinou, por todo o cuidado e paciência demonstrados e pelo ânimo incansável com que sempre nos conduziu, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha família: pais, avós, irmão, cunhada, tios e primos, pelo incentivo e pelas orações.

À Norma, minha noiva, fiel companheira neste empreendimento, como em todos os outros de minha vida.

Ao Deus Trino, Autor de toda vida, humana ou cítrica.

*“Com medidas de prudência farás a guerra;  
na multidão de conselheiros está a vitória.”*

Provérbios 24.6

## Resumo

Os citros são as plantas economicamente mais importantes da fruticultura mundial. O Brasil responde por cerca de 30% da produção do planeta, e o Estado de São Paulo produz cerca de 80% dos citros do país. A pior ameaça atual a esse mercado é a doença bacteriana conhecida como greening ou huanglongbing (HLB), pela severidade dos sintomas, por afetar todas as variedades de citros e pela rapidez com que se espalha pelos pomares, transmitida pelo inseto psilídeo *Diaphorina citri*. O greening torna os frutos inúteis para consumo e leva à morte da planta. Não existe cura para a doença, de modo que o principal método de controle de infestação é a combinação das pulverizações, para reduzir a população do inseto vetor, com a erradicação das plantas doentes. Este último procedimento é efetuado porque a planta doente funciona como foco de propagação para o restante do pomar. Por isso, é importante identificar e erradicar a planta doente o mais cedo possível. Hoje, a identificação das plantas doentes é feita por inspeção visual. Esse método é muito pouco eficaz, pois, na ausência de frutos, os sintomas nas folhas não se manifestam de maneira uniforme em toda a planta e podem ser bastante sutis, sendo até confundidos com outras doenças. Além disso, as plantas inoculadas permanecem cerca de um ano sem manifestar sintoma algum. Por isso, a inspeção visual tipicamente identifica apenas cerca de 27% das plantas infectadas. O método de diagnóstico mais preciso disponível atualmente é a reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR). Entretanto, essa técnica é trabalhosa e dispendiosa, o que torna impossível seu uso para o diagnóstico de grandes quantidades de plantas. Este trabalho propõe uma metodologia de diagnóstico baseada na obtenção de espectros de fluorescência induzida por laser (LIFS) das folhas e na aplicação de redes neurais artificiais para distinguir plantas saudáveis e doentes. Um experimento realizado no campo com pés de laranja Pêra-rio enxertada em limoeiro Cravo demonstrou que plantas sintomáticas podem ser diagnosticadas com eficiência de 87%. Um experimento controlado usando mudas de laranja Valência em citrumeleiro Swingle atestou que a técnica proposta também é capaz de diagnosticar plantas assintomáticas, obtendo taxas de acerto de até 63%. Da comparação dos resultados com os obtidos por RT-PCR constatou-se que a técnica aqui proposta apresenta taxa de acerto até duas vezes maior nos estágios iniciais do desenvolvimento da doença, até dois meses antes do aparecimento dos sintomas. Foram feitos também estudos preliminares da viabilidade do uso das técnicas de imagens de fluorescência induzida por laser (LIFI) e espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) para o diagnóstico precoce do greening. Os resultados foram bons

em ambos os casos: na fase assintomática da doença, LIFI obteve sempre mais de 68% de acerto, e LIBS obteve mais de 62% em todos os casos. Todas as técnicas forneceram, portanto, resultados muito melhores que os da inspeção visual, e todas são mais viáveis que o RT-PCR, tanto pela rapidez quanto pelo custo envolvido.



## **Abstract**

Citrus plants are the most economically important fruit worldwide. Brazil accounts for about 30% of the planet's production, and the State of Sao Paulo produces 80% of citrus in the country. Nowadays, the worst threat to this market is the bacterial disease known as greening or huanglongbing (HLB), because it causes severe symptoms, affects all citrus varieties, and spreads very quickly through the orchards, being transmitted by the insect *Diaphorina citri*. The greening-affected fruits are useless and the plant dies. There is no healing for this disease, so the main method for infestation control is pulverization, to reduce the population of the vector insect, combined with eradication of diseased plants. The last procedure is done because the diseased plant acts as a focus, spreading HLB to the healthy trees around. Therefore, it is important to identify and eradicate the diseased plant as soon as possible. The identification of diseased plants is done currently by visual inspection. This method is very inefficient, because, in the absence of fruits, the leaf's symptoms do not appear uniformly throughout the plant and when appear they can be quite subtle, and even they can be mistaken for other diseases. Moreover, inoculated plants do not show any symptoms for about a year. This is why visual inspection typically identifies only about 27% of infected plants. At present, the most accurate method of diagnosis available is real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). However, this technique is laborious and costly, making impossible to use it for large scale diagnosis. This study proposes a new diagnostic methodology carried out in the leaves, without any preparation, based on laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) and artificial neural networks to distinguish diseased plants from healthy ones. A field experiment using Pêra-rio orange grafted on Cravo lemon plants has shown that symptomatic trees can be diagnosed with an efficiency of 87%. A controlled experiment using Valência orange on Swingle citrumelo trees testified that the proposed technique is also able to diagnose asymptomatic plants, achieving accuracy rates up to 63%. Comparison with results obtained by RT-PCR revealed that the technique proposed here achieves accuracy rates up to twice as high in the early stages of disease development, until two months before the onset of symptoms. Preliminary studies about the feasibility of laser-induced fluorescence imaging (LIFI) and laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for greening early diagnosis were also performed. Results were good in both cases: in the asymptomatic stage of the disease, LIFI always got more than 68% accuracy, and LIBS obtained more than 62% in all cases. All

the techniques have provided thus far better results than those from visual inspection, and they all are more applicable than RT-PCR, because of quickness and low cost of analysis.

## Lista de figuras

- Figura 1.1.** Frutos de plantas com greening. Em (a), vê-se a aparência externa do fruto; em (b), a seção transversal; e, em (c), uma semente abortada. Fonte: FUNDECITRUS, 2009. ... 18
- Figura 1.2.** Folhas de laranjeiras com sintomas de greening (a) e deficiências de zinco (b), manganês (c) e magnésio (d) [FUNDECITRUS, 2009]. ..... 20
- Figura 1.3.** Trator com plataforma, usado na inspeção do greening [JORNAL DA CIDADE DE HOLAMBRA, 2009]. ..... 21
- Figura 2.1.** O inseto psilídeo *Diaphorina citri*, único transmissor do greening no Brasil. ... 26
- Figura 2.2.** Diagrama de energia mostrando alguns processos de transferência de energia que envolvem transições eletrônicas. Os conjuntos de linhas pretas horizontais representam estados de energia do elétron; os conjuntos inferior, intermediário e superior representam o estado fundamental (singleto), o primeiro estado excitado tripleto e o primeiro estado excitado singleto, respectivamente. As diferentes linhas em cada conjunto não correspondem a diferentes níveis de energia do elétron, mas sim da molécula, sob a forma de energia vibracional. As setas correspondem às transições eletrônicas, sendo a cor vermelha usada para transições que emitem fótons, enquanto a cor verde indica decaimentos não-radioativos. Os processos radioativos incluem: (a) a emissão de fluorescência; (b) a excitação do elétron, mediante a absorção de um fóton; e (c) a emissão de fosforescência, com a inversão de spin do elétron. Os processos de decaimento não-radioativo são: (d) retorno ao estado fundamental, mediante transferência de energia do elétron à molécula; (e) passagem do elétron do estado singleto para o estado tripleto, ocasionando inversão de spin; e (f) retorno ao estado fundamental (singleto) a partir do estado tripleto, mediante transferência de energia do elétron à molécula. .... 30
- Figura 2.3.** Representação de cores no sistema RGB. A cor preta está na origem, e a escala de cinza se encontra no segmento de reta que liga a origem ao vértice oposto (1,1,1), onde se situa a cor branca. As cores primárias puras se encontram nos vértices que estão sobre os respectivos eixos. Os vértices restantes contêm as combinações das três cores primárias, tomadas duas a duas. Fonte: <<http://www.ic.uff.br/~aconci/RGBparaHSV.html>>. .... 34
- Figura 2.4.** Representação de cores no sistema HSV. Fonte: <<http://www.ic.uff.br/~aconci/RGBparaHSV.html>>. .... 35
- Figura 2.5.** Representação de cores no sistema HSV. Fonte: <<https://csel.cs.colorado.edu/~csci4576/SciVis/SciVisColor.html>>. .... 35
- Figura 2.6.** Esquema de um neurônio artificial e seu funcionamento, mostrando como ele produz um valor de saída a partir dos valores de entrada e dos coeficientes ou “pesos”. ..... 41
- Figura 2.7.** Esquema de uma rede neural artificial. Os retângulos representam as variáveis de entrada, e os círculos representam os neurônios. .... 42
- Figura 4.1.** Esquema do equipamento, incluindo a estrutura interna do miniespectrômetro e a seção transversal do cabo de fibras ópticas. .... 51

<b>Figura 4.2.</b> Imagem do equipamento usado para realização das medidas de LIFS. ....	51
<b>Figura 4.3.</b> Imagem do instante da medida, mostrando a região da folha escolhida para a coleta. ....	52
<b>Figura 4.4.</b> À esquerda está a montagem do equipamento de aquisição de imagens. A fonte laser está posicionada no canto esquerdo, e é possível ver a câmera fotográfica. A caixa no canto direito contém a amostra. À direita está um esquema que ilustra o funcionamento do sistema de aquisição de dados. ....	53
<b>Figura 4.5.</b> Imagem do equipamento LIBS. À esquerda estão os espectrômetros; no centro, a câmara de ablação; à direita, a fonte do laser de Nd:YAG. ....	54
<b>Figura 4.6.</b> Imagem da nervura central de uma folha, mostrando as pequenas incisões feitas pelas medidas de LIBS. ....	55
<b>Figura 4.7.</b> Intensidade da linha de base em 600nm e em 900nm. ....	58
<b>Figura 4.8.</b> Espectro típico de LIFS, indicando a posição e o valor dos comprimentos de onda utilizados para a composição dos descritores. O valor de $D_9$ foi usado para correção da linha de base e, portanto, tem valor nulo em todos os espectros. ....	59
<b>Figura 5.1.</b> Espectros típicos do conjunto de amostras de copa Pêra-rio e porta-enxerto Cravo. ....	65
<b>Figura 5.2.</b> Gráfico de PCA do conjunto de amostras de copa Pêra-rio e porta-enxerto Cravo. ....	66
<b>Figura 5.3.</b> Espectros típicos do conjunto de amostras de copa Valência e porta-enxerto Swingle. ....	68
<b>Figura 5.4.</b> Gráfico de PCA do conjunto de amostras de copa Valência e porta-enxerto Swingle. ....	68
<b>Figura 5.5.</b> Espectros típicos do conjunto de amostras da nona semana do experimento de diagnóstico precoce. ....	72
<b>Figura 5.6.</b> Gráfico de PCA do conjunto de amostras da nona semana do experimento de diagnóstico precoce. ....	73
<b>Figura 5.7.</b> Espectros típicos do conjunto de amostras da trigésima primeira semana do experimento de diagnóstico precoce. ....	73
<b>Figura 5.8.</b> Gráfico de PCA do conjunto de amostras da trigésima primeira semana do experimento de diagnóstico precoce. ....	74
<b>Figura 5.9.</b> Folhas de laranjeira com sintomas de greening (a) e de deficiência de zinco (b). Fonte: FUNDECITRUS, 2009. ....	77

<b>Figura 5.10.</b> Mudas sadias durante o quinto mês do experimento. ....	77
<b>Figura 5.11.</b> Mudas com greening durante o quinto mês do experimento. ....	78
<b>Figura 5.12.</b> Imagens de fluorescência induzida por laser obtidas durante o experimento de diagnóstico precoce. Estão representadas imagens típicas do primeiro mês e do sétimo mês, tanto sadias quanto doentes. ....	83
<b>Figura 5.13.</b> Exemplos de colorgramas, extraídos do sétimo lote. ....	84
<b>Figura 5.14.</b> Gráfico de PCA dos dados de LIFI da terceira semana. ....	85
<b>Figura 5.15.</b> Gráfico de PCA dos dados de LIFI da sétima semana. ....	85
<b>Figura 5.16.</b> Gráfico de PCA dos dados de LIFI da décima nona semana. ....	86
<b>Figura 5.17.</b> Espectros de excitação e emissão das clorofilas a e b. Fonte: PRICE, 2010. ...	87
<b>Figura 5.18.</b> Alguns espectros de LIBS da vigésima semana, com os prováveis elementos responsáveis por cada pico. ....	90
<b>Figura 5.19.</b> Gráfico de PCA feito a partir dos dados de LIBS da quarta semana. ....	91
<b>Figura 5.20.</b> Gráfico de PCA feito a partir dos dados de LIBS da vigésima semana. ....	91

## Lista de tabelas

- Tabela 4.1.** Identificação dos grupos de plantas utilizadas no experimento de avaliação da precocidade do diagnóstico. .... 48
- Tabela 4.2.** Datas da inoculação e das medidas para cada um dos quatro conjuntos do experimento de diagnóstico precoce. .... 49
- Tabela 4.3.** Descritores utilizados na análise dos dados de LIFS. .... 58
- Tabela 4.4.** Parâmetros ótimos das redes neurais construídas para cada lote do experimento de diagnóstico precoce usando LIFS. .... 61
- Tabela 5.1.** Matriz de confusão do conjunto de amostras de copa Pêra-rio e porta-enxerto Cravo, divididas em três classes. O estado real das amostras é dado nas linhas, enquanto o diagnóstico fornecido pela ANN aparece nas colunas. As classificações corretas estão em negrito. .... 66
- Tabela 5.2.** Matriz de confusão do conjunto de amostras de copa Pêra-rio e porta-enxerto Cravo, divididas em duas classes. O estado real das amostras é dado nas linhas, enquanto o diagnóstico fornecido pela ANN aparece nas colunas. As classificações corretas estão em negrito. .... 67
- Tabela 5.3.** Matriz de confusão do conjunto de amostras de copa Valência e porta-enxerto Swingle, divididas em três classes. O estado real das amostras é dado nas linhas, enquanto o diagnóstico fornecido pela ANN aparece nas colunas. As classificações corretas estão em negrito. .... 69
- Tabela 5.4.** Matriz de confusão do conjunto de amostras de copa Valência e porta-enxerto Swingle, divididas em duas classes. O estado real das amostras é dado nas linhas, enquanto o diagnóstico fornecido pela ANN aparece nas colunas. As classificações corretas estão em negrito. .... 69
- Tabela 5.5.** Taxas de acerto obtidas pelas ANNs para os dados de LIFS de cada um dos 28 lotes de amostras do experimento de diagnóstico precoce. A tabela contém ainda o valor médio e o desvio padrão para cada mês. Os laudos foram emitidos para cada folha. .... 74
- Tabela 5.6.** Taxas de acerto obtidas pelas ANNs para os dados de LIFS de cada um dos 28 lotes de amostras do experimento de diagnóstico precoce. A tabela contém ainda o valor médio e o desvio padrão para cada mês. Os laudos foram emitidos para cada planta. .... 81
- Tabela 5.7.** Número de plantas identificadas como doentes em cada um dos lotes já analisados do experimento de diagnóstico precoce. .... 95
- Tabela 5.8.** Comparação entre as taxas de acerto obtidas pelas técnicas RT-PCR e LIFS para as mudas inoculadas. .... 96
- Tabela 5.9.** Acordos e desacordos entre as técnicas RT-PCR e LIFS para diagnóstico, expressos em porcentagens. O sinal “+” indica que a planta foi corretamente identificada

como doente pela técnica em questão. O sinal “-“ indica que a planta foi erroneamente identificada como sadia pela técnica. .... 97

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>17</b>
<b>2. Revisão bibliográfica .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Greening .....</b>	<b>24</b>
2.1.1. Histórico e dados sobre a doença .....	24
2.1.2. Métodos de diagnóstico .....	27
<b>2.2. Fluorescência induzida por laser .....</b>	<b>28</b>
2.2.1. Princípios físicos .....	28
2.2.2. Espectroscopia de fluorescência .....	31
2.2.3. Imagens de fluorescência .....	33
<b>2.3. Emissão óptica com plasma induzido por laser .....</b>	<b>36</b>
<b>2.4. Reação de polimerase em cadeia em tempo real .....</b>	<b>37</b>
<b>2.5. Métodos de análise .....</b>	<b>39</b>
2.5.1. Análise de componentes principais .....	39
2.5.2. Redes neurais artificiais.....	41
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>44</b>
<b>4. Materiais e métodos .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Diagnóstico em condição de campo .....</b>	<b>45</b>
4.1.1. Experimento com copa Pêra-rio e porta-enxerto Cravo .....	45
4.1.2. Experimento com copa Valência e porta-enxerto Swingle .....	45
<b>4.2. Avaliação da precocidade do diagnóstico .....</b>	<b>46</b>
4.2.1. Preparação das mudas .....	46
4.2.2. Coleta das folhas .....	49
4.2.3. Preparação das amostras .....	49
<b>4.3. Técnicas experimentais .....</b>	<b>50</b>



4.3.1. Espectroscopia de fluorescência induzida por laser .....	50
4.3.2. Imagens de fluorescência induzida por laser .....	52
4.3.3. Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser .	53
4.3.4. Extração de DNA das folhas .....	55
4.3.5. Detecção da bactéria <i>Ca. L. asiaticus</i> por RT-PCR .....	56
<b>4.4. Análise dos dados .....</b>	<b>57</b>
4.4.1. LIFS .....	57
4.4.2. LIFI .....	61
4.4.3. LIBS .....	61
4.4.4. Redes neurais artificiais .....	62
<b>5. Resultados e discussão .....</b>	<b>65</b>
5.1. Diagnóstico em condição de campo .....	65
5.1.1. Experimento com copa Pêra-rio e porta-enxerto Cravo .....	65
5.1.2. Experimento com copa Valência e porta-enxerto Swingle .....	67
5.2. Avaliação da precocidade do diagnóstico .....	72
5.2.1. Espectroscopia de fluorescência induzida por laser .....	72
5.2.2. Imagens de fluorescência induzida por laser .....	82
5.2.3. Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser .	90
5.2.4. Diagnóstico por reação de polimerase em cadeia em tempo real ....	94
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>99</b>
6.1. Principais resultados .....	99
6.2. Desenvolvimentos futuros .....	103
6.3. Considerações finais .....	105
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>106</b>

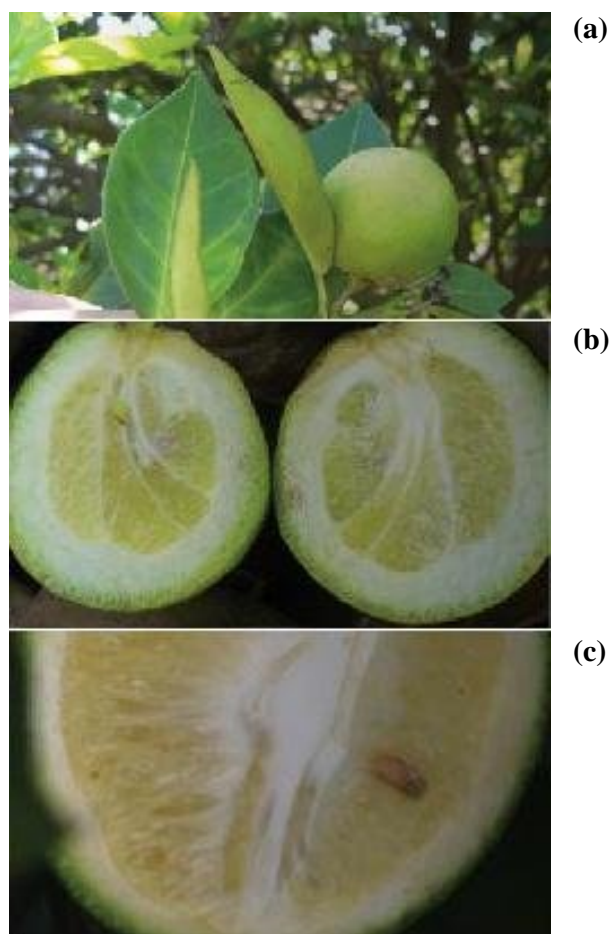
## 1. Introdução

Os citros representam a porção mais importante da fruticultura, no Brasil e no mundo. O Brasil é o maior produtor de citros do mundo, e produz anualmente mais de dez bilhões de laranjas. Em 2003, foram colhidas no país 18,3 milhões de toneladas dessas frutas, além de 1,3 milhão de toneladas de tangerinas e quase um milhão de toneladas de limões [EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL, 2005a, 2005b, 2005c]. Em 2004, a citricultura brasileira foi responsável por quase 21 milhões de toneladas de frutas, o que representa 19% da produção mundial e 41% da colheita total das três Américas. No caso específico das laranjas, a participação da economia nacional é ainda maior: 29% do total mundial e 48% da colheita do continente americano são cultivados no Brasil [EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL, 2005d]. O Estado de São Paulo fornece a maior parte dessa produção: em 2008 foram colhidas 14,8 milhões de toneladas de laranjas, o que representa 79% do total de 18,7 milhões produzidos no país naquele ano [IBGE, 2008].

Uma das mais graves ameaças atuais a esse mercado é a doença chamada greening, também conhecida como Huanglongbing (HLB). Essa doença é conhecida desde 1919, quando foi diagnosticada na China. No Brasil, o primeiro caso registrado só veio a ocorrer em março de 2004, num pomar localizado no município de Araraquara/SP. O greening causa hoje muito mais preocupações e prejuízos aos citricultores que qualquer outra doença, constituindo-se em uma grande ameaça às culturas de citros pela severidade dos sintomas, pelo potencial de progressão da doença e por afetar indistintamente todas as variedades comerciais. Atualmente, os Estados Unidos são o segundo maior produtor mundial de citros. Na Flórida, o principal polo citrícola americano, estima-se que o greening aliado ao clima desfavorável provocará uma queda mínima de 10%, podendo chegar a 25%, na produtividade em relação à safra anterior [TIAN et al., 2009].

A doença é causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter*, da qual são conhecidas três subespécies, designadas pelos nomes *asiaticus*, *africanus* e *americanus*. No Brasil, a transmissão é realizada pelo psílideo *Diaphorina citri*. Não existe cura ou tratamento para o greening; as plantas são erradicadas a fim de evitar a contaminação de plantas ainda não atingidas, isto é, a proliferação da doença para o restante do pomar. A bactéria atua no floema, que é o conjunto de vasos condutores de seiva elaborada das folhas às raízes, bloqueando, assim, a transmissão dos nutrientes nela contidos.

Na maioria dos casos, o primeiro sintoma da presença do greening na planta é o aparecimento de manchas amareladas irregulares nas folhas, as quais vão crescendo até tomar toda a sua superfície. Entretanto, esse sintoma, tecnicamente conhecido como clorose, não atinge todos os ramos, e sim alguns deles apenas. O crescimento da planta cessa, se ela não for ainda totalmente desenvolvida. Os frutos amadurecem apenas parcialmente, tornam-se menores e com formato irregular, além de apresentarem sementes abortadas. A queda precoce dos frutos também é comum. Isso os torna inúteis para todos os tipos consumo, decorrendo daí o grande prejuízo econômico causado pela doença em questão. Além disso, o fruto pode conter manchas amareladas na casca, e por dentro apresenta filetes alaranjados que partem das proximidades do pedúnculo. O tecido branco entre a casca e a polpa tende a ser mais espesso que o normal.

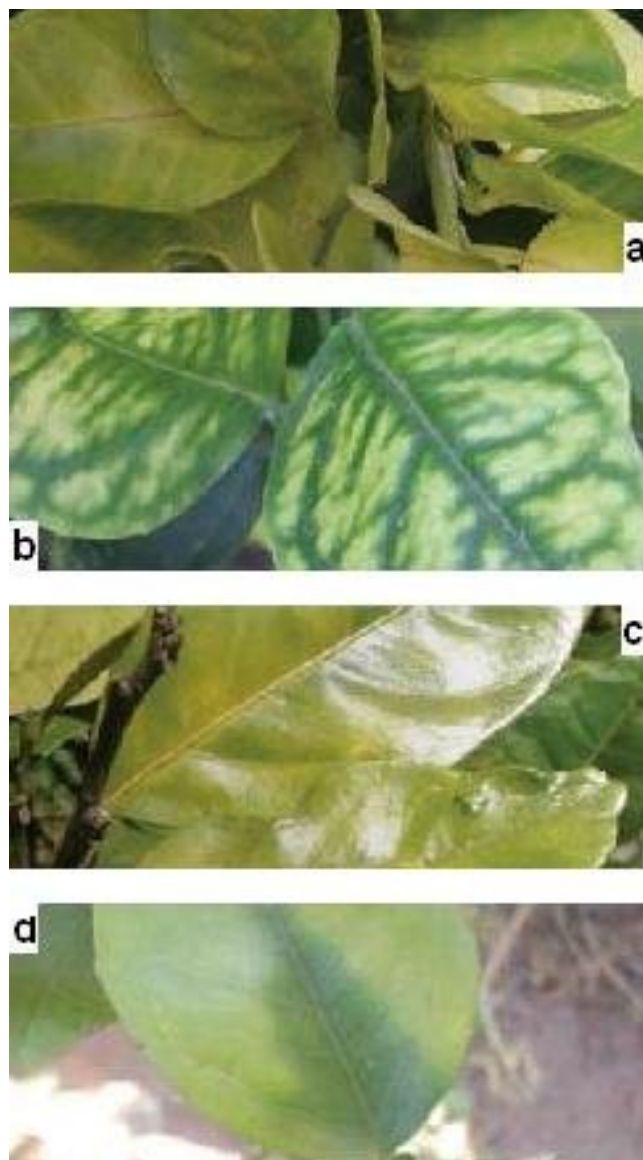


**Figura 1.1.** Frutos de plantas com greening. Em (a), vê-se a aparência externa do fruto; em (b), a seção transversal; e, em (c), uma semente abortada. Fonte: FUNDECITRUS, 2009.

Atualmente, o diagnóstico da doença é feito pela técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que busca identificar o DNA da bactéria presente nos tecidos foliares. Segundo o

método tradicional de realização de testes usando PCR, folhas que possuem a clorose típica geram laudos positivos em 99% dos casos, mas em folhas sem sintomas isso ocorre apenas 10% das vezes. Há técnicas derivadas do PCR tradicional capazes de fornecer resultados mais precisos, como o PCR de tempo real ou quantitativo. Contudo, apesar de ser uma técnica eficiente, o PCR é demasiado caro e também muito trabalhoso, como será mostrado no capítulo Materiais e Métodos. Esse fato torna impossível sua aplicação em larga escala – por exemplo, para inspeção mensal de trezentas mil árvores, número de laranjeiras tipicamente encontrado numa fazenda citrícola.

Dada essa dificuldade, o PCR tem sido utilizado de modo bastante seletivo, e o controle da doença é feito através de inspeções visuais periódicas realizadas por funcionários das próprias fazendas, devidamente treinados para esse fim. Esse método, porém, possui limitações muito severas. Uma delas é seu elevado grau de imprecisão, já que, pelo fato de que poucos ramos manifestam amarelecimento, é possível que o técnico examine a planta do ponteiro à copa sem notar os sintomas. Esse problema é agravado pelo fato de que, a fim de dar conta da inspeção mensal ou quinzenal de toda a fazenda, a equipe de técnicos dispõe de apenas alguns segundos para inspecionar cada planta. Outro problema é a subjetividade inerente ao método. Os sintomas do greening podem ser confundidos, sobretudo em sua fase inicial, com os de outros problemas que também causam amarelecimento das folhas. Alguns desses problemas são as deficiências de zinco, manganês e magnésio, bem como lesões e rachaduras nos galhos da planta. Além disso, nem sempre as árvores infectadas pela bactéria causadora do greening apresentam os sintomas típicos [FUNDECITRUS, 2009].



**Figura 1.2.** Folhas de laranjeiras com sintomas de greening **(a)** e deficiências de zinco **(b)**, manganês **(c)** e magnésio **(d)** [FUNDECITRUS, 2009].



**Figura 1.3.** Trator com plataforma, usado na inspeção do greening [JORNAL DA CIDADE DE HOLAMBRA, 2009].

Autorizado por um convênio firmado com a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, o Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura) prestou, em 2009, serviços de fiscalização por amostragem nos pomares do Estado de São Paulo e do triângulo mineiro. O objetivo dessas vistorias foi o de fazer cumprir a Instrução Normativa 53, de outubro de 2008, que determinou a responsabilidade do citricultor pela localização e eliminação das plantas que apresentem sintomas da doença, bem como a punição dos infratores. Por meio dessas inspeções, o Fundecitrus reuniu uma grande quantidade de dados sobre a distribuição da doença nas regiões abrangidas. Ao longo do ano de 2009, foram inspecionados quase 51 milhões de plantas em 5.397 propriedades distribuídas por 229 municípios. Quase oitocentas mil plantas foram erradicadas, e cerca de 2,4 milhões tiveram sua erradicação determinada; além disso, 1,6 milhão foi colocado sob suspeita. Isso significa que 4,8 milhões de plantas, ou 9,4% do total inspecionado, apresentaram sintomas típicos da doença. A gravidade do problema se torna ainda mais patente se analisada por outro ângulo: dos 28.802 talhões inspecionados em 2009, foram considerados suspeitos 18.470, ou 64,1%, dos quais 1.234 apresentaram sintomas em mais de 28% das plantas observadas [FUNDECITRUS, 2010].

Em reunião realizada em janeiro de 2010, o Fundecitrus optou pelo fim das atividades de inspeção visual, por entender que essa medida se mostrou ineficaz na contenção da

proliferação da doença [FOLHA RIBEIRÃO, 2010]. A entidade passou a atuar apenas na orientação dos citricultores. As inspeções visuais continuaram a ser feitas pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária, vinculada à Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Contudo, é de se esperar que a saída do Fundecitrus torne menos eficaz a aplicação da Instrução Normativa 53, de modo que as iniciativas individuais dos citricultores para contenção do greening se tornarão mais importantes.

A ineficiência das inspeções no combate à propagação da doença se explica em parte pela imprecisão e subjetividade do método de controle da doença por inspeção visual. Há, porém, outra razão importante, que poderia comprometer por si só a eficácia das inspeções, ainda que os sintomas do greening, uma vez manifestos, pudessem ser detectados de imediato e sem risco de erro. Essa razão reside no fato de que a manifestação dos sintomas ocorre entre seis meses e dois anos após a contaminação da planta. Tipicamente, o intervalo de tempo entre esses dois eventos é de cerca de um ano. Durante essa fase, embora não haja meios de detectar visualmente a doença, a planta já é capaz de transmitir a bactéria aos psilídeos e, portanto, se constitui em foco de difusão do greening.

Diante do exposto, convém não apenas o desenvolvimento de um método capaz de fornecer um diagnóstico rápido ou mesmo instantâneo, mas também que o intervalo entre a contaminação da planta e seu diagnóstico seja tão curto quanto possível. Erradicando as plantas contaminadas antes da expressão dos sintomas, será possível diminuir o tempo no qual as árvores permanecem no campo, atuando como focos de transmissão do greening para plantas saudáveis. Dessa forma, será possível reduzir a velocidade de propagação da doença e os prejuízos causados por ela. Assim, o desenvolvimento de métodos alternativos eficazes de diagnóstico e controle da doença poderá se mostrar de grande utilidade no combate à doença.

Esforços têm sido feitos rumo a novos métodos de diagnóstico, eficientes e viáveis. Um dos mais promissores envolve a aplicação de métodos de análise multivariada sobre espectros de fluorescência induzida por laser (LIFS) obtidos a partir das folhas [ZAGHI, 2008]. Esse trabalho demonstrou a existência de diferentes padrões espectrais que permitem a distinção entre plantas saudáveis e doentes a partir dos espectros de fluorescência das folhas. Contudo, nenhum esforço foi feito rumo à elaboração de critérios classificatórios bem definidos. Portanto, não pôde ser feita nenhuma estimativa quantitativa da eficiência do método, ou seja, de qual é a margem de erro inerente ao método. Além disso, o trabalho mencionado acima se utilizou de folhas assintomáticas e sintomáticas, mas todas elas foram coletadas de plantas que já haviam manifestado sintomas da doença. As folhas assintomáticas utilizadas não possuíam sintomas em si mesmas, mas as plantas de origem já davam sinais de

contaminação por greening em outras folhas. Portanto, não há dados disponíveis sobre o potencial da técnica para o diagnóstico durante a fase anterior ao surgimento de sintomas na planta.

O presente trabalho procura aprofundar a investigação do potencial da técnica LIFS para o diagnóstico do greening, tanto na fase sintomática quanto na fase assintomática da doença. Este trabalho fornece também uma estimativa da precisão desse método de diagnóstico em ambos os casos. Além disso, este trabalho examina a viabilidade do uso de duas outras técnicas, tendo em vista o mesmo fim.

Foi realizada uma análise exploratória da técnica de imagens de fluorescência induzida por laser (LIFI). Seu fundamento físico é o fenômeno da fluorescência, assim como no caso da técnica LIFS. A fluorescência é um fenômeno associado às transições eletrônicas nos átomos e à interação dos elétrons com a radiação eletromagnética. A fluorescência de uma amostra pode transmitir informações sobre sua composição química. Portanto, tecidos foliares de plantas sadias e doentes podem apresentar diferentes padrões de fluorescência, uma vez que a atuação da bactéria no organismo, ao dificultar ou impedir o transporte de seiva elaborada, produz um desequilíbrio fisiológico que se reflete na alteração da concentração de algumas substâncias fluorescentes. Essa alteração foi demonstrada em [ZAGHI, 2008] para as clorofilas a e b. A diferença entre LIFS e LIFI é que a primeira capta as informações relacionadas à fluorescência da amostra na forma de espectro, enquanto a segunda registra imagens compostas pela luz fluorescente.

A terceira técnica a ser utilizada neste trabalho é a espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS). Essa técnica utiliza um laser de alta potência para decompor uma pequena parte das moléculas da amostra em seus átomos constituintes, formando um plasma de alta temperatura. Durante o resfriamento subsequente, os átomos emitem radiação eletromagnética, que é captada sob a forma de espectro. Pelo fato de ser captado a partir de átomos isolados, o espectro de LIBS presta-se à análise multielementar, qualitativa ou quantitativa. Desse modo, a contaminação pelo greening pode ser detectada de modo indireto, se a presença da bactéria induzir variação na concentração de um ou mais elementos químicos.



## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Greening

#### 2.1.1. Histórico e dados sobre a doença

O greening é a mais preocupante dentre as centenas de doenças presentes no cenário citrícola atual. Também é conhecida pelo acrônimo HLB, derivado de seu nome no idioma chinês, *Huanglongbing*, que significa “doença do ramo amarelo”. A primeira notícia que a comunidade científica recebeu dessa doença se deu provavelmente em 1919, quando foi relatada a existência de uma doença no sul da China cujos sintomas parecem idênticos ao do greening. Em 1935, o greening já havia se transformado em um sério problema para a citricultura daquela região. Em 1921, casos semelhantes foram descobertos nas Filipinas, país onde o greening se tornou uma grave ameaça a partir de 1957. A doença foi descrita na África do Sul em 1937, mas já era conhecida ali desde 1928. Foi nesse país que recebeu o nome “greening”. Em 1991, já havia sido diagnosticada em onze países da Ásia e dezesseis da África [GRAÇA, 1991]. Nos quinze anos seguintes, mais treze países foram alcançados pela doença, que passou para o continente americano e para a Oceania [ZAGHI, 2008]. O Brasil, maior produtor de citros do mundo, foi atingido em 2004, e os Estados Unidos, que ocupam a segunda posição, o foram no ano seguinte.

No Brasil, a doença foi detectada pela primeira vez no município de Araraquara, no interior paulista, tendo sido mais tarde descoberta também no triângulo mineiro e no norte do Paraná. Em maio de 2009, já havia atingido 216 municípios paulistas, um mineiro e 34 paranaenses. O extremo norte, oeste e noroeste do Estado foram menos atingidos que sua região central [LOPES, S. A., 2010]. Inspeções promovidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) detectaram greening em 64% dos pomares visitados. Essa não é a realidade de todas as regiões do estado, pois o Fundecitrus dava preferência às regiões de maior infestação para efetuar as inspeções. Dados estaduais gerais, baseados também nas inspeções feitas pelos próprios produtores, mostraram que, em outubro de 2009, mais de 29% dos talhões estavam contaminados. E a realidade pode ser ainda pior que isso, pois cerca de 32% das fazendas do estado não passam por inspeções, e outros 32% as fazem sem uma metodologia rigorosa [MASSARI, 2010]. Em fazendas mantidas nessas condições, a

incidência do greening tende a ser mais intensa [BASSANEZI, 2010], de onde se conclui que a taxa de contaminação real dos talhões paulistas deve ser superior a 30%.

Muito se discutiu nos anos 60 e 70 sobre a natureza do agente causal do greening. Apenas em 1978 foi sugerido pela primeira vez que se tratava de uma bactéria verdadeira [GARNIER et al., 1978]. Hoje se sabe que a doença é causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter*, da qual são conhecidas atualmente três espécies: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *africanus* e *americanus*. No Brasil, o último tipo se manifestou primeiro, sendo logo seguido pelo primeiro. O *Candidatus Liberibacter asiaticus* propagou-se com maior rapidez, e hoje é a variedade predominante. Isso se explica em parte pelo fato de que essa espécie não é sensível a altas temperaturas, o que permite que se espalhe pelas regiões mais quentes. Sabe-se desde 1974 [BOVÉ, 1974] que o *Candidatus Liberibacter africanus* só se desenvolve em regiões de clima ameno, e experimentos recentes mostraram que o mesmo ocorre com o *Candidatus Liberibacter americanus*. *Candidatus Liberibacter asiaticus*, que em 2004 era responsável por menos de 10% das plantas infectadas, responde agora por mais de 90%. Além da insensibilidade às altas temperaturas, essa espécie apresenta outra característica que favorece sua maior difusão pelos pomares: a densidade de bactérias nos tecidos da planta é em média dez vezes superior à do *Candidatus Liberibacter americanus*. Com isso, aumenta a probabilidade de contaminação do vetor ao se alimentar da planta infectada [LOPES, S. A., 2010].

A transmissão da doença pode ser dar pela enxertia usando borbulhas contaminadas. Contudo, os principais transmissores da doença são insetos hemípteros da família *Psyllidae*, os quais têm poucos milímetros de comprimento e se alimentam da seiva da planta. Esses insetos são contaminados pela bactéria ao ingerir a seiva e infectam plantas saudáveis também ao se alimentar delas. Quinze minutos de alimentação numa planta contaminada podem ser suficientes para a contaminação [GRAÇA, 1991], mas há grandes desacordos na literatura especializada quanto ao período de latência da doença no inseto: de 1 a 21 dias [GRAÇA, 1991; LOPES, J. R. S., 2010]. Também não há acordo quanto à eficiência de transmissão: todos os valores entre 1% e 100% já foram propostos.

Esse mecanismo de transmissão da doença só foi descoberto em 1965, e o primeiro psilídeo identificado como vetor foi o *Trioza erythrae*. Pouco tempo depois, em 1966, constatou-se que o *Diaphorina citri*, que tem preferência por climas quentes e secos, também era transmissor do greening. Este último está presente nas Filipinas e na Índia, bem como na Península Arábica e em várias ilhas africanas do Pacífico [GRAÇA, 1991]. No Brasil, *Diaphorina citri* é a única espécie transmissora da doença. Essa espécie transmite as bactérias

*Candidatus Liberibacter asiaticus* e *americanus*, ao passo que o *Candidatus Liberibacter africanus* é transmitida pelo psilídeo *Trioza erythrae*.



**Figura 2.1.** O inseto psilídeo *Diaphorina citri*, único transmissor do greening no Brasil.

Embora sejam possíveis tanto a aquisição quanto a transmissão da bactéria pelo inseto nos estágios ninfais, é na fase adulta que o controle se torna mais importante, devido à maior mobilidade e longevidade desse estágio. Estudos experimentais indicaram que, uma vez adquirida a bactéria, o psilídeo conserva a capacidade de transmissão por toda a vida. Há evidências de que o psilídeo *Trioza erythrae* transmite a bactéria aos descendentes, mas vários trabalhos indicaram que o *Diaphorina citri* não tem essa capacidade [LOPES, J. R. S., 2010].

A persistência do patógeno no vetor e sua provável latência fazem do controle por meio de inseticidas um elemento importante no controle da própria doença. Contudo, a facilidade da aquisição e da inoculação, as imperfeições inerentes a toda aplicação de inseticidas e o próprio caráter perene da cultura de citros tornam difícil um controle eficaz por esse método.

### 2.1.2. Métodos de diagnóstico

O método de controle do greening mais praticado atualmente é a inspeção visual, empreendida de preferência por técnicos treinados e dedicados com exclusividade às inspeções. Contudo, esse não pode ser considerado um autêntico método de diagnóstico, por lhe faltar auto-suficiência. Por causa dos vários fatores que podem induzir ao erro, conforme explicado na Introdução, a erradicação das plantas visualmente identificadas como contaminadas pelo greening só tem início após a confirmação da presença da bactéria no pomar por um método de diagnóstico mais confiável.

O primeiro método de diagnóstico para o greening foi desenvolvido nos anos 60, e consistiu no uso de plântulas (plantas de sementes recém-germinadas), nas quais era enxertado um fragmento do porta-enxerto da planta analisada. Se a planta em questão estivesse contaminada pelo greening, a plântula manifestaria os sintomas em três ou quatro meses.

Métodos de diagnóstico mais rápido foram desenvolvidos mais tarde. Em 1968, foi proposto um método que identificava nos tecidos doentes um fluoróforo ausente em plantas sadias, após tê-lo isolado por meio de um método cromatográfico. Porém, descobriu-se mais tarde que outros distúrbios bioquímicos induziam a produção da mesma substância, e também que essa produção está sujeita a influências climáticas e não ocorre em todas as plantas. O método foi melhorado ao longo dos anos, mas esse último problema persistiu, e não foram obtidos bons resultados antes do aparecimento dos sintomas [GRAÇA, 1991].

Outros métodos foram desenvolvidos usando microscopia convencional, de fluorescência ou eletrônica. Todos eles requerem trabalho laboratorial e são invasivos, pois são mais eficazes quando aplicados no tecido floemático. Métodos baseados na detecção de anticorpos monoclonais não forneceram bons resultados por terem se mostrado específicos demais [GRAÇA, 1991; ZAGHI, 2008]. Há ainda um outro método, proposto na patente WO2007021485-A2, que identifica a bactéria por meio de espalhamento Raman, mas isso só é possível depois que as amostras são submetidas a um complexo tratamento químico.

Sabe-se desde a década de 70 que a doença leva à falta de zinco, ferro, cálcio e magnésio, e também ao excesso de potássio [GRAÇA, 1991]. Assim, outros métodos buscaram diagnosticar o greening por meio da análise da mudança de concentração de certas substâncias ou micronutrientes, sobretudo nos últimos anos. É o caso da patente JP2004264101-A, cujo método detecta, a partir da análise de extratos por meio de reação de iodo, variações na concentração de amido causadas pela doença. O método descrito na patente

JP2006267092-A também funciona a partir de extratos, mas utiliza espectrofotometria de absorção para detectar quedas na concentração de manganês e ferro. Essas técnicas, porém, não são específicas, pois há outras doenças e disfunções capazes de produzir efeitos similares, e requerem certa dose de trabalho no preparo das amostras. Um esforço semelhante que traz melhoramentos em ambos os aspectos usa fluorescência de raios X incidindo diretamente sobre as folhas, e o diagnóstico é feito a partir dos espectros levando em conta cinco micronutrientes: potássio, cálcio, ferro, cobre e zinco [PEREIRA, 2010]. Por levar em conta várias concentrações simultaneamente, esse método é mais robusto que os demais. Além disso, ele apresenta uma grande vantagem por dispensar o preparo das amostras.

Os métodos mais eficientes e utilizados atualmente são variações da reação de polimerase em cadeia (PCR). O PCR em tempo real, ou RT-PCR, foi utilizado como técnica de referência neste trabalho, e informações sobre ele podem ser encontradas na seção 2.4. Trata-se, porém, de um método trabalhoso e dispendioso, como se pode notar no item 4.3.4.

ZAGHI (2008) propôs o uso da fluorescência induzida por laser para o diagnóstico do greening, demonstrando a viabilidade da técnica. Entretanto, nenhuma avaliação quantitativa da eficiência do método foi feita, e também não foi avaliado seu potencial para o diagnóstico precoce. Dentre outros objetivos, o presente trabalho busca dar continuidade a esse empreendimento fornecendo respostas a essas perguntas.

## **2.2. Fluorescência induzida por laser**

### **2.2.1. Princípios físicos**

A fluorescência é um fenômeno baseado em processos de interação entre radiação e matéria. Ela ocorre quando um elétron pertencente a um átomo recebe energia de um fóton, de modo que essa energia, sendo insuficiente para provocar a ejeção do elétron, faz com que ele se mova a um estado excitado. Ao retornar ao estado fundamental, o elétron dissipa a energia excedente sob a forma de um novo fóton. As transições eletrônicas da fluorescência não envolvem inversão de spin, ou seja, são transições singleto-singleto, e é isso o que distingue a fluorescência de um fenômeno análogo, a fosforescência.

O processo de absorção de um fóton por um átomo e a emissão de um novo fóton é bem conhecido: a energia desses fótons corresponde à energia adquirida ou perdida por um elétron na excitação a um estado mais elevado ou retorno a um estado inferior. No entanto, o

intervalo de tempo entre a excitação e a relaxação de um átomo no processo da fluorescência é consideravelmente longo em relação a outros eventos que ocorrem na escala atômica e subatômica. Esse intervalo é da ordem de  $10^{-8}$ s, que é um tempo  $10^3$  vezes maior que o período típico de rotações moleculares,  $10^4$  vezes maior que o intervalo médio entre colisões de moléculas líquidas em temperatura ambiente e  $10^7$  vezes maior que o período típico de vibrações moleculares [MENZEL, 1995].

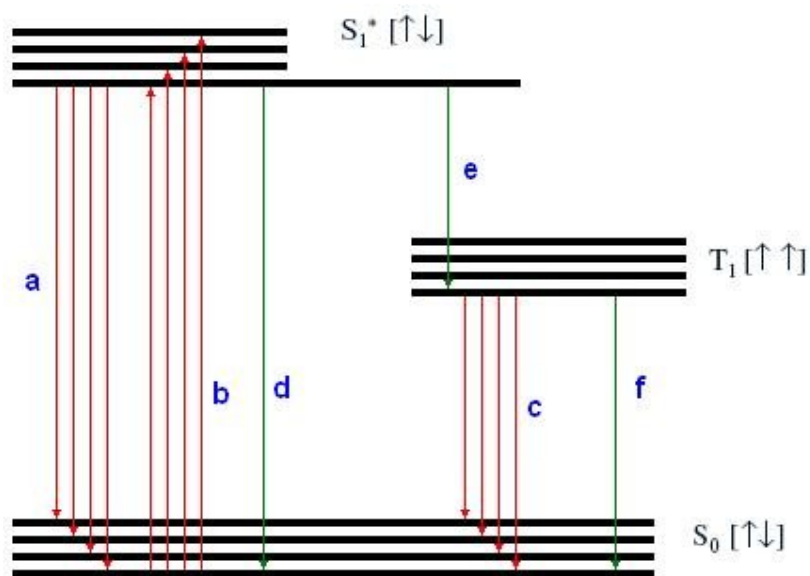
A extensão média do intervalo de tempo decorrido entre a excitação e a emissão é determinada, em última análise, pelas leis da mecânica quântica. Essas leis determinam, no caso em questão, as probabilidades de cada uma das diversas transições possíveis em um dado intervalo de tempo. Visto que o caráter do formalismo da teoria quântica é inerentemente estatístico, os intervalos de tempo mencionados acima não são exatos. Em comparação com alguns outros fenômenos microscópicos, como os mencionados no parágrafo anterior, é correto dizer que as transições eletrônicas envolvidas no caso da fluorescência são relativamente pouco prováveis, e por isso levam um tempo consideravelmente longo para ocorrer em um número elevado de elétrons. É possível ilustrar isso traçando uma analogia com os casos de decaimento radioativo dos núcleos instáveis, cujo tempo de meia-vida também está associado à probabilidade de ocorrência da emissão de partículas do núcleo.

As propriedades da luz emitida pela amostra fluorescente também se devem em grande parte às leis quânticas. A intensidade medida da luz emitida em um dado comprimento de onda depende essencialmente da probabilidade de uma transição associada à quantidade de energia correspondente. A razão disso é que, se uma dada transição é mais provável que outra, então uma quantidade maior de elétrons da amostra passará por ela, e mais fótons com aquela energia específica serão emitidos, resultando numa intensidade maior captada pelo instrumento de medição. Esse resultado é estatístico, como já foi dito. Porém, o resultado obtido pelo instrumento é macroscópico, e consiste nas intensidades detectadas em cada comprimento de onda. Sendo assim, as flutuações probabilísticas tornam-se, na prática, desprezíveis.

A absorção do fóton incidente por um elétron pode, além de excitar o elétron, incrementar a energia cinética vibracional da molécula como um todo. Essa excitação vibracional da molécula, porém, é dissipada por colisões com outras moléculas num intervalo de tempo cerca de cem vezes menor que o tempo característico da fluorescência. Esse processo, denominado relaxação vibracional, faz com que a molécula perca parte da energia adquirida pela absorção do fóton incidente antes que o elétron excitado retorne ao estado fundamental. Em consequência disso, o fóton emitido terá energia menor que a do fóton

incidente. A emissão, por sua vez, também pode, pelo princípio da conservação do momento linear, levar a molécula novamente a um estado de excitação vibracional. Essa nova excitação é obtida à custa da energia do fóton. Dessa forma, a energia do fóton emitido pode ser ainda menor, de modo que esse fenômeno faz aumentar a diferença de energia entre os fótons incidente e emitido.

A figura 2.2 ilustra de maneira esquemática os principais aspectos das transições eletrônicas envolvidas na fluorescência, de acordo com a explicação dada nos parágrafos anteriores.



**Figura 2.2.** Diagrama de energia mostrando alguns processos de transferência de energia que envolvem transições eletrônicas. Os conjuntos de linhas pretas horizontais representam estados de energia do elétron; os conjuntos inferior, intermediário e superior representam o estado fundamental (singleto), o primeiro estado excitado tripleto e o primeiro estado excitado singleto, respectivamente. As diferentes linhas em cada conjunto não correspondem a diferentes níveis de energia do elétron, mas sim da molécula, sob a forma de energia vibracional. As setas correspondem às transições eletrônicas, sendo a cor vermelha usada para transições que emitem fótons, enquanto a cor verde indica decaimentos não-radioativos. Os processos radioativos incluem: **(a)** a emissão de fluorescência; **(b)** a excitação do elétron, mediante a absorção de um fóton; e **(c)** a emissão de fosforescência, com a inversão de spin do elétron. Os processos de decaimento não-radioativo são: **(d)** retorno ao estado fundamental, mediante transferência de energia do elétron à molécula; **(e)** passagem do elétron do estado singleto para o estado tripleto, ocasionando inversão de spin; e **(f)** retorno ao estado fundamental (singleto) a partir do estado tripleto, mediante transferência de energia do elétron à molécula.

Quimicamente falando, existem basicamente duas maneiras pelas quais a energia proveniente da radiação luminosa que incide sobre a amostra pode ser absorvida e, portanto,

deixar de ser emitida através da fluorescência. Uma delas é o rearranjo interno da molécula, no qual os átomos se movem de modo a redistribuir e absorver a energia adquirida. A outra se dá através de colisões e outros mecanismos que provocam transferência de energia da molécula excitada para as moléculas vizinhas. Assim, a presença de ligações duplas na cadeia dificulta o processo de transferência interna de energia. Isso se dá porque, ao contrário da ligação simples, a ligação dupla é rotacionalmente rígida, o que limita a variedade de movimentos possíveis que uma molécula pode realizar durante o processo de redistribuição de energia, e, portanto, limita a eficiência do processo em si. O mesmo argumento é válido para as ligações triplas. Dessa forma, substâncias orgânicas abundantes em ligações duplas e triplas, como anéis aromáticos e outras estruturas, têm maior probabilidade de apresentar fluorescência.

O método analítico baseado no fenômeno da fluorescência possui muitas variações, como natureza da fonte luminosa, tipo de luz incidente e modo de coleta dos dados. O uso de raios X é um dos mais antigos e mais amplamente utilizados. Hoje também se usam radiações ultravioleta, visível e infravermelha. Com relação à fonte luminosa, sempre se utilizaram lâmpadas de diversos tipos acopladas a um monocromador. Posteriormente, a partir do fim dos anos 60, começou a ser utilizada a fonte laser, que, além de dispensar o monocromador, possui outras vantagens, como a alta direcionalidade (todos os fótons são emitidos na mesma direção), intensidade e coerência.

É possível listar, em resumo, as seguintes características da técnica, que a tornam potencialmente interessante para lidar com problemas como o descrito aqui: **1.** o custo da análise é baixo em relação aos métodos empregados atualmente; **2.** o levantamento do espectro pode ser feito instantaneamente, assim como o laudo baseado em suas propriedades; **3.** o emprego da técnica dispensa o preparo das amostras, eliminando também a produção de resíduos químicos; e **4.** a fluorescência tem obtido considerável sucesso na análise de materiais orgânicos, vivos ou não, em diversos campos do conhecimento.

### **2.2.2. Espectroscopia de fluorescência**

A espectroscopia de fluorescência presta-se tradicionalmente a diversas aplicações, especialmente em bioquímica, biologia molecular, biofísica, físico-química, física atômica e molecular e química analítica. Embora outras aplicações tenham sido feitas, como no estudo de plasmas ou de cinética química, a vasta maioria das aplicações da técnica sempre foi vinculada a substâncias orgânicas, incluindo-se aí tecidos vivos, como no caso do presente



trabalho. Aplicações bem-sucedidas nesse campo encontram-se facilmente nas ciências médicas ou do solo (alguns exemplos são [LARIONOV et al., 2003; LUALDI et al., 2007; ZHU et al., 2008; MILORI et al., 2002; ZSOLNAY et al., 1999]). A razão disso é que, como foi explicado acima, a fluorescência é um fenômeno frequentemente presente em moléculas suficientemente rígidas, uma condição satisfeita por muitas substâncias orgânicas. Em compostos orgânicos heterogêneos, como solos e tecidos vivos animais e vegetais, a presença de substâncias fluorescentes sob condições apropriadas é sempre muito provável. Ao contrário do que ocorre com algumas outras técnicas espectroscópicas, para as quais a heterogeneidade da amostra é um elemento de dificuldade, para a espectroscopia de fluorescência esse é um dos fatores que possibilitam sua aplicação em diversos casos.

A técnica passou por uma evolução considerável desde seu surgimento. Uma das mais importantes diz respeito à fonte luminosa, conforme já foi discutido. Outra consiste na estrutura e funcionamento do espectrômetro. O espectrômetro tradicional consiste de um sensor óptico acoplado a um filtro monocromador. Esse filtro deixa passar a luz correspondente a um dado intervalo de comprimentos de onda, bloqueando os demais. O comprimento de onda que é transmitido através do filtro e atinge o medidor varia ao longo do tempo, e desse modo é composto o espectro, ao fim de vários minutos. Posteriormente foi desenvolvido um novo tipo de espectrômetro, capaz de captar todos os pontos do espectro instantaneamente, decompondo a luz emitida através de uma grade de difração ou mecanismo equivalente, e posicionando diversos sensores ópticos nos locais adequados. Esse método torna possível a economia de tempo e a miniaturização do equipamento, embora seja um pouco inferior em termos de resolução. O equipamento utilizado neste trabalho possui um laser na região da luz visível (561nm) e um miniespectrômetro.

A espectroscopia de fluorescência tem sido usada para diagnóstico em medicina e odontologia, encontrando aplicação principalmente no combate a diversos tipos de câncer, mas também no de cáries, lesões e outros problemas de saúde [ENDO et al., 2009; IONITA, 2009; Mitchell et al., 1999]. No estudo de plantas, a técnica tem se mostrado útil para a compreensão de processos envolvendo pigmentos fluorescentes, como as clorofilas e os carotenóides [KRAUSE, 1991; MAXWELL et al., 2000]. No contexto da citricultura, essa metodologia tem sido utilizada para diagnóstico de doenças como a Morte Súbita e o Declínio [TERENCIO, 2006], cancro cítrico [MARCASSA et al., 2006] e o próprio greening [ZAGHI, 2008]. Esse último trabalho demonstrou ainda a correlação entre certas deformações espectrais provocadas por essa doença e a variação na concentração das clorofilas a e b.

### 2.2.3. Imagens de fluorescência

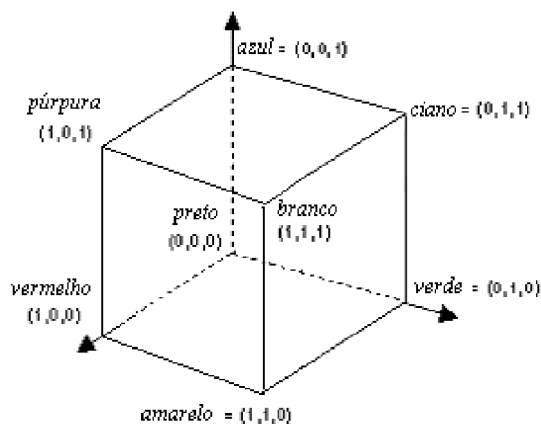
A técnica de imagens de fluorescência vem sendo usada para uma enorme variedade de aplicações. Embora a intensidade da luz emitida por fluorescência seja sempre baixa se comparada à luz meramente refletida pela amostra, a obtenção de imagens é facilitada pelo fato de que a fluorescência, como foi explicado anteriormente, ocorre sempre em comprimentos de onda maiores que o da luz incidente. É fácil, portanto, eliminar a reflexão e deixar apenas a luz fluorescente, bastando para isso posicionar entre a amostra e o detector um filtro óptico que bloqueia especificamente a faixa do espectro que contém a luz emitida pela fonte. Descontadas essas adições feitas ao equipamento, o sistema de aquisição de imagens de fluorescência em tamanho natural funciona da mesma maneira que um equipamento que fotografa imagens comuns.

As imagens de fluorescência vêm sendo empregadas de muitas maneiras, tanto em tamanho real quanto para imagens microscópicas. A difusão da moderna tecnologia fotográfica a preços acessíveis tem impulsionado o aumento da produção de trabalhos relacionados a essa metodologia. Uma de suas vantagens em relação à espectroscopia reside na capacidade de obter dados sobre a distribuição da fluorescência ao longo da superfície estudada, possibilitando que informações úteis sejam levantadas a partir dos métodos já estabelecidos de análise de textura e forma.

Contudo, a mera análise de cores também pode fornecer informações úteis, mediante a análise dos histogramas de cores ou colorgramas. Para isso, as cores são representadas em um dado sistema de cores, que descreve suas propriedades de modo quantitativo. O sistema de cores mais conhecido é o *Red-Green-Blue*, ou RGB, que se baseia no fato de que muitas das cores que o sistema visual humano é capaz de perceber podem ser descritas como combinações das cores vermelha, verde e azul. Por isso, essas três cores são chamadas “primárias”. Dessa forma, o espectro de cores conhecidas pode ser representado por um cubo, em cujos vértices se encontram as três cores primárias, suas três combinações, o branco e o preto, dispostos da maneira mostrada na figura 2.3. Dessa forma, as cores podem ser representadas por um vetor num espaço tridimensional, com componentes contidas no intervalo fechado  $[0,1]$ . Neste trabalho, em que foram utilizadas imagens de 256 bits, foi realizada uma mudança de escala a fim de representar cada componente como um número inteiro no intervalo entre 0 e 255.

Utiliza-se também um sistema de cores denominado RGB relativo, no qual é levada em conta apenas a proporção das três cores primárias na composição da cor, e não seu valor

absoluto. Obtém-se esses parâmetros relativos dividindo o valor de cada componente pela soma das três componentes. Assim, por exemplo, o vermelho relativo é dado pela expressão  $R / (R + G + B)$ , aplicando-se um raciocínio análogo às outras duas componentes [ANTONELLI et al., 2004].

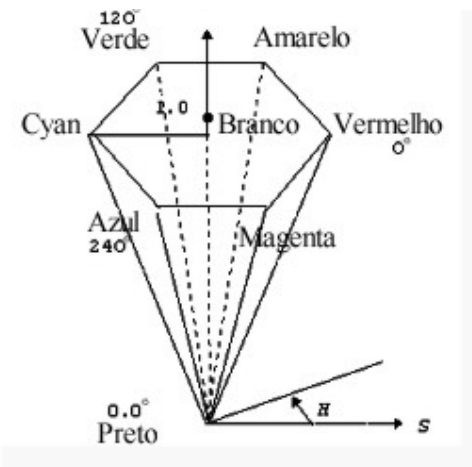


**Figura 2.3.** Representação de cores no sistema RGB. A cor preta está na origem, e a escala de cinza se encontra no segmento de reta que liga a origem ao vértice oposto (1,1,1), onde se situa a cor branca. As cores primárias puras se encontram nos vértices que estão sobre os respectivos eixos. Os vértices restantes contêm as combinações das três cores primárias, tomadas duas a duas. Fonte: <<http://www.ic.uff.br/~aconci/RGBparaHSV.html>>.

Existem, contudo, algumas cores que não podem ser representadas no sistema RGB. Na verdade, nenhum sistema finito de cores primárias é capaz de representar todas as cores percebidas pelo aparato visual humano. Por isso, a fim de extrair o máximo possível de informações de cor a partir de uma imagem, é comum a utilização combinada de vários sistemas de cores, inclusive alguns que não se baseiam no uso de cores primárias. Neste trabalho foram utilizados dois desses sistemas: HSV e HLS.

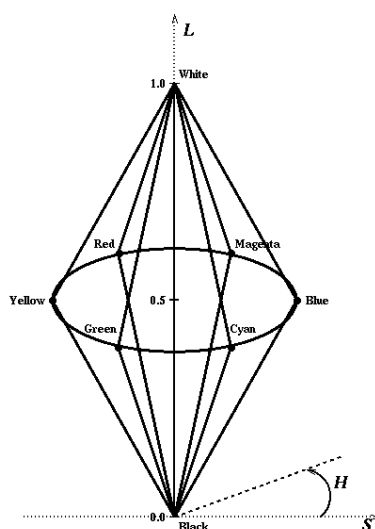
Assim como acontece no caso do RGB, esses dois sistemas são conhecidos pelos acrônimos em inglês das variáveis que utilizam para descrever as cores. O HSV utiliza os parâmetros *hue*, *saturation* e *value* (matiz, saturação e luminância, respectivamente). Esse sistema pode ser ilustrado geometricamente por um cone ou pirâmide regular, como na figura 2.4. A escala de cinza está contida no eixo vertical da figura, estando o preto no vértice e o branco no centro da base. A altura da cor é a luminância, parâmetro que determina quão clara é a cor em questão. O matiz é dado pelo ângulo polar. Convencionou-se posicionar o vermelho em  $0^\circ$ , o verde em  $120^\circ$  e o azul em  $240^\circ$ . A saturação é medida pela distância da cor em relação ao eixo das escalas de cinza. Essa variável mede a pureza relativa de um matiz em

relação aos demais. Uma cor mais próxima do eixo é menos pura que uma cor situada na extremidade, por estar mais próxima do extremo diametralmente oposto.



**Figura 2.4.** Representação de cores no sistema HSV. Fonte: <<http://www.ic.uff.br/~aconci/RGBparaHSV.html>>.

O sistema HLS é muito semelhante ao HSV, inclusive porque dois dos parâmetros utilizados são os mesmos: o matiz (H) e a saturação (S). Porém, a luminância (V) é substituída pela luminosidade (L, de *lightness*). Nesse sistema, o preto e o branco são representados como vértices opostos de dois cones unidos pela base, como se pode observar na figura 2.5.



**Figura 2.5.** Representação de cores no sistema HSV. Fonte: <<https://csel.cs.colorado.edu/~csci4576/SciVis/SciVisColor.html>>.

Assim como a técnica espectroscópica baseada no mesmo fenômeno, as imagens de fluorescência vêm sendo amplamente utilizadas no diagnóstico de doenças humanas [FELLER et al., 2004; KOSAKA et al., 2009; THONG et al., 2009]. No contexto da botânica, essa técnica já foi empregada em estudos com propósitos diversos e com as mais variadas espécies, tais como interação com herbicidas, reação a stress hídrico e outros fatores, bem como interação com patógenos e diagnóstico de doenças, dentre outros [LICHTENTHALER et al., 1997; BUSCHMANN et al., 2000; BERGER et al., 2007; SCHOLES et al., 2009; Canada-Canada et al., 2008; KONISHI et al., 2008].

A Embrapa Instrumentação Agropecuária vem realizando estudos nesse sentido não apenas com o greening, mas também outras doenças, como Morte Súbita dos Citros (MSC) e Declínio dos Citros. Utilizando uma câmera digital comum, uma fonte laser azul (473nm) e um filtro óptico adequado, bem como histogramas de distribuição e outras metodologias tradicionais para análise de imagens, foram constatadas diferenças significativas dessas doenças entre si e em relação às sadias.

### **2.3. Emissão óptica com plasma induzido por laser**

LIBS (*Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*) é uma técnica espectroscópica recente que opera convertendo uma parte da amostra em plasma com o auxílio de uma fonte laser de alta energia. O elevadíssimo gradiente de campo elétrico do laser leva a um rompimento de todas as ligações entre os átomos da amostra, bem como as ligações entre os elétrons e respectivos núcleos, resultando daí o plasma, cuja temperatura atinge instantaneamente um valor máximo entre 10.000 e 20.000°C, permanecendo nesse estado por alguns microssegundos. Ao resfriar, os elétrons reúnem-se novamente aos núcleos, liberando energia na forma de radiação eletromagnética, a qual é captada e resulta no espectro a ser analisado.

Visto que o espectro é coletado após a formação do plasma, quando já não há ligações químicas entre os átomos, essa técnica presta-se à análise elementar, ou seja, permite identificar quais são os elementos químicos presentes na amostra, já que cada elemento possui suas energias de ligação características, que resultam em linhas distintas no espectro.

O equipamento é composto por uma fonte laser, uma lente focalizadora do laser sobre a amostra, um sistema de lentes coletoras que dirige a radiação emitida pelo plasma a uma fibra óptica, que por sua vez a conduz ao espectrômetro. Este decompõe a luz por meio de

uma rede de difração; os detectores registram as intensidades de cada ponto do espectro, enviando as informações ao programa apropriado.

As vantagens da técnica LIBS sobre as técnicas analíticas tradicionais são as seguintes: **1.** a extrema rapidez das análises, dispensando ou reduzindo consideravelmente o preparo das amostras; **2.** embora seja um método destrutivo, a porção destruída da amostra é consideravelmente pequena (da ordem de  $10^{-6}$ g); **3.** presta-se à análise de amostras em qualquer estado físico, isto é, sejam sólidas, líquidas ou gasosas; **4.** como técnica de análise elementar, é capaz de detectar todos os elementos simultaneamente, num único espectro, bastando que o equipamento cubra um intervalo suficientemente grande de comprimentos de onda, como de fato acontece em muitos modelos comercializados; e **5.** pode ser facilmente reduzido e transformado num equipamento portátil.

As desvantagens do LIBS são basicamente duas. A primeira é que os limites de detecção são altos em comparação aos de outras técnicas, o que torna inviável a detecção de elementos presentes em baixas concentrações. E a segunda deve-se ao próprio caráter inovador e experimental da técnica, que, sendo ainda muito recente, tem um número relativamente reduzido de aplicações que possam ser tomadas como referência, e não existem ainda metodologias bem estabelecidas para sua utilização [SANTOS et al., 2006].

A espectroscopia de plasma induzido por laser tem encontrado aplicações principalmente na química analítica. No Brasil, grande parte dos esforços se dirige a aplicações no campo da agricultura, especialmente na ciência dos solos [SILVA, 2008; FERREIRA et al., 2009]. No contexto da citricultura, a única aplicação para essa técnica encontrada na literatura especializada foi proposta em um estudo de nutrientes [OHTA et al., 2009]. A técnica é tradicionalmente apenas qualitativa, mas esforços bem-sucedidos têm resultado na extração de boas informações quantitativas sobre a concentração de diversos elementos nas amostras estudadas [SILVA, 2008; FERREIRA et al., 2009; FERREIRA et al., 2008; PANDHIJA et al., 2010].

## **2.4. Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR)**

O PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica de análise genética *in vitro* muito utilizada nas ciências médicas e biológicas. Ela se baseia na ação da polimerase, nome dado ao conjunto das enzimas responsáveis pela montagem das cadeias de DNA ou RNA, que contêm a informação genética do organismo. A aplicação do método é precedida pela

preparação da amostra, durante a qual o DNA do tecido analisado é extraído e isolado em solução. O PCR permite saber se um dado fragmento de código está ou não presente na solução. Para isso, utiliza-se uma substância que recebe o nome de *primer*, e que consiste em um fragmento de RNA correspondente ao trecho de DNA cuja presença se deseja averiguar. O *primer* se liga quimicamente ao fragmento procurado, se ele estiver presente na solução, permitindo que a polimerase entre em ação e duplique de maneira cíclica o fragmento procurado, bastando que haja disponibilidade de material na solução, isto é, de nucleotídeos. Após  $n$  ciclos, cada exemplar do fragmento de DNA procurado é transformado em  $2^n$  fragmentos idênticos, o que equivale a mais de um trilhão em apenas quarenta ciclos, em um processo que se desenvolve em menos de duas horas. Os fragmentos replicados são então separados e identificados por meio de eletroforese em gel ou técnica equivalente.

O método de RT-PCR, ou *Real-Time Polymerase Chain Reaction*, é uma variação do PCR que permite não só a detecção, mas também a quantificação do fragmento genético encontrado – e portanto, indiretamente, da célula que o continha. O RT-PCR utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação. Uma sonda (pequeno fragmento de DNA) marcada com corante fluorescente (fluoróforo na posição 5' da sonda), específica para um segmento gênico da *Candidatus Liberibacter asiaticus*, é capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original. Dessa forma, se na reação de amplificação de uma amostra de DNA onde a bactéria esteja presente a sonda irá hibridizar e, quando degradada, a fluorescência é captada pelo equipamento resultando em sinal positivo para presença da bactéria naquela amostra.

Trata-se da técnica mais confiável à disposição para o diagnóstico atualmente, e por isso decidiu-se utilizá-la para validação dos resultados das técnicas utilizadas neste trabalho. Dessa forma, torna-se possível verificar se as alterações eventualmente observadas ao longo do experimento, tanto nos espectros de LIFS e LIBS quanto nas imagens de LIFI, podem ser correlacionadas com o aumento da concentração de bactérias nas folhas analisadas.

A técnica se presta a análises microbiológicas, virológicas, imunológicas e hematológicas, além de monitoração de transplante de órgãos e diagnóstico pré-natal [DORAK, 2006]. Bioquímica, biologia celular, medicina veterinária e ciências forenses, das plantas e dos alimentos também têm se beneficiado amplamente dessa técnica. No campo da citricultura, tem sido usada especialmente no estudo de doenças causadas por vírus, mas também de doenças bacterianas como a clorose variegada dos citros (CVC) e o próprio greening, em várias partes do mundo, sobretudo nos últimos cinco anos [WANG et al., 2009;

ANANTHAKRISHNAN et al., 2010; PERONI et al., 2008; BENYON et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008].

## 2.5. Métodos de análise

### 2.5.1. Análise de componentes principais

O PCA (*Principal Component Analysis*) é uma ferramenta de análise multivariada muito difundida em diversos meios. Suas principais aplicações encontram-se nas áreas relacionadas à química analítica, à estatística e à informática. Nessa última, encontra-se sobretudo em métodos de transmissão de dados, ao passo que na primeira é empregado como precioso auxílio na análise de resultados experimentais, a ponto de ter se tornado uma das metodologias mais fundamentais da disciplina denominada quimiometria.

Em essência, a análise de componentes principais consiste na definição de um novo sistema de coordenadas cujas propriedades são de interesse para uma análise mais eficiente dos resultados. A matriz de dados, de tamanho  $m \times n$  (podem ser, por exemplo,  $m$  espectros, cada um contendo  $n$  pontos), é tomada como um conjunto de  $m$  pontos dispersos num espaço de  $n$  dimensões. O novo sistema de coordenadas terá sua origem no centróide ou “centro de massa” do conjunto, e as direções de seus eixos é definida pela matriz de covariância. A covariância de duas variáveis  $x_a$  e  $x_b$  (no exemplo em questão, as intensidades relacionadas a dois diferentes comprimentos de onda), denotada por  $\text{cov}(x_a, x_b)$  é definida pela seguinte expressão:

$$\text{cov}(x_a, x_b) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_a(i) - \bar{x}_a)(x_b(i) - \bar{x}_b)$$

Note-se que  $\text{cov}(x_a, x_b) = \text{cov}(x_b, x_a)$ , e que a covariância de uma variável consigo mesma é sua variância, ou seja,  $\text{cov}(x, x) = \text{var}(x)$ . Os elementos  $C_{ij}$  da matriz de covariância são definidos como  $\text{cov}(x_i, x_j)$ , sendo os índices  $i$  e  $j$  definidos segundo a ordem dos comprimentos de onda do espectro. Portanto, a matriz é simétrica ( $C_{ij} = C_{ji}$ ) e ortogonal, e os elementos da diagonal principal são não-negativos. A soma desses elementos, ou traço da matriz, fornece a variância total do conjunto.

É possível demonstrar que a soma dos autovalores da matriz de covariância é igual ao seu traço. Cada autovalor representa uma determinada parcela da variância original dos dados,



e essa é a variância que existe na direção do autovetor correspondente. Isso significa que, se os autovalores forem ordenados de modo decrescente, resultará daí que a direção definida pelo primeiro autovetor possuirá uma variância maior que a variância de qualquer direção ortogonal a ela – pois, visto que a matriz é ortogonal, todos os autovetores são ortogonais entre si. A direção definida pelo segundo autovalor terá variância maior que todas as direções restantes, e assim por diante, até chegar às últimas direções possíveis, cuja variância é desprezível.

Na verdade, pode-se demonstrar também que a direção definida pelo primeiro autovetor é não só maior que a associada aos demais autovetores, mas é também a direção de maior variância possível para aquele conjunto de dados. Analogamente, a direção dada pelo segundo autovetor é a de maior variância possível dentre as ortogonais ao primeiro; a dada pelo terceiro autovetor é a de maior variância possível dentre as ortogonais aos dois primeiros simultaneamente, e assim por diante. Essas direções são denominadas “componentes principais”, derivando daí o nome da ferramenta. A direção associada ao primeiro autovalor é chamada de “primeira componente principal”; a associada ao segundo autovalor, “segunda componente principal”; e assim por diante. Utilizam-se também as abreviações PC1, PC2, etc.

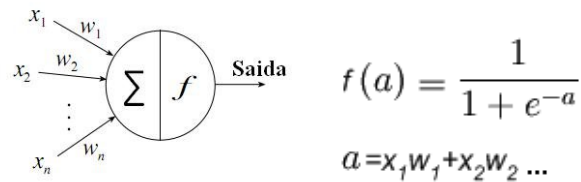
O efeito da aplicação da mudança de coordenadas em questão é, portanto, o de concentrar tanto quanto possível a variância total dos dados originais em um número relativamente pequeno de dimensões. Em muitos casos, esse número é muito menor que o número de variáveis original: para os dados de espectroscopia de fluorescência induzida por laser apresentados neste trabalho, por exemplo, a primeira componente principal abarca sozinha mais de 98% da variância original dos espectros, os quais contêm mais de dois mil pontos – e, portanto, mais de duas mil dimensões.

Ao preservar a quase totalidade da variância, o PCA preserva também a quase totalidade da informação potencialmente útil para a classificação, visto que a detecção de diferenças entre classes de espectros pressupõe a existência de diferenças entre os espectros, o que implica na existência de variância. Eis a razão da imensa utilidade dessa ferramenta: ela preserva a variância reduzindo drasticamente o número de variáveis. A análise de componentes principais não é em si mesma um método de classificação, mas seu resultado é vantajoso para qualquer método de classificação ou análise de que se deseje fazer uso em seguida. Em razão da redução do número de variáveis, a criação de classificadores de qualquer tipo se torna muito mais fácil e rápida. E, mesmo para a mera análise gráfica visual, é mais fácil observar o comportamento de umas poucas variáveis que o de centenas ou milhares delas.

## 2.5.2 Redes neurais artificiais

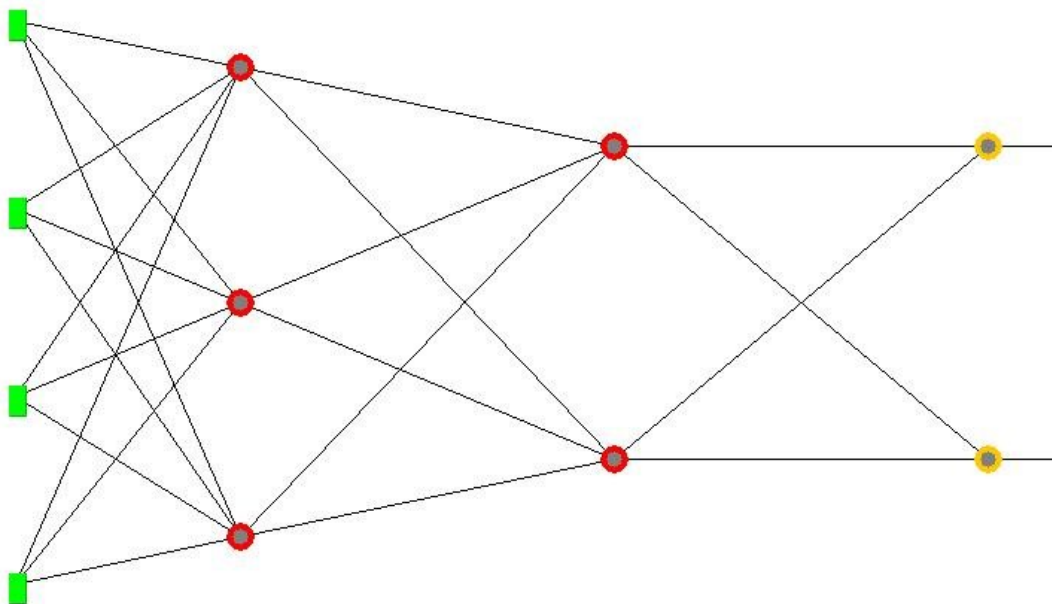
As redes neurais artificiais constituem uma ferramenta poderosa que encontram aplicações em diversas áreas, mas principalmente na informática, na engenharia elétrica e na química analítica. Por sua versatilidade, é um método útil tanto para classificação quanto para calibração de dados, e por isso é uma ferramenta potencialmente útil em todas as ciências experimentais.

A estrutura interna de uma rede neural artificial é complexa, mas seu princípio de funcionamento é redutível à interação entre suas unidades, os neurônios. O esquema de um deles é mostrado na figura 2.6. Cada neurônio recebe um determinado número  $n$  de variáveis de entrada, designados por  $x_i$  ( $i = 1, \dots, n$ ) e produz, em função delas, um determinado valor de saída. Os neurônios utilizados nas redes neurais deste trabalho utilizam uma função  $f(x_1, \dots, x_n)$  da forma mostrada na equação abaixo. Os coeficientes  $w_i$ , comumente chamados de “pesos”, podem variar de um neurônio para outro, assim como o próprio número  $n$  de variáveis de entrada [KHAN et al., 1999].



**Figura 2.6.** Esquema de um neurônio artificial e seu funcionamento, mostrando como ele produz um valor de saída a partir dos valores de entrada e dos coeficientes ou “pesos”.

A natureza das variáveis de entrada depende da posição do neurônio na rede, que usualmente possui duas ou três camadas de neurônios. A figura 2.7 mostra uma rede simplificada, com duas camadas e apenas sete neurônios. As variáveis de entrada dos neurônios da primeira camada são os próprios dados fornecidos pelo usuário, sejam eles quais forem. Os neurônios da segunda camada, por sua vez, utilizam como variáveis de entrada os valores de saída dos neurônios da primeira camada. E os da terceira camada usam como variáveis de entrada os valores de saída resultantes da segunda camada.



**Figura 2.7.** Esquema de uma rede neural artificial. Os retângulos representam as variáveis de entrada, e os círculos representam os neurônios.

O número de neurônios da camada final corresponde ao número de classes sob as quais a rede neural pode enquadrar uma dada amostra. A rede acima possui dois neurônios na camada final, assim como a maior parte das redes que serão utilizadas neste trabalho. Isso significa que ela pode fornecer duas respostas possíveis, isto é, pode enquadrar cada amostra em uma de duas classes existentes. O valor de saída de cada neurônio está restrito ao intervalo aberto  $]0,1[$ , visto que o contradomínio da função  $f$  está restrito a esse intervalo, independentemente dos valores adotados para os pesos. Portanto, as respostas finais A e B terão também valores definidos nesse intervalo. O algoritmo treinador da rede tentará construí-la de modo que, para amostras pertencentes à classe A, o valor final do neurônio A seja próximo de 1 e o do neurônio B seja próximo de 0. O contrário, naturalmente, deverá acontecer para as amostras pertencentes à classe B [ROJAS, 2006].

O modo de fazer com que isso aconteça consiste em encontrar um valor apropriado para cada um dos coeficientes de cada neurônio. É isso que procura fazer o algoritmo treinador da rede. Existem vários tipos de algoritmos aptos ao desempenho dessa tarefa; para os fins deste trabalho, optou-se pelo assim chamado *backpropagation*. A explicação do funcionamento desse algoritmo não será dada aqui de maneira detalhada, e o leitor interessado pode encontrá-la em [BERNACKI, 2004]. Contudo, os princípios gerais serão delineados abaixo, para que se possa compreender o papel desempenhado pelos parâmetros escolhidos para as redes neurais utilizadas neste trabalho.

O algoritmo *backpropagation* procura o valor apropriado para os pesos por meio de um processo cíclico que, partindo de valores aleatoriamente definidos, busca o deslocamento gradual rumo a uma configuração na qual o erro seja o menor possível. Isso é feito mediante a comparação entre o resultado esperado e o efetivamente obtido para cada amostra. A diferença entre esses dois valores é o erro, e o algoritmo corrige todos coeficientes na tentativa de reduzir o erro global, que é dado pela soma dos quadrados dos erros associados a cada amostra. Esse processo constitui um ciclo da execução do programa. A rede resultante, com os coeficientes corrigidos, é submetida ao mesmo processo, repetindo o ciclo. O **tempo de treinamento** do algoritmo determina o número de ciclos empregados. Outros dois parâmetros importantes estão associados à correção implementada ao final de cada ciclo: a **taxa de aprendizado** e o **momento**. A primeira determina diretamente a intensidade da variação imposta a cada coeficiente, que pode ser suave ou abrupta. O segundo está vinculado à “memória” do algoritmo, permitindo que o valor das correções feitas nos ciclos anteriores interfira em maior ou menor grau no valor da correção atual.

Embora o algoritmo seja, sem dúvida, muito mais complexo, o princípio essencial é o mesmo que opera no ajuste de uma função aos dados experimentais usando a regressão pelo método dos mínimos quadrados: ajustar apropriadamente os coeficientes de modo a obter uma estimativa correta a partir dela. A versatilidade das redes neurais artificiais reside justamente no grande número de coeficientes – da ordem de centenas, neste trabalho – e na forma das funções resultantes de cada neurônio, os quais permitem a simulação de funções muito complexas.

### 3. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é disponibilizar para o setor produtivo citrícola um método preciso e economicamente viável para o diagnóstico do greening (HLB).

Os objetivos específicos deste trabalho podem ser enunciados da seguinte maneira:

1. Avaliar o potencial da técnica de espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS) para realizar o diagnóstico do greening em citros durante a fase sintomática da doença.
2. Avaliar o potencial da técnica LIFS para realizar o diagnóstico do greening em citros durante a fase assintomática da doença.
3. Construir um classificador capaz de diagnosticar doenças em plantas cítricas a partir de espectros de fluorescência obtidos de suas folhas.
4. Elaborar um estudo suficientemente rigoroso, tanto do ponto de vista qualitativo como do quantitativo, do desempenho da técnica de diagnóstico por LIFS em comparação com o método de diagnóstico por inspeção visual para o diagnóstico do greening em citros durante a fase assintomática da doença.
5. Testar a viabilidade do uso, para o mesmo fim, da técnica de imagens de fluorescência induzida por laser (LIFI), comparando-a com a LIFS e com a inspeção visual.
6. Testar a viabilidade do uso, para o mesmo fim, da técnica de espectroscopia de emissão atômica com plasma induzido por laser (LIBS), comparando-a com a LIFS e com a inspeção visual.

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1. Diagnóstico em condição de campo**

A fim de possibilitar o cumprimento do primeiro objetivo específico e de contribuir para o cumprimento do segundo, foram realizados dois experimentos com folhas extraídas de laranjeiras cultivadas ao ar livre: **1.** o experimento com copa Pêra-rio enxertada em limoeiro Cravo (Fazenda Bocaina) e **2.** experimento com copa Valência enxertada em citrumeleiro Swingle (Fazenda Citrícola).

#### **4.1.1. Experimento com copa Pêra-rio e porta-enxerto Cravo**

A fim de possibilitar o cumprimento do primeiro objetivo específico e de contribuir para o cumprimento do segundo, foram realizados dois experimentos com folhas extraídas de laranjeiras cultivadas ao ar livre. O primeiro deles foi realizado com amostras enviadas pelo grupo Louis Dreyfus Commodities. As folhas foram extraídas de árvores já adultas, todas as quais consistem em copas de laranjeira Pêra-rio enxertadas sobre limoeiro Cravo. Foram utilizados dois conjuntos de árvores: o das sadias e o das contaminadas por greening. De ambos os conjuntos foram coletadas folhas maduras. No primeiro caso, as folhas são consideradas sadias, enquanto no segundo as folhas foram denominadas doentes. As folhas doentes, por sua vez, dividem-se em duas categorias: a das que apresentam sintomas da doença (sintomáticas) e a das que, visualmente falando, não se distinguem das sadias (assintomáticas). Ao todo foram recebidas 120 folhas assintomáticas, 118 sintomáticas e 125 sadias. As amostras doentes vieram de laranjeiras plantadas na Fazenda Bocaina, localizada no município de Cravinhos, enquanto as sadias vieram da Fazenda São Francisco, situada no município de Sertãozinho, ambas na região de Ribeirão Preto, no Estado de São Paulo. Todas as plantas utilizadas nesse experimento foram declaradas sadias ou contaminadas por greening mediante análise genética por reação de polimerase em cadeia (PCR).

#### **4.1.2. Experimento com copa Valência e porta-enxerto Swingle**

O segundo experimento de campo foi realizado a partir de amostras enviadas pelo Grupo Fischer, as quais foram coletadas da Fazenda Citrícola, situada no município de Gavião

Peixoto, no interior de São Paulo. Assim como no experimento anterior, as folhas foram coletadas de árvores adultas. Os dois experimentos têm em comum ainda o fato de terem suas amostras divididas entre sadias e infectadas, sendo este último grupo subdividido em folhas sintomáticas e assintomáticas. Entretanto, no presente caso as plantas escolhidas possuíam copa de laranjeira Valência e porta-enxerto de citrumeleiro Swingle. Outra diferença importante é que não foi possível submeter as amostras à análise de PCR, tendo o estado das plantas sido determinado apenas por inspeção visual realizada por funcionários da fazenda. Desse modo, não é possível ter certeza de que as plantas incluídas nesta segunda categoria eram de fato sadias. É seguro assumir, contudo, que boa parte delas não havia sido infectada pela bactéria causadora do greening, pois, além de não apresentarem sintoma algum, foram propositalmente escolhidas em um talhão com baixa ocorrência da doença. As plantas doentes foram classificadas como tais por terem apresentado os sintomas característicos do greening. Dessa forma, o conjunto consistiu de três grupos de amostras: sadias, isto é, retiradas de árvores sem sintomas e com baixa probabilidade de contaminação; assintomáticas, ou seja, sem a clorose característica, mas retiradas de árvores que apresentam sintomas; e sintomáticas, que manifestaram a clorose característica do greening. Foram coletadas e analisadas cem folhas de cada um desses três grupos.

## **4.2. Avaliação da precocidade do diagnóstico**

A fim de avaliar o potencial das técnicas de espectroscopia de fluorescência induzida por laser, imagens de fluorescência induzida por laser e espectroscopia de emissão atômica com plasma induzido por laser para a realização do diagnóstico precoce do greening em citros, foi montado um experimento para avaliação periódica de um conjunto de mudas, incluindo tanto espécimes sadios quanto inoculados com a bactéria. Essas mudas forneceram amostras para os procedimentos experimentais descritos a seguir, bem como para comparação usando a técnica de diagnóstico por reação de polimerase em cadeia (PCR).

### **4.2.1. Preparação das mudas**

O conjunto consistiu de duzentas mudas de laranjeira Valência (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertadas sobre citrumeleiro Swingle [*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. A escolha da copa e do porta-enxerto foi feita com base na elevada importância

comercial dessa combinação em escala mundial e crescente utilização por citricultores brasileiros [POMPEU JÚNIOR et al., 2008]. A estufa que abrigou as mudas utilizadas neste trabalho situa-se no Centro de Citricultura do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), localizado no município de Cordeirópolis-SP.

Metade das mudas foi conservada sadia, enquanto a outra metade sofreu a inoculação artificial da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* pelo processo de enxertia de borbulha. Essa variedade da bactéria foi escolhida por ser o tipo predominante atualmente nos pomares paulistas, e também por não ser sensível às altas temperaturas, ao contrário do que ocorre com os tipos *africanus* e *americanus* [GRAÇA, 1991; LOPES, J. R. S., 2010]. Ambos os conjuntos foram enxertados também com uma estirpe fraca protetora do vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* – CTV), por ser esse um procedimento adotado por todos os grandes produtores do país com o intuito de premunização contra estirpes fortes do vírus. A inoculação do vírus foi feita, portanto, para tornar as mudas mais semelhantes às plantas usualmente cultivadas nas fazendas.

Outro procedimento adotado durante a fase de preparação das mudas foi a poda, efetuada anteriormente à inoculação. A poda visa estimular um novo fluxo vegetativo com novas brotações, favorecendo a manifestação dos sintomas. As mudas foram mantidas em casa de vegetação e receberam tratamento idêntico ao longo de todo o experimento no que diz respeito a temperatura, irrigação, adubação, podas e outros procedimentos de manejo. Além disso, essa condição garantiu que as plantas não inoculadas permanecessem sadias ao longo de todo o experimento, uma vez que não tiveram contato com, o psilídeo *Diaphorina citri*. A escolha de mudas ao invés de plantas adultas foi necessária, em primeiro lugar, por uma questão de economia de espaço, mas também foi conveniente devido ao fato de que as mudas tendem a manifestar os sintomas mais rapidamente.

As mudas inoculadas com a bactéria foram numeradas de 1 a 100, e as sadias (não inoculadas) foram numeradas de 101 a 200. Depois disso, as mudas foram divididas em quatro grupos, que serão aqui designados pelas letras **A**, **B**, **C** e **D**. O grupo **A** compreende as mudas enumeradas de 1 a 25 e 101 a 125; o grupo **B** inclui as mudas 26 a 50 e 126 a 150; o grupo **C** abrange as laranjeiras numeradas entre 51 e 75 e entre 151 e 175; finalmente, o grupo **D** designa as mudas restantes, isto é, as de número 76 a 100 e 176 a 200. Assim, cada grupo foi composto por plantas inoculadas e sadias em igual quantidade. A tabela 4.1 exhibe essa divisão de maneira esquemática.



**Tabela 4.1.** Identificação dos grupos de plantas utilizadas no experimento de avaliação da precocidade do diagnóstico.

<b>Grupo</b>	<b>Plantas inoculadas</b>	<b>Plantas sadias</b>
<b>A</b>	1 a 25	101 a 125
<b>B</b>	26 a 50	126 a 150
<b>C</b>	51 a 75	151 a 175
<b>D</b>	76 a 100	176 a 200

As plantas dos grupos **A**, **B**, **C** e **D** foram inoculadas nos dias 15/06, 22/06, 29/06 e 06/07, respectivamente. Ou seja, os grupos foram inoculados em intervalos regulares de uma semana. Essa divisão foi adotada levando-se em conta o fato de que a quantidade de amostras era grande o suficiente para inviabilizar a medição de todas as amostras num curto intervalo de tempo, isto é, em um ou dois dias. Assim, cada semana foi dedicada à medição das amostras fornecidas por um dos grupos, segundo a ordem em que foram feitas as inoculações, resultando num ciclo aproximadamente mensal. Assim, por exemplo, as quatro primeiras semanas de análise foram designadas a partir deste ponto como “primeiro mês”, as quatro semanas subsequentes como “segundo mês”, e assim por diante. Em cada mês, todos os grupos foram analisados. Cada um dos quatro grupos foi medido após um idêntico número de semanas decorridas a partir da inoculação. A única exceção foi o último mês, quando os grupos **C** e **D** sofreram uma defasagem de uma semana em relação aos grupos **A** e **B**. Nessa época, porém, as mudas já estavam bem desenvolvidas, de modo que o efeito dessa defasagem não foi importante. As datas iniciais de cada sessão de medições estão listadas na tabela 4.2, abaixo.

**Tabela 4.2.** Datas da inoculação e das medidas para cada um dos quatro conjuntos do experimento de diagnóstico precoce.

<b>Grupo</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>Inoculação</b>	15/06/2009	22/06/2009	29/06/2009	06/07/2009
<b>Mês 1</b>	13/07/2009	20/07/2009	27/07/2009	03/08/2009
<b>Mês 2</b>	10/08/2009	17/08/2009	24/08/2009	31/08/2009
<b>Mês 3</b>	08/09/2009	14/09/2009	21/09/2009	28/09/2009
<b>Mês 4</b>	05/10/2009	13/10/2009	19/10/2009	26/10/2009
<b>Mês 5</b>	09/11/2009	16/11/2009	23/11/2009	30/11/2009
<b>Mês 6</b>	-	-	-	-
<b>Mês 7</b>	05/01/2010	11/01/2010	18/01/2010	25/01/2010
<b>Mês 8</b>	01/02/2010	08/02/2010	22/02/2010	01/03/2010

#### 4.2.2. Coleta das folhas

Como se pode observar na tabela 4.2, o experimento se estendeu por oito meses, tendo sofrido uma interrupção durante o sexto mês, no qual a rotina experimental foi impossibilitada por uma mudança de sala a que foram submetidos os equipamentos do Laboratório de Óptica e Lasers da Embrapa Instrumentação Agropecuária (LOLEIA). Dentre as cinquenta mudas de cada grupo, cerca de quinze mudas inoculadas e quinze sadias foram selecionadas para as análises. De cada uma delas foram coletadas três folhas. Essas folhas estavam sempre situadas na região superior da planta, possuíam aproximadamente a mesma idade e, na medida do possível, estavam livres de qualquer anomalia aparente. As amostras coletadas semanalmente por técnicos do IAC (Cordeirópolis) eram enviadas para análise na Embrapa Instrumentação Agropecuária (São Carlos). Na fase inicial do experimento, foi relativamente difícil encontrar folhas maduras o suficiente, ao passo que nos últimos meses tornou-se mais difícil encontrar folhas sem sinais de deficiência nutricional, sobretudo nas plantas inoculadas. (Para uma discussão desse fato, vide seção Resultados e discussão.)

#### 4.2.3. Preparação das amostras

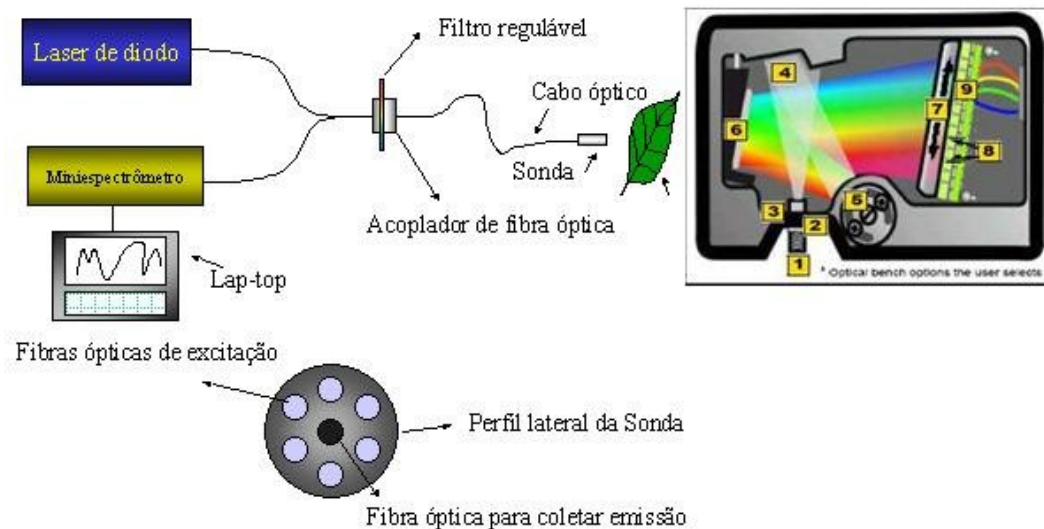
Uma vez coletadas e trazidas até o LOLEIA, as amostras eram limpas com algodão embebido em água destilada, a fim de eliminar a poeira e outros resíduos capazes de

prejudicar os resultados. As medidas de espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS) e imagens de fluorescência induzida por laser (LIFI) eram feitas menos de oito horas após a coleta, enquanto as medidas de espectroscopia de emissão atômica com plasma induzido por laser (LIBS) eram feitas no dia seguinte, menos de 24 horas após a coleta. A seguir serão descritos os equipamentos e procedimentos utilizados durante as medições.

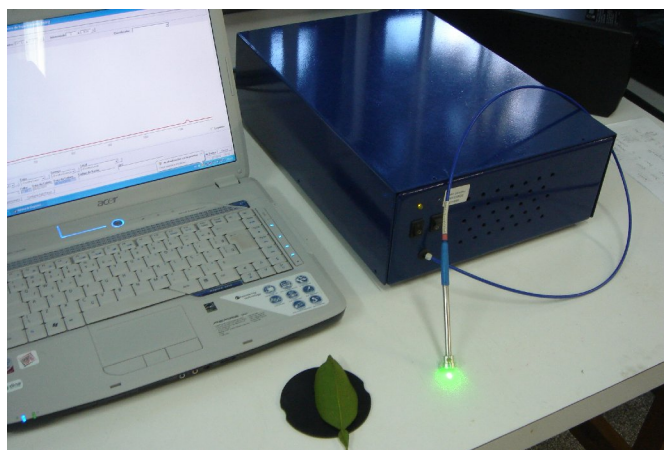
### **4.3. Técnicas experimentais**

#### **4.3.1. Espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS)**

O equipamento usado na aquisição de dados de LIFS é um sistema portátil montado no próprio LOLEIA. Esse sistema possui os seguintes componentes: um laser de diodo Coherent Compass 561-20, com emissão em 561nm e potência de 8mW, e um miniespectrômetro Ocean Optics USB2000, de 4,25nm de resolução, que decompõe a luz proveniente da amostra nos comprimentos de onda entre 541,43nm e 1197,59nm e envia os dados resultantes para o software gerenciador. Um sistema de fibras ópticas conduz o laser da fonte à amostra, coleta sua emissão e a envia ao miniespectrômetro. Um filtro óptico ajustável bloqueia parte da luz refletida, cuja elevada intensidade poderia causar danos ao miniespectrômetro. O equipamento possui um software chamado Diagnóstico, desenvolvido também no LOLEIA, por meio do qual o usuário gerencia a aquisição e armazena os dados dela resultantes. As figuras 4.1 e 4.2, apresentadas abaixo, mostram o esquema e uma imagem do equipamento:



**Figura 4.1.** Esquema do equipamento, incluindo a estrutura interna do miniespectrômetro e a seção transversal do cabo de fibras ópticas.



**Figura 4.2.** Imagem do equipamento usado para realização das medidas de LIFS.

Os parâmetros ajustáveis do equipamento são três: tempo de integração, número de médias e *boxcar*. O tempo de integração (em ms) é o tempo durante o qual o sistema capta a luz proveniente da amostra antes de dar início a uma nova contagem. O número de médias é a quantidade de espectros coletados para se obter um espectro médio que melhor represente a emissão da amostra. Essa estratégia também foi adotada a fim de se minimizar o ruído que, sendo aleatório, tende a ser suprimido com o cálculo da média, o que não ocorre com a emissão de fluorescência. O terceiro parâmetro é o *boxcar*. Trata-se um parâmetro de pré-tratamento do espectro usado em sua suavização; essa suavização se faz por meio de uma média, em cada ponto, envolvendo certo número de vizinhos de cada lado do ponto em

questão. Neste trabalho, foram adotados os valores de 30ms para o tempo de integração, 10 para o número de médias e 1 para o *boxcar*.

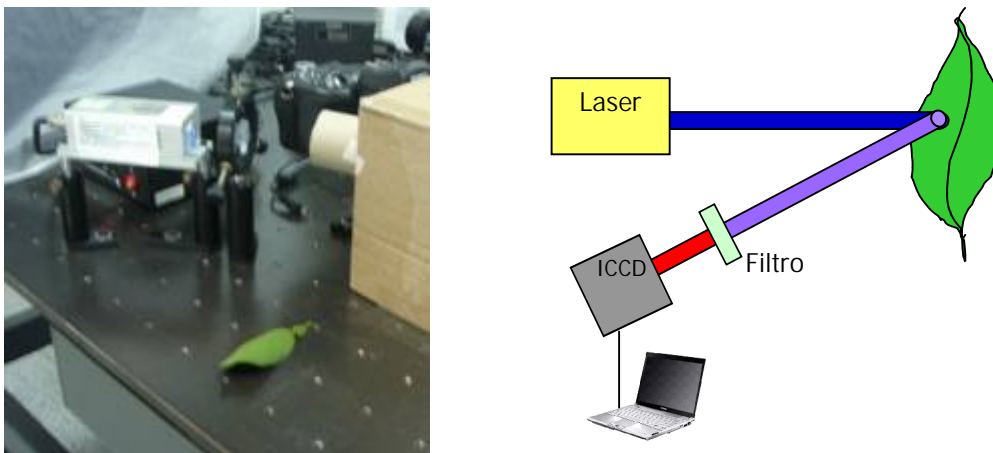
O procedimento experimental consistiu em posicionar a ponta da sonda, que contém a extremidade das fibras ópticas, perpendicularmente sobre a região ventral da folha, próximo ao pedúnculo, conforme a figura 4.3, por ser a região em que os espectros aparecem mais bem definidos [ZAGHI, 2008], tomando-se o devido cuidado para que a luz não incidisse diretamente sobre as nervuras da folha. Antes da coleta e armazenamento do espectro, cada amostra ficava exposta à excitação proveniente da fonte laser por cerca de um segundo, tempo suficiente para que a intensidade da fluorescência resultante atingisse seu valor máximo.



**Figura 4.3.** Imagem do instante da medida, mostrando a região da folha escolhida para a coleta.

#### **4.3.2. Imagens de fluorescência induzida por laser (LIFI)**

Os dados de LIFI foram obtidos a partir da mesma região da folha escolhida para aquisição dos espectros de LIFS. Foi utilizada uma câmera digital CCD da marca Sony, modelo Cybershot DCR-TRV27, com resolução de 8,0 megapixels. Sobre a região de interesse incidiu luz vinda de uma fonte laser Roithner Lasertechnik, cujo comprimento de onda é de 473nm (azul, portanto) e cuja potência foi mantida fixa em 5,0mW. A região iluminada é circular e possui cerca de 3cm de diâmetro. O aparato contém ainda um filtro óptico colorido da marca Melles Griot, colocado entre a câmera e a amostra; esse filtro bloqueia a luz de comprimento de onda inferior a 500nm, de modo a eliminar a forte reflexão e permitir que apenas a fluorescência seja captada pelo equipamento fotográfico. A aquisição dos dados foi feita num ambiente escuro.



**Figura 4.4.** À esquerda está a montagem do equipamento de aquisição de imagens. A fonte laser está posicionada no canto esquerdo, e é possível ver a câmera fotográfica. A caixa no canto direito contém a amostra. À direita está um esquema que ilustra o funcionamento do sistema de aquisição de dados.

#### 4.3.3. Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)

O equipamento utilizado no caso da espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) foi um sistema comercial de bancada da Ocean Optics, modelo LIBS2500plus, o qual conta com uma fonte laser de Nd:YAG que emite cada tiro num intervalo de 20ns e com uma energia de 50mJ. Outros dados são: taxa de repetição de até 500Hz, diâmetro do feixe laser próximo a 0,5mm. O sistema de aquisição é composto por um conjunto de sete espectrômetros que, através de um sistema de fibras ópticas, captam o espectro de 188nm a 966nm, com uma resolução óptica de 0,1nm, e o enviam ao software gerenciador, que é o OOIBase32, comercializado também pela empresa Ocean Optics. O primeiro dos sete espectrômetros capta a radiação incidente de comprimento de onda entre 188nm a 292nm; o segundo, de 292nm a 383nm; o terceiro, de 383nm a 507nm; o quarto, de 507nm a 618nm; o quinto, de 618nm a 716nm; o sexto, de 716nm a 800nm; e o último capta no intervalo entre 800nm e 966nm. Foram dados dois tiros para a aquisição de cada espectro.

O LIBS, como já foi dito, é uma técnica destrutiva, embora a massa perdida para a captação de cada espectro seja da ordem de apenas 20µg ou menos, o que de modo algum inviabiliza o aproveitamento da amostra para realização de outras análises. Contudo, foi constatado que a pequena incisão feita nas partes mais finas da folha (ou seja, fora das nervuras) é ocasionalmente suficiente para atravessá-la; esse fato poderia comprometer a confiabilidade dos resultados, visto que torna possível a presença de plasma formado a partir do anteparo subjacente à amostra. Para evitar esse risco, optou-se por adquirir todos os

espectros a partir da nervura central da folha. Uma importante razão adicional para a adoção desse procedimento reside no fato de que a bactéria se concentra na nervura central mais que em outras partes da folha. Assim, a escolha dessa região torna mais provável a obtenção de padrões espectroscópicos próprios causados também pela presença da bactéria, e não apenas pelo desequilíbrio químico gerado na planta pela doença.

A fim de manter o foco do laser sobre a amostra, esta foi posicionada de maneira apropriada e mantida tão plana quanto possível por duas placas de alumínio dotadas de um orifício central e fixadas com presilhas. Foram coletados dez espectros de cada folha, colhidos de diferentes pontos da nervura central, de modo a contornar o problema de uma provável heterogeneidade da amostra, um fator com o qual essa técnica tem dificuldade de lidar em virtude da pouca quantidade de matéria amostrada [SILVA, 2008].

As figuras 4.5 e 4.6 mostradas abaixo exibem, respectivamente, o equipamento com suas principais partes constituintes e as marcas deixadas em uma das amostras após a medição.



**Figura 4.5.** Imagem do equipamento LIBS. À esquerda estão os espectrômetros; no centro, a câmara de ablação; à direita, a fonte do laser de Nd:YAG.



**Figura 4.6.** Imagem da nervura central de uma folha, mostrando as pequenas incisões feitas pelas medidas de LIBS.

#### **4.3.4. Extração de DNA das folhas**

Depois de concluídas as medições em todas as três técnicas, as amostras foram reenviadas ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC para realização das análises de RT-PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*). O procedimento experimental adotado neste caso, para cada folha, está dado nos passos a seguir:

1. Liofilização da folha;
2. trituração de 250mg do material resultante, em almofariz e com nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino;
3. transferência do pó para um tubo eppendorf de 2,0ml;
4. adição de 700µl de solução tampão de brometo de trimetilamônio cetílico (CTAB)-sarcosyl a 60°C, seguida de vortexação;
5. incubação dos tubos em banho-maria a 60°C durante 30min, com três sessões de agitação durante esse período;
6. resfriamento em temperatura ambiente, seguido da adição de 700µl de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção de 24:1;



7. centrifugação da solução a 12000rpm durante 8min;
8. transferência de 450µl da fase superior para um tubo de 1,7ml;
9. adição e mistura de 45µl de solução tampão de CTAB-sarcozyl a 60°C;
10. repetição dos itens 7 e 8, com extração de 400µl da fase superior;
11. adição de 400µl de solução tampão de brometo de CTAB a 60°C, seguida de mistura cuidadosa e 15min de repouso em temperatura ambiente;
12. centrifugação a 10000rpm durante 4min, seguida do descarte da solução sobrenadante;
13. dissolução da fase restante, em banho-maria a 65°C, durante 10min, em 400µl de água contendo 1% de solução de tris(hidroximetil)aminometano-HCl (tris-HCl) a 1M, 0,2% de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0,5M e 20% de solução de cloreto de sódio a 5M;
14. adição de 800µl de etanol absoluto resfriado a -80°C, seguida de repouso por 30min;
15. centrifugação a solução a 12000rpm e 4°C durante 10min;
16. remoção da solução sobrenadante, seguida de lavagem do precipitado com 700µl de etanol 70%;
17. centrifugação a 12000rpm e 4°C durante 5min;
18. secagem em estufa a 50°C durante 15min;
19. dissolução em 25µl da solução usada no item 13, mas sem cloreto de sódio, seguida da adição de RNase;
20. repouso da solução por 30min a 37°C, e por 12h a 4°C.

#### **4.3.5. Detecção da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* por RT-PCR**

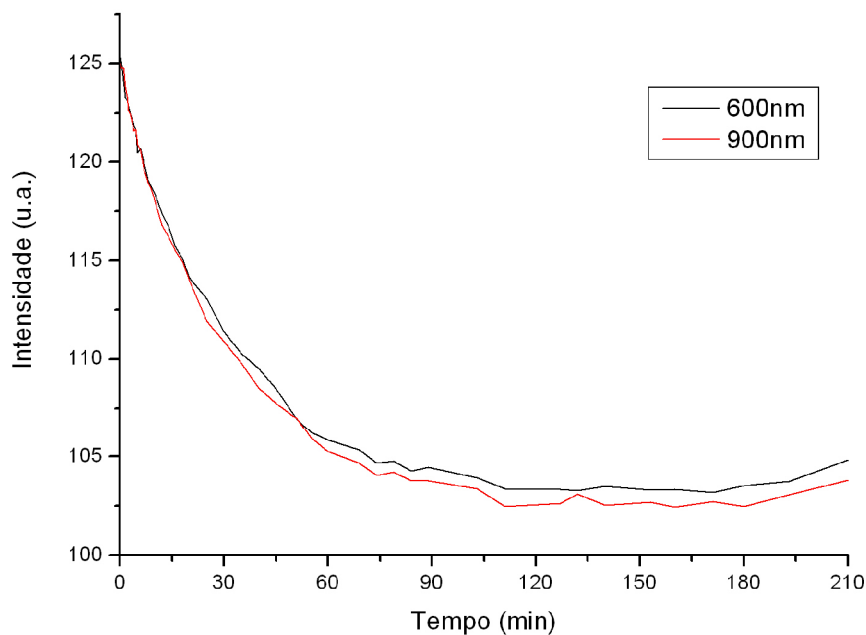
Os *primers* e sondas usados no ensaio foram desenhados por CARLOS et al., (2006) no software Primer Express (versão 2.0: Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) e sintetizados pela mesma empresa. Esse desenho foi com base na sequência do gene 16S rDNA de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (GenBank AY919311). Para cada coleta foram montadas placas de RT-PCR compostas pelas amostras, em duplicata, de DNA de uma muda sadia (sem bactéria) como controle negativo, por amostras de todas das mudas infectadas pela bactéria e pelo controle de amplificação (reação sem DNA). A amplificação, a aquisição dos dados e as análises foram feitas no equipamento ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems) com a versão 1.4 do software de análise SDS.

## 4.4. Análise dos dados

Ao longo deste trabalho foi produzida uma imensa quantidade de dados: cerca de 2.500 espectros de LIFS, o mesmo número de imagens de LIFI e cerca de 25 mil espectros de LIBS. A distinção entre os dados coletados por meio das diversas técnicas e a partir dos diversos grupos de amostras nem sempre é visualmente evidente. Sendo assim, fez-se necessário o uso de métodos avançados de análise multivariada, bem como de pré-processamento dos espectros e imagens. As redes neurais artificiais (ANNs) constituem a principal ferramenta utilizada, segundo o procedimento descrito no final da presente seção. Contudo, os dados obtidos por cada técnica passaram por etapas de pré-processamento adequadas, as quais serão descritas a seguir.

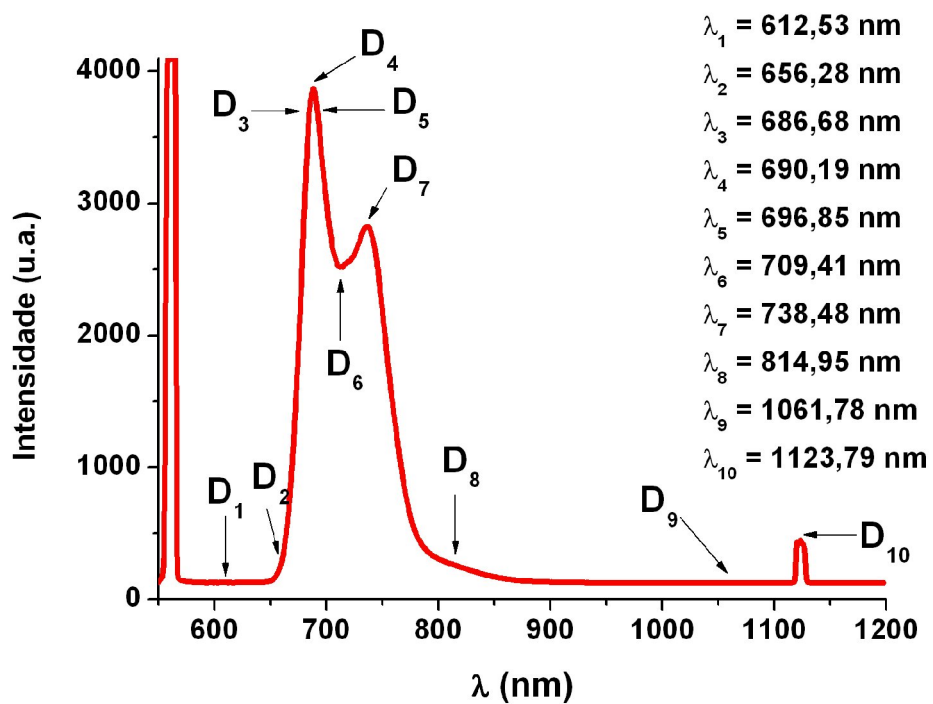
### 4.4.1. LIFS

Todos os espectros de LIFS receberam um pré-tratamento, que consistiu na correção da linha de base. Esse procedimento foi adotado após a constatação de que a intensidade da linha sofre variações com o tempo que, embora pequenas, podem ter algum efeito sobre os resultados. O efeito deve-se, provavelmente, a pequenas variações de temperatura do sistema (e não do ambiente), as quais podem afetar os diodos fotorreceptores presentes no miniespectrômetro. A figura 4.7 mostra o resultado de uma coleta de espectros feita ao longo de três horas e meia, durante as quais a fonte laser permaneceu ligada e a sonda foi mantida apontando fixamente para uma superfície lisa, situada a uma distância de cerca de 10cm. Não houve variações na luminosidade do ambiente, e a temperatura da sala foi mantida em 24°C. A contagem do tempo começa a partir do instante em que o equipamento é ligado. A figura mostra a variação da intensidade em função do tempo para dois comprimentos de onda, 600nm e 900nm, situados à esquerda e à direita, respectivamente, da banda de fluorescência: no intervalo de tempo em que as medidas são tipicamente feitas, de 30min a 2h após o início do funcionamento do laser, há um decréscimo persistente que leva a uma variação total de cerca de 7 unidades, ou 6% da intensidade inicial. A fim de evitar efeitos indesejáveis devidos a esse fenômeno, portanto, a linha de base foi corrigida para todo o espectro. Foi utilizado o software comercial Matlab para esse fim.



**Figura 4.7.** Intensidade da linha de base em 600nm e em 900nm.

Visto que o número de conexões (e, portanto, de coeficientes a serem ajustados) de uma rede neural artificial aumenta muito com o número de variáveis de entrada, a inclusão do espectro completo tornaria demasiado longo o tempo necessário para o treinamento da rede. Além disso, não há garantia de que o resultado seria o melhor possível, uma vez que a presença de intensidades associadas a regiões do espectro irrelevantes para a classificação correta teria o provável efeito de confundir o algoritmo gerador da rede neural. Por isso, optou-se, no caso dos espectros de LIFS, pela tentativa de captar as propriedades mais importantes do espectro por meio de um conjunto de índices descritores, os quais são calculados em função das intensidades relacionadas a certos comprimentos de onda particularmente importantes. Esses comprimentos de onda, por sua vez, contêm picos de fluorescência ou reflectância, ou ainda pontos de mínimo, por exemplo. Esses comprimentos de onda são indicados na figura 4.8, e os descritores calculados a partir de suas intensidades são mostrados na tabela 4.3.



**Figura 4.8.** Espectro típico de LIFS, indicando a posição e o valor dos comprimentos de onda utilizados para a composição dos descritores. O valor de  $D_9$  foi usado para correção da linha de base e, portanto, tem valor nulo em todos os espectros.

**Tabela 4.3.** Descritores utilizados na análise dos dados de LIFS.

<b>Descritor</b>	<b>Equação</b>
<b>F<sub>1</sub></b>	$D_4 / D_7$
<b>F<sub>2</sub></b>	$D_4 / D_{10}$
<b>F<sub>3</sub></b>	$D_7 / D_{10}$
<b>F<sub>4</sub></b>	$(D_4 - D_6) / D_{10}$
<b>F<sub>5</sub></b>	$(D_7 - D_6) / D_{10}$
<b>F<sub>6</sub></b>	$D_1 / D_{10}$
<b>F<sub>7</sub></b>	$(D_4 - D_7) / D_{10}$
<b>F<sub>8</sub></b>	$D_5 / D_{10}$
<b>F<sub>9</sub></b>	$(D_4 - D_6) / (D_7 - D_6)$
<b>F<sub>10</sub></b>	$\text{arctg} [ D_7 / (\lambda_9 - \lambda_7) ]$
<b>F<sub>11</sub></b>	$\text{arctg} [ D_1 / (\lambda_9 - \lambda_1) ]$
<b>F<sub>12</sub></b>	$\text{arctg} [ D_4 / (\lambda_9 - \lambda_4) ]$
<b>F<sub>13</sub></b>	$\text{arctg} [ (D_4 - D_6) / (\lambda_6 - \lambda_4) ]$
<b>F<sub>14</sub></b>	$\text{arctg} [ (D_7 - D_6) / (\lambda_7 - \lambda_6) ]$
<b>F<sub>15</sub></b>	$F_{10} \cdot F_{12}$
<b>F<sub>16</sub></b>	$F_{11} \cdot F_{13}$
<b>F<sub>17</sub></b>	$(D_5 - D_3) / D_{10}$
<b>F<sub>18</sub></b>	$D_2 / D_{10}$
<b>F<sub>19</sub></b>	$D_8 / D_{10}$
<b>F<sub>20</sub></b>	$D_3 / D_{10}$
<b>F<sub>21</sub></b>	$\text{arctg} [ D_6 / (\lambda_9 - \lambda_6) ]$
<b>F<sub>22</sub></b>	$(D_4 - D_3) / D_{10}$
<b>F<sub>23</sub></b>	$(D_4 - D_5) / D_{10}$

Esses descritores serviram como variáveis de entrada para as redes neurais artificiais. Testes preliminares mostraram que, no caso do LIFS, tais descritores são mais eficientes que as componentes principais, que foram usadas no caso das outras duas técnicas.

#### **4.4.2. LIFI**

A análise das imagens de fluorescência também não se deu sem um pré-processamento. Em cada imagem, foi selecionada uma região quadrada de duzentos pixels de lado. Dessa porção foram extraídos os histogramas RGB, e a partir desses resultados foram calculados ainda o brilho total, o RGB relativo e os histogramas HSI para cada imagem, segundo uma divisão em 256 bits. (Informações adicionais podem ser encontradas no capítulo Revisão Bibliográfica.) Os dez histogramas foram então reunidos num único arquivo, resultando num conjunto de 2560 valores associados a cada imagem. A partir disso, efetuou-se a análise de componentes principais (PCA), sendo empregadas as três primeiras componentes de cada conjunto. Esse valor foi escolhido após a realização de testes em que eram usadas de uma a sete componentes principais, sendo que o número sete foi escolhido por ser suficiente para incluir pelo menos 90% da variância original dos dados para todos os conjuntos analisados. Os resultados demonstraram que três componentes é a quantidade que maximiza o desempenho das redes neurais artificiais. A variância abrangida pelas três primeiras componentes principais varia entre os diversos conjuntos, com valores entre situados 75% e 88% da variância original dos histogramas reunidos; exceto para os conjuntos dos dois últimos meses, que resultaram em porcentagens significativamente inferiores: entre 64% e 68%. O procedimento computacional utilizado é bastante difundido, e o PCA foi feito através de um programa desenvolvido em linguagem Matlab.

#### **4.4.3. LIBS**

No caso dos espectros de LIBS, foi selecionada a região de 188nm a 292nm, correspondente à parcela captada pelo primeiro espectrômetro. Essa escolha foi motivada pelo fato de que, devido à alta resolução do equipamento, o tratamento do espectro todo seria muito dispendioso do ponto de vista computacional. Foi então calculada a primeira derivada dessa porção do espectro, segundo o bem conhecido método numérico da derivada simétrica de sete pontos. O resultado foi submetido à análise de componentes principais. As componentes principais resultantes de cada conjunto foram utilizadas como variáveis de entrada para as redes neurais artificiais, como no caso das componentes principais resultantes do pré-tratamento dos dados de LIFI. A diferença reside no fato de que, para a análise dos dados de LIBS, foram utilizados oito componentes principais, pois um estudo preliminar dos dados demonstrou que esse número fornece uma distinção mais acurada entre as classes

estudadas. Em todos os casos, a variância contida nas oito primeiras componentes principais incluiu pelo entre 61% e 88% da variância original do espectro. Todas essas operações foram feitas através do software Diagnóstico, acima mencionado.

#### **4.4.4. Redes neurais artificiais (ANNs)**

Uma das principais vantagens do PCA consiste justamente na possibilidade de fácil visualização do conjunto de dados em dimensões reduzidas, de modo a tornar possível um julgamento qualitativo e facilitar a comparação entre diferentes conjuntos. Contudo, o PCA não é em si mesmo um classificador de padrões, de modo que não pode, por si mesmo, fornecer um diagnóstico automático com base nas características da amostra, e tampouco é capaz de estimar quantitativamente o potencial de distinção de um dado conjunto. Da mesma forma, os descritores usados para os espectros de LIFS não oferecem resultados quantitativos com capacidade de discriminação individual e automática. Essa lacuna pode ser preenchida pela aplicação das redes neurais artificiais (ANNs). Uma rede neural é um autêntico classificador que, com base num método de aprendizado supervisionado, busca encontrar padrões de diferenciação no próprio conjunto, fornecendo um laudo específico para cada amostra nele presente.

Para a criação das redes neurais foi utilizado o software gratuito Weka, versão 3.6.1. Esse software foi desenvolvido por pesquisadores da Universidade de Waikato, Nova Zelândia, e conta com diversos algoritmos de aprendizado de máquina que podem ser utilizados em tarefas de mineração de dados [HALL et al., 2009]. Além da classificação de dados, utilizada neste trabalho, o Weka também oferece ferramentas de pré-processamento, regressão, agrupamento, visualização e desenvolvimento de regras de associação.

O programa lê os dados em um arquivo de extensão ARFF corretamente formatado, executa automaticamente o treinamento da rede neural e fornece estatísticas para o conjunto de dados. Cabe ao usuário escolher os parâmetros a serem empregados no treinamento da rede, os quais podem ter influência decisiva sobre a qualidade do resultado. Em vista do fato de que não existem critérios bem aceitos para escolha desses parâmetros, optou-se por testar, para cada conjunto de dados, um grande número de combinações de valores de parâmetros e escolher a que resultasse em um melhor desempenho. Os parâmetros testados para diversos valores foram: tempo de treinamento, taxa de aprendizado e momento (vide seção introdutória para uma explicação do significado desses parâmetros). Os parâmetros ótimos se mostraram consideravelmente diferentes para cada conjunto, conforme se nota na tabela 4.4.

**Tabela 4.4.** Parâmetros ótimos das redes neurais construídas para cada lote do experimento de diagnóstico precoce usando LIFS.

<b>Lote</b>	<b>Taxa de aprendizado</b>	<b>Momento</b>	<b>Tempo de treinamento</b>
<b>1</b>	0,5	0,2	100
<b>2</b>	0,15	0,2	150
<b>3</b>	0,4	0,2	100
<b>4</b>	0,3	0,2	50
<b>5</b>	0,1	0,2	100
<b>6</b>	0,3	0,26	600
<b>7</b>	0,3	0,2	300
<b>8</b>	0,06	0,2	340
<b>9</b>	0,32	0,2	90
<b>10</b>	0,25	0,2	2600
<b>11</b>	0,3	0,2	220
<b>12</b>	0,32	0,2	350
<b>13</b>	0,3	0,24	150
<b>14</b>	0,04	0,2	1300
<b>15</b>	0,3	0,2	500
<b>16</b>	0,18	0,2	430
<b>17</b>	0,14	0,2	50
<b>18</b>	0,29	0,19	190
<b>19</b>	0,25	0,01	700
<b>20</b>	0,3	0,2	100
<b>21-24</b>	-	-	-
<b>25</b>	0,1	0,26	400
<b>26</b>	0,45	0,19	410
<b>27</b>	0,27	0,18	500
<b>28</b>	0,2	0,21	530
<b>29</b>	0,3	0,4	50
<b>30</b>	0,3	0,2	300
<b>31</b>	0,3	0,2	100
<b>32</b>	0,05	0,15	3200



As redes neurais construídas para classificação dos dados de LIFS possuíam onze neurônios na primeira camada; para os dados de LIFI, esse número foi de apenas dois neurônios e, para os dados de LIBS, de cinco neurônios. Em todos os casos, a segunda e última camada continha dois neurônios.

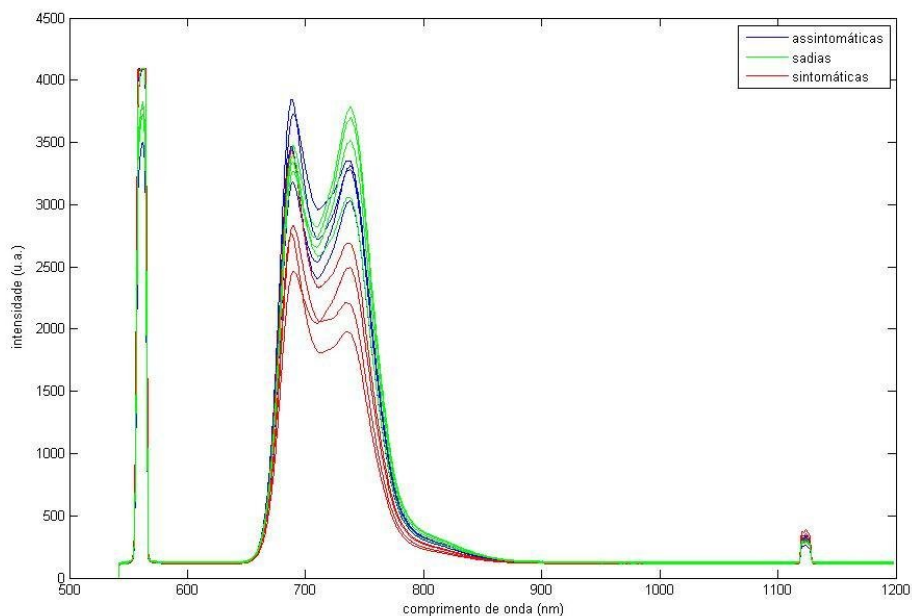
A estimativa da taxa de acerto para cada conjunto foi feita por meio do método de validação cruzada, com dez *fold*s. O software Weka também implementa automaticamente esse recurso. Seu princípio de funcionamento é simples: o conjunto de dados é dividido em dez grupos; em seguida, um deles é posto de lado enquanto o programa cria uma rede neural usando os outros nove; a rede resultante é então testada com o grupo que havia sido deixado de lado. Esse grupo é então reintegrado ao conjunto, e outro grupo é excluído; repete-se o mesmo processo até o último grupo. Assim, tem-se uma estimativa do poder de classificação da rede para um dado conjunto; por outro lado, o desempenho da melhor rede possível para um dado conjunto diz algo sobre o grau de separabilidade dos conjuntos de amostras nele presentes.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Diagnóstico em condição de campo

#### 5.1.1. Experimento com copa Pêra-rio e porta-enxerto Cravo

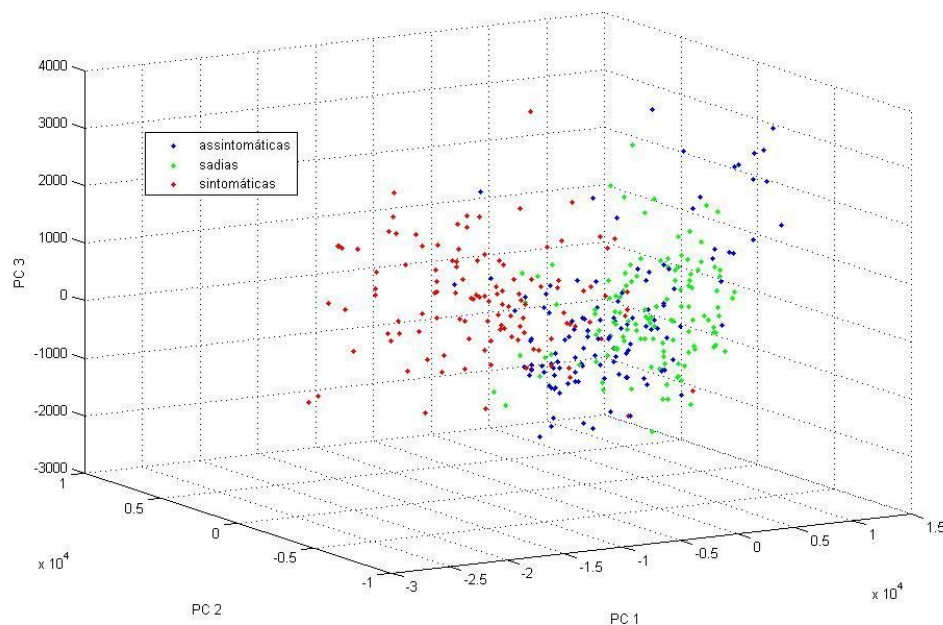
Na figura 5.1, mostrada abaixo, são apresentados espectros típicos de fluorescência induzida por laser para cada uma das classes (assintomáticas, sintomáticas e sadias) do conjunto de amostras de laranja Pêra-rio enxertada em Cravo, fornecidas pelo grupo Louis Dreyfus Commodities. A distinção visual existe para a classe das folhas sintomáticas em relação às outras duas, e se deve à diminuição na intensidade do espectro como um todo. Também parece haver uma distinção entre sadias e assintomáticas, devida sobretudo à maior intensidade do segundo pico (738nm) no caso das primeiras. Nesse caso, porém, a confusão entre as duas classes é mais acentuada.



**Figura 5.1.** Espectros típicos do conjunto de amostras de copa Pêra-rio e porta-enxerto Cravo.

A figura 5.2 mostra um gráfico de PCA desse mesmo conjunto de dados. Nota-se, mais uma vez, uma separação boa – embora não perfeita – entre as amostras sintomáticas e as

demais. Contudo, a distinção entre sintomáticas e sadias, embora não seja inexistente, é pouco definida.



**Figura 5.2.** Gráfico de PCA do conjunto de amostras de copa Pêra-rio e porta-enxerto Cravo.

A tabela 5.1 mostra a matriz de confusão gerada pela rede neural artificial. Os parâmetros usados foram: taxa de aprendizado 0,4, momento 0,2 e tempo de treinamento 140. Os acertos, destacados em negrito, somam 293, contra 70 erros – ou seja, a taxa de acerto global é de 81%. Os erros mais frequentes são confusões entre assintomáticas e sadias (36), seguidos pela confusão entre assintomáticas e sintomáticas (29). Essa tendência está de acordo com o que já indicava o PCA.

**Tabela 5.1.** Matriz de confusão do conjunto de amostras de copa Pêra-rio e porta-enxerto Cravo, divididas em três classes. O estado real das amostras é dado nas linhas, enquanto o diagnóstico fornecido pela ANN aparece nas colunas. As classificações corretas estão em negrito.

	Assintomática	Sadia	Sintomática
Assintomática	<b>91</b>	18	11
Sadia	18	<b>103</b>	4
Sintomática	18	1	<b>99</b>

Convém destacar o motivo pelo qual foram coletadas tanto folhas assintomáticas quanto sintomáticas. Esse motivo reside na necessidade de identificar todos os padrões espectrais que possam ser encontrados em plantas doentes e utilizados no diagnóstico. Além disso, tal procedimento é útil para fins de comparação com os resultados do experimento de diagnóstico precoce, que serão apresentados e discutidos a seguir. Essa utilidade se deve ao fato de que, entre as mudas artificialmente inoculadas e cultivadas em estufa, estiveram presentes tanto folhas assintomáticas quanto sintomáticas.

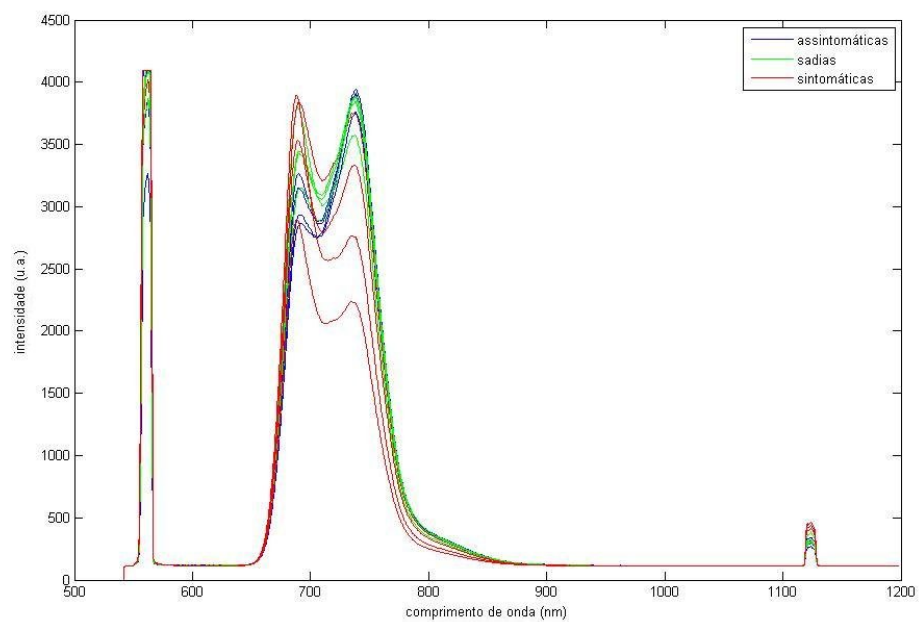
Para a realização do diagnóstico, contudo, a confusão entre assintomáticas e sintomáticas não é de fato um erro, visto que em ambos os casos a planta seria corretamente classificada como contaminada por greening. Portanto, uma estimativa correta da taxa de acerto no diagnóstico na fase sintomática da doença deve adotar uma divisão em duas classes, doentes e sadias, com número de amostras aproximadamente igual em cada uma delas. O resultado para 125 sadias e 125 doentes de ambos os tipos, escolhidas a esmo e mais ou menos igualmente distribuídas entre assintomáticas e sintomáticas, é o que se segue na tabela 5.2. A taxa de acerto global é de 87%.

**Tabela 5.2.** Matriz de confusão do conjunto de amostras de copa Pêra-rio e porta-enxerto Cravo, divididas em duas classes. O estado real das amostras é dado nas linhas, enquanto o diagnóstico fornecido pela ANN aparece nas colunas. As classificações corretas estão em negrito.

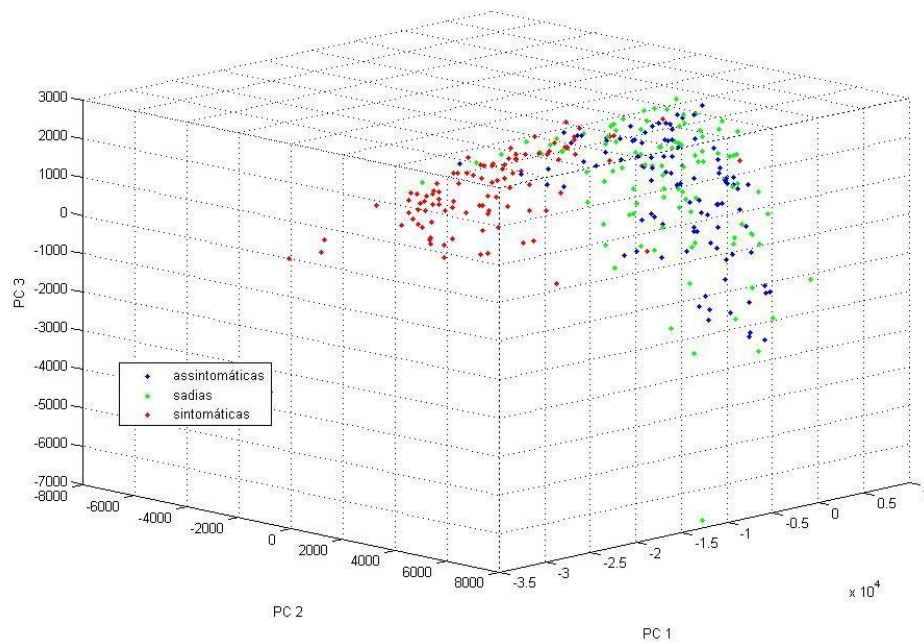
	Doente	Sadia
Doente	<b>115</b>	10
Sadia	22	<b>103</b>

### 5.1.2. Experimento com copa Valência e porta-enxerto Swingle

Da mesma forma que foi feito para o conjunto anterior, são exibidos abaixo os espectros típicos de cada classe e o gráfico do PCA para o conjunto de folhas de laranja Valência enxertada em citrumelo Swingle, fornecidas pela Grupo Fischer. Nota-se que há uma distinção entre as folhas sintomáticas e as demais, mas nenhuma diferença claramente visível entre sadias e assintomáticas.



**Figura 5.3.** Espectros típicos do conjunto de amostras de copa Valência e porta-enxerto Swingle.



**Figura 5.4.** Gráfico de PCA do conjunto de amostras de copa Valência e porta-enxerto Swingle.

A tabela 5.3, mostrada a seguir, contém a matriz de confusão da rede neural obtida para esse conjunto de dados, a qual foi treinada segundo os seguintes parâmetros: taxa de aprendizado 0,3, momento 0,2 e tempo de treinamento 650.

**Tabela 5.3.** Matriz de confusão do conjunto de amostras de copa Valência e porta-enxerto Swingle, divididas em três classes. O estado real das amostras é dado nas linhas, enquanto o diagnóstico fornecido pela ANN aparece nas colunas. As classificações corretas estão em negrito.

	Assintomática	Sadia	Sintomática
Assintomática	<b>69</b>	26	5
Sadia	34	<b>55</b>	11
Sintomática	2	11	<b>87</b>

A taxa de acerto global para essa configuração é de 70%. Percebe-se que o erro mais significativo se encontra na classificação das sadias, as quais recebem muito frequentemente o diagnóstico de assintomáticas; o contrário também acontece com frequência. Quando é construído um classificador que não leva em conta a distinção entre amostras assintomáticas e sintomáticas, usando cinquenta elementos de cada um desses tipos e cem folhas sadias, obtém-se a matriz de confusão exibida na tabela 5.4, e a taxa de acerto é muito parecida: 69%.

**Tabela 5.4.** Matriz de confusão do conjunto de amostras de copa Valência e porta-enxerto Swingle, divididas em duas classes. O estado real das amostras é dado nas linhas, enquanto o diagnóstico fornecido pela ANN aparece nas colunas. As classificações corretas estão em negrito.

	Doente	Sadia
Doente	<b>82</b>	18
Sadia	45	<b>55</b>

Em ambas as matrizes acima, mas sobretudo nesta última, é possível ver um contraste marcante com o dos resultados obtidos para o conjunto de amostras de Pêra-rio em Cravo, mostrados há pouco, que apresentou taxas de acerto globais de 81% e 87%. Tais taxas são muito superiores aos 70% e 69% obtidos aqui. Existem três explicações possíveis para esse fato, nenhuma das quais exclui necessariamente as demais.

A primeira é que talvez, por razões fisiológicas ou outras quaisquer, a combinação de variedades Valência/Swingle manifeste os efeitos do greening de maneira mais sutil que a combinação Pêra/Cravo. A veracidade dessa hipótese não implicaria forçosamente em diferenças de outros tipos – quanto aos sintomas visíveis, por exemplo –, mas sim somente em diferentes taxas de variação na concentração dos fluoróforos afetados pela luz de comprimento de onda 561nm, como as clorofilas a e b [ZAGHI, 2008]. É sabido que, quanto à manifestação dos sintomas, diferenças ainda mais intensas existem, por exemplo, em variedades de copa como a Hamilin. Infelizmente, porém, a investigação dessa hipótese foge demais aos objetivos deste trabalho e às possibilidades das ferramentas aqui utilizadas, de modo que a questão deve ser deixada em aberto para ser esclarecida por trabalhos futuros.

A segunda explicação possível se encontra na maior quantidade de plantas envolvidas no experimento que empregou amostras de Pêra-rio em Cravo. Cerca de oitenta plantas foram utilizadas nesse experimento, ao passo que apenas trinta foram analisadas no experimento envolvendo amostras de Valência em Swingle. A redução do número de plantas neste último foi necessária a fim de tornar viável a análise por PCR de todas elas. A menor diversidade de plantas pode ter tornado a correta classificação mais fácil para a ANN. Contudo, os dados coletados para a realização deste trabalho não são suficientes para a confirmação dessa hipótese, pois não foi possível identificar, no lote de amostras recebido, as folhas que foram extraídas de uma mesma planta. Não há, pois, evidência conclusiva da validade dessa conjectura, de modo que ela deverá ser estudada em trabalhos futuros.

A terceira explicação possível reside no fato de que o estado fitopatológico das amostras fornecidas pela Fischer foi diagnosticado somente por inspeção visual, não tendo sido possível confirmar por PCR o laudo emitido pelo técnico que realizou a coleta. Em decorrência disso, é bastante plausível a hipótese de que uma parcela significativa das amostras enviadas sob o rótulo de “sadias” tenham, na realidade, sido extraídas de plantas já infectadas, embora assintomáticas. Essa hipótese ganha ainda maior plausibilidade diante do resultado obtido pela rede neural artificial, cujo diagnóstico conflita mais frequentemente com o da inspeção visual justamente quanto às folhas consideradas sadias: segundo as matrizes de confusão acima, cerca de um terço das amostras “sadias” possuem padrão espectral semelhante ao das assintomáticas, e a taxa de acerto do classificador para as folhas sadias é de apenas 55%, contra 82% no caso anterior. Para as folhas doentes, as taxas de acerto correspondentes são de 82% e 92%. Há, portanto, diferenças entre os dois conjuntos de folhas doentes, mas essas diferenças são bem menores que as existentes entre os dois conjuntos de folhas sadias.

Este trabalho não possui meios de estimar precisamente a eficiência da inspeção visual. Contudo, é possível traçar um limite superior, partindo da hipótese de que o uso desse método sem o auxílio do PCR é a causa principal da diferença entre as taxas de acerto obtidas para os dois conjuntos. Nesse caso, o erro inerente à técnica LIFS, conforme foi adotada neste trabalho, é de cerca de 13%. Assim, a parcela restante do erro deve ser atribuída às limitações da própria inspeção visual. Neste experimento, portanto, o erro inerente à inspeção visual pode ser estimado em cerca de 21%, pois  $87\% - 79\% = 69\%$ , que é a taxa de acerto efetivamente obtida, considerando ambas as fontes de erro.

Entretanto, seria otimista demais estimar em apenas 21% (ou seja,  $100\% - 79\%$ ) o erro das inspeções visuais em geral. Não deve ser esquecido que as amostras sadias foram colhidas em regiões de baixa infestação. É de se esperar que em regiões com maior incidência de plantas com sintomas haja também mais plantas contaminadas pelo greening, mas que se encontram em fase assintomática. Assim, fatalmente, o erro inerente à inspeção visual crescerá de modo considerável. E de fato há evidências de que apenas 57,6% das plantas identificadas como doentes no campo manifestam sintomas, como atestam comparações entre os dados de inspeções visuais com laudos obtidos por RT-PCR. E a eficiência típica de uma inspeção visual é de apenas 47,6%, considerando-se apenas o universo das plantas sintomáticas [BELASQUE JÚNIOR, 2009]. Assim, dentre as plantas doentes situadas num dado pomar, uma inspeção visual típica identificará como tais cerca de 27,4%.

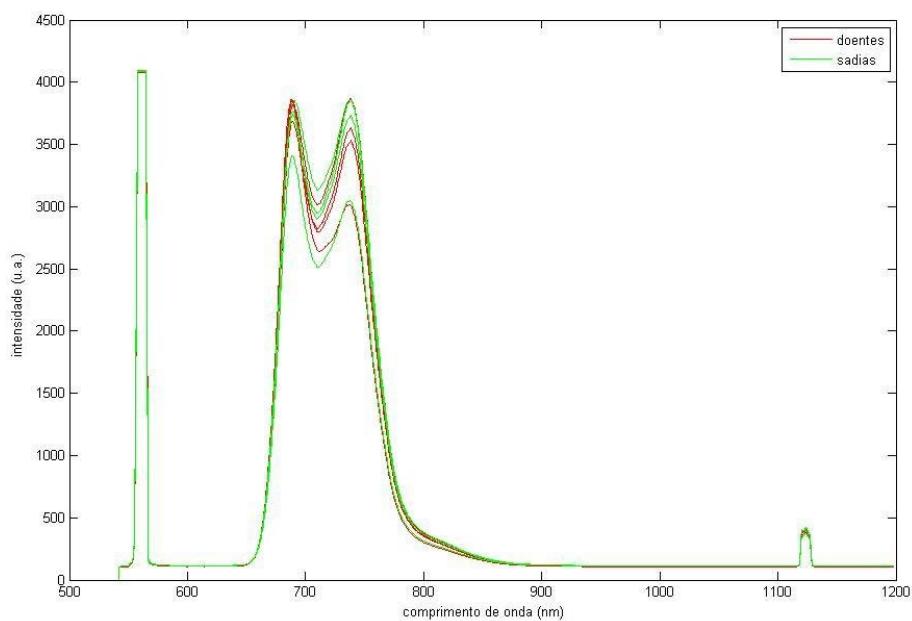
Em vista de tudo isso, a discrepância entre os resultados deste experimento e os apresentados no item 5.1.1 pode ser explicada pelas limitações da inspeção visual. Trata-se claramente de uma demonstração adicional das limitações desse método de controle da doença, mesmo em regiões de baixa infestação. Isso nos remete de volta ao problema mencionado na Introdução deste trabalho, que é justamente o que lhe serve de justificativa. Portanto, o resultado do experimento discutido no item 5.1.1 é a estimativa mais confiável da eficiência da técnica proposta neste trabalho para o diagnóstico do greening em pomares. Essa eficiência é de 87% - muito superior a qualquer outro método aplicável em grande escala. Na verdade, esse valor pode ser ainda maior, pois, como será mostrado na seção 5.2.4, o RT-PCR também possui um erro inerente.



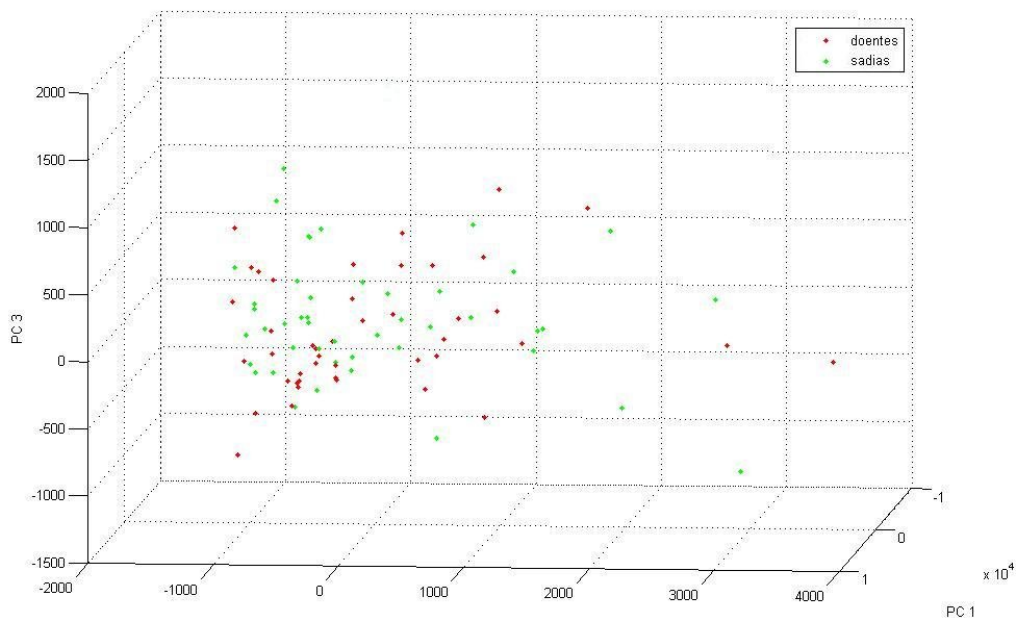
## 5.2. Avaliação da precocidade do diagnóstico

### 5.2.1. Espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS)

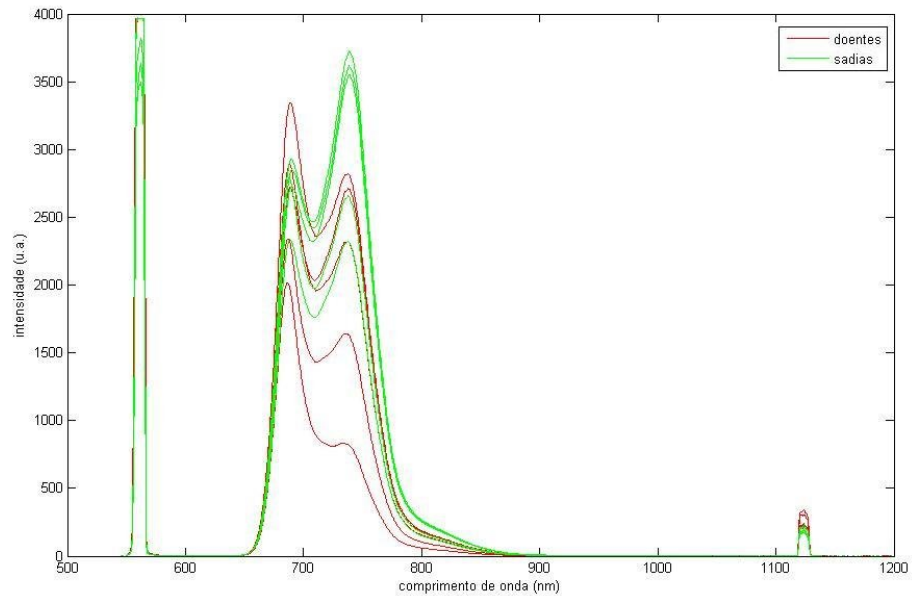
Dada a enorme quantidade de espectros levantados – 28 séries de medidas ao longo de oito meses – e a pouca dessemelhança dos espectros coletados ou gráficos de PCA, é desnecessário exibir todos neste trabalho. A título de exemplo, porém, as figuras 5.5 a 5.8 trazem os espectros típicos e o gráfico de PCA para dois dos conjuntos. O primeiro deles é o da nona semana, que corresponde ao terceiro mês do grupo A. Esse conjunto foi escolhido por ter produzido um resultado típico dos primeiros meses. Pode-se notar que a distinção visual entre espectros de folhas saudáveis e inoculadas a partir da forma do espectro ou do próprio PCA é quase impossível. O segundo conjunto é o da semana 31, ou seja, o conjunto do grupo C correspondente ao oitavo mês. Nesse caso, são possíveis tanto a distinção visual não só por meio do PCA mas também diretamente dos espectros, pois as folhas doentes produzem espectros em que o segundo pico é menos intenso que o primeiro.



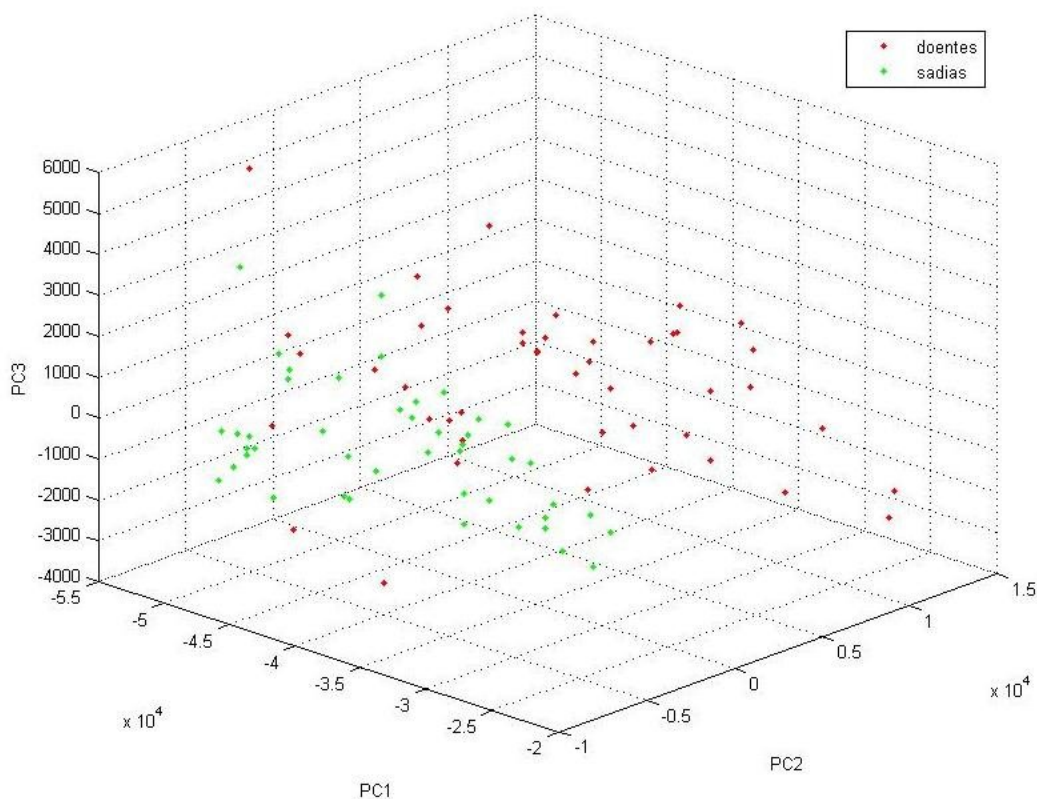
**Figura 5.5.** Espectros típicos do conjunto de amostras da nona semana do experimento de diagnóstico precoce.



**Figura 5.6.** Gráfico de PCA do conjunto de amostras da nona semana do experimento de diagnóstico precoce.



**Figura 5.7.** Espectros típicos do conjunto de amostras da trigésima primeira semana do experimento de diagnóstico precoce.



**Figura 5.8.** Gráfico de PCA do conjunto de amostras da trigésima primeira semana do experimento de diagnóstico precoce.

A tabela 5.5, apresentada a seguir, mostra os resultados da taxa de acerto global para cada um dos 28 conjuntos estudados. Analisando os dados abaixo, é possível fazer várias interessantes constatações, que serão expostas e discutidas em seguida.

**Tabela 5.5.** Taxas de acerto obtidas pelas ANNs para os dados de LIFS de cada um dos 28 lotes de amostras do experimento de diagnóstico precoce. A tabela contém ainda o valor médio e o desvio padrão para cada mês. Os laudos foram emitidos para cada folha.

Mês	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Média	Desvio padrão
1	56,3%	60,5%	42,3%	56,0%	53,8%	7,9%
2	65,5%	54,3%	53,8%	66,7%	60,1%	7,0%
3	63,2%	58,0%	74,4%	47,6%	60,8%	11,1%
4	59,8%	65,4%	65,4%	63,1%	63,4%	2,7%
5	69,0%	53,1%	53,4%	73,8%	63,1%	9,9%
6	-	-	-	-	-	-
7	70,1%	55,6%	73,1%	69,0%	66,9%	7,8%
8	74,7%	69,1%	87,1%	63,1%	73,5%	10,3%

Pode-se observar que não há um padrão claramente definido de progressão dos quatro grupos ao longo do tempo. As taxas de acerto de todos os grupos sofreram ao menos duas quedas consideráveis ao longo do experimento. Não há nenhuma correlação detectável entre as variações das quatro taxas de acerto ao longo do tempo. Alguns grupos experimentaram variações consideravelmente abruptas em certos meses: a maior variação positiva foi de 20,6% se deu no grupo C, na transição do segundo para o terceiro mês; e a maior variação negativa foi de 19,1%, e se deu no grupo D, também na transição entre os meses 2 e 3. Apesar disso, o comportamento médio de cada mês sofre uma nítida progressão ao longo do tempo, exceto por uma queda de apenas 0,3% do quarto para o quinto mês. Os aumentos mais expressivos da distinção média entre os conjuntos se deram nas transições entre os meses 1 e 2 e os meses 7 e 8: 6,3% e 6,6%, respectivamente. Isso significa que há uma tendência geral facilmente discernível, a despeito da ausência de tal tendência nos quatro grupos individualmente considerados.

A análise do desvio padrão mostra que, exceto no quarto mês, quando o desvio padrão caiu abruptamente a 2,7%, as dispersões associadas a cada mês se mantiveram sempre iguais ou superiores a 7%. Essa exceção não deve ser considerada significativa, visto que não se manteve nos meses seguintes. Não há nenhum indício de uma tendência ao aumento ou à diminuição da dispersão das taxas de acerto entre os quatro grupos ao longo do tempo.

Não é possível encontrar explicações precisas para todas as informações que podem ser extraídas da tabela 5.5. Apesar disso, é seguro inferir que em parte, pelo menos, a ausência de um padrão facilmente identificável – crescimento monotônico da distinção entre amostras sadias e inoculadas, bem como comportamento idêntico para cada um dos quatro grupos – pode ser atribuída à distribuição bastante desigual das manifestações químicas da presença da doença. Embora o greening seja uma doença sistêmica, a bactéria causadora não se distribui de maneira uniforme pelos ramos e folhas da planta; da mesma forma, seus efeitos podem se manifestar de maneira consideravelmente heterogênea.

Um indício disso pode ser encontrado no próprio fato de que a clorose característica dessa doença aparece inicialmente em umas poucas folhas; e, mesmo numa folha contaminada, o amarelecimento tende a ser consideravelmente assimétrico, atingindo algumas partes da superfície foliar e deixando intactas outras partes. É natural que essa heterogeneidade gritante se manifeste na forma de flutuações nos resultados, visto que foram coletadas apenas três folhas por planta e que a coleta foi feita mais ou menos a esmo, ou seja,

não houve seleção das folhas exceto por sua posição na muda, como foi descrito no capítulo Materiais e Métodos.

A diferença de comportamento entre os quatro conjuntos pertencentes a um mesmo mês também se deve em parte a uma outra diferença: como foi explicado na seção Materiais e Métodos, as inoculações nos quatro grupos foram feitas em semanas diferentes, de modo que todas as medidas feitas num mesmo mês contassem sempre com um intervalo de tempo idêntico desde a inoculação. Contudo, o mesmo não aconteceu com as podas, que foram feitas no mesmo dia para todas plantas. Dessa forma, os ramos de todos os grupos começaram a brotar ao mesmo tempo, e os grupos medidos primeiro apresentaram folhas mais jovens que os medidos por último. Em virtude desse fato, parte das diferenças espectrais detectadas provavelmente se deve a diferenças no grau de maturação das folhas, especialmente nos meses iniciais do experimento.

Restam, porém, algumas tendências gerais dignas de nota: a pouca variação média que se deu do segundo para o terceiro mês, bem como do quarto para o quinto. Parece seguro concluir que mudanças mais profundas aconteceram na fisiologia das plantas entre o primeiro mês e o segundo, do terceiro para o quarto e a partir do quinto.

A mudança de comportamento das folhas a partir do quinto mês certamente vincula-se a alterações químicas ou fisiológicas das plantas inoculadas em virtude da presença das bactérias. Os primeiros sintomas de clorose assimétrica começaram a se manifestar durante o quinto mês. O fato de os sintomas terem aparecido, num primeiro momento, em bem poucas plantas não é surpreendente, e esse baixo número de folhas sintomáticas é pouco influente sobre o resultado do treinamento da rede neural.

Um fenômeno diverso do aparecimento dos sintomas é provavelmente o responsável pelo aumento médio do poder de distinção entre o terceiro mês e o quarto. Esse fenômeno pode ser visualizado nas imagens abaixo. Sua ocorrência teve início no terceiro mês, mas apenas a partir do quarto ela passou a ser significativa. Trata-se do surgimento de manchas amarelas que não podem, entretanto, ser confundidas com o greening, pois são simétricas, possuem um tom característico e afetam sobretudo a região que circunda as nervuras da folha. A figura 5.9, mostrada abaixo, evidencia a diferença entre os dois tipos de manchas. Além das diferenças visualmente detectáveis, as plantas com deficiência manifestam também uma diferença de textura, tornando-se mais rígidas.



**Figura 5.9.** Folhas de laranjeira com sintomas de greening (a) e de deficiência de zinco (b).  
Fonte: FUNDECITRUS, 2009.

Esse novo tipo de amarelecimento é sabidamente causado por uma deficiência nutricional, que consiste na baixa concentração do elemento zinco. O fato digno de nota, entretanto, é que as plantas inoculadas foram muito mais afetadas por essa deficiência que as sadias. As figuras 5.10 e 5.11 mostram fotografias das plantas na estufa, as quais foram tiradas durante o quinto mês. Na primeira imagem vemos as plantas sadias, enquanto na segunda aparecem as inoculadas. Percebe-se claramente que o segundo grupo encontrava-se já tomado em grande parte pelos sintomas da deficiência, ao passo que no primeiro esse era ainda uma ocorrência bem mais rara.



**Figura 5.10.** Mudas sadias durante o quinto mês do experimento.



**Figura 5.11.** Mudas com greening durante o quinto mês do experimento.

Visto que todas as árvores receberam idêntico tratamento no que diz respeito a adubação, irrigação e todos os demais fatores pertinentes, a única explicação possível para essa disparidade de comportamentos é que, de alguma forma, a presença da bactéria impede que a planta faça uso normal dos nutrientes que são colocados à sua disposição. E os efeitos disso, como demonstra a cronologia dos eventos observados, começam a se fazer sentir antes do surgimento dos sintomas do greening propriamente dito: quase todas as plantas doentes já apresentavam sintomas de deficiência nutricional antes que dessem qualquer sinal da clorose assimétrica característica da doença.

Há muito se sabe que o greening provoca deficiência de zinco e outros micronutrientes, e diversos estudos confirmaram esse fato ao longo dos anos, conforme apontado no item 2.1.2. Embora essa descoberta não deva nada à espectroscopia de fluorescência ou mesmo ao PCR, ela pode ser um elemento importante na explicação de alguns aspectos dos dados apresentados na tabela 5.5, pois ela permite ao menos um vislumbre do mecanismo químico e fisiológico subjacente aos resultados observados. Esse vislumbre é algo que a espectroscopia de fluorescência e as redes neurais artificiais não podem fornecer por si mesmas. Há uma coincidência temporal, na transição do terceiro para o quarto mês, entre o surgimento de uma quantidade significativa amostras com sintomas

visíveis de deficiência nutricional e a acentuação das diferenças espectroscópicas entre as folhas saudáveis e as inoculadas. Talvez a precocidade do diagnóstico do greening por espectroscopia de fluorescência não seja possibilitada apenas por concentrações significativas da própria bactéria, mas também por um vínculo menos direto – e presumivelmente bem mais complexo – entre a infecção pelo greening e alterações na composição química da folha causadas pelo bloqueio do transporte de nutrientes gerado pela atuação da bactéria no floema.

Esse quadro, se verdadeiro, oferece uma possível desvantagem: fica sem resposta, por enquanto, a questão da possibilidade de se distinguir, usando espectroscopia de fluorescência, a deficiência nutricional causada pelo greening da provocada por outras fontes de deficiência, como a simples ausência das substâncias necessárias no solo ou uma dificuldade de absorção inerente à estrutura fisiológica da planta. É bem possível, por outro lado, que essas diferenças existam e sejam direta ou indiretamente identificáveis. A resposta a tal pergunta, entretanto, foge às possibilidades e propósitos do presente trabalho.

Os resultados obtidos são comparáveis aos do conjunto enviado pelo Grupo Fischer, de folhas extraídas de laranjas Valência enxertadas em Swingle, que é a mesma combinação usada neste experimento. A maior parte dos conjuntos analisados a partir do quarto mês apresentaram distinção no mínimo comparável aos 69% obtidos para aquele conjunto. A média global esteve abaixo desse patamar nos cinco primeiros meses, mas tornou-se comparável a ele no sétimo mês e o superou no último mês. Os resultados dos dois experimentos são compatíveis entre si, visto que o experimento com plantas adultas incluiu grande quantidade de folhas sintomáticas. Isso significa que as condições eram semelhantes às dos últimos meses do experimento de diagnóstico precoce.

A tabela 5.5 mostra resultados de diagnósticos feitos individualmente para cada folha. Ou seja, a rede neural correspondente a cada um dos 28 conjuntos forneceu um diagnóstico específico para cada uma das cerca de 90 folhas. Porém, o interesse maior deste trabalho reside no diagnóstico de plantas, não de folhas isoladas. De acordo com o que foi descrito na seção Materiais e Métodos, ao longo do presente experimento foram coletadas três folhas de cada planta. Portanto, o laudo correspondente a cada planta não deve se basear em uma única folha, mas sim levar em conta o conjunto dos laudos obtidos individualmente a partir das três folhas.

Quando se faz isso, quatro resultados são possíveis. Dois deles não são problemáticos, pois consistem no acordo total dos três laudos, seja considerando todas as folhas doentes ou considerando-as todas saudáveis. As outras duas possibilidades envolvem conflito entre os laudos: duas folhas identificadas como doentes e uma como saudável, ou uma considerada doente



e duas tidas como sadias. Diante disso, três possibilidades se apresentam quanto à escolha do critério para se classificar uma planta como doente: **(a)** considerá-la assim se pelo menos uma das folhas for identificada como contaminada; **(b)** exigir que a doença seja diagnosticada em pelo menos duas das três folhas (nesse caso, a presença de um único diagnóstico positivo seria atribuída à margem de erro inerente ao classificador); ou **(c)** exigir que todas as folhas sejam classificadas como doentes para que a planta seja assim considerada.

Trata-se, portanto, da escolha entre critérios mais ou menos rigorosos para se considerar a planta doente. O critério **(a)** obterá maior taxa de acerto para plantas inoculadas com o greening, mas à custa de um erro considerável no caso das plantas sadias. O critério **(c)**, ao contrário, minimizará o erro entre as plantas sadias à custa de torná-lo mais alto no caso das doentes. O critério **(b)** resulta num valor intermediário para o erro em ambos os casos. Todos os três critérios foram aplicados ao conjunto de dados obtidos neste experimento, e foi constatado que o critério **(b)** é o que proporciona a melhor taxa de acerto global na maioria dos casos. Portanto, será esse o critério utilizado na discussão dos diagnósticos por planta apresentados a seguir. Esses resultados estão apresentados na tabela 5.6.

**Tabela 5.6.** Taxas de acerto obtidas pelas ANNs para os dados de LIFS de cada um dos 28 lotes de amostras do experimento de diagnóstico precoce. A tabela contém ainda o valor médio e o desvio padrão para cada mês. Os laudos foram emitidos para cada planta.

<b>Mês</b>	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>	<b>Grupo C</b>	<b>Grupo D</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>1</b>	51,9%	55,2%	26,9%	53,6%	46,9%	13,4%
<b>2</b>	65,5%	51,1%	50,0%	71,4%	59,5%	10,6%
<b>3</b>	61,4%	66,2%	73,1%	50,0%	62,7%	9,7%
<b>4</b>	61,9%	70,3%	61,5%	57,1%	62,7%	5,5%
<b>5</b>	69,0%	55,2%	61,5%	75,0%	65,2%	8,6%
<b>6</b>	-	-	-	-	-	-
<b>7</b>	78,8%	59,6%	76,9%	75,0%	72,6%	8,8%
<b>8</b>	79,0%	70,1%	96,2%	75,0%	80,1%	11,3%

Como na tabela 5.5, também aqui as taxas de acerto correspondentes a cada um dos quatro grupos sofrem oscilações ao longo do tempo. Porém, as diminuições são menos frequentes, e nenhuma ocorre após o quinto mês: a taxa de acerto do grupo B sofreu uma diminuição no segundo mês; as dos grupos A e D, no terceiro mês; a do grupo C, no quarto mês; e a do grupo B, no quinto mês. Todas as outras 19 transições se deram com aumento ou conservação da taxa de acerto anterior. Houve transições abruptas, dentre as quais merecem destaque as duas primeiras do grupo C, ambas tendo resultado num aumento de 23,1% no grau de distinção, e a diminuição de 21,4% ocorrida no grupo D entre os meses 2 e 3. Apesar disso, como ocorreu também na tabela 5.5, tem-se aqui uma progressão nítida na taxa de acerto média, que só se mantém estável na transição do terceiro mês para o quarto.

Comparando as tabelas 5.5 e 5.6, pode-se notar que o desvio padrão associado a cada mês não é muito diferente nas duas tabelas. De modo geral, aliás, há notáveis semelhanças na forma como as taxas de acerto de cada lote se relacionam com as outras do mesmo grupo ou do mesmo mês. Como foi dito no parágrafo anterior, o aumento da taxa de acerto média ao longo do tempo é outra semelhança importante. Contudo, há também uma diferença importante, que aparece ao serem comparados os valores em si mesmos, e não em sua relação com os demais valores.

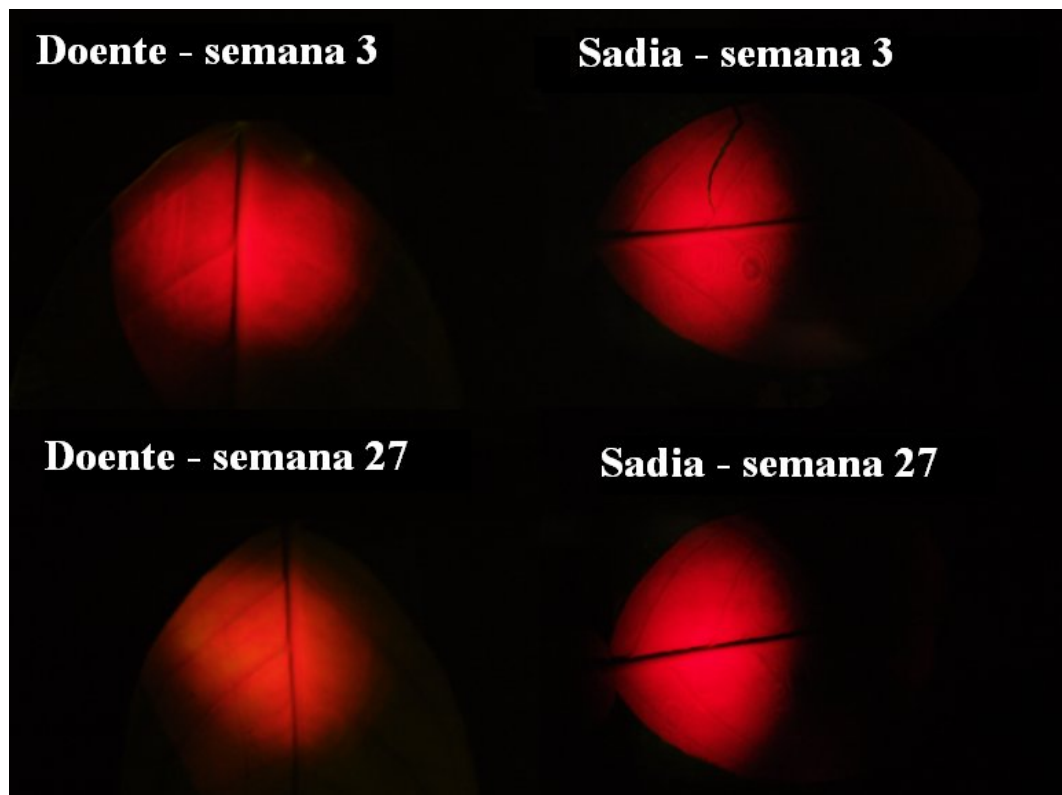
No primeiro mês, a taxa de acerto da classificação por planta é consideravelmente inferior à obtida na classificação por folha em todos os quatro conjuntos, resultando numa média inferior em 6,9%. Nos três meses seguintes, dois dos quatro lotes ainda apresentam classificações melhores no diagnóstico por folha que no diagnóstico por planta, mas as taxas

de acerto médias permanecem aproximadamente as mesmas: menos de 2% para mais ou menos de 1% para menos. A partir do quinto mês, o resultado inicial se inverte, e todos os quatro grupos passam a exibir melhores resultados no diagnóstico por planta. E não apenas isso, mas a vantagem é crescente: 2,1% no quinto mês, 5,6% no sétimo e 6,5% no oitavo. No último mês tem-se uma taxa de acerto média de 80,1%, consideravelmente superior à obtida no mesmo período para folhas individuais.

Todas essas considerações parecem indicar que o desempenho do método aqui utilizado para diagnóstico de plantas assintomáticas possui eficiência comparável à das inspeções visuais comumente adotadas nas fazendas para diagnóstico de plantas já sintomáticas. Além disso, os resultados obtidos na fase sintomática da doença são superiores aos da inspeção visual. Dado o aumento gradual do poder de distinção entre plantas saudáveis e doentes, não é possível determinar com precisão o intervalo de tempo a partir do qual o método de diagnóstico aqui apresentado se torna eficaz. Quanto a isso, parece haver considerável variação, de acordo com as características de cada planta. Contudo, pode-se apontar o segundo mês como uma fase importante, a partir do qual o valor típico das taxas de acerto passam a cerca de 60%, daí aumentando gradualmente até atingir cerca de 80% no oitavo mês.

### **5.2.2. Imagens de fluorescência induzida por laser (LIFI)**

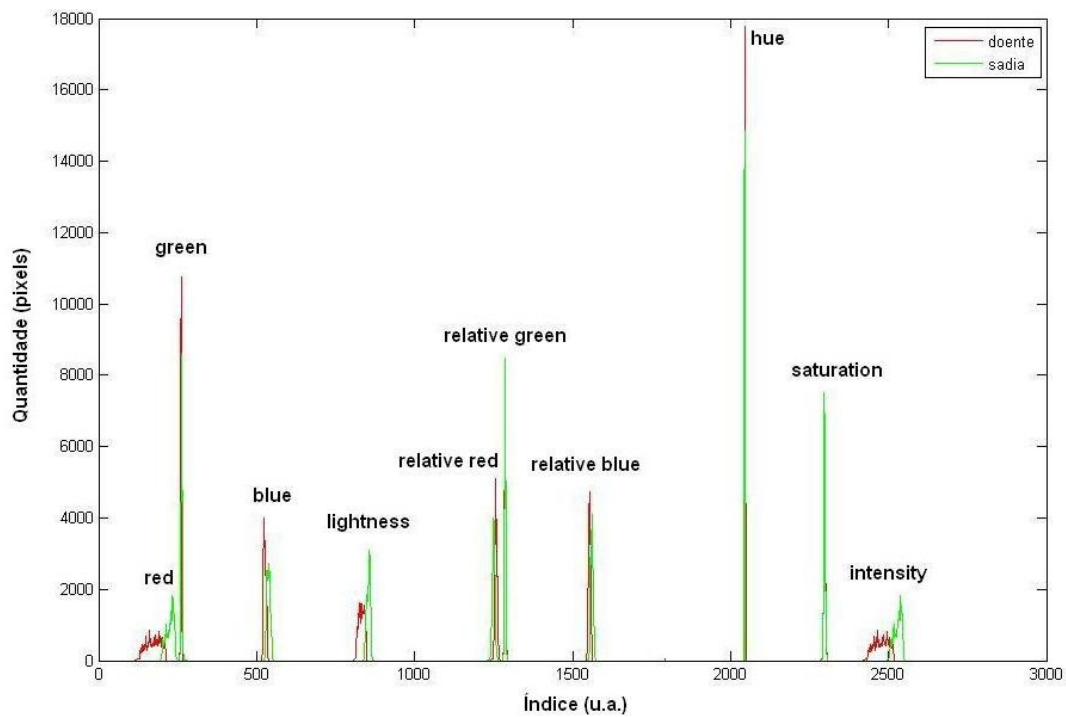
Assim como ocorre com os dados de LIFS, também aqui a exposição completa dos dados levantados se faz desnecessária, dada a enorme semelhança aparente entre elas. Contudo, algumas imagens são fornecidas na figura 5.12 a título de exemplo. Foram escolhidos exemplares saudáveis e doentes de dois conjuntos.



**Figura 5.12.** Imagens de fluorescência induzida por laser obtidas durante o experimento de diagnóstico precoce. Estão representadas imagens típicas do primeiro mês e do sétimo mês, tanto sadias quanto doentes.

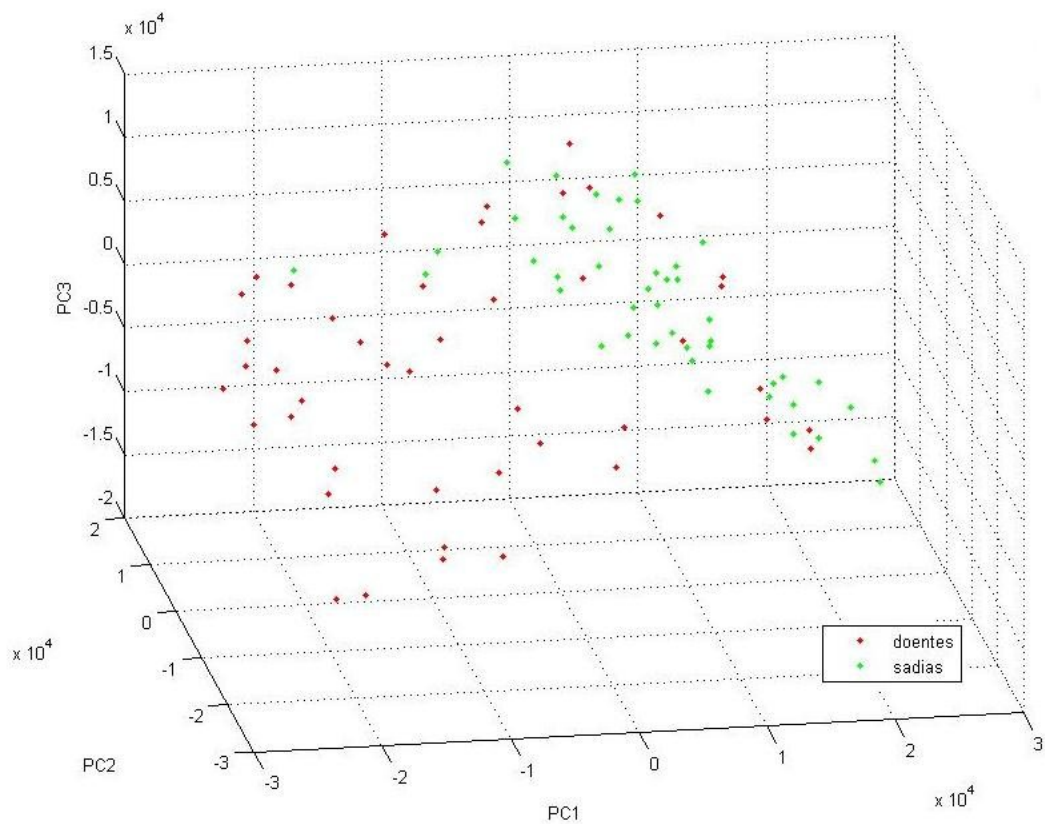
É possível notar que, no primeiro mês, as folhas sadias são visualmente indistinguíveis das doentes, pois ambas apresentam o mesmo tom avermelhado quando submetidas às condições do experimento. Ambas as colorações mudam ao longo do tempo, mas as folhas doentes geralmente sofrem mudanças mais intensas, evoluindo em direção a tons amarelados.

A figura 5.13 apresenta dois colorogramas da sétima semana, a título de ilustração, indicando a região correspondente a cada variável medida ou calculada. Os colorogramas em questão se distinguem principalmente por suas diferenças no vermelho e na intensidade.

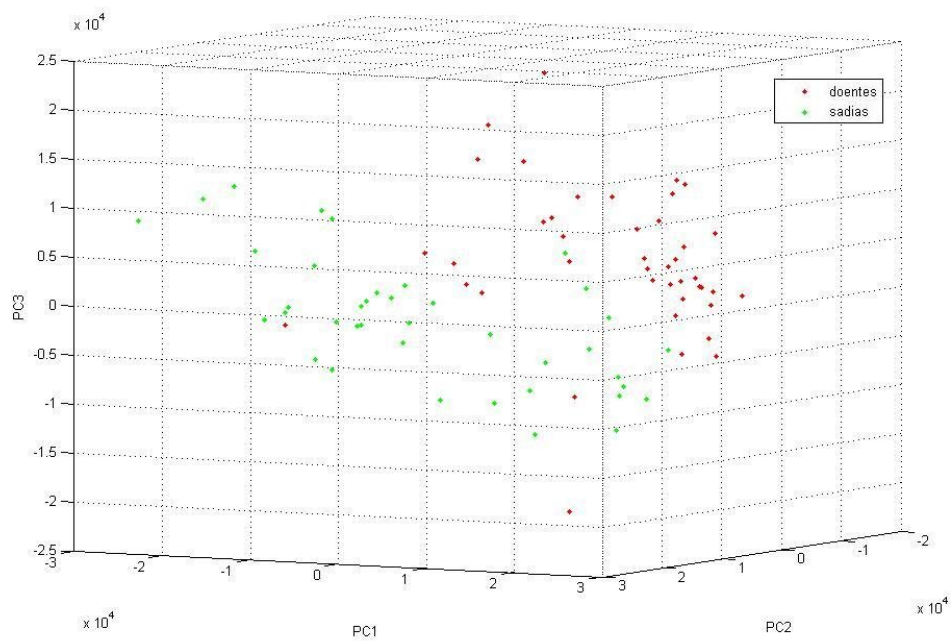


**Figura 5.13.** Exemplos de colorgramas, extraídos do sétimo lote.

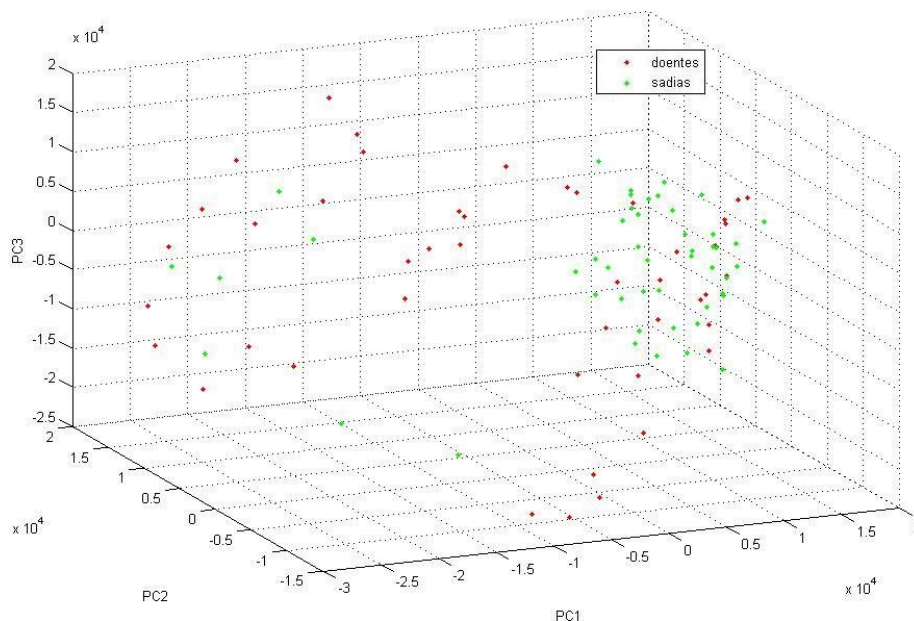
As figuras 5.14 a 5.16, por sua vez, exibem os resultados do PCA feito para dois dos 28 conjuntos. Foram escolhidos os conjuntos correspondentes à terceira, à sétima e à décima nona semana.



**Figura 5.14.** Gráfico de PCA dos dados de LIFI da terceira semana.



**Figura 5.15.** Gráfico de PCA dos dados de LIFI da sétima semana.



**Figura 5.16.** Gráfico de PCA dos dados de LIFI da décima nona semana.

Examinando as figuras 5.14 a 5.16, é possível notar que a distinção visual das semanas 3 e 7 é melhor que a da semana 19. Esse fato ilustra um fenômeno constatado nos demais conjuntos analisados por PCA, os quais não serão exibidos aqui por serem muito semelhantes aos das figuras 5.14 a 5.16. Nos dois primeiros meses, a distinção entre as imagens de folhas doentes e sadias tende a ser maior à que se verifica nos três meses seguintes. Apenas a partir do sétimo mês o grau de separação volta a ascender a níveis semelhantes aos originais, ou ainda melhores.

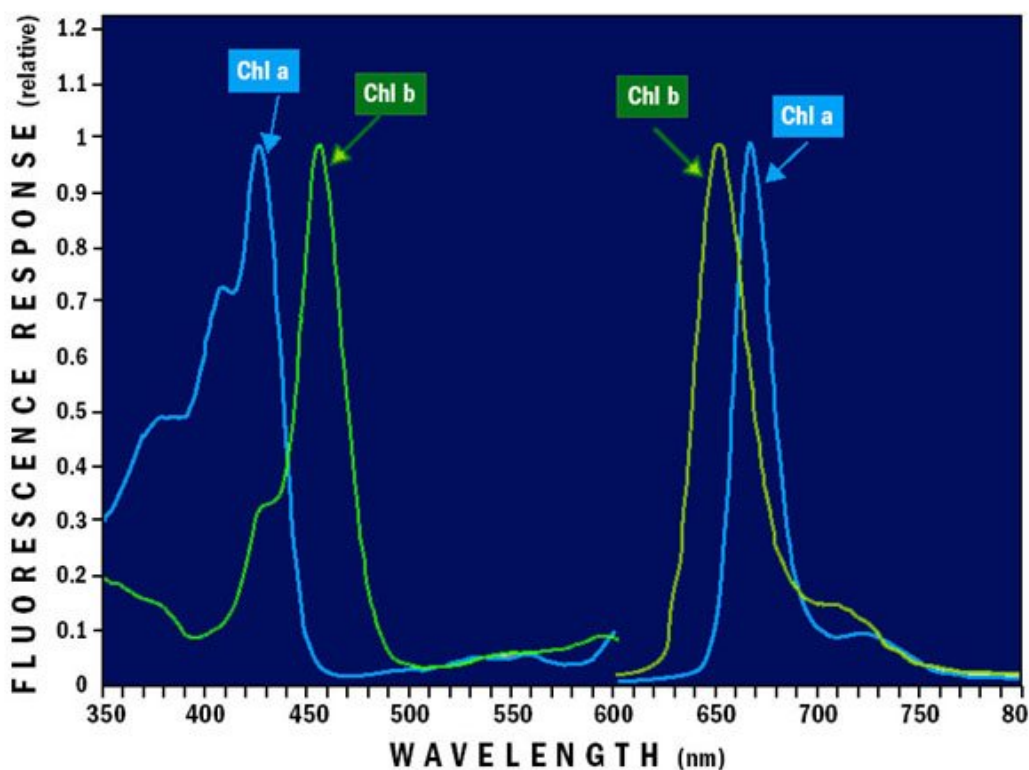
O aumento do grau de distinção nos últimos dois meses pode seguramente ser creditado à manifestação dos sintomas do greening, e está de acordo com o que foi observado a partir da técnica LIFS. Por outro lado, a diminuição do grau de distinção no terceiro mês representa um comportamento diferente do que foi observado a partir da primeira técnica. Convém tentar entender as razões que levam a tal diferença.

A falta de correlação entre as duas técnicas nesse ponto indica que as causas subjacentes às mudanças detectadas pelos espectros de LIFS e pelos colorgramas de LIFI são diferentes e mutuamente independentes. Foge ao propósito deste trabalho a investigação dos processos físicos e químicos que levam aos efeitos observados em um ou outro caso. Dessa forma, tal investigação será deixada como sugestão para trabalhos futuros. Todavia, é seguro

inferir que tamanha discrepância só se explica mediante a suposição de que os principais fluoróforos ativados em cada caso não são os mesmos.

Esses resultados são explicáveis pelo fato de que as duas técnicas utilizaram diferentes comprimentos de onda de excitação: 561nm para LIFS e 473nm para LIFI. Visto que os diferentes fluoróforos são excitados por radiações de diferentes comprimentos de onda, e dada a enorme quantidade de substâncias orgânicas potencialmente fluorescentes que se encontram presentes na superfície da folha de laranjeira, não chega a ser surpreendente que as duas técnicas, embora fundamentadas no mesmo fenômeno físico, produzam resultados parcialmente desconexos.

Esse fato pode ser ilustrado pelo exemplo bem conhecido: o da clorofila, uma substância presente em abundância nos tecidos foliares. A figura 5.17 exibe os espectros de excitação e emissão das clorofilas a e b. Para o presente propósito, é de especial interesse o espectro de excitação da clorofila b. A figura 5.17 mostra que essa substância fluoresce fortemente quando excitada por luz de 473nm, e bem pouco quando excitada por radiação de 561nm. Essa diferença e outras semelhantes certamente são responsáveis por pelo menos uma parte das diferenças entre os resultados observados para as duas técnicas.



**Figura 5.17.** Espectros de excitação e emissão das clorofilas a e b. Fonte: PRICE, 2010.



Contudo, é necessário ter em mente também que outras diferenças entre as técnicas podem ter sido relevantes na produção dessas diferenças, especialmente o próprio fato de que uma das técnicas lida com espectros, enquanto a outra extrai informações a partir de colorgramas que são, por sua vez, obtidos de imagens. Os intervalos de emissão analisados também não são os mesmos: enquanto a fluorescência captada pelo espectrômetro utilizado neste experimento no intervalo de 600nm a 900nm, o equipamento de LIFI utilizado lida com a fluorescência emitida no intervalo espectral que vai de 500nm a 700nm, aproximadamente.

Outra diferença importante a ser ressaltada é que, ao contrário do que ocorreu com a técnica LIFS, a técnica LIFI utilizada neste trabalho não deu sinais de sensibilidade às manifestações de deficiência de zinco. Isso se constata analisando a cronologia dos eventos: as folhas com sinais de deficiência nutricional apareceram pela primeira vez no terceiro mês, e sua presença se tornou mais abundante a partir do quarto mês. Contudo, a análise dos dados de LIFI não indicou uma maior distinção no terceiro mês em comparação com o segundo, e tampouco no quarto relativamente aos precedentes.

O grau de distinção relativamente elevado observado nos dois primeiros meses ainda necessita de explicação. Embora os dados obtidos neste trabalho sejam insuficientes para uma descrição precisa das causas de tal fenômeno, é possível levantar uma hipótese plausível e passível de testes futuros. De acordo com o que foi explicado na seção Materiais e Métodos, buscou-se coletar folhas maduras ao longo de todo o experimento. No entanto, isso nem sempre foi possível, sobretudo nos meses iniciais. Devido à pouca idade das mudas e das brotações, uma parcela significativa das amostras coletadas nos primeiros meses era constituída de folhas que brotaram havia menos tempo que o estipulado como ideal para os fins deste experimento. Apenas a partir do terceiro mês de coletas essa idade tida como ideal foi atingida pela totalidade das folhas enviadas para o laboratório.

Foi também a partir do terceiro mês que diminuiu sensivelmente a distinção entre os colorgramas de folhas saudáveis e os de folhas doentes. A incidência de folhas novas nos dois primeiros meses foi praticamente a mesma entre os dois conjuntos, saudáveis e doentes. É possível, portanto, que as folhas que ainda não atingiram a maturidade contenham substâncias que não apenas têm sua concentração afetada pela presença do greening, mas também fluorescem quando excitadas por radiação eletromagnética de comprimento de onda 473nm. Essa observação é compatível com o fato amplamente conhecido de que, nos pomares cítricos, os sintomas da doença costumam se manifestar primeiramente nas brotações novas, sobretudo durante a estação chuvosa.

É possível ainda que os fluoróforos responsáveis pelo elevado grau de distinção do LIFI nos dois primeiros meses não esteja relacionado à idade das folhas, mas sim à cronologia do desenvolvimento da própria doença. O sistema imunológico das plantas cítricas pode produzir dezenas de substâncias em reação à presença de patógenos como a bactéria causadora do greening, e algumas dessas substâncias são fluorescentes. É possível, portanto, que alguns fluoróforos que emitem sob a excitação de 473nm sejam produzidos nos meses imediatamente posteriores à inoculação e deixem de sê-lo numa fase posterior do desenvolvimento da doença. Essa hipótese também deverá ser investigada futuramente.

Também é possível, naturalmente, que ambas as hipóteses sejam verdadeiras. Seja como for, a técnica LIFI com excitação em 473nm é sensível a algum elemento importante da interação entre a planta e a bactéria.

Tudo indica que a contribuição mais importante da técnica LIFI, segundo o modo pelo qual foi empregada neste trabalho, encontra-se no diagnóstico precoce, sobretudo na fase imediatamente posterior à inoculação. Nesse período, a LIFS aparenta possuir limitações mais severas. Naturalmente, essa conclusão deve ser sustentada com cautela, visto que se baseia em uma análise puramente qualitativa dos gráficos de PCA obtidos em cada caso, especialmente as figuras 5.6, 5.14 e 5.15.

Contudo, não deve ser desprezado o fato de que a análise de PCA indica, em muitos casos, distinções mais nítidas para LIFI que para LIFS, inclusive nos meses em que a primeira apresenta seu pior desempenho. É o caso da figura 5.16, que apresenta, no entanto, uma distinção comparável à da figura 5.8, que mostra um dos melhores resultados obtidos por LIFS.

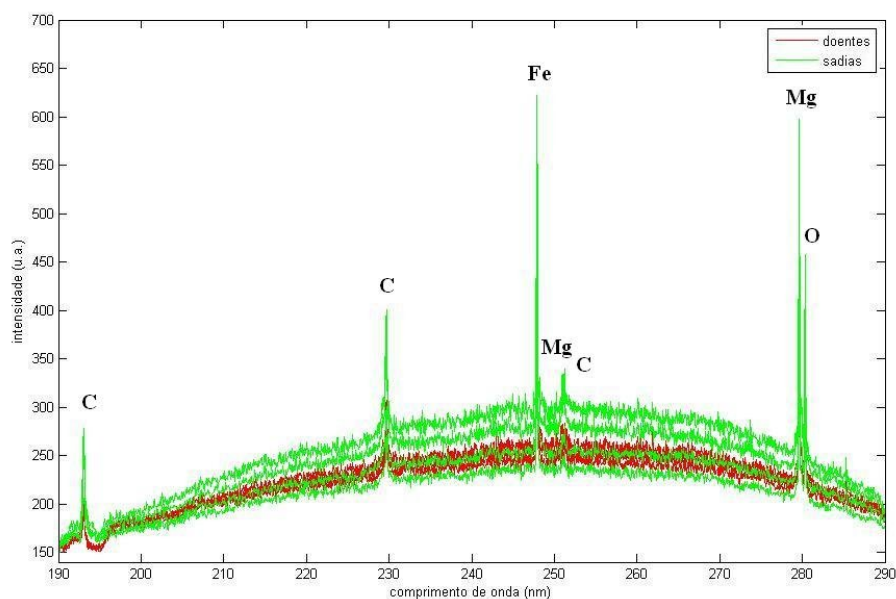
Embora o propósito desta análise seja puramente preliminar e qualitativo, foi feita uma tentativa de estimar a taxa de acerto de um classificador a partir dos dados de LIFI. Isso foi feito mediante a utilização das três primeiras componentes principais como variáveis de entrada de uma rede neural artificial. Os resultados mostram que a taxa de acerto típica foi de 75% nos dois primeiros meses, caindo para algo entre 68% a 70% nos três meses seguintes e voltando depois ao patamar original.

Deve ser levado em conta que este trabalho constatou que o PCA não é a melhor maneira de extrair informações relevantes a partir dos espectros de LIFS. É plausível, portanto, a hipótese de que também haja maneiras mais eficazes de extrair informações úteis dos colorgramas de imagens obtidas por LIFI. Portanto, é de se esperar que taxas de acerto consideravelmente superiores sejam possíveis, de modo que os valores mencionados no parágrafo anterior devem ser tomados como um limite mínimo. Portanto, apesar de suas

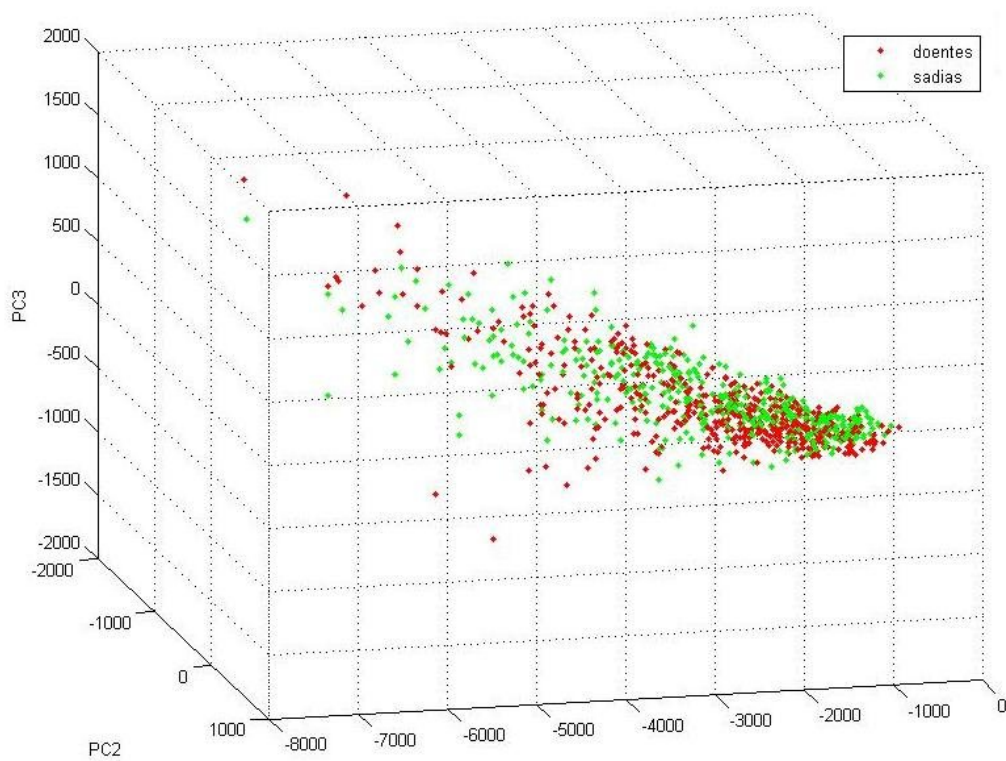
limitações, a análise aqui empreendida fornece boas razões para esperar ótimos resultados de um método de classificação que funcione a partir de imagens de fluorescência.

### 5.2.3. Espectroscopia de emissão atômica com plasma induzido por laser (LIBS)

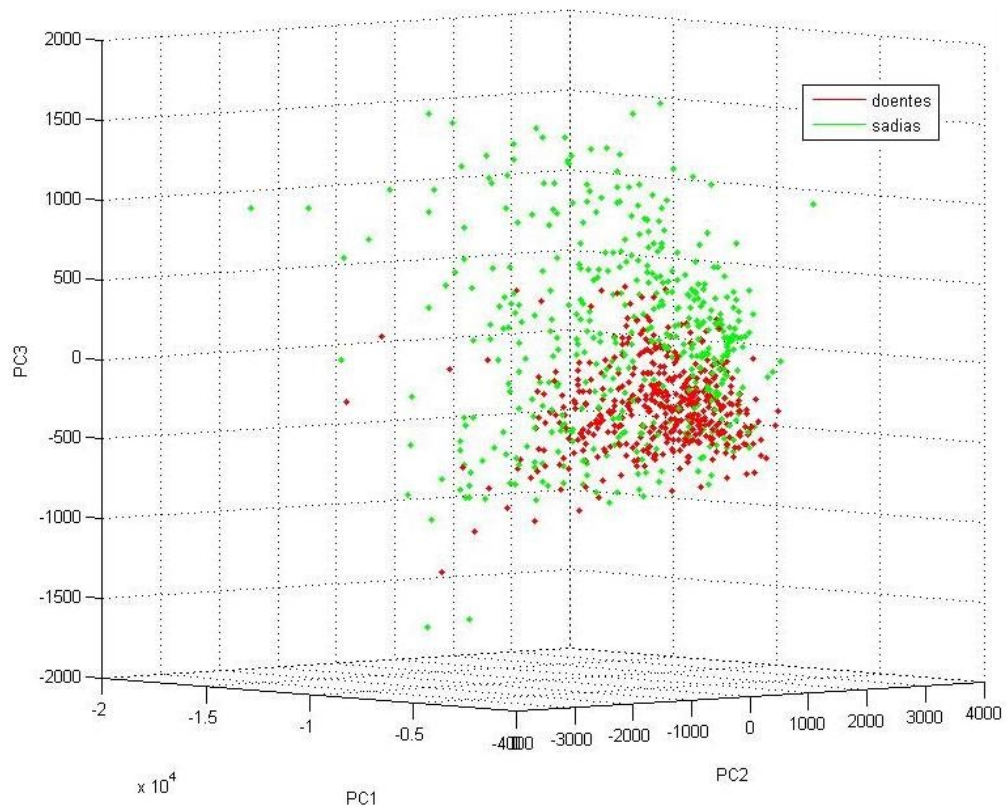
Seguindo o mesmo procedimento adotado na exposição dos resultados de LIFS e LIFI, serão apresentados a seguir alguns espectros de LIBS, a título de ilustração, bem como do PCA construído a partir desses dados. Os espectros mostrados na figura 5.18 foram escolhidos a esmo do conjunto da vigésima semana. Quanto ao PCA das figuras 5.19 e 5.20, foram escolhidos os conjuntos da quarta semana, por apresentar um comportamento visual típico, e o da vigésima semana, por apresentar uma distinção visual notável nas três primeiras componentes principais. Contudo, é necessário ter em mente que, de acordo com testes preliminares efetuadas a partir dos dados do presente experimento, cerca de oito componentes principais podem ser necessárias para produzir bons classificadores.



**Figura 5.18.** Alguns espectros de LIBS da vigésima semana, com os prováveis elementos responsáveis por cada pico.



**Figura 5.19.** Gráfico de PCA feito a partir dos dados de LIBS da quarta semana.



**Figura 5.20.** Gráfico de PCA feito a partir dos dados de LIBS da vigésima semana.

As figuras 5.19 e 5.20 sugerem que houve um aumento considerável no grau de distinção entre espectros de folhas sadias e doentes entre o primeiro mês e o quinto. Na verdade, os gráficos de PCA revelam um melhoramento considerável já no segundo mês, e um comportamento relativamente estável daí em diante. Esse melhoramento na transição do primeiro mês para o segundo condiz com o que foi observado por meio da técnica LIFS. Contudo, a relativa estabilidade subsequente não tem similaridade com nada do que foi observado nas outras duas técnicas.

Assim como foi feito para LIFI, também para LIBS efetuou-se uma estimativa da taxa de acerto por meio de componentes principais e redes neurais artificiais. No caso de LIBS, porém, foram utilizadas as oito primeiras componentes principais de cada espectro como variáveis de entrada para a rede neural. Os resultados mostraram uma média de 62% no primeiro mês e 70% a 75% nos outros meses, sem demonstrar qualquer tendência ao longo do tempo. Esses resultados mostram que a técnica LIBS possui uma utilidade em potencial para o diagnóstico do greening comparável à das outras técnicas analisadas neste trabalho. Com relação a essas estimativas, é necessário enfatizar que, da mesma forma que para as estimativas das taxas de acerto de LIFI, estas são preliminares e indicam apenas um limite mínimo.

Há uma característica da técnica LIBS que deve ser levada em conta e que a distingue das outras duas. Conforme explicado na seção Revisão Bibliográfica, a técnica é muito suscetível à heterogeneidade da amostra. Essa suscetibilidade, por sua vez, explica-se pela pequena quantidade de matéria amostrada, embora esse fato também se constitua, por outro lado, em uma das principais vantagens da técnica. Portanto, uma mesma folha pode produzir resultados muito discrepantes, conforme a região escolhida para ablação.

Esse problema pode ser solucionado ou atenuado mediante a aquisição de uma grande quantidade de espectros de LIBS por amostra. Se forem colocadas à disposição do método de análise dados extraídos de várias regiões da amostra, as flutuações pontuais tornam-se menos importantes na produção de um laudo sobre o estado fitopatológico da folha e, por conseguinte, também da planta. No experimento aqui descrito, como já foi explicado na seção Materiais e Métodos, foram coletados dez espectros de cada folha (e, portanto, trinta de cada árvore), medidos em diferentes regiões da nervura central. Porém, o laudo emitido pela rede neural baseou-se em cada espectro considerado individualmente. Uma exploração mais profunda dos dados adquiridos nesse experimento deverá levar em conta a necessidade de produzir laudos únicos para cada planta, como foi feito a partir dos dados de LIFS. Ou seja,

deverá tomar em consideração todos os dados fornecidos pelos vários espectros obtidos de suas várias folhas.

As diferenças constatadas na evolução temporal, ao longo do experimento, entre os resultados obtidos por LIBS e os adquiridos mediante as técnicas LIFS ou LIFI são perfeitamente compatíveis com o fato de que os fenômenos subjacentes são diferentes em cada caso. Enquanto os padrões espectrais de espectroscopia de emissão óptica de plasma estão relacionados às concentrações dos micronutrientes nos tecidos foliares, os padrões dos espectros ou imagens de fluorescência se relacionam à concentração de moléculas orgânicas que apresentam estruturas químicas específicas, as quais fluorescem quando atingidas por fótons que possuem o comprimento de onda apropriado. Conforme já foi mostrado, as mesmas amostras apresentaram comportamentos diferentes diante das técnicas LIFS e LIFI, embora ambas tomem a fluorescência como fenômeno físico subjacente. Portanto, não é surpreendente que os resultados de LIBS tenham se mostrado diferentes de ambas. Contudo, esse fato parece mostrar que os padrões de fluorescência analisados não têm nenhuma relação direta com as concentrações dos elementos químicos que compõem os fluoróforos. Ou pelo menos que esses padrões não se correlacionam com as concentrações dos elementos que, ao retornar do estado de plasma a que foram excitados, emitem no intervalo analisado.

É necessário ressaltar, contudo, que o método de análise empregado neste trabalho está longe de ter esgotado as possibilidades de extrair informações úteis para diagnóstico a partir das amostras analisadas. Em primeiro lugar, foi analisada a informação fornecida por apenas um dos sete espectrômetros que compõem o equipamento. Apenas o intervalo de emissão que vai de 188nm a 292nm foi analisado, e resta ainda toda a região de 292nm até 966nm. Assim, elementos que não emitem no intervalo abrangido pelo primeiro espectrômetro não foram incluídos na análise levada a efeito neste trabalho.

A evolução temporal dos graus de distinção para LIBS não indicam nenhuma sensibilidade da técnica à deficiência de zinco ocorrida nas amostras doentes, que começou a se manifestar no terceiro mês e se intensificou a partir do quarto. Não houve mudanças significativas no grau de distinção entre o segundo e o quarto mês. Da mesma forma, não há evidências de variações detectáveis nas concentrações elementares em virtude do aparecimento dos sintomas.

A partir dos dados apresentados e discutidos neste trabalho, não é possível encontrar explicações definitivas para o aumento do grau de separação entre amostras sadias e doentes no segundo mês. Contudo, esse fenômeno pode estar vinculado ao amadurecimento das folhas utilizadas no experimento. Esse fato foi apresentado acima, em conexão com os resultados

obtidos pela técnica LIFI, cuja taxa de acerto diminuiu a partir do terceiro mês. É possível que a técnica LIBS seja mais sensível a esse amadurecimento, mas detectando-o mais cedo e respondendo a ele de maneira positiva. No entanto, é possível também que esse aumento súbito da taxa de acerto no segundo mês decorra diretamente da interação entre a planta e o patógeno, conforme também foi apontado na discussão sobre os resultados de LIFI. Análises adicionais serão necessárias para confirmar ou impugnar essas hipóteses.

É necessário enfatizar que muitas possibilidades estão abertas para o melhoramento dos resultados proporcionados por essa técnica, pois a análise aqui elaborada está longe de ser exaustiva. Isso se dá especialmente em razão das duas limitações acima mencionadas: a falta de um diagnóstico que leve em conta os dados de diversos espectros simultaneamente e o fato de que apenas um dos sete espectrômetros que compõem o equipamento teve seus dados analisados aqui. Além disso, a análise empreendida é puramente qualitativa, como também o foi a análise dos dados de LIFI.

Contudo, apesar de todas as limitações dos resultados de LIBS aqui apresentados, essa análise revela alguns fatos importantes e positivos. Apesar de toda a diversidade das amostras, que se refletiu na discrepância entre os lotes individualmente considerados, há uma grande estabilidade no comportamento geral ou médio já a partir do segundo mês. E a própria existência dessa estabilidade é um indício concreto de uma possibilidade muito vantajosa: se análises futuras puderem fornecer melhores taxas de acerto a partir dos dados fornecidos pela técnica LIBS, é provável que esse melhoramento se mostre aplicável a uma grande quantidade de plantas assintomáticas, inclusive as que foram inoculadas num tempo relativamente recente.

#### **5.2.4. Diagnóstico por reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR)**

Serão discutidos agora os resultados fornecidos reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR), que é a técnica de referência deste trabalho. Infelizmente, nem todos os lotes puderam ser analisados a tempo de ter seus resultados incluídos aqui. As plantas sadias não foram analisadas, dado o baixíssimo risco de contaminação por greening nas condições do experimento. Foram feitas as análises apenas para as amostras extraídas de plantas inoculadas entre as semanas 1 a 16, 18 a 20 e 25 a 29. Mesmo estando incompletos, porém, os dados disponíveis até o presente momento dão ensejo a constatações importantes para este trabalho. Para cada um dos lotes analisados, a tabela 5.7 mostra o número de plantas nos quais foi detectado o DNA da bactéria.

**Tabela 5.7.** Número de plantas identificadas como doentes em cada um dos lotes já analisados do experimento de diagnóstico precoce.

<b>Mês</b>	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>	<b>Grupo C</b>	<b>Grupo D</b>
<b>1</b>	0	0	3	2
<b>2</b>	2	3	1	11
<b>3</b>	3	0	6	8
<b>4</b>	6	10	13	14
<b>5</b>	-	7	13	9
<b>6</b>	-	-	-	-
<b>7</b>	11	8	13	12
<b>8</b>	11	-	-	-

Ao longo dos oito meses de experimento, todas as mudas tiveram folhas submetidas à análise de RT-PCR seis vezes. Essa técnica resultou em um laudo positivo ao menos uma vez para todas as plantas, com exceção de três mudas pertencentes ao grupo A.

A tabela 5.7 permite a constatação do fato de que o número de plantas que receberam diagnóstico positivo para greening não aumenta monotonicamente com o tempo. Diminuições desse número ocorreram cinco vezes ao longo do experimento, ou seja, em um quarto das oportunidades. Isso significa que plantas identificadas como doentes num certo mês podem ser tomadas como saudáveis num período posterior. Esse fenômeno ocorreu ao menos uma vez para mais de um terço das mudas inoculadas analisadas neste experimento. Ele decorre da já mencionada heterogeneidade da distribuição da bactéria: visto que as folhas são coletadas a esmo, existe sempre a possibilidade de haver baixas concentrações da bactéria nas folhas coletadas, de modo que o laudo resultante é um falso negativo. Esse risco é particularmente alto quando o número de folhas coletadas é pequeno, como no caso do presente experimento. Tudo isso indica que a técnica RT-PCR, embora seja a mais confiável de que se dispõe atualmente, não permanece imune ao problema da heterogeneidade da distribuição da bactéria causadora do greening. Como já foi mostrado, esse mesmo fato afeta a confiabilidade da técnica LIFS.

Esses resultados são úteis, pois o princípio de funcionamento do RT-PCR está na detecção do DNA da bactéria em meio ao DNA da própria planta, extraído dos tecidos foliares. Dessa forma, o laudo positivo requer a presença da bactéria em concentração superior a certo limite de detecção, de modo que os resultados da técnica se vinculam diretamente à presença da bactéria em quantidade significativa. Assim, além de validar os



resultados obtidos por LIFS, o RT-PCR auxilia na interpretação dos dados, indicando que a ausência observada de homogeneidade e uniformidade entre os conjuntos deve-se ao menos parcialmente à distribuição desigual do próprio patógeno pelas folhas da planta.

Conquanto não estejam completos, os dados já obtidos por meio da técnica RT-PCR permitem algumas comparações com a técnica LIFS. A tabela 5.8 mostra uma comparação entre as taxas de acerto médias das duas técnicas em cada mês para as plantas inoculadas.

**Tabela 5.8.** Comparação entre as taxas de acerto obtidas pelas técnicas RT-PCR e LIFS para as mudas inoculadas.

Mês	RT-PCR	LIFS
1	9,0%	54,3%
2	31,0%	57,8%
3	31,0%	60,2%
4	78,2%	63,6%
5	70,8%	61,7%
6	-	-
7	80,0%	62,0%
8	78,6%	80,2%

A tabela 5.8 permite constatar que o potencial da técnica LIFS para o diagnóstico precoce nos três primeiros meses é maior que o da técnica RT-PCR, que de fato não funciona bem nessa fase de desenvolvimento da doença. Do quarto mês em diante, RT-PCR obtém resultados consideravelmente melhores que nos três meses iniciais, mas não superiores aos que podem ser obtidos por LIFS no oitavo mês. Porém, LIFS faz progressos lentos no diagnóstico correto das plantas doentes, sobretudo entre o terceiro mês e o sétimo.

Um último conjunto de informações que convém analisar está dado na tabela 5.9. Essa tabela permite visualizar o grau de concordância das duas técnicas quanto a seus respectivos diagnósticos. Em outras palavras, a tabela mostra quantas das mudas doentes são identificadas como tais por ambas as técnicas, por uma ou outra delas ou, finalmente, por nenhuma.

**Tabela 5.9.** Acordos e desacordos entre as técnicas RT-PCR e LIFS para diagnóstico, expressos em porcentagens. O sinal “+” indica que a planta foi corretamente identificada como doente pela técnica em questão. O sinal “-” indica que a planta foi erroneamente identificada como sadia pela técnica.

Mês	RT-PCR+/LIFS+	RT-PCR+/LIFS-	RT-PCR-/LIFS+	RT-PCR-/LIFS-
1	3,6%	5,5%	52,7%	38,2%
2	18,2%	12,7%	40,0%	29,1%
3	18,2%	12,7%	41,8%	27,3%
4	52,7%	25,5%	10,9%	10,9%
5	48,8%	22,0%	12,2%	17,1%
6	-	-	-	-
7	60,0%	20,0%	1,8%	18,2%
8	71,4%	7,1%	0,0%	21,4%

Pode-se notar que, exceção feita ao primeiro mês, o valor da primeira coluna é sempre superior ao da segunda. Isso significa que, dentre as mudas doentes identificadas como tais pelo RT-PCR, a maioria é também assim identificada pela técnica LIFS. O grau de concordância entre as duas técnicas, dado pela primeira coluna somada à última, começa já significativo, em cerca de 42%, e cresce até atingir cerca de 93%, no último mês. Nos três primeiros meses, a maior parte dos acordos se dão nos falsos negativos (última coluna). No quarto mês, com o aumento súbito de diagnósticos corretos feitos por RT-PCR, os acordos nos laudos positivos (primeira coluna) passam a ser dominantes, e assim permanecem até o fim do experimento. Na medida em que o tempo avança, diminui a proporção de mudas classificadas corretamente por LIFS mas não por RT-PCR (terceira coluna), fato que reflete o aumento da taxa de acerto desta última técnica. Já as mudas classificadas erroneamente como sadias por LIFS e acertadamente como doentes por RT-PCR crescem no começo devido ao aumento da taxa de acerto do RT-PCR, mas voltam a diminuir a partir do quinto mês por causa do aumento da taxa de acerto do LIFS.

Assim, os principais resultados desta comparação entre LIFS e RT-PCR podem ser resumidos da seguinte forma: o acordo entre as duas técnicas tende a crescer com o tempo. A taxa de acerto obtida pelas duas no final do experimento é equivalente, mas RT-PCR alcança esse patamar já no quarto mês. Nos três primeiros meses, o acerto obtido por LIFS é cerca de duas vezes maior que o obtido por RT-PCR. Assim, embora haja vantagens indiscutíveis na aplicação do RT-PCR na fase intermediária (do mês 4 ao mês 7), o desempenho da técnica

LIFS foi comparável no último mês e superior nos três primeiros. Essas vantagens somam-se às já enunciadas na Introdução, devidas sobretudo à rapidez e baixo custo da técnica LIFS.

## 6. Conclusão

### 6.1. Principais resultados

À luz do exposto no capítulo Resultados e Discussão e dos objetivos propostos deste trabalho, devem ser destacadas as conclusões seguintes.

O conjunto de amostras extraídas de laranjeiras Valência enxertadas em citrumelo Swingle, diagnosticadas por inspeção visual, resultou numa distinção consideravelmente inferior à do conjunto de folhas extraídas de laranjeiras Pêra-rio enxertadas em limoeiro Cravo, diagnosticadas por PCR: 69% e 87%, respectivamente. Embora isso possa se dever em parte a condições químicas e fisiológicas intrínsecas às combinações de copa e porta-enxerto utilizadas, ou mesmo à diferença de quantidade de plantas utilizadas, tudo leva a crer que a causa principal dessa discrepância está no fato de que o primeiro conjunto foi certificado por um método de diagnóstico pouco confiável, sobretudo no que diz respeito às plantas sadias. Esse fato reforça a importância da obtenção de um método mais preciso de análise, dada a impossibilidade de aplicação em larga escala do PCR. A estimativa mais confiável mostra que a eficácia do método em condições de campo é de 87%, o que implica em uma taxa de acerto três vezes melhor que a da inspeção visual.

O experimento de avaliação da precocidade do diagnóstico forneceu resultados interessantes para todas as técnicas. No caso da espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS), ficou demonstrada a existência de uma variabilidade considerável no comportamento das plantas face à inoculação da bactéria causadora do greening ao longo de todo o experimento. Essa variabilidade – que se estende também aos grupos de amostras – é, talvez, o principal obstáculo à elaboração de um classificador capaz de obter um bom desempenho para todos os conjuntos, o que se evidencia pelo fato de que os parâmetros das várias redes neurais construídas resultaram muito diferentes entre si.

Apesar disso, o experimento forneceu também vários resultados positivos, a começar pelo fato de que a distinção global média esteve em torno de 60% já no segundo mês. Esse resultado tem grande importância, já que se está falando de plantas inteiramente assintomáticas e recém-contaminadas. Portanto, as diferenças espectrais começaram a se manifestar de modo mais frequente quatro meses antes do aparecimento dos sintomas da doença, que só começaram a surgir no quinto mês, e mesmo assim apenas num número reduzido de plantas.

Esse resultado indica que o diagnóstico pode ser feito desde o início do desenvolvimento da doença, e com precisão muito superior ao que vem sendo obtido pelo método de controle por inspeção visual – que é de 27%, levando-se em conta a totalidade das plantas contaminadas presentes em um pomar típico. Esse método depende da aparição dos sintomas, os quais levam pelo menos seis meses para aparecer em condições de campo. A distinção espectral continuou aumentando em todos os meses, com apenas uma exceção, começando com 47% e chegando a 80% no final do experimento.

Constatou-se ainda que as amostras inoculadas se mostraram consideravelmente mais sensíveis que as sadias à deficiência nutricional de zinco, a tal ponto que os sintomas dessa deficiência se manifestaram em muitas das plantas inoculadas antes que os sintomas do próprio greening começassem a se tornar visíveis em algumas delas. Estudos mais aprofundados são necessários, contudo, para determinar de modo mais preciso a causa de tal comportamento, ou seja, o mecanismo pelo qual a presença da bactéria inibe o aproveitamento normal dos nutrientes pela planta infectada.

As técnicas de imagens de fluorescência induzida por laser (LIFI) e espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) foram apenas preliminares e de caráter qualitativo. Apesar dessas limitações, algumas conclusões importantes foram alcançadas neste trabalho.

Os resultados obtidos a partir de LIFI mostraram-se consideravelmente diferentes dos obtidos via LIFS. A constatação mais surpreendente é que, nos dois meses iniciais, foi obtido um grau de diferenciação superior ao que se viu nos meses seguintes. A diferença mais importante entre as amostras dos meses 1 e 2 e as dos períodos posteriores reside no seguinte fato: nos dois primeiros, era considerável a quantidade de folhas novas, devido à poda recente e à pouca idade das mudas. A partir do terceiro mês, todas as folhas coletadas já se encontravam em idade madura. Essa correlação sugere que a queda na distinção dos dados de LIFI a partir do terceiro mês se vincula de algum modo ao amadurecimento das folhas. Os resultados aqui apresentados sugerem que as imagens de fluorescência, coletadas segundo os procedimentos expostos neste trabalho, são mais sensíveis que o LIFS aos efeitos do greening em folhas novas.

É necessário ressaltar que tais diferenças não necessariamente se devem às técnicas em si. Não é lícito concluir, a partir do exposto acima, que todas as diferenças constatadas são diferenças entre a técnica espectroscópica e a técnica de imagens. Uma possibilidade no mínimo igualmente plausível é que as diferenças observadas se devam em parte ao fato de que o comprimento de onda de excitação utilizado é diferente em cada caso: para LIFS, utilizou-se

um laser de 561nm, ao passo que um laser de 473nm foi usado no caso da LIFI. É provável que fluoróforos diferentes sejam excitados em cada caso. Sendo os tecidos foliares muito complexos do ponto de vista químico, é provável que diferentes substâncias tenham suas concentrações afetadas de modo diverso pela interação do patógeno com a planta. Além disso, o intervalo espectral de emissão coletado em cada caso também não foi o mesmo. Desse modo, não chega a ser surpreendente a diferença constatada entre os resultados das duas técnicas.

A técnica LIFI não deu sinais de sensibilidade à deficiência mineral que afetou plantas doentes a partir do terceiro mês. Porém, o mesmo não pode ser dito com relação aos sintomas propriamente ditos, pois o grau de separação entre as amostras sadias e doentes melhorou consideravelmente no sétimo mês.

A análise qualitativa aqui empreendida mostra que, no que diz respeito ao grau de distinção entre plantas sadias e doentes observados por PCA, muitos dos conjuntos de dados obtidos por LIFI podem ser comparados favoravelmente aos obtidos por LIFS. Isso é verdade inclusive no período que vai do terceiro ao quinto mês, no qual a sensibilidade da técnica LIFI permaneceu menor que nos demais meses. Esse fato indica que a técnica possui um grande potencial que pode ser explorado futuramente com o objetivo do aprimoramento diagnóstico do greening.

Os resultados obtidos a partir da técnica LIBS divergem tanto dos resultados de LIFS quanto dos de LIFI. Suas características principais são uma distinção relativamente baixa no mês imediatamente posterior à inoculação, seguida por uma distinção melhorada a partir do segundo mês, mantendo-se aproximadamente estável até o final do experimento.

O aumento considerável do grau de distinção no segundo mês pode ser atribuído tanto à evolução da própria doença quanto à relativa maturidade das folhas utilizadas, em comparação com as do mês anterior. Se a segunda hipótese for verdadeira, trata-se de um indício de que a técnica LIBS é ainda mais sensível que a LIFI à idade das folhas, e também pode significar que, havendo disponibilidade de folhas maduras desde o início, a utilização bem-sucedida da técnica pode ser ainda mais precoce. Naturalmente, não se pode excluir a possibilidade de ambas as hipóteses serem verdadeiras.

Como foi apontado no capítulo Revisão Bibliográfica, a técnica LIBS utiliza uma parcela muito pequena da amostra. Em virtude disso, a técnica tende a ser mais sensível que as outras duas às diferenças entre os diferentes pontos da superfície da folha analisada. Apesar dessa suscetibilidade e da ampla variabilidade dela resultante, contudo, o comportamento típico das amostras permaneceu razoavelmente estável desde o segundo mês até o final do

experimento. O poder de distinção da técnica não demonstrou sensibilidade à deficiência nutricional de zinco, e tampouco à manifestação dos sintomas do greening. A estabilidade detectada nas taxas de acerto dessa técnica ao longo dos meses foi maior que a encontrada nos resultados de LIFS e LIFI. Essa é uma das características mais notáveis observadas no desempenho da técnica ao longo do experimento.

Não há tendências semelhantes entre os dados de LIBS e as técnicas baseadas em fluorescência quanto à evolução temporal, exceto pelo aumento do grau de distinção no segundo mês, que também foi observado por LIFS. Esse pode ser um indício de que há pouca correlação entre as concentrações dos elementos químicos e as dos fluoróforos excitados durante a aquisição dos dados de LIFS e LIFI.

Os dados de diagnóstico por reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) utilizou apenas as folhas doentes de 24 dos 28 conjuntos de amostras. Apesar dessa limitação, os dados disponíveis indicam certa variabilidade entre os diversos conjuntos e a ausência de semelhança entre suas respectivas evoluções temporais. Essas diferenças são mais intensas nos meses iniciais, e vão se atenuando na medida em que a bactéria e seus efeitos se espalham pela planta.

A heterogeneidade dessa distribuição fez com que, em cerca de um quarto das oportunidades, o número de plantas com laudo positivo num dado grupo de amostras tenha sido menor que no mês anterior. Além disso, mais de um terço das plantas foram, em algum momento, declaradas sadias pelo RT-PCR após terem sido declaradas portadoras do greening no mês anterior. Esses fatos sugerem que nem mesmo a técnica mais confiável de que se dispõe atualmente é de todo imune às diferenças na distribuição da bactéria.

A técnica RT-PCR mostrou-se capaz de diagnosticar corretamente o estado fitopatológico de cerca de 55% das plantas no primeiro mês, cerca de 65% nos meses seguintes e entre 85% e 90% a partir do quarto mês, mantendo-se nesse patamar até o fim do experimento. Cabe observar que o quarto mês representa a iminência da manifestação dos sintomas para a maioria das plantas. O fato de haver sempre, nas condições deste experimento, um erro mínimo de 10% é um indício adicional da viabilidade comercial da técnica proposta neste trabalho, que chega a 80% com muito maior facilidade operacional, custo quase nulo e potencial para aplicação em larga escala.

Comparando os resultados das técnicas LIFS e RT-PCR, nota-se que a segunda apresenta um resultado claramente inferior nos três primeiros meses. Nesse período, a técnica LIFS foi capaz de diagnosticar o greening corretamente em 50% a 60% das plantas inoculadas, enquanto RT-PCR falha em pelo menos 70% dos casos. Exceto no primeiro mês

após a inoculação, a maioria das plantas identificadas como doentes por RT-PCR foram também assim consideradas por LIFS. O acordo entre as duas técnicas é de cerca de 45% nos primeiros meses, subindo a cerca de 65% no quarto mês e chegando a mais de 90% no final do experimento.

## 6.2. Desenvolvimentos futuros

Este trabalho deixa abertos muitos caminhos para futuros progressos e aprofundamentos. Um deles é a procura por classificadores capazes de fornecer resultados mais precisos e com validade mais abrangente. Isso inclui tanto o melhoramento do desempenho das redes neurais artificiais quanto a tentativa de utilização de outros métodos, como o *Support Vector Machine* (SVM), a Distância de Mahalanobis e vários outros comumente utilizados no campo da quimiometria.

Outro possível desdobramento futuro pode se dar no campo da fisiologia e da química das plantas, cujo estudo pode esclarecer os mecanismos responsáveis pela diferenciação entre plantas doentes e sadias e, talvez, propiciar a criação ou adaptação dos métodos aqui utilizados para melhor captar essa distinção.

Os procedimentos acima mencionados poderão ser úteis também para uma melhor compreensão dos fenômenos subjacentes a cada uma das técnicas. Dessa forma, talvez seja possível adquirir um entendimento mais profundo e preciso das causas que produzem as semelhanças e diferenças constatadas entre os resultados de cada técnica.

As imagens coletadas ao longo do experimento de avaliação de diagnóstico precoce podem ser analisadas com profundidade consideravelmente maior do que foi feito neste trabalho. Os colorgramas, por exemplo, podem ser melhor estudados com vistas à identificação das variáveis mais importantes para a determinação do estado fitopatológico das plantas. Contudo, existem muitas outras propriedades das imagens cujo estudo ainda não foi feito. Uma das limitações mais evidentes dos colorgramas – e também dos espectros – é que eles suprimem toda informação sobre a distribuição espacial dos pixels. Análises de forma e textura poderiam ser combinadas às análises de cor em busca de padrões que permitam uma distinção mais eficaz entre amostras sadias e contaminadas por greening. As imagens de fluorescência induzida por laser oferecem uma rica gama de possibilidades que não foi, até o momento, devidamente explorada. Além disso, a quantidade e a qualidade dos dados para análise podem ser incrementadas mediante o uso de câmeras hiperespectrais.



A técnica espectroscópica baseada na produção de plasma também é passível de consideráveis aprofundamentos na análise. Este trabalho lidou apenas com uma pequena parte do espectro captado pelo equipamento: somente o primeiro dos sete espectrômetros foi analisado. Além disso, convém que se estabeleça uma metodologia de diagnóstico capaz de levar em conta os dados dos vários espectros obtidos a partir de uma única folha. O sucesso obtido nesse sentido deverá resultar em uma maior taxa de acerto, bem como a uma maior robustez do método.

Visto que as análises dos resultados de LIFI e LIBS foram apenas preliminares e qualitativas, elas apresentam uma maior gama de possibilidades para futuros desdobramentos. Um deles consiste na busca por meios mais eficazes de extração de informações de suas respectivas imagens e colorgramas. O exemplo da técnica LIFS, conforme descrito na seção Materiais e Métodos, indica que o PCA está muito longe de ser capaz de disponibilizar para um software classificador toda a informação útil possível. É de extrema importância, portanto, investir tempo e esforços na obtenção de um método de pré-processamento dos dados que faça justiça à riqueza de informações contida nos dados brutos.

O esforço do diagnóstico pode ser também estendido a outras variedades de laranja, outras combinações de copa e porta-enxerto e talvez até outras espécies de citros.

Finalmente, deve ser ressaltado que neste trabalho foram coletadas três folhas por muda no experimento da estufa. Essas contingências foram determinadas por fatores práticos envolvidos na realização do experimento. Não foi feito nenhum estudo visando à determinação do número ideal de amostras para cada técnica. Esse fator é importante, pois uma escolha equivocada pode limitar a eficácia do diagnóstico, especialmente em vista da enorme heterogeneidade da distribuição da bactéria e seus efeitos, como foi demonstrado nas páginas precedentes. Visto que o alvo é a elaboração de um laudo para cada planta, é possível recorrer a uma quantidade consideravelmente maior de folhas provenientes de uma mesma árvore.

Esse fato, por um lado, constitui uma das mais severas limitações do presente trabalho. Por outro, no entanto, indica que resultados ainda mais confiáveis poderão ser obtidos futuramente, quando for possível dispor de uma maior quantidade de informações sobre cada planta. Dessa forma, é de fundamental importância que no futuro seja feito um estudo criterioso buscando determinar a quantidade de amostras que minimiza o erro de diagnóstico para uma dada planta, buscando-se o desenvolvimento de um protocolo experimental adequado para esse fim. Tudo isso, naturalmente, deverá ser feito levando-se em conta

também as limitações práticas impostas pelas necessidades agronômicas e econômicas das fazendas.

### **6.3. Considerações finais**

A técnica LIFS demonstrou grande potencial para o diagnóstico em condições de campo, obtendo uma confiabilidade de 87%, quase o dobro dos 47,6% tipicamente identificados pelos procedimentos de inspeção visual tipicamente empregados nas fazendas citrícolas.

Da mesma forma, essa técnica apresentou boas taxas de acerto no experimento de diagnóstico precoce, chegando a obter mais de 60% quando nenhum sintoma havia ainda se manifestado e alcançando no último mês a mesma precisão do RT-PCR, a técnica de diagnóstico mais confiável de que se dispõe atualmente, depois de tê-la superado no período inicial. A análise preliminar do potencial das técnicas LIFI e LIBS para o diagnóstico precoce também forneceu resultados muito satisfatórios, sempre superiores a 60% de acerto. A importância desses resultados pode ser percebida quando são comparados aos meros 27% de plantas inoculadas efetivamente identificadas pela inspeção visual, e também quando é levado em conta que todas as três técnicas podem fornecer análises rápidas e de baixo custo.

Em vista do exposto, pode-se dizer que este trabalho abre muitas portas para desdobramentos futuros, ao mesmo tempo em que oferece motivos para esperança de que o greening, a mais séria ameaça presente à citricultura brasileira e mundial, seja derrotado pelo progresso das pesquisas visando à melhoria dos métodos de diagnóstico. Este trabalho deu várias importantes contribuições para esse fim.

## Referências bibliográficas

ANANTHAKRISHNAN, G.; VENKAPRASANNA, T.; ROY, A.; BRLANSKY, R. N. *Characterization of the mixture of genotypes of a Citrus tristeza virus isolate by reverse transcription-quantitative real-time PCR*. **Journal of Virological Methods**, 2010, v. 164, n. 1-2, p. 75-82.

ANTONELLI, A.; COCCHI, M.; FAVA, P.; FOCA, G.; FRANCHINI, G. C.; MANZINI, D.; ULRICI, A. *Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to a wavelet-based classification algorithm*. **Analytica Chimica Acta**. 2004, v. 515, p. 3-13.

BASSANEZI, R. B. **Aspectos epidemiológicos do HLB e suas implicações no manejo da doença**. Cordeirópolis, 2010. Publicado em <<http://www.iac.sp.gov.br>>; não mais disponível. Acesso em: 21 de maio de 2010.

BELASQUE JÚNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; LEITE JÚNIOR, R. P.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. *Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de huanglongbing (HLB, greening) visando o controle efetivo da doença*. **Tropical Plant Pathology** [online]. 2009, v. 34, ed. 3, p. 137-145. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1982-56762009000300001&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-56762009000300001&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 02/03/2010.

BENYON, L.; ZHOU, L.; WEATHERSBEE, A.; DUAN, Y. *Nested PCR is essential for the detection of extremely low titer of Candidatus Liberibacter asiaticus from citrus and its vector psyllid Diaphorina citri*. **Phytopathology**, 2008, v. 98, ed. 6, p. S21.

BERGER, S.; BENEDIKTYOVÁ, Z.; MATOUS, K.; BONFIG, K.; MUELLER, M. J.; NEDBAL, L.; ROITSCH, T. *Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of P. syringae and of oxylipins on A. thaliana*, **Journal of Experimental Botany**, 2007, v. 58, p. 797.

BERNACKI, M. **Principles of training multi-layer neural network using backpropagation**. Cracóvia, 2004. Disponível em: <[http://galaxy.agh.edu.pl/~vlsi/AI/backp\\_t\\_en/backprop.html](http://galaxy.agh.edu.pl/~vlsi/AI/backp_t_en/backprop.html)>. Acessado em: 10 de novembro de 2009.

BOVÉ, J. M.; CALAVAN, E. C.; CAPOOR, S. P.; CORTEZ, R. E.; SCHWARZ, R. E. *Influence of temperature on symptoms of California stubborn, South African greening, Indian citrus decline and Phillipines leaf mottling diseases*. **Proceedings of the Sixth Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, 1974, p. 12-15.

BUSCHMANN, C.; LANGSDORF, G.; LICHTENTHALER, H. K., *Imaging of blue, green, and red fluorescence emission of plants: an overview*, **Photosynthetica**, 2000, v. 38, p. 483.

CARLOS, E. F., COLETTA FILHO, H. D., TARGON, M. L. N.; MACHADO, M. A. (2006). *Quantitative real-time PCR based on TAQMAN probes for the molecular detection of*

Candidatus *Liberibacter asiaticus* and *Ca. L. americanus*. In **Huanglongbing-greening International Workshop** (p. 81), Ribeirão Preto, SP, Brazil, July 16–20, 2006 Proceedings.

CANADA-CANADA, F.; DE LA PENA, A. M.; DIEZ, N. M.; GIRON, A. J.; HEISEL, F.; MIEHE, J. A.; POTES, J. *Laser-induced fluorescence imaging system for weather stress analysis in plant leaves of different wheat varieties*. **Chemia Analityczna**, 2008, v. 53, ed. 4, p. 545-556.

CHEMIMAGE CORPORATION (Pittsburgh, EUA). S. Stewart; J. S. Maier; J. P. Treado. **Raman spectral analysis of pathogens**. US WO2007021485-A2, 30 de abril de 2008.

DORAK, M. T. (org.). **Real-time PCR**. Abingdon, Taylor & Francis, 2006.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL. **Produção brasileira de laranja em 2003**. Cruz das Almas, 2005a. Disponível em: <<http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/labr2003.xls>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2009.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL. **Produção brasileira de limão em 2003**. Cruz das Almas, 2005b. Disponível em: <<http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/libr2003.xls>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2009.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL. **Produção brasileira de tangerina em 2003**. Cruz das Almas, 2005c. Disponível em: <<http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/tabr2003.xls>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2009.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL. **Produção internacional de citros em 2004**. Cruz das Almas, 2005d. Disponível em: <<http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/labr2003.xls>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2009.

ENDO, Y.; KIRIHARA, K.; HATTORI, T.; FUJITA, R. *Experimental study for the diagnosis of gastric cancer by laser induced fluorescence spectroscopy (LIFS)*. **Gastrointestinal Endoscopy**, 2009, v. 51, ed. 4, p. AB95.

FELLER, L.; YASMAN, Y.; BULATOV, V.; SCHECHTER, I. *Spectral fluorescence imaging for quantitative diagnosis and mapping of dental fluorosis affected tooth surfaces*. **Instrumentation Science & Technology**, 2004, v. 32, ed. 6, p. 579-588.

FERREIRA, E. C.; ANZANO, J. M.; MILORI, D. M. B. P.; FERREIRA, E. J.; Lasheras, R. J.; Bonilla, B.; MONTULL-IBOR, B.; CASAS, J.; MARTIN NETO, L. *Multiple response optimization of laser-induced breakdown spectroscopy parameters for multi-element analysis of soil samples*. **Applied Spectroscopy**, 2009, v. 63, p. 1081-1088.

FERREIRA, E. C.; MILORI, D. M. B. P.; FERREIRA, E. J.; SILVA, R. M.; MARTIN NETO, L. *Artificial neural network for Cu quantitative determination in soil using a portable Laser Induced Breakdown Spectroscopy system*. **Spectrochimica Acta – Part B: Atomic Spectroscopy**, 2008, v. 63, p. 1216-1220.

FOLHA RIBEIRÃO. **Fundecitrus oficializa a saída da fiscalização do greening em SP.** Ribeirão Preto, 2010. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/noticias/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=104223>>. Acesso em: 29 de janeiro de 2010.

FUNDECITRUS – FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Fiscalização do greening** – 2009. Araraquara, 2010. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/Pagina/cancrocitrico,271>>. Acesso em: 31 de janeiro de 2010.

FUNDECITRUS – FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Greening: manual técnico.** Araraquara, 2009. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/PageFlip/pageflip.aspx?idPage=143>>. Acesso em: 31 de janeiro de 2010.

GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. *The organism associated with citrus greening disease is probably a member of the Schizomycetes.* **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektions**, 1978, v. 241, p. 221-222.

GRAÇA, J. V. *Citrus greening disease.* **Annual Review of Phytopathology**, 1991, v. 29, p. 109-136.

HALL, M.; FRANK, E.; HOLMES, G.; PFAHRINGER, B.; REUTEMANN, P.; WITTEN, I. H. *The WEKA Data Mining Software: an update.* **SIGKDD Explorations**, 2009, v. 11, ed. 1.

HIROSHIMA UNIVERSITY; NATIONAL AGRICULTURE & FOOD RESEARCH ORGANIZATION (Hiroshima, Japão). T. Masaoka; A. Saito. **Assay for citrus greening disease using iodine-starch reaction.** JP 2004264101-A, 21 de fevereiro de 2008, 05 de outubro de 2008.

IONITA, I. *Early diagnosis of tooth decay using fluorescence and polarized Raman spectroscopy.* **Optoelectronics and advanced materials: rapid communications**, 2009, v. 3, ed. 10, p. 1122-1126.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil.** Rio de Janeiro, 2008, v. 20, n. 12, p. 54-56.

JORNAL DA CIDADE DE HOLAMBRA. **Holambrense cria plataforma inédita para inspeção de laranjeiras.** Holambra, 2009, ed. 745. Disponível em: <<http://www.jcholambra.com.br/Ed745/Noticia02.htm>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2010.

KHAN, F.; CERVANTES, A. *Real time object recognition for teaching neural networks.* **29<sup>th</sup> ASEE/IEEE Frontier in Education Conference**, San Juan, 1999, p. 11b31-11b37.

KONISHI, A.; EGUSHI, A.; HOSOI, F.; OMASA, K. *3D monitoring spatio-temporal effects of herbicide on a whole plant using combined range and chlorophyll a fluorescence imaging.* **Functional Plant Biology**, 2009, v. 36, ed. 10-11, p. 874-879.

KOSAKA, N.; OGAWA, M.; CHOYKE, P. L.; KOBAYASHI, H. *Clinical implications of near-infrared fluorescence imaging in cancer*. **Future Oncology**, 2009, v. 5, ed. 9, p. 1501-1511.

KRAUSE, G. H. *Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics*, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 1991, v. 42, p. 313.

LARIONOV, P. M.; MALOV, A. N.; MANDRIK, M. M.; MASLOV, N. A.; ORISHICH, A. M. *Changes in the laser-induced fluorescence spectrum of myocardium tissue with decrease in its viability*. **Journal of Applied Spectroscopy**, 2003, v. 70, p. 38-42.

LICHTENTHALER, H. K.; MIEHÉ, J. A., *Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress*, **Trends in Plant Science**, 1997, v. 2, p. 316.

LOPES, J. R. S. **Biologia da transmissão de *Candidatus Liberibacter* por *Diaphorina citri***. Cordeirópolis, 2010. Publicado em <<http://www.iac.sp.gov.br>>; não mais disponível. Acesso em: 21 de maio de 2010.

LOPES, S. A. **As bactérias do HLB: sensibilidade a altas temperaturas, multiplicação na planta e ineficácia da poda no manejo da doença**. Cordeirópolis, 2010. Publicado em <<http://www.iac.sp.gov.br>>; não mais disponível. Acesso em: 21 de maio de 2010.

LUALDI, M.; COLOMBO, A.; LEO, E.; MORELLI, D.; MARCHESINI, R. *Natural fluorescence spectroscopy of human blood plasma in the diagnosis of colorectal cancer: feasibility study and preliminary results*. **Tumori**, 2007, v. 93, ed. 6, p. 567-571.

MARCASSA, L. G.; GASPAROTO, M. C. G.; BASQUETE JUNIOR, J.; LINS, E. C.; NUNES, D. F.; BAGNATO, V. S. *Fluorescence spectroscopy applied to orange trees*. **Laser Methods in Biology and Medicine**, 2006, v. 16, p. 884-888.

MASSARI, C. A. **III Dia do Huanglongbing: levantamentos**. Cordeirópolis, 2010. Publicado em <<http://www.iac.sp.gov.br>>; não mais disponível. Acesso em: 21 de maio de 2010.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N., *Chlorophyll fluorescence - a practical guide*, **Journal of Experimental Botany**. 2000, v. 51, p. 659.

MENZEL, E. R. **Laser spectroscopy: techniques and applications**. Nova York, Marcel Dekker Inc., 1995.

MILORI, D. M. B. P.; MARTIN NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V. S. *Humification degree of soil humic acid determined by fluorescence spectroscopy*. **Soil Science**, 2002, v. 167, ed. 11, p. 739-749.

MITCHELL, M. F.; CANTOR, S. B.; RAMANUJAM, N.; TORTOLERO-LUNA, G.; RICHARDS-KORTUM, R. *Fluorescence spectroscopy for diagnosis of squamous intraepithelial lesions of the cervix*. **Obstetrics and Gynecology**, 1999, v. 93, ed. 3, p. 462-470.

OHTA, T.; ITO, M.; KOTANI, T.; HATTORI, T. *Emission enhancement of laser-induced breakdown spectroscopy by localized surface plasmon resonance for analyzing plant nutrients*. **Applied Spectroscopy**, 2009, v. 63, ed. 5, p. 555-558.

OKINAWA PREFECTURE GOVERNMENT (Okinawa, Japão). S. Tajo; K. Takaezu; Y. Nasu; A. Oshiro; M. Uehara. **Method and kit for detecting citrus greening disease**. JP 2006267092-A, 28 de fevereiro de 2003, 24 de outubro de 2004.

PANDHIJA, S.; RAI, N. K.; RAI, A. K.; THAKUR, S. N. *Contaminant concentration in environmental samples using LIBS and CF-LIBS*. **Applied Physics B – Lasers and Optics**, 2010, v. 98, ed. 1, p. 231-241.

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 Spectroscopy**, 2010, v. 25, p. 351-355.

PERONI, L. A.; REIS, J. R. R.; DELLA COLETTA, H.; DE SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A.; STACH-MACHADO, D. R. *Assessment of the diagnostic potential of Immunocapture-PCR and Immuno-PCR for Citrus Variegated Chlorosis*. **Journal of Microbiological Methods**, 2008, v. 75, ed. 2, p. 302-307.

POMPEU JÚNIOR, J.; BLUMER, S. *Laranjeiras e seus porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo*. **Laranja**, Cordeirópolis, 2008, v.29, n.1-2, p.35-50.

PRICE, B. **Fluorescence**. Berkeley, 2010. Disponível em: <<http://icecube.berkeley.edu/~bramall/work/astrobiology/fluorescence.htm>>. Acesso em: 17 de junho de 2010.

ROJAS, R. *The backpropagation algorithm*, in: **Neural networks**. Berlim, Springer-Verlag, 2006.

SANTOS JÚNIOR, D.; TARELHO, L. V. G.; KRUG, F. J.; MILORI, D. M. B. P.; MARTIN NETO, L.; VIEIRA JÚNIOR, N. D. *Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS): fundamentos, aplicações e perspectivas*. **Revista Analytica**, 2006, v. 24, p. 72-81.

SCHOLES, J. D.; ROLFE, S. A. *Chlorophyll fluorescence imaging as tool for understanding the impact of fungal diseases on plant performance: a phenomics perspective*. **Functional Plant Biology**, 2009, v. 36, ed. 10-11, p. 880-892.

SILVA, R. M. **Estudo de uma metodologia para estimar a quantidade de carbono em amostras de solo utilizando espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)**. Dissertação de mestrado, IQSC-USP, São Carlos, 2008.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOIEUX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. *Distribution and quantification of Candidatus Liberibacter americanus, agent of huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR*. **Molecular and Cellular Probes**, 2008, v. 22, ed. 3, 139-150.

TERENCIO, J. C. C. **Detecção precoce da morte súbita dos citros usando fluorescência.** Dissertação de mestrado, IQSC-USP, São Carlos, 2006.

THONG, P. S. P.; OLIVO, M.; CHIN, W. W. L. BHUVANESWARI, R.; MANCER, K.; SOO, K. C. *Clinical application of fluorescence endoscopic imaging using hypericin for the diagnosis of human oral cavity lesions.* **British Journal of Cancer**, 2009, v. 101, ed. 9, p. 1580-1584.

TIAN, Y.; LOPES, F. **Clima e greening afetam safra de laranja da Flórida.** São Paulo, 2009. Disponível em: [http://inovadefesa.ning.com/group/defesasaniatriavegetal/forum/topics/clima-e-greening-afetam-safra?xg\\_source=activity](http://inovadefesa.ning.com/group/defesasaniatriavegetal/forum/topics/clima-e-greening-afetam-safra?xg_source=activity)>. Acesso em: 14 de dezembro de 2009.

WANG, X. F.; ZHOU, C. Y; TANG, K. Z. ZHOU, Y.; LI, Z. A. *A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China.* **European Journal of Plant Pathology**, 2009, v. 124, ed. 1, p. 175-180.

ZAGHI, A. F. **Diagnóstico de doenças de citros utilizando espectroscopia de fluorescência.** Dissertação de mestrado, IQSC-USP, São Carlos, 2008.

ZHU, C. F.; PALMER, G. M.; BRESLIN, T. M. HARTER, J.; RAMANUJAM, N. *Diagnosis of breast cancer using fluorescence and diffuse reflectance spectroscopy: a Monte-Carlo-model-based approach.* **Journal of Biomedical Optics**, 2008, v. 13, ed. 3.

ZSOLNAY, A.; BAIGAR, E.; JIMENEZ, M.; STEINWEG, B.; SACCOMANDI, F. *Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying.* **Chemosphere**, 1999, v. 38, p. 45-50.



# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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