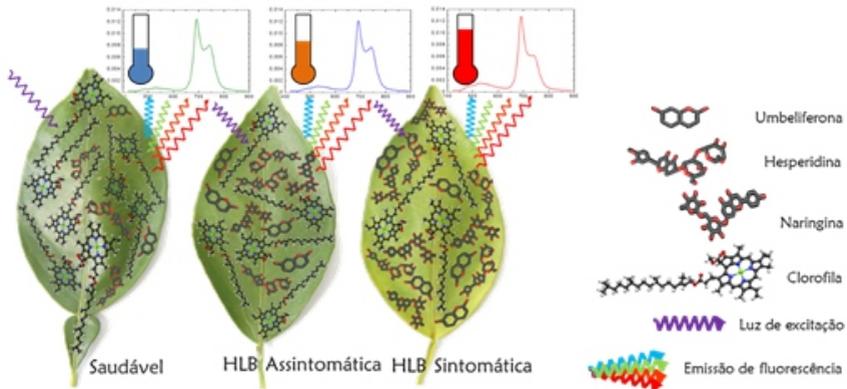


Desenvolvimento de protocolo para diagnóstico do citrus-greening (HLB) em campo com a espectroscopia de fluorescência induzida por laser



ISSN 1678-0434

Dezembro, 2018

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 41

**Desenvolvimento de protocolo para
diagnóstico do citrus-greening (HLB)
em campo com a espectroscopia de
fluorescência induzida por laser**

Anielle Coelho Ranulfi
Thiago Kubota
Juliana Freitas-Astúa
Aida Magalhães
Paulino Ribeiro Villas-Boas
Ednaldo José Ferreira
Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

São Carlos, SP
2018

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452

Caixa Postal 741

CEP 13560-970 São Carlos, SP

Fone: (16) 2107 2800

Fax: (16) 2107 2902

www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Instrumentação

Comitê de Publicações

Presidente

Wilson Tadeu Lopes da Silva

Secretária-executiva

Maria do Socorro Gonçalves de Souza Monzane

Membros

Carlos Renato Marmo

Cíntia Cabral da Costa

Cristiane Sanchez Farinas

Elaine Cristina Paris

Maria Alice Martins

Paulo Renato Orlandi Lasso

Normalização bibliográfica

Maria do Socorro Gonçalves de Souza Monzane

Imagem da capa

Anielle Coelho Ranulfi

Capa, editoração eletrônica e

tratamento das ilustrações

Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2018): 100 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados internacionais de Catalogação na publicação (CIP)

Embrapa Instrumentação

R213bp&d Ranulfi, Anielle Coelho

Desenvolvimento de protocolo para diagnóstico do citrus-greening (HLB) em campo com a espectroscopia de fluorescência induzida por laser / Anielle Coelho Ranulfi, Thiago Kubota, Juliana Freitas-Astúa, Aida Magalhães, Paulino Ribeiro Villas-Boas, Ednaldo José Ferreira, Débora Marcondes Bastos Pereira Milori. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação, 2018.

44 p. – (Embrapa Instrumentação. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN: 1678-0434; 41).

1. Citros. 2. Diagnóstico. 3. HLB. 4. Greening. 5. Cancro cítrico. 6. Espectroscopia de fluorescência induzida por laser. I. Ranulfi, A. C. II. Kubota, T. III. Freitas-Astúa, J. IV. Magalhães, A. V. Villas-Boas, P. R. VI. Ferreira, E. J. VII. Milori, D. M. B. P. VIII. Título. IX. Série.

CDD 21 ED 632.3

© Embrapa 2018

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Objetivos	13
Fundamentos Teóricos: Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS)	14
Materiais e Métodos	18
Amostras	18
Conjunto para o Estudo do HLB	18
Conjunto para o Estudo do Cancro Cítrico e Distinção entre Doenças	19
Preparo das Amostras	20
Teste de qPCR	20
Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser	21
Tratamento dos Dados	23
Avaliação do Diagnóstico Precoce do HLB	23
Análise do Conjunto para o Estudo do Cancro Cítrico e Diferenciação entre Doenças	24
Classificadores via regressão	24
Resultados e discussões	25
HLB	25
Cancro Cítrico	26
Conclusão	40
Referências	41

Desenvolvimento de protocolo para diagnóstico do citrus greening (HLB) em campo com a espectroscopia de fluorescência induzida por laser

Anielle Coelho Ranulfi¹

Thiago Kubota²

Juliana Freitas-Astúa³

Aida Magalhães⁴

Paulino Ribeiro Villas-Boas⁵

Ednaldo José Ferreira⁶

Déborá Marcondes Bastos Pereira Milori⁷

Resumo

Com clima diversificado e terras férteis, o Brasil tem vocação natural para o desenvolvimento agropecuário e todas as suas vertentes. Assim, o agronegócio é hoje a principal locomotiva da economia brasileira, representando cerca de um terço do nosso Produto Interno Bruto (PIB). Nesse contexto, o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do planeta, com destaque para a produção de laranjas. Particularmente, o país lidera a produção mundial de suco de laranja e conta com uma participação de 85% nas exportações deste produto. Porém, um dos principais fatores atuais que restringem os lucros e a expansão da citricultura é o controle fitossanitário. Atualmente, dentre as principais doenças podemos destacar o HLB e o cancro cítrico. Ambas, doenças bacterianas que não têm cura, comprometem a produção e desenvolvimento da fruta e levam à morte da árvore. Dessa maneira, o monitoramento destas é fundamental para evitar danos aos frutos e a necessidade da erradicação de plantações inteiras. O presente trabalho avaliou o emprego das técnicas de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS) como forma de diagnóstico destas doenças, se apresentando como uma alternativa às inspeções visuais e ao PCR utilizados atualmente. Para isso, folhas de citros in natura provenientes de plantas saudáveis, com HLB ou com cancro foram amostradas e medidas. Através do sistema LIFS foi realizado um estudo de precocidade no diagnóstico do HLB.

¹Aluna de doutorado IFSC-USP/Embrapa Instrumentação

²Aluno de mestrado IFSC-USP/Embrapa Instrumentação

³Pesquisadora Embrapa Mandioca e Fruticultura

⁴Pós-doc Embrapa Instrumentação

⁵Pesquisador Embrapa Instrumentação

⁶Analista Embrapa Instrumentação

⁷Física, Doutora em Física, pesquisadora na Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP, debora.milori@embrapa.br

Este sistema fotônico pôde detectar a doença até 21 meses antes do aparecimento dos primeiros sintomas visuais. Foram utilizados classificadores sazonais, criados a partir de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) e conjuntos de calibração previamente avaliados. Quanto ao cancro cítrico e o sistema LIFS, taxas de acerto superiores a 90% foram alcançadas nos melhores casos de validação cruzada dos dados. A diferenciação do cancro e do HLB também foi possível pela mesma técnica ao avaliar um conjunto pequeno de dados, que atingiu uma taxa de acerto de 82%. Por fim, os resultados corroboraram com a ideia inicial de se realizar o diagnóstico do HLB e do cancro cítrico através de técnicas fotônicas. Dentre outras vantagens estas permitem uma análise rápida, in loco, sem a necessidade de preparo de amostra. Além disso, para o HLB, a técnica fotônica LIFS demonstrou menor sensibilidade à distribuição não homogênea da doença, quando comparada com a técnica de referência (qPCR).

Palavras-chave: Citros. Diagnóstico. HLB. Greening. Cancro cítrico. Espectroscopia de fluorescência induzida por laser.

Development of a protocol for the diagnosis of citrus-greening (HLB) in the field with laser-induced fluorescence spectroscopy

Abstract

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

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

Introdução

A alimentação é uma certeza diária de toda humanidade, o que torna o tema da produção de alimentos um dos mais importantes. Nesse contexto, o Brasil é um dos principais fornecedores de produtos agropecuários para o mundo. Com um clima diversificado, chuvas regulares, energia solar abundante e grande parte de toda a água doce disponível no planeta, o Brasil tem cerca de 70 milhões de hectares de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade. Esses fatores fazem do país um lugar de vocação natural para a agropecuária e todos os negócios relacionados à suas cadeias produtivas. O desenvolvimento científico-tecnológico e a modernização da atividade rural, conseguidos através de pesquisas e da expansão da indústria de máquinas e implementos, contribuíram muito para que o país atingisse o patamar de uma das mais respeitáveis plataformas mundiais do agronegócio, que é hoje a principal locomotiva da economia brasileira.

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo. Nesse contexto, destaca-se a produção de laranjas, que contemplou com 16,36 milhões de toneladas o setor produtivo em 2012/2013 e deve aumentar em torno de 8% em 2013/2014, segundo a USDA, atingindo 17,75 milhões de toneladas, impulsionada por elevada produtividade e clima favorável.

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

É com o suco de laranja que o país confirma sua liderança. De cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos no Brasil. Em nenhuma outra *commodity*², o país tem expressividade semelhante. A força da indústria brasileira de suco de laranja não está só nas exportações, o seu caráter empreendedor impulsionou, na década de 1990, o surgimento das primeiras agroindústrias brasileiras a atuarem em solos estrangeiros, o que fortaleceu ainda mais a sua posição competitiva frente ao cenário internacional. Apenas no Cinturão Citrícola, o Brasil produz 53% de todo o suco de laranja

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

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

produzido no mundo. Segundo dados da USDA, a exportação brasileira de suco deve superar a produção, fazendo com que os estoques caiam, acompanhando o ritmo dos embarques. Já a produção de suco de laranja dos Estados Unidos deve cair cerca de 12%, principalmente devido a perdas com HLB na Flórida.

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

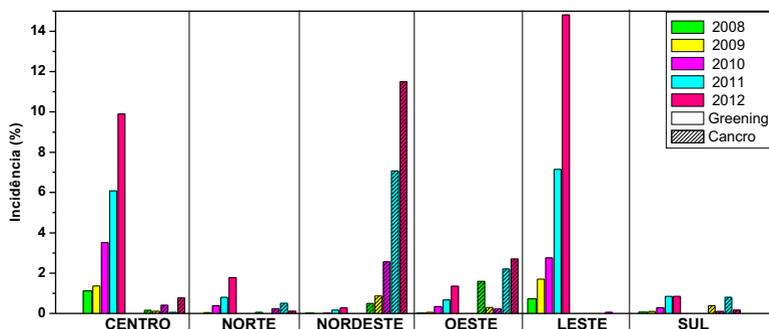
Adotando um rendimento médio de duas caixas de laranja por árvore estima-se que o Cancro Cítrico, a CVC, a Morte Súbita e o Greening, ou *Huanglongbing* (HLB), foram responsáveis por uma redução anual de cerca de 78 milhões de caixas, que, comparadas com os 317 milhões de caixas colhidas na safra 2009/10,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

Atualmente, o manejo adotado para uma tentativa de controle do HLB são pulverizações para controle do inseto vetor, erradicação de árvores doentes e plantio de mudas certificadas. As árvores doentes são identificadas através de inspeções visuais frequentes na fazenda na busca por sintomas da doença, um método viável do ponto de vista prático, porém com um erro associado bastante grande. Estima-se que para o caso do HLB, a taxa de acerto das inspeções visuais chegue a 47% apenas em relação às plantas sintomáticas, já que o método não identifica árvores doentes em fase assintomática. Isto é um grande problema, já que para cada árvore sintomática presente no campo, existam outras duas ou três contaminadas em fase assintomática. Para o diagnóstico da doença a técnica de referência utilizada é o PCR (Reação em Cadeia Polimerase), uma técnica sensível de diagnóstico, que busca o DNA (ácido desoxirribonucleico) da bactéria na planta. Porém, é realizada em poucas árvores apenas para confirmação da presença da bactéria no campo, (9-11) já que trata-se de uma técnica de alto custo, que envolve diversas etapas de processamento, e cujo resultado pode demorar dias, sendo inviável do ponto de vista prático e econômico.

Para prevenir o aparecimento do Cancro Cítrico também são feitas inspeções visuais frequentes e bem mais cuidadosas do que as realizadas para o HLB, uma

vez que os sintomas são menos visíveis; é realizado ainda o plantio de mudas sadias certificadas, desenvolvidas em viveiros telados; todo o material de colheita é cuidadosamente manipulado; e também é feito o plantio de quebra ventos para evitar a ação do vento e poeira sobre o pomar. Quando uma planta é identificada com sintomas, o procedimento é eliminá-la do pomar para que se evite dessa maneira a permanência do inóculo no campo. No estado de São Paulo está em vigor uma Resolução³ que obriga a eliminação das árvores contaminadas, que devem ser queimadas no local, e pulverização das demais plantas de citros abrangidas pelo raio perifocal de no mínimo 30 metros, medido a partir da planta contaminada (e eliminada), com calda cúprica na concentração de 0,1% de cobre metálico, repetindo a pulverização a cada brotação.

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



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

Figura 1 - Incidência de HLB e Cancro Cítrico nas regiões produtoras de citros. Para o HLB a contaminação é dada em porcentagem de plantas sintomáticas encontradas. E para o Cancro Cítrico, é dada em porcentagem de talhões contaminados.

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

Diante do exposto, é possível observar a gravidade e distribuição espacial das doenças que acometem os pomares, a baixa eficiência no controle do desenvolvimento de tais doenças bacterianas, que se propagam com velocidade assustadora, e por fim a necessidade de meios de diagnóstico precoce, já que não existe a cura para determinadas doenças. Cada doença ou estresse biótico sofrido pela planta leva a alterações específicas no metabolismo da mesma, que por sua vez, acarretam em alterações químicas em seus órgãos. Tais alterações podem, por fim, ser detectadas pela aplicação de técnicas espectroscópicas adequadas e, assim realizadas a caracterização e diagnóstico da doença.

O controle de uma doença no campo, como o HLB e o cancro cítrico, através de uma nova tecnologia deve promover a redução das perdas para o produtor, culminando na eliminação destas doenças no campo a longo prazo, trazendo o desenvolvimento rural e tendo como consequência o aumento da produção, promovendo a segurança alimentar e nutricional que buscamos. A implantação de técnicas como estas, que seguem os preceitos da química verde e não produzem resíduos, devem ainda, impactar positivamente a sustentabilidade ambiental, já que traria a redução do uso de agroquímicos no campo, possibilitando sua aplicação em taxas variáveis, permitindo, portanto, o acesso a alimentos mais seguros e saudáveis.

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

Segundo Buschmann, a fluorescência da vegetação terrestre consiste quase exclusivamente da fluorescência das folhas. As folhas por sua vez, possuem quatro bandas de fluorescência: uma no vermelho (próximo a 690 nm) e outra no infravermelho (próximo a 740 nm), correspondente à fluorescência da clorofila, e outras duas bandas largas na região do azul (430-450 nm) e verde (520-530 nm), correspondendo às emissões de ácidos cinâmicos, ácidos p-cumáricos e ácidos ferrúlicos (metabólitos secundários). Doenças, estresses

ou outras alterações podem levar a variações nas concentrações dos pigmentos e metabólitos na planta, e estas podem ser detectadas pela técnica fotônica de fluorescência.

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

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

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

Objetivos

Dessa maneira, este trabalho continua estudos propostos pelo grupo do Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação, São Carlos – SP, que viabiliza esforços na busca e desenvolvimento de equipamentos alternativos

para diagnóstico, precoce e não invasivo, de doenças dos citros, baseados nos princípios da biofotônica. Nele, foi avaliada a Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser, do inglês *Laser-induced Fluorescence Spectroscopy* (LIFS) com o objetivo de verificar a potencialidade da técnica como forma de diagnóstico do HLB através da medida de folhas de citros doentes (HLB), sintomáticas e assintomáticas, e também de folhas saudáveis, e do cancro cítrico, por meio da medida de folhas das mesmas classes acima citadas para um estudo preliminar da doença. Para ambos os casos não houve necessidade de preparo de amostra, sendo os dados adquiridos nas folhas in natura. Para as tentativas de diagnóstico, foi realizada a indução de classificadores via Regressão por Mínimos Quadrados Parciais, do inglês *Partial Least Square Regression* (PLSR), metodologia proposta por Frank e colaboradores, (18) e empregada por Cardinali. (19,20)

Fundamentos Teóricos: Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS)

Fisicamente os fótons absorvidos pela estrutura eletrônica elevam a energia da molécula a estados quânticos excitados. Para a molécula excitada atingir o estado fundamental ela deve dissipar a energia absorvida por processos de decaimento radiativo e/ou não-radiativo. O processo de decaimento não-radiativo é aquele no qual a energia em excesso é liberada por relaxações vibracionais das moléculas, e acontecem muito mais rapidamente devido às colisões entre elas (10-11 – 10-13 segundos). Quando ocorre emissão de radiação pela matéria o fenômeno é chamado de luminescência. Esta é, por sua vez, dividida formalmente em duas categorias: a fluorescência e a fosforescência, que ocorrem dependendo da natureza do estado excitado. A fluorescência ocorre a partir de estados excitados do tipo singleto, estado em que o spin dos elétrons se encontra anti-paralelo, ou seja, um spin *up* e um spin *down*, como se pode notar na ilustração da . Já a fosforescência ocorre a partir de estados excitados do tipo tripleto, estado em que o spin dos elétrons se encontra paralelo, ou seja, ambos spin *up* ou ambos spin *down* (Figura 2).

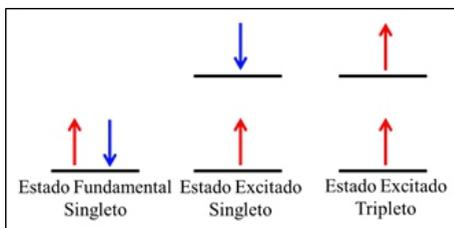
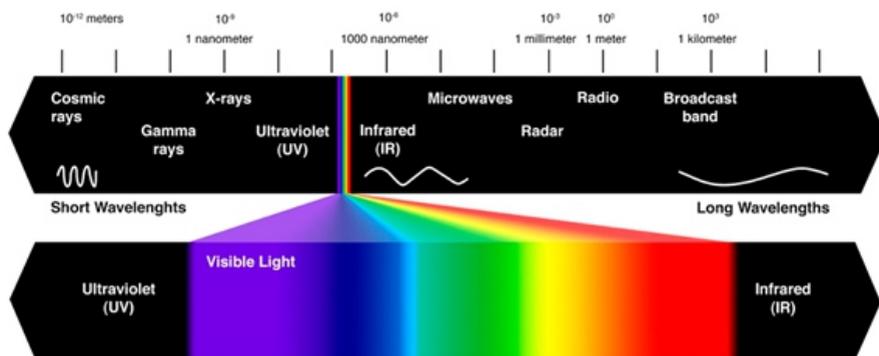


Figura 2 - Spin nos estados fundamental e excitados. A diferença entre uma molécula no estado fundamental e no estado excitado está no fato de os elétrons serem diamagnéticos no estado fundamental e paramagnéticos no estado excitado. Essa diferença no estado do spin faz com que a transição singleto para tripleto (ou tripleto para

singleto) seja mais improvável do que as transições do tipo singleto-singleto, já que a primeira envolve uma mudança no estado eletrônico. Em vermelho está o spin *up* e em azul o spin *down*.

A espectroscopia eletrônica ocorre na região que vai do ultravioleta ao infravermelho próximo, passando pelo visível, regiões que podem ser observadas no espectro eletromagnético da Figura 3.



Fonte: ROHDEN.

Figura 3 - Espectro eletromagnético. Destaque para o intervalo da luz visível.

A teoria quântica mostra que a energia das moléculas é quantizada em certos valores, e estes dependem da diferença de energia entre os níveis eletrônicos envolvidos na transição. A energia é dada pela Lei de Planck, e expressa pela equação $E = h\nu = hc/\lambda$ em que E é a energia, h a constante de Planck, c a velocidade da luz, ν e λ a frequência e o comprimento de onda do fóton, respectivamente. Quando ocorre uma transição eletrônica, a molécula deve, portanto, absorver ou emitir a diferença de energia, de acordo com a seguinte relação:

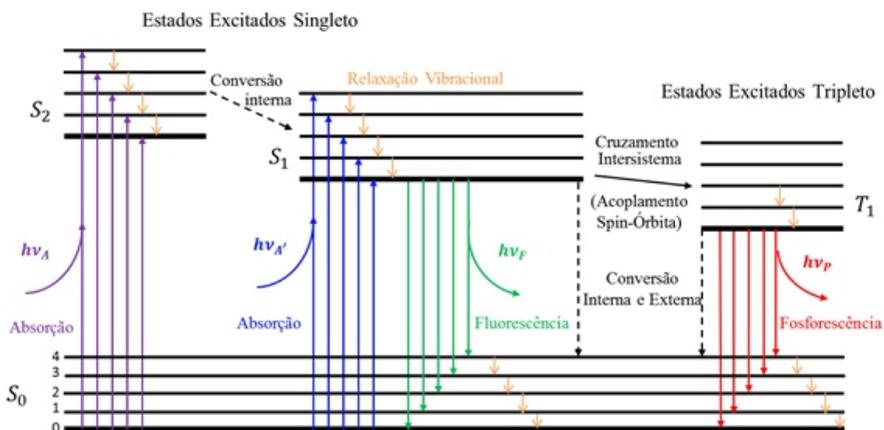
$$\Delta E = E_f - E_i = h\nu \quad \text{Equação (1)}$$

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

A Figura 4 mostra um típico diagrama de Jablonski, em que o estado fundamental singleto, e o primeiro e segundo estado excitado singleto estão designados, respectivamente, por S_0 , S_1 e S_2 . Nestes, os fluoróforos podem existir em diferentes níveis de energia vibracionais, designados por 0, 1, 2... . O estado eletrônico tripleto está representado por T_1 . As transições entre os estados foram retratadas em setas verticais.

O processo de **absorção** de energia ocorre muito rapidamente, com transições tipicamente da ordem de 10^{-15} s, um tempo muito pequeno para deslocamentos do núcleo de acordo com o que diz o Princípio de Franck-Condon, assim a transição mais provável é aquela que não envolve a mudança das coordenadas nucleares e é representada pela seta completamente vertical na ilustração da Figura 4. Após o processo de absorção, podem então ocorrer diversos

processos, descritos também na Figura 4. Por exemplo, o fluoróforo excitado em algum nível eletrônico mais alto (por exemplo, S_1 ou S_2), pode diminuir sua energia sobre decaimentos não radiativos, ou seja, energia dissipada em vibrações moleculares. Colisões de moléculas com as espécies excitadas e o solvente levam a uma rápida transferência de energia e um pequeno aumento da temperatura do solvente. Estes processos de **relaxação vibracional** são muito rápidos, chegando a durar 10^{-12} s ou menos.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4 - Diagrama de Jablonski. As setas apontando para cima, em violeta e azul representam a energia absorvida pelo sistema. Em laranja é possível notar as relaxações vibracionais. A conversão interna e externa está indicada pela seta preta tracejada. A seta preta contínua, também na diagonal, indica o cruzamento intersistema, que envolve estados excitados singlete e tripleto. Em verde, está representado o decaimento referente à fluorescência, e em vermelho, o decaimento da fosforescência.

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

O processo de **conversão externa** envolve a interação e a transferência de energia entre os estados excitados e o solvente ou soluto. Baixas temperaturas

e uma alta viscosidade levam, portanto, a uma maior fluorescência, pois reduzem o número de colisões entre as moléculas, e desta forma, retardam as perdas energéticas por esta via.

O retorno ao estado fundamental a partir do mais baixo nível vibracional do estado excitado S_1 , sem variação do spin total ($DS=0$), é uma transição permitida por dipolo elétrico e acontece a uma taxa de mais ou menos $10^8 s^{-1}$. A este tipo de transição radiativa chamamos **fluorescência**. (14) Apenas para lembrar, as regras de seleção que determinam as transições permitidas por dipolo elétrico são $\Delta l = \pm 1$, $\Delta m = 0, \pm 1$ e $\Delta s = 0$, a partir da qual a transição acima foi justificada.

Moléculas no estado S_1 podem também fazer uma conversão para primeiro estado tripleto T_1 . E a conversão de S_1 para T_1 é chamada de **cruzamento intersistema** e ocorre com variação no valor do spin total da molécula ($DS=1$). Emissões a partir de T_1 para o fundamental são proibidas por dipolo elétrico pelas regras de seleção quânticas, mas podem ocorrer via interações do tipo quadrupolar elétrica ($DS=0$), resultando em decaimento radiativo lento, da ordem de segundos a milissegundos, e neste caso denominam-se **fosforescência**. (14)

A fluorescência em compostos orgânicos ocorre usualmente em sistemas cíclicos rígidos e com duplas ligações. A molécula de clorofila, que absorve nas regiões do azul e vermelho e fluoresce no vermelho e infravermelho, é formada basicamente por uma porfirina contendo no seu centro um íon Mg. Ela possui um quinto anel adicional à estrutura básica das porfirinas de quatro anéis pirrólicos, contendo um grande número de duplas ligações em um sistema conjugado, sendo tais ligações alternadamente simples e duplas, possuindo muitos elétrons que podem tomar parte na absorção da luz. A estrutura da molécula de clorofila está ilustrada na Figura 5.

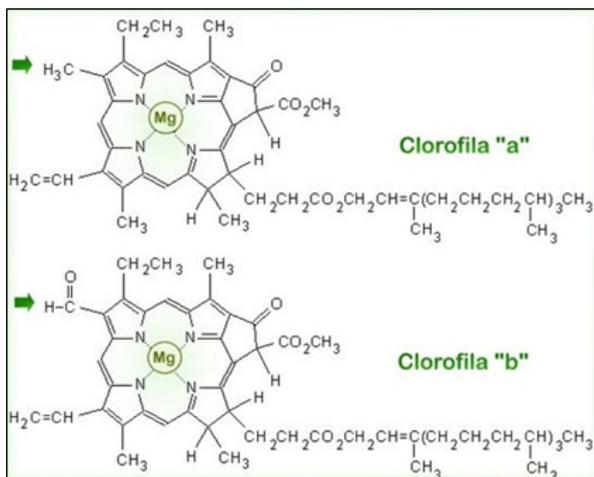
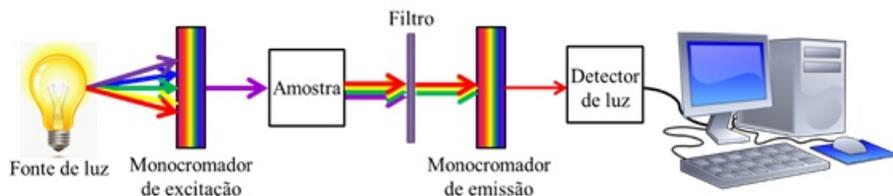


Figura 5 - Estrutura das moléculas de clorofila *a* e *b*. Na sua estrutura básica observa-se uma porfirina, com um magnésio no centro, e um quinto anel pirrólico conferindo à estrutura ainda mais rigidez e um grande número de elétrons. As setas indicam os radicais que diferenciam a clorofila *a* da clorofila *b*.

Fonte: MARTINEZ

De modo geral, um equipamento de espectroscopia de fluorescência consiste basicamente de uma fonte de luz com uma ampla faixa espectral para excitação da amostra, um monocromador para seleção do comprimento de onda de excitação, um monocromador para medir a luz emitida pela amostra, um filtro para reduzir a entrada de luz da excitação no monocromador de emissão, um detector de luz, e por fim, um computador com software dedicado para a aquisição e análise dos dados. Na espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS) no lugar de uma fonte de luz e um monocromador de excitação se utiliza um laser. Nesta configuração se perde o grau de liberdade de variação do comprimento de onda de excitação, mas é possível aumentar a intensidade de luz excitando a amostra em comprimentos de onda onde a absorção de luz é mais efetiva para observação da fluorescência desejada. A figura 3.5 mostra um esquema simplificado de um aparato de espectroscopia de fluorescência.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5 - Esquema contendo os principais componentes de um aparato de espectroscopia de fluorescência. Uma fonte de luz com ampla faixa espectral para excitação da amostra incide em um monocromador para a seleção do comprimento de onda de excitação, e a luz selecionada incide na amostra, que responde com a fluorescência. Além da fluorescência é possível captar a reflexão da luz usada na excitação, e para eliminar esta influência, antes chegar ao monocromador de emissão a luz passa por um filtro. Feito isso, a luz proveniente da fluorescência da amostra atinge o detector, que está ligado a um computador dedicado à aquisição e análise dos dados.

Materiais e Métodos

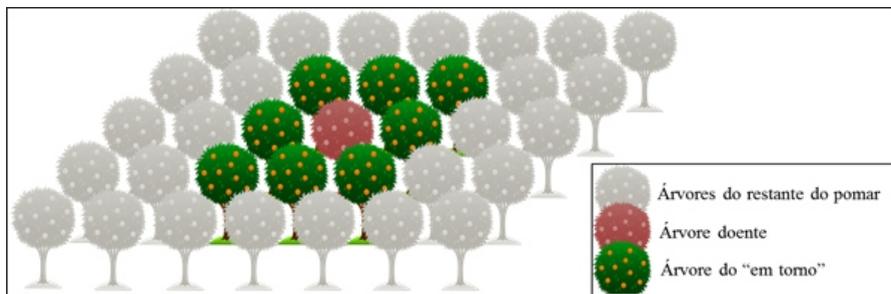
Amostras

Conjunto para o estudo do HLB

As amostras de folhas para o estudo do HLB foram coletadas de laranjeiras adultas da combinação de Valência, enxertadas em citrumelo Swingle, coletadas de árvores cultivadas em campo, enviadas pelo Grupo Terral e oriundas da Fazenda Citrícola, situada na cidade de Gavião Peixoto - SP. Três conjuntos de árvores foram avaliados no campo para extração de folhas: árvores sadias, árvores infectadas com HLB, e árvores com alta probabilidade de infecção com HLB. As amostras foram recebidas mensalmente, de acordo com as inspeções regulares que ocorreram na fazenda no período de estudo, e foram

coletadas pelas equipes de inspeção treinadas e que prestam serviço na própria fazenda. De cada árvore foram coletadas em média cinco folhas, à meia altura e ao redor da planta.

As folhas de árvores contaminadas foram divididas em HLB-Sintomática, ou seja, folhas que apresentavam sintomas visíveis da doença, e HLB-Assintomática, folhas que foram retiradas de uma planta que manifestou os sintomas do HLB, porém de ramos que não apresentavam os sintomas. As plantas saudáveis utilizadas, por sua vez, não apresentavam qualquer deficiência nutricional e estavam localizadas em talhões de baixa infestação de doenças e pragas. Ao conjunto que conta com as classes de folhas: HLB-Sintomática, HLB-Assintomática e Sadia foi dado o nome de conjunto de calibração. As folhas de árvores com alta probabilidade de serem contaminadas com HLB vieram de quarenta árvores presentes no campo que se encontram ao redor de cinco árvores que já foram eliminadas por estarem comprovadamente contaminadas com HLB devido ao aparecimento dos sintomas visuais da doença, como mostra a Figura 6. Assim, devido à proximidade com as plantas HLB sintomáticas, essas árvores foram previamente escolhidas e acompanhadas mensalmente desde Maio/2011. A este conjunto de 200 folhas (mensais) foi dado o nome de conjunto do “entorno” por analogia à localização das mesmas, e por motivo de simplicidade na referência a essas amostras daqui em diante.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 6 - Disposição de parte do conjunto de árvores do “entorno”.

O conjunto de calibração foi usado para a construção de classificadores, e avaliação do LIFS em estudo em relação à capacidade de diagnose. O conjunto de amostras do “entorno” foram usadas para um estudo de capacidade de diagnóstico precoce pelo sistema LIFS-405, que será descrito adiante.

Conjunto para o estudo do Cancro Cítrico e distinção entre doenças

As amostras de cancro cítrico foram folhas coletadas de laranjeiras adultas, com aproximadamente oito anos, e de três combinações diferentes: Valência enxertada em Limão Cravo; Valência enxertada em Laranja Caipira; e Pêra enxertada em Limão Cravo. Estas amostras também foram provenientes de

árvores cultivadas em campo na região de Araraquara. Para as duas últimas combinações também foram recebidas algumas amostras de HLB para que fosse possível comparar dados e verificar a distinção das duas doenças.

Preparo das amostras

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

Teste de qPCR

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

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

Para o conjunto de plantas do “entorno” foram executados 10 teste de RT-qPCR de Maio/2011 a Maio/2013. A extração do DNA foi realizada pelo método descrito por Murray e Thompsom. (35) O DNA total foi extraído a partir de 100 mg (peso fresco) de nervura e pecíolo, utilizando brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB, do inglês *cetyltrimethyl ammonium bromide*). O DNA foi então eluído

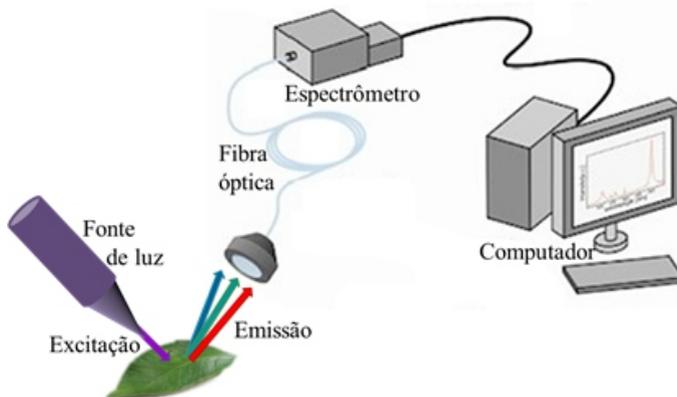
em 60 μL de solução tampão (1:10 de Tris-EDTA 1 mol/L, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNase A), e sua concentração e qualidade foram analisadas por eletroforese em gel de agarose e também pelo espectrofotômetro no ultravioleta visível NanoDrop™ 8000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Denmark). A concentração de DNA final foi padronizada em 10 ng/ μL .

Os *primers* e sondas usados para o qPCR foram baseados na sequência referente à porção 16S do RNA ribossômico de *Ca. Liberibacter asiaticus*. Os *primers forward* e *reverse* foram respectivamente, AS-84F 5'-TCACCGGCAGTCCCTATAAAAGT-3' e AS-180R 5'-GGGTTAAGTCCCGCAACGA-3' e a sonda AS-NED-MGB-111T 5'-ACATCTAGGTAAAAACC-3' como descrito por Coletta Filho e colaboradores. (36) Para o ensaio de qPCR otimizado foi necessário 0,8 μM de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), 0,2 μM de sonda para *Ca. Liberibacter asiaticus*, *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 4 μL de DNA molde padrão (10 ng/ μL), 1X *Eukaryotic 18S rRNA Endogenous control* (Applied Biosystems) como um controle interno para a normalização da quantidade de DNA total de cada reação, e água Milli-Q para um volume final de 20 μL . O protocolo de amplificação rápida correu por 20 s a 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificação (3 s a 95 °C e 30 s a 60 °C). A amplificação, aquisição de dados e análise de dados foram feitos com o ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems), utilizando o software de detecção de sequência (versão 1.4).

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

Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser

Para as medidas com LIFS, foram utilizados dois equipamentos portáteis, desenvolvidos no próprio Laboratório de Óptica e Lasers da Embrapa Instrumentação. Ambos os equipamentos possuem o mesmo aparato, com diferença nos comprimentos de onda de excitação dos lasers. A Figura 7 a seguir traz um esquema simplificado do sistema LIFS montado no Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação.



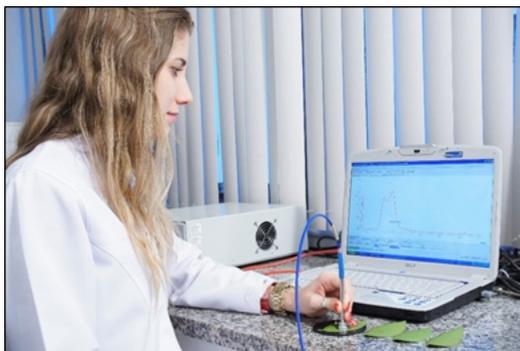
Fonte: Adaptado de JUHA (97).

Figura 7 - Esquema simplificado do sistema LIFS montado no Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação. Como fonte luz para excitação da amostra é usado um laser. Este induz a fluorescência da amostra, que é então captada e conduzida por uma fibra óptica até um espectrômetro. Este por sua vez, está ligado a um computador e um software dedicado para a aquisição e análise dos dados.

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

Para aquisição dos espectros o sistema foi mantido com alguns parâmetros fixos, que constam na , a seguir. O boxcar é um parâmetro de suavização do espectro. Assim, o valor deste parâmetro designa o número de pontos de comprimento de onda maiores e menores do que o ponto central, que serão

utilizados para realização da média das intensidades e, substituirão a intensidade do ponto central. A temperatura da sala foi mantida próxima aos 23°C.



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

Figura 8 - Exemplo do momento de uma medida utilizando o sistema LIFS-561nm na face abaxial de uma folha de laranja doce.

Tabela 1 - Parâmetros para os sistemas LIFS.

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

Fonte: Elaborada pela autora.

Tratamento dos dados

Avaliação do diagnóstico precoce do HLB

As amostras do conjunto de HLB foram medidas pelo sistema LIFS-405 e os espectros obtidos foram pré tratados de forma a corrigir o *offset*. Para isso foi calculada a média das intensidades no intervalo de 425 a 430 nm, e este valor foi subtraído de todo intervalo espectral. Em seguida, os espectros foram normalizados pela área e os valores de intensidade relativa foram usados para as análises posteriores.

A primeira parte dos estudos com HLB envolveu a análise dos conjuntos de calibração medidos, objetivando a construção de um classificador via PLSR, robusto e eficiente o bastante no diagnóstico da doença. Para a construção dos modelos de classificação, cuja metodologia está descrita na seção 5.6.5, foi utilizado o software livre Weka 3.6. (37)

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

Análise do conjunto para o estudo do Cancro Cítrico e diferenciação entre doenças

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

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

Classificadores via regressão

A capacidade de discriminação entre as classes em estudo através da construção de classificadores via regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR), que associa as classes nominais à números, usando um processo de binarização e em seguida, aplica funções para definição de cada classe. Este método foi proposto por Frank e colaboradores (38) e encontra-se bem explicado e utilizado por Cardinali. (22)

Para indução dos classificadores utilizamos o *software* livre Weka 3.6, amplamente utilizado em quimiometria. (37) Primeiramente, para construção dos classificadores foi necessário estabelecer um conjunto denominado Treino para calibração do modelo de regressão, e um conjunto que chamamos de Teste para validação do modelo gerado. Assim, através da validação cruzada verificamos a capacidade de generalização do modelo de predição. Ou seja, o conjunto de dados total é dividido em n grupos, o sistema utiliza $n-1$ grupos para a geração

do modelo, e em seguida testa o modelo no grupo que ficou de fora da construção do modelo, e assim, verifica o desempenho deste através da análise de parâmetros como taxa global de acerto na classificação, curva ROC, entre outros fornecidos pelo próprio software utilizado. Na sequência, o grupo de teste é reintegrado ao grupo, e um novo grupo de teste é retirado, até que todos os grupos sejam usados uma vez como conjunto Teste. É possível ainda que essa divisão dos grupos aleatória seja feita diversas vezes para execução da validação cruzada. Assim, ao final teremos diversos resultados que melhor representam a situação real do conjunto.

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

Resultados e Discussões

HLB

Um espectro típico de cada uma das classes envolvidas neste estudo, obtido através das medidas com o sistema LIFS-405, encontra-se ilustrado na Figura 9, e em cada um deles é possível observar as diferentes bandas de fluorescência. A primeira delas referente às emissões no azul-verde, entre 450 e 600 nm, e as outras duas bandas na região do vermelho-infravermelho, entre 650 e 780 nm aproximadamente.

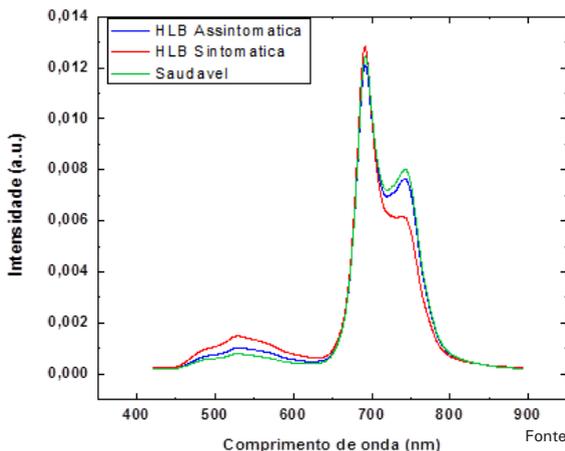


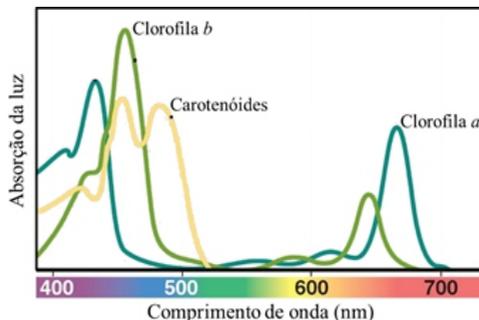
Figura 9 - Espectros de fluorescência médios típicos de cada uma das três classes envolvidas no estudo do HLB.

Os grandes responsáveis pela primeira grande banda de fluorescência são os metabólitos secundários, que dão grande contribuição na diferenciação da doença, já que os valores de intensidade relativa de cada um dos espectros completos foram os dados usados para construção e validação dos classificadores. Como exemplo de metabólitos secundários pode-se citar os ácidos ferrúlicos e os ácidos p-cumáricos. O primeiro é o precursor da umbeliferona, uma cumarina, e o segundo por sua vez, dá origem, em uma das vias metabólicas, aos flavonoides. A fluorescência da cumarina umbeliferona, e dos flavonoides hesperidina e narigina foram estudados e demonstrados por Cardinali. (22) A maioria destes compostos está relacionada com os mecanismos de defesa das plantas e ação contra a presença de patógenos, como fungos e bactérias. Assim, a associação destes fatores pode ser uma indicativa da presença de HLB.

A segunda banda de fluorescência observada corresponde, à temperatura ambiente, principalmente à fluorescência das moléculas de clorofila *a*, e às emissões referentes ao fotossistema⁴ II, com pico em 690nm. A terceira banda de fluorescência, com pico em 740 nm, corresponde principalmente à fluorescência do fotossistema II, à emissão da clorofila *a* devido à reabsorção (já que as emissões em 690 nm são também absorvidas por ela) e, nesse caso, também há uma contribuição do fotossistema I à fluorescência (que contribui com 30-35% da fluorescência referente aos fotossistemas I e II) (39). Esta terceira banda é geralmente menos intensa no espectro porque, a luz com baixo comprimento de onda, como é o caso do comprimento de onda de excitação empregado neste estudo (405 nm), é rapidamente absorvida pelos carotenoides e clorofilas (Figura 10) disponíveis nos cloroplastos presentes na camada superficial da folha, e sendo assim, a maior parte da fluorescência emitida pelas clorofilas precisa percorrer um curto caminho para deixar a folha. Dessa maneira, apenas uma pequena parte dessa fluorescência é reabsorvida, não havendo uma inversão dos picos em 690 e 740 nm, como notaremos mais adiante no caso do sistema LIFS-561. (40)

Nos espectros de folhas HLB-Sintomáticas é possível notar uma diminuição da intensidade do pico em 740 nm quando comparados com os espectros de folhas Saudáveis, e isto ocorre devido a uma diminuição na concentração de clorofila, que pode ser notado pelo sintoma visível de clorose nas mesmas, corroborando com o estudo de Kancheva e colaboradores, (26). Assim, quanto menor a quantidade de clorofila disponível, menor a reabsorção das emissões no pico em 690 nm, provocando um ligeiro aumento deste pico, e uma diminuição do pico em 740nm. A variação em 740 nm também pode ser devido a uma baixa eficiência na transferência de energia do fotossistema II para o fotossistema I, já que se encontram prejudicados pela doença, e dessa forma, prejudicam a absorção e emissão dos próprios fotossistemas.

⁴Fotossistemas são complexos proteicos envolvidos no processo de fotossíntese



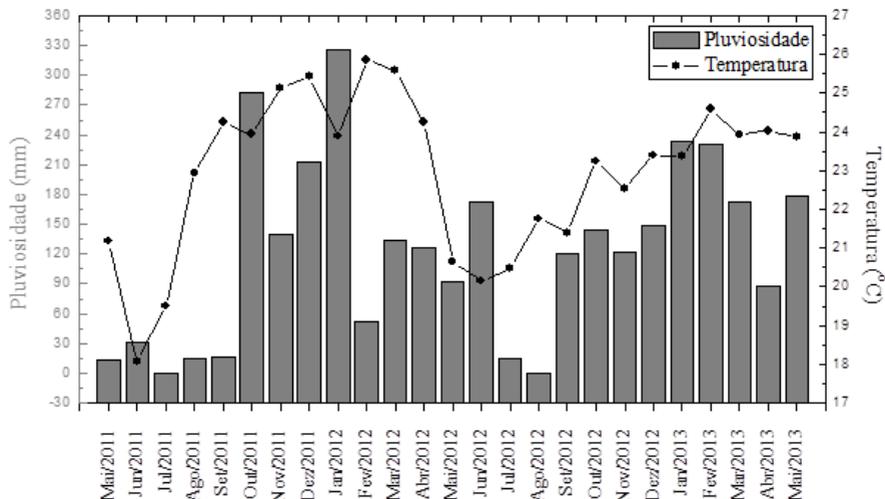
Fonte: Adaptado de AUSTINPRICE2012 (41).

Figura 10 - Espectros de absorção da luz por alguns dos pigmentos presentes nos cloroplastos. A linha tracejada em vermelho destaca o comprimento de onda de 405 nm utilizado nas análises desta etapa.

Pode-se notar pela figura 5.2 que a clorofila *b* absorve muito pouco em 405 nm, e assim, a sua contribuição para o espectro de fluorescência deve ser baixa. Além disso, à temperatura ambiente e em condições fisiológicas, a energia absorvida pela clorofila *b* é rápida e eficientemente transferida para a clorofila *a*. (42) Em condições normais, a fluorescência é emitida predominantemente (~90%) pelos complexos de clorofila presentes no fotossistema II (que contém a maior parte dos pigmentos acessórios das plantas). Porém, de modo geral, apenas de 2-5% da energia absorvida por um fotossistema é dissipada em fluorescência. (43) O restante da energia é dissipado em calor e vibrações. (25)

As plantas têm a capacidade de preservar suas funções vitais mesmo sob grande variação das condições ambientais. Estas grandes variações provocam mudanças na planta a nível celular, em resposta a tais estresses (bióticos ou abióticos), mudanças estas que podem afetar o espectro de emissão de fluorescência de uma folha de citros. (25) O estresse pode, ainda, alterar a quantidade de luz (energia) absorvida, que é usada na fotossíntese, e também a indução de fluorescência da clorofila e dos fotossistemas em geral. Dessa maneira, estudos recentes mostraram que a fluorescência induzida por laser é uma ferramenta não invasiva capaz de detectar estresse hídrico em plantas de citros. (91-92)

Sendo assim, ao iniciar os estudos com os classificadores, decidimos separar os dados dos conjuntos de calibração medidos, de acordo com a variação da pluviosidade e temperatura, para que estes não fossem, portanto, fatores que pudessem influenciar ou interferir no diagnóstico das plantas. A variação na quantidade de chuvas e temperatura pode ser observada na Figura 11 para os meses do experimento. Assim, de Maio/2011 a Maio/2013, os meses de Abril a Setembro amostraram o conjunto de calibração da época de seca, e as folhas recebidas entre os meses de Outubro e Março amostraram o conjunto de calibração da época de chuvas, divisão baseada também na ocorrência ao longo dos anos para a região.



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

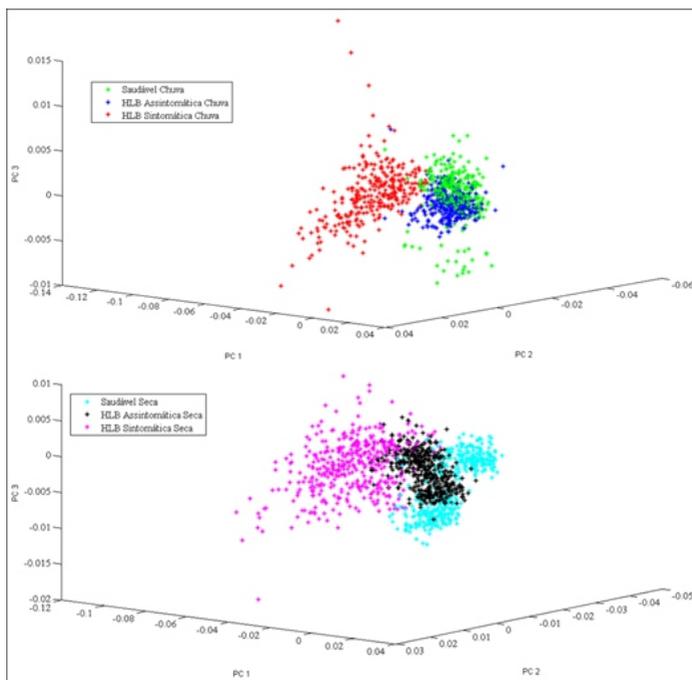
Figura 11 - Dados médios mensais de pluviosidade e temperatura do local onde as amostras foram coletadas.

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

Por fim, o classificador de épocas chuvosas contou com um total de 900 folhas, sendo 300 folhas de cada uma das classes, e o classificador de períodos secos contou com 1290 amostras, ou seja, 430 amostras de cada classe. Assim, cada classificador ficou com diferente número de amostras. Isto ocorreu porque nos meses com poucas chuvas a quantidade de árvores identificadas como doentes no campo era bem maior do que o número de árvores identificadas como doentes por HLB, pelas equipes de inspeção, na época de muita chuva. Ao que

parece, as plantas conseguem reagir melhor enquanto no período chuvoso, em que poucas delas apresentam os sintomas do HLB. Já no período que passam por um estresse hídrico e de baixas temperaturas, a planta parece estar mais sensível, já que além de reagir contra a presença do patógeno também precisa manter suas demais funções controladas devido aos estresses abióticos que também está enfrentando, o que sugere uma justificativa para maior manifestação dos sintomas.

A fim de demonstrar as diferenças entre as classes presentes nos dois classificadores construídos, empregamos o teste de PCA em três dimensões. A Figura 12 mostra as classes bem separadas, com uma pequena confusão entre HLB Assintomática e as folhas Saudáveis. Esta confusão já era esperada, já que a doença se desenvolve de forma não homogênea na planta e algumas das folhas assintomáticas ainda podem estar em um estágio muito inicial de reação contra a presença do patógeno. É interessante também observar o comportamento intermediário da classe HLB Assintomática, que se encontra entre a classe Saudável e a HLB Sintomática na distribuição dos clusters no PCA-3D.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 12 - PCA-3D do conjunto de amostras envolvidas nos classificadores de época chuvosa (acima) e de época de seca (abaixo) nos quais se pode notar a separação das classes envolvidas.

Construídos os classificadores, havia a necessidade de validá-los ainda, antes de emprega-los para classificar as amostras mensais do conjunto do “em torno”. Para tanto, os conjuntos de calibração cujos espectros foram adquiridos de junho/2013 a fevereiro/2014 foram usados para a validação. Também estas amostras foram então divididas de forma sazonal, usando os mesmos critérios usados na divisão em relação aos classificadores e, portanto um conjunto contendo 300 amostras (100 amostras de cada classe) foi empregado na validação do classificador para épocas chuvosas, e um segundo conjunto, contendo 225 amostras de folhas (75 folhas de cada uma das classes) foi usado na validação do classificador de períodos secos. O classificador de chuva apresentou um acerto global de 90% na validação do conjunto também de chuva. Ao tentar classificar o conjunto de validação de seca, o acerto do classificador caiu para 56%. Já o classificador de seca ao ser validado com o conjunto também de seca apresentou um acerto de 85%, e quando com o conjunto de chuva, caiu para 66%. A matriz de confusão para as validações podem ser vistas na Tabela 2.

Tabela 2 - Matrizes de confusão para validação dos classificadores de épocas chuvosas e de seca construídos.

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

Fonte: Elaborada pela autora.

Depois de construídos e validados com taxas superiores a 85%, os classificadores foram empregados na avaliação do diagnóstico precoce das árvores do conjunto do “em torno”. Sabendo que para cada árvore foram avaliadas cinco folhas, foram consideradas doentes aquelas que apresentaram ao menos três, das cinco folhas, diagnosticadas como doente; as árvores que apresentaram apenas uma ou duas folhas, das cinco totais, classificadas como

doentes, a árvore foi considerada Suspeita, e dessa maneira ficou marcada para que fosse avaliada mais cuidadosamente pelas equipes de inspeção nos meses seguintes. Foram consideradas saudáveis aquelas árvores que apresentaram as cinco folhas medidas classificadas como saudável. Esse acompanhamento foi feito mensalmente, e os resultados de classificação para as árvores constituintes do conjunto do “em torno” estão na Tabela 3.

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

Legenda	Árvore central	Árvore Doente	Árvore Suspeita	Apresentou Sintomas	Testadas PCR
	Em torno Planta A	Em torno Planta B	Em torno Planta C	Em torno Planta D	Em torno Planta E
Mai/2011					
Jun/2011					
Jul/2011					
Ago/2011					
Set/2011					
Out/2011					

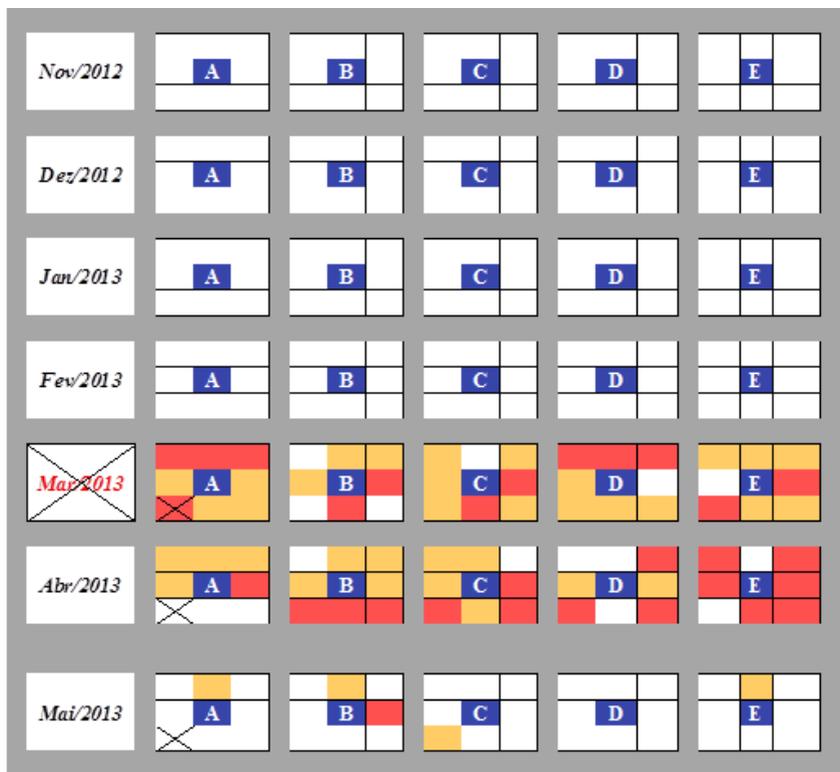
(Continua)

(Continuação da Tabela 3)

<i>Nov/2011</i>					
<i>Dez/2011</i>					
<i>Jan/2012</i>					
<i>Fev/2012</i>					
<i>Mar/2012</i>					
<i>Abr/2012</i>					
<i>Maio/2012</i>					
<i>Jun/2012</i>					
<i>Jul/2012</i>					
<i>Ago/2012</i>					
<i>Set/2012</i>					
<i>Out/2012</i>					

(Continua)

(Continuação da Tabela 3)



Fonte: Elaborada pela autora.

Observando os dados obtidos foi possível notar a alta capacidade de diagnóstico das plantas em relação ao HLB, e principalmente verificar uma periodicidade de manifestação da doença, mesmo em fase assintomática. Assim, existiram meses em que o número de plantas diagnosticadas foi grande, e também podemos notar o diagnóstico de apenas plantas saudáveis em alguns outros meses. Dessa maneira, é possível inferir a alta capacidade de reabilitação da planta em determinados períodos, camuflando toda e qualquer alteração química que a doença possa estar causando nela. Tais mudanças podem estar sim associadas de alguma maneira ao excesso ou falta de chuvas, e aumento ou decréscimo da temperatura quando comparamos com os dados existentes no gráfico da Figura 11.

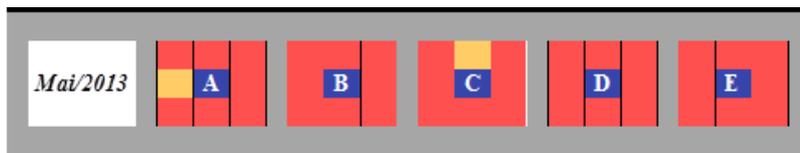
Dentre o conjunto de árvores do “em torno”, uma chamou a atenção porque apresentou os sintomas do HLB, devidamente identificada pelas equipes de inspeção, durante o experimento, o que ocorreu em Março/2013. É importante observar que o sistema LIFS-405 a vinha diagnosticando como suspeita ou como doente desde Junho/2011, em quase todos os meses em que foi possível

realizar o diagnóstico de algumas plantas. A exceção foi o mês de Julho/2012, em que ela não foi diagnosticada, porém, foi um mês em que pouquíssimas plantas o foram, e um mês em que apenas uma delas foi detectada como doente, segundo o critério adotado.

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

Se os critérios adotados anteriormente para designar uma planta como doente, suspeita ou saudável, forem adotados e carregados para os meses seguintes, ou seja, uma vez diagnosticada como doente, doente a partir daquele mês, e uma vez considerada suspeita, esse diagnóstico fosse carregado para os meses seguintes, das 40 árvores avaliadas, em 25 meses, 38 delas foram diagnosticadas como infectadas por HLB pelo sistema LIFS-405 de diagnóstico, e apenas duas ainda não tiveram o diagnóstico confirmado de doente, porém encontravam-se sob observação em campo até o final dos estudos como árvores suspeitas de estarem contaminadas. E desta forma, no último mês de análises o mapa seria o representado na Tabela 4, segundo a legenda da Tabela 3.

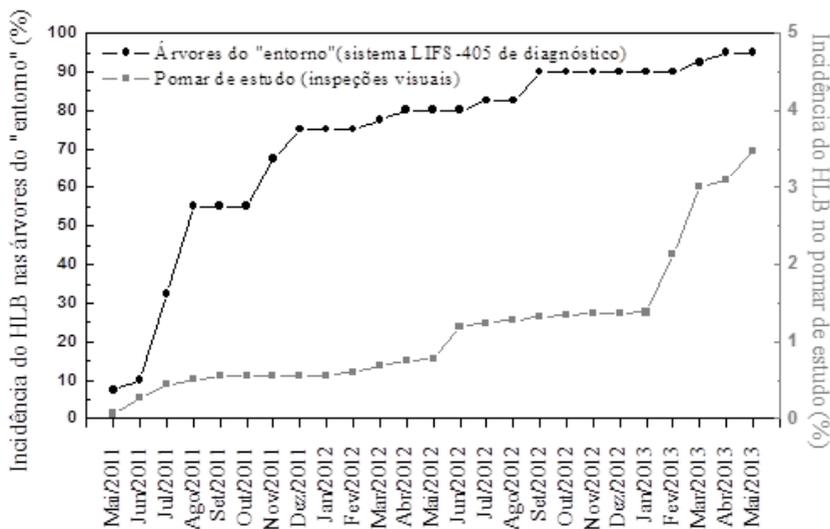
Tabela 4 - Mapa final de infestação segundo diagnóstico realizado pelos classificadores sazonais criados.



Fonte: Elaborada pela autora.

Uma curva de infestação do pomar em estudo, por meio da detecção por inspeção visual feita na fazenda mensalmente, pode ser observada na Figura 13. Nela, foi apresentada também a curva de infestação das árvores acompanhadas por meio do sistema LIFS-405, em que foi possível observar uma curva de crescimento bastante acelerado, o que já era esperado, já que estamos avaliando árvores com alta probabilidade de infecção. Os resultados obtidos corroboram com um estudo realizado por Costa e Guilhoto publicado em 2012 (46) que demonstram a importância e os impactos econômicos da eliminação do HLB por meio do diagnóstico precoce. Este estudo mostrou que o estado de São Paulo, maior produtor de laranjas do país, poderá ter todas as suas árvores do

parque citrícola infectadas com HLB até 2016 já que a doença segue uma tendência de crescimento exponencial, como também foi possível notar neste trabalho através da detecção pelo sistema óptico LIFS-405.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 13 - Gráfico de evolução da incidência do HLB nas árvores do “entorno” acompanhadas e diagnosticadas pelo sistema LIFS-405 em comparação com a curva de infestação do pomar estudado, cujo diagnóstico foi feito através das inspeções visuais em campo.

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

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

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

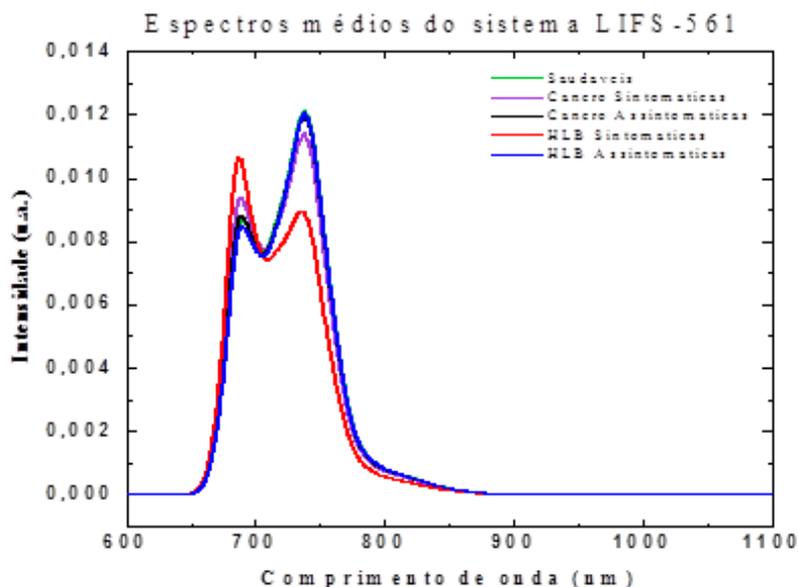
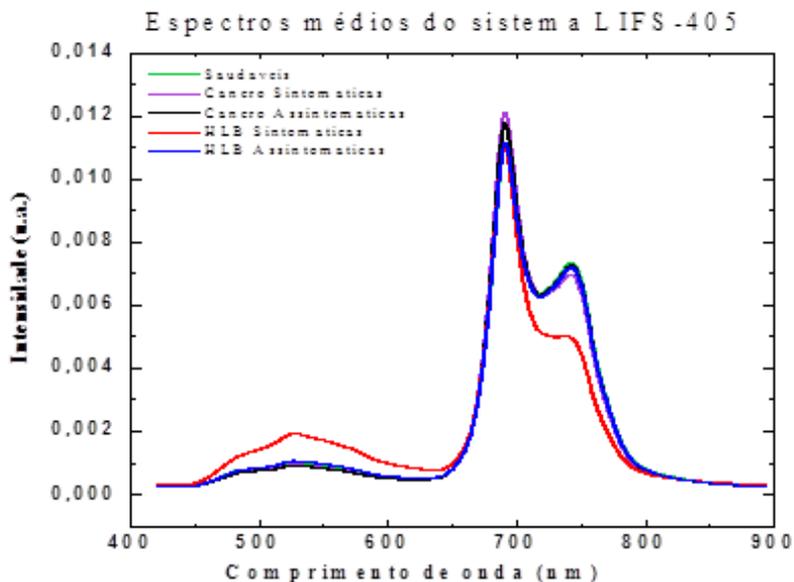
Quanto ao teste de qPCR, pode-se dizer que é regular, uma vez que demonstrou alta dependência à distribuição não homogênea da bactéria na planta, não sendo capaz de realizar o diagnóstico da mesma com sucesso. Além dos outros problemas já citados e relacionados ao alto custo do exame, preparo de amostra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

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

Cancro Cítrico

Os espectros médios característicos de cada uma das classes estudadas, e para cada um dos dois equipamentos com os quais estes foram adquiridos, encontram-se na Figura 14.

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



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 14 - Gráficos dos espectros médios característicos das classes de folhas estudadas através do sistema de fluorescência. Acima, espectros obtidos pelo sistema LIFS-405, e abaixo os espectros adquiridos pelo sistema LIFS-561.

O espectro de fluorescência do sistema LIFS-405 já foi explorado anteriormente, porém, o do sistema LIFS-561 ainda não. Nele podemos observar as bandas de fluorescência características da clorofila com máximos em aproximadamente 685-690 nm e 735-740 nm. Com a excitação em 561 nm, de maior comprimento de onda e, portanto, menos energética do que a excitação com 405 nm, é possível observar contribuições de fluorescência de camadas mais profundas da folha. O resultado disso é uma atenuação da banda com máximo em 690 nm quando comparado com o espectro de fluorescência com excitação em 405 nm devido ao efeito de reabsorção. (47) Quando comparamos o comportamento do espectro das amostras HLB Sintomáticas com as demais, todas adquiridas pelo sistema LIFS-561, verificamos uma inversão no comportamento dos máximos de fluorescência. Isso ocorre justamente pelo efeito de reabsorção, ou seja, quanto maior a quantidade de clorofila presente na folha, maior o efeito de reabsorção e, portanto maior a intensidade de emissão de fluorescência em 740 nm. Da mesma forma, se a concentração de clorofila é baixa, o que ocorre nas folhas HLB Sintomáticas, menor é a reabsorção, o que resulta em um aumento na intensidade de fluorescência em 690 nm e uma diminuição das emissões em 740 nm, justificando o comportamento destoante dessa classe de amostras.

Os dados de intensidade como os vistos acima foram utilizados como dados de entrada para a construção de classificadores via PLSR. Os conjuntos foram separados por combinação, já que a técnica é sensível às diferentes combinações de copa e porta-enxerto de citros, (21) e por equipamento utilizado nas aquisições. Assim, para o conjunto da combinação Valência enxertada em Cravo, com o número de componentes otimizado em 10 de acordo com as taxas de acerto e RMSE, o acerto do classificador após a validação cruzada em 10 *folds* foi de 86,7% para o sistema LIFS-405. Para o mesmo conjunto, que contou com 15 amostras de cada classe, o acerto foi de 82,2% quando medido pelo sistema LIFS-561. Já para a combinação Valência enxertada em Caipira, os acertos foram de 73,3% e 76,7% para, respectivamente o sistema LIFS-405 e LIFS-561, e o número total de amostras desse conjunto foi 45. E por fim, os acertos para a combinação de Pêra enxertada em Limão Cravo (45 amostras no total) foram de 91,1% para o LIFS-405 e 88,9% para o sistema LIFS-561. Na maioria dos casos o sistema LIFS-405 teve desempenho superior ao do sistema LIFS-561, o que pode ser justificado pela primeira banda de fluorescência referente à emissão dos metabólitos secundários. Para este último caso, combinação Pêra X Cravo, a matriz de confusão está na Tabela 5, e ainda, usando estes dois classificadores construídos, foi feita a validação dos mesmos e cujos resultados podem ser vistos na mesma tabela. Vale lembrar que os acertos mencionados anteriormente desconsideram a confusão entre classe sintomática e assintomática.

Tabela 5 - Matrizes de confusão da validação cruzada dos classificadores à esquerda, e da validação com conjunto externo à direita para ambos os sistemas de fluorescência estudados.

		Sistema LIFS-405					
		Classificador			Validação		
Classe nominal	Classificada como	Saudável	Cancro Sintomática	Cancro Assintomática	Saudável	Cancro Sintomática	Cancro Assintomática
	Saudável		86,7%	0%	13,3%	87,8%	6,1%
Cancro Sintomática		0%	86,7%	13,3%	-	-	-
Cancro Assintomática		13,3%	33,3%	53,4%	25,7%	22,9%	51,4%
Saudável		80%	6,7%	13,3%	79,4%	8,8%	11,8%
Cancro Sintomática		6,7%	80%	13,3%	-	-	-
Cancro Assintomática		6,7%	20%	73,3%	28,6%	20%	51,4%

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao analisar os dados da tabela acima, verificamos a alta capacidade de diferenciação entre as classes, mesmo que com discretas diferenças notadas entre as médias dos espectros ilustrados. O desempenho dos equipamentos foi bastante semelhante para este estudo, com um acerto um pouco superior do sistema LIFS-405 em relação ao LIFS-561, o que pode ser devido à contribuição da banda de fluorescência devido aos metabólitos secundários, na região das emissões no azul-verde.

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

Foi avaliada ainda a capacidade de diferenciação entre as doenças HLB e Cancro Cítrico por esta técnica. Para isso, foi construído um classificador que continha as classes Cancro Sintomática, HLB Sintomática e Saudáveis, e foi avaliada a taxa de acerto deste. A taxa de acerto para o caso do sistema LIFS-405 foi de 82,2%, a mesma taxa alcançada para o sistema LIFS-561. Cada um dos conjuntos contou com 45 amostras, sendo 15 de cada classe. As matrizes de confusão para ambos os casos se encontram na Tabela 6.

Tabela 6 - Matriz de confusão obtida na diferenciação do HLB e do cancro cítrico para os dois sistemas ópticos em avaliação.

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

Fonte: Elaborada pela autora.

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

Ao envolver também as classes Cancro Assintomática e HLB Assintomática no estudo anterior, verificamos uma queda grande na taxa de acerto que chegou a mais ou menos 63% para os dois sistemas ópticos. Uma queda já esperada já que foram introduzidas as classes com a maior dificuldade de distinção, e que caracterizam o maior desafio para os pesquisadores e citricultores. Tendo em vista que as amostras de cancro cítrico são de difícil acesso, medidas deverão ser tomadas para que se viabilizem meios de obtenção de amostras de plantas contaminadas para que os estudos possam seguir, realizando um maior número de medidas e análises para otimização da técnica.

Conclusão

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

O estudo de precocidade foi longo, com duração de dois anos, para que os resultados dessem melhor confiabilidade ao sistema e ao diagnóstico a ser

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

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

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

Referências

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

BITANCOURT, A.A. O cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, n. 6, p. 101–111, 1957.

BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; LEITE JUNIOR, 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**, v. 34, n. 3, p. 137–145, 2009.

LI, W.; HARTUNG, J.S.; LEVI, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of microbiological methods**, v. 66, n. 1, p. 104–15, 2006.

CARMO D. T.; LUC DANET, J.; EVEILLARD, S.; MARTINS, C. E.; JESUS JUNIOR, W. C.; YAMAMOTO, T. P.; LOPES, A. S.; BEOZZO, R. B.; AYRES, J. A. SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” *Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular and cellular probes**, v. 19, n. 3, p. 173–9, 2005.

JAGOEIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. PCR detection of the two “*Candidatus*” *Liberobacter* species associated with greening disease of citrus. **Molecular and cellular probes**, v. 10, n. 1, p. 43–50, 1996.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer Science + Business Media, LLC, 954 p. 2006.

MILORI, D.M.B.P.; MARTIN-NETO, L.; Índice de humidificação obtido através da fluorescência induzida por laser. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2004. 17 p. (Embrapa Instrumentação São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2004. 17 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 7).

TIVET, F.; MORAES SÁ, J. C.; LAL, R.; MILORI, D. M. B. P.; BIEDIS, C.; LETOURMY, L.; PINHEIRO, L. A.; BORSZOWSKI, R.; HARTMAN, D. C. Assessing humification and organic C compounds by laser-induced fluorescence and FTIR spectroscopies under conventional and no-till management in Brazilian Oxisols. **Geoderma**, v. 207–208, n. 1, p. 71–81, 2013.

MILORI, D. M. B. P.; GALETI, H. V. A.; MARTIN-NETO, L.; DIECKOW, J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; BAYER, C.; SALTON, J. Organic Matter Study of Whole Soil Samples Using Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, n. 1, p. 57–63, 2006.

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

LICHTENTHALER, H. K.; MIEHE, J. A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. **Trends in plant science**, v. 2, n. 8, p. 316–320, 1997.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.

MILORI, D.M.B.P.; RAYNAUD, M.; VILLAS-BOAS, P. R.; VENÂNCIO, A. L.; MOUNIER, S.; BASSANEZI, R. B.; REDON, R. Identification of citrus varieties using laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS). **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 95, p. 11–18, 2013.

CARDINALI, M.C.D.B. Diagnóstico de Huanglongbing (HLB) em citros utilizando técnicas fotônicas. São Carlos, SP, 2012. 117 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012

ZAGHI, A. F. Diagnóstico de doenças de citros utilizando espectroscopia de fluorescência. São Carlos, 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos..

VENÂNCIO, A.L. Avaliação da precocidade do diagnóstico do greening por técnicas de fluorescência. Ribeirão Preto, 2010. 111 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ROHÁČEK, K., SOUKUPOVÁ, J.; BARTÁK, M. Chlorophyll fluorescence: A wonderful tool to study plant physiology and plant stress. In: B Schoefs (Ed.); **Plant Cell Compartments - Selected Topics**. v.661, p. 41–104, 2008.

KANCHEVA, R.H., BORISOVA, D.S.; ILIEV, I. Chlorophyll fluorescence as a plant stress indicator. In: **Proceedings of the Fifth National Conference**. p. 301–306, 2008.

TERÊNCIO, J. C. C. Detecção precoce da morte súbita dos citros usando fluorescência. 2006. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

TERÊNCIO, J. C. C.; MILORI, D. M. B. P.; et al. Diagnóstico da Morte Súbita dos Citros (MSC) Utilizando Fluorescência das Folhas. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2006. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15).

ATKINS, P.; PAULA, J. **Físico-Química**. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 2004.

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

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic acids research**, v. 8, n. 19, p. 4321–4325, 1980.

COLETTA-FILHO, H. D.; CARLOS, E. F.; ALVES, K. C. S.; PEREIRA, M. A. R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. In planta multiplication and graft transmission of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' revealed by Real-Time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, n. 1, p. 53–60, 2009.

WITTEN, I. H.; FRANK, E. **Data Mining: Practical machine learning tools and techniques**. San Francisco, CA 94111: Diane Cerra, 2005.

FRANK, E.; WANG, Y.; INGLIS, S.; HOLMES, G.; WITTEN, I. H. Using model trees for classification. **Machine Learning**, v. 32, n. 1, p. 63–76, 1998.

PEDRÓS, R.; MOYA, I.; GOULAS, Y. Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. **Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 7, n. 4, p. 498–502, 2008.

BUSCHMANN, C.; LICHTENTHALER, H. K. Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 152, n. 2–3, p. 297–314, 1998.

PAPAGEORGIU, G. Chlorophyll Fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In: Govindjee (Ed.); **Bioenergetics of Photosynthesis**. London: Academic Press, Inc, p. 655, 1975.

GOVINDJEE, R. Introduction to photosynthesis. In: Govindjee (Ed.); **Bioenergetics of Photosynthesis**. New York, London: Academic Press, inc, p. 655, P. 655.

MARCASSA, L.G.; GASPAROTO, M.C.G.; BELASQUE JUNIOR, J.; LINS, E. C.; NUNES, F. D.; BAGNATO, V. S. Fluorescence spectroscopy applied to orange trees. **Laser Physics**, v. 16, n. 5, p. 884–888, 2006.

BELASQUE, J.; GASPAROTO, M. C. G.; MARCASSA, L. G. Detection of mechanical and disease stresses in citrus plants by fluorescence spectroscopy. **Applied optics**, v. 47, n. 11, p. 1922–6, 2008.

COSTA, C. C.; GUILHOTO, J. J. M. Impactos econômicos do sistema de detecção e eliminação precoce de citros com huangloving. **Revista de economia e agronegócio**, v. 9, n. 3, p. 347–368, 2012.

AGATI, G. Response of the in vivo chlorophyll fluorescence spectrum to environmental factors and laser excitation wavelength. **Pure and Applied Optics: Journal of the European Optical Society Part A**, v. 7, n. 4, p. 797–807, 1998.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Instrumentação

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP

Telefone: (16) 2107 2800 - Fax: (16) 2107 2902

www.embrapa.br/instrumentacao



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

