



AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR LASER (LIBS) NO ESTUDO DE DOENÇAS EM CITROS: HLB (GREENING) E CANCRO CÍTRICO

A.C. Ranulfi^{1,2}, A.B. Magalhães², R.A. Romano^{1,2}, E.J. Ferreira², P.R. Villas-Boas², D.M.B.P. Milori²

- (1) Instituto de Física de São Carlos, IFSC/USP, Av. Trabalhador São-Carlense, 400, 13566-590, São Carlos, SP, aniranulfi@gmail.com, renan.romano@gmail.com
(2) Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, habibe.aida@gmail.com, ednaldo.ferreira@embrapa.br, paulino.villas-boas@embrapa.br, debora.milori@embrapa.br

Resumo: O agronegócio é hoje a principal locomotiva da economia brasileira, representando cerca de um terço do PIB. Nesse contexto, o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do planeta, com destaque para a cultura da laranja, em que o país lidera a produção de suco, e conta com uma participação de 85% nas exportações deste produto. Porém, um dos principais fatores atuais que restringem a expansão da citricultura é o controle fitossanitário. Atualmente, dentre as principais doenças dos citros podemos destacar o Huanglongbing (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 da técnica de Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Laser (LIBS) como forma de diagnóstico destas doenças, se apresentando como uma alternativa às inspeções visuais e ao PCR utilizados atualmente. Para isso, folhas de citros provenientes de plantas sadias, com HLB ou com cancro foram amostradas e medidas. A partir dos dados gerados pela espectroscopia, foram induzidos classificadores por meio da técnica de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais. Taxas de acerto em torno 80% e 90% foram alcançadas pelo modelo gerado para o diagnóstico do HLB e do Cancro cítrico, respectivamente. Variações nutricionais significantes de Ca e Mg foram identificadas para o caso das amostras com HLB em comparação com as amostras sadias.

Palavras-chave: citros, greening, cancro cítrico, diagnóstico, espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser.

EVALUATION OF LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS) IN THE STUDY OF CITRUS DISEASES: HLB (GREENING) AND CITRUS CANCER

Abstract: 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 citrus crop, in which 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 HLB (Greening) and Citrus Canker are highlighted, two bacterial diseases that have no cure and affect yield and fruit development. Therefore, monitoring is essential to prevent damage to fruits and complete eradication of infected orchards. The present study evaluated the use of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) techniques as alternative diagnostic methods to visual inspection and PCR technique, currently used. For that, citrus leaves from healthy, HLB or citrus canker infected plants, were sampled and measured. From the generated data by spectroscopy, classifiers were induced through Partial Least Square Regression technique. Success rates around 80% and 90% have been achieved by the generated model for diagnosis of citrus HLB and Canker, respectively. Nutritional changes of Ca and Mg have been identified in HLB plants.

Keywords: citrus, greening, citrus canker, diagnosis, laser-induced breakdown spectroscopy.

1. Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo. Nesse contexto, destaca-se a produção de laranjas brasileira, com 16,36 milhões de toneladas em 2012/2013 e deve aumentar em torno de 8% em 2013/2014, segundo a USDA. (UNITED STATES, 2014). É com o suco de laranja que o país confirma sua liderança no mercado: de cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos no Brasil. (NEVES et al., 2010) Porém, os principais fatores atuais que limitam os lucros e a expansão da citricultura são os problemas fitossanitá-

rios. Assim, o monitoramento das doenças e pragas é fundamental para evitar danos aos frutos, e a necessidade de erradicação de plantações inteiras. Neste trabalho duas das principais doenças dos citros foram foco de estudo: o Huanglongbing (HLB), também conhecido como greening, e o cancro cítrico.

O HLB é a mais recente e destrutiva doença bacteriana dos citros no Brasil, e é causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*. O sintoma inicial do HLB aparece, em um ramo ou galho, que apresenta folhas de coloração amarelada ou verde mais clara. (FILHO; BARBOSA; NASCIMENTO, 2009) Os frutos de plantas contaminadas apresentam-se deformados, mais ácidos e menores. A doença não tem cura, e atualmente, o manejo adotado para uma tentativa de controle são pulverizações para controle do inseto vetor (nome popular - *Diaphorina citri*), plantio de mudas certificadas e erradicação de árvores doentes, identificadas por meio de inspeções visuais frequentes na busca por sintomas da doença (JUNIOR et al., 2009). Para a confirmação da presença da bactéria em campo usualmente é utilizada a técnica PCR (Reação em Cadeia Polimerase), (LI; HARTUNG; LEVY, 2006) uma técnica bastante sensível, porém inviável prática e economicamente para aplicações em larga escala.

Já o Cancro Cítrico, é causado pela bactéria *Xanthomonas citri citri* e constitui-se uma das principais doenças da citricultura pois não existem medidas capazes de eliminá-la completamente do pomar. A doença manifesta-se por lesões em folhas, frutos e ramos, e quando as condições são altamente favoráveis à infecção estas provocam desfolhamento, morte descendente e aborto de frutos (DAS, 2003). Para prevenir o aparecimento do Cancro Cítrico também é feito o plantio de mudas sadias certificadas, a desinfecção de todo material de colheita e, inspeções visuais frequentes para identificação e eliminação da planta do pomar por queima no local (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002).

Apesar dos esforços para controlar o espalhamento das duas doenças, dados de incidência mostram um crescimento alarmante (FUNDECITRUS, 2013). Dessa maneira, o principal objetivo deste trabalho é avaliar o uso da técnica LIBS como uma forma alternativa de diagnóstico eficaz das doenças, e ainda como uma forma de caracterizar e melhor compreender a ação das mesmas. LIBS é uma técnica espectroscópica usada para determinar a composição elementar, e é um método de espectroscopia de emissão atômica que utiliza um plasma gerado por laser como fonte de energia para vaporizar, atomizar e excitar a amostra. (MIZIOLEK; PALLÉSCHI; SCHECHTER, 2006). Com o resfriamento do plasma, os elétrons excitados retornam aos seus estados fundamentais liberando a energia absorvida na forma de radiação eletromagnética, cujas frequências são características de cada espécie excitada. A identificação dos átomos presentes na amostra se dá pela identificação das linhas de emissão, que constam na literatura (KRAMIDA et al., 2014). Assim, a técnica LIBS busca as alterações químicas que, possivelmente, estão ocorrendo nos órgãos da planta devido à presença da doença, e por meio de ferramentas quimiométricas buscou-se a caracterização de cada uma das classes de amostras estudadas e por fim, o diagnóstico das doenças.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

Para as medidas realizadas, as amostras foram folhas de laranjeiras adultas das combinações de Valência enxertadas em Swingle (1) e Valência enxertadas em Laranja Caipira (2), todas oriundas de plantas de pomares comerciais da região de Araraquara. Foram analisadas folhas de classes conhecidas, e designadas por: Sadias, HLB Sintomáticas, HLB Assintomáticas, Cancro Sintomáticas e Cancro Assintomáticas.

2.2. Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser

Foram adquiridos dez espectros por amostra de citros na face abaxial da folha *in natura*. O equipamento utilizado foi um LIBS2500, da Ocean Optics, composto por um *Q-switched* laser de Nd:YAG, com emissão no comprimento de onda de 1064 nm, em pulsos de 8 ns. O sistema de detecção é formado por um conjunto de sete espectrômetros de alta resolução, que englobam a faixa espectral de 189 a 966 nm, com resolução óptica em torno de 0,1 nm.

Os dados espectrais foram primeiramente normalizados pela área de cada uma das sete janelas dos espectrômetros. Em seguida, foi realizada a média dos dados por amostra, já que foram adquiridos 10 espectros por folha. Por fim, os dados de intensidade dos espectros médios foram dados como entrada para a indução de classificadores via Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), e observadas as taxas de acerto na validação cruzada dos dados como forma de avaliação do desempenho da técnica em discriminar as classes em estudo, e consequentemente a possibilidade de obtenção de um diagnóstico precoce para as doenças.

Resultados e Discussão

O espectro típico das folhas de citros obtido com LIBS no sistema experimental descrito encontra-se ilustrado na Figura 1. Os traços verticais que cortam o espectro dividem cada uma das sete janelas espectrais do sistema.

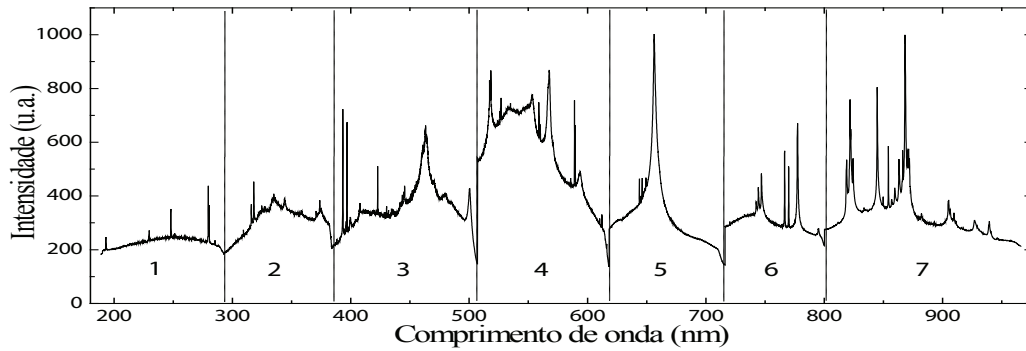


Figura 1. Espectro LIBS típico obtido a partir de folha de citros in natura. Abaixo do espectro estão enumeradas as janelas espectrais, bem como os pontilhados indicam o início e o fim de cada uma delas.

Após normalizar e calcular os dados espectrais pela área de cada uma das sete janelas espectrais, e calcular a média dos dados por amostra, foram avaliadas as taxas de acerto obtidas pela validação cruzada dos dados, para ambas as doenças. Em relação ao HLB, a taxa de acerto alcançada dando como entrada todo o espectro LIBS, foi de aproximadamente 89%, e envolveu as classes Sadia, HLB Sintomática e HLB Assintomática. Para o caso do cancro, essa taxa chegou a quase 97%, e envolveu as classes Sadia, Cancro Sintomática e Cancro Assintomática. Foram avaliadas ainda as taxas de acerto referente ao intervalo de cada espectrômetro para investigar a possibilidade de simplificação do sistema para ir a campo. Os resultados estão na Tabela 1.

Tabela 1. Taxa de acerto global do classificador obtida por meio da validação cruzada em relação à média das amostras para cada espectrômetro. Em destaque os melhores desempenhos.

Intervalos de análise	Taxas de Acerto (%)	
	HLB*	Cancro Cítrico**
Espectrômetro 1	68,4	84,0
Espectrômetro 2	82,9	74,5
Espectrômetro 3	87,2	83,0
Espectrômetro 4	88,9	93,1
Espectrômetro 5	84,6	83,5
Espectrômetro 6	83,8	85,1
Espectrômetro 7	75,2	80,3

*Combinação 1 de copa e porta-enxerto. **Combinação 2 de copa e porta-enxerto.

Em relação ao HLB, os espectros LIBS foram analisados em relação às linhas de emissão, e foram identificados alguns elementos. Dois deles chamaram a atenção por apresentarem diferenças de intensidades entre as classes de folhas avaliadas, demonstrando que de fato ocorrem variações nutricionais na planta devido à presença e ação da doença. A Figura 2 traz alguns picos de Magnésio e Cálcio, em que tais variações foram observadas. Através de tais variações nas intensidades espectrais é possível inferir qualitativamente as alterações nutricionais que podem estar ocorrendo na planta devido à doença.

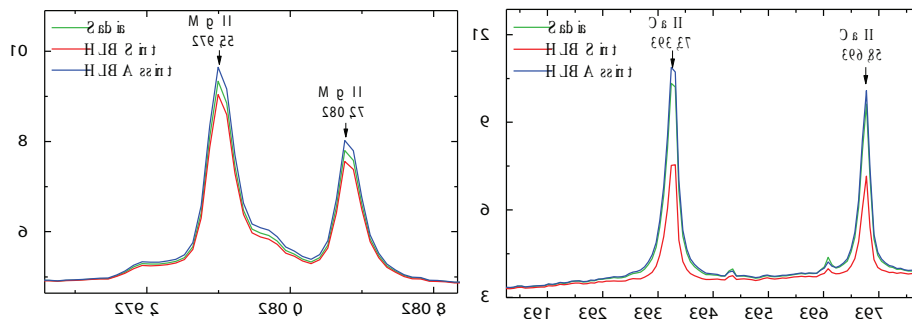


Figura 2. Picos de emissão referentes aos elementos Magnésio e Cálcio, observados através da média por classe de amostras dos espectros LIBS obtidos de folhas de citros.

O magnésio é o centro da molécula de clorofila e, portanto está envolvido na via fotossintética da planta. É conhecido que os níveis de clorofila em uma planta doente com HLB são reduzidos, e desta forma, afetam a con-

centração do nutriente – magnésio - na mesma. O principal sintoma da deficiência de magnésio é a clorose, que se inicia na ponta das folhas maduras, e também a queda prematura de frutos (RUTEC, 2014). Já o Cálcio, elemento que mais variou entre as classes de folhas estudadas, apresentando-se sempre em menor quantidade nas folhas sintomáticas, é necessário para o correto desenvolvimento da planta, principalmente em relação ao crescimento das raízes. É muito importante como constituinte das paredes celulares por formar compostos que a fortalecem, e ainda o íon Cálcio tem se mostrado importante como segundo mensageiro em muitas rotas de sinalização em plantas, incluindo rotas que envolvem a resposta à herbivoria. (HOWE; JANDER, 2008). O Cálcio é um elemento de baixa mobilidade na planta, e sua deficiência pode prejudicar a fixação da mesma ao solo, além de causar sintomas como o desvanecimento da clorofila ao longo das margens da folha e também na nervura central, espessamento e perda de vigor das folhas, mantendo-as pequenas, queda excessiva das folhas e diminuição da produção de frutos, pode apresentar ainda o pericídio de galhos inteiros, e os frutos podem se apresentar disformes, com baixo teor de suco e alto teor de ácidos e sólidos solúveis. (ZEKRI; OBREZA, 2012).

Por fim, foi possível observar um bom desempenho da técnica LIBS para avaliação de nutrição das amostras e busca pelo diagnóstico das duas doenças. Além disso, a técnica possui inúmeras vantagens para este tipo de aplicação, dentre elas, a técnica LIBS é robusta e pouco complexa no que diz respeito à instrumentação, permitindo o desenvolvimento de equipamentos portáteis para análises em campo, de forma rápida e eficaz, sem a necessidade de árduo e demorado preparo de amostras, e sem a produção de resíduos químicos, o que contribui grandemente para práticas sustentáveis na agricultura. A possibilidade de aplicação em larga escala da técnica é outra vantagem.

4. Conclusões

A técnica LIBS demonstrou ter grande potencial no diagnóstico do HLB e do cancro cítrico. Taxas de acerto superiores a 89% foram alcançadas no diagnóstico de ambas as doenças, apresentando-se como uma forma alternativa de diagnóstico, motivando a busca por melhores resultados e incentivando estudos que empreguem a técnica LIBS para outras análises em campo.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo financiamento da pesquisa e das bolsas; e à Embrapa Instrumentação pela infraestrutura e apoio fornecidos.

Referências

- DAS, A. K. Citrus canker - a review. *Journal of Applied Horticulture*, v. 5, n. 1, p. 52–60, 2003.
- FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). Levantamentos. 2013. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos>>. Acesso em: 26 mar. 2014.
- GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact. *Plant Health Progress*, 2002.
- HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, p. 41–66, 2008.
- JUNIOR, J. B.; FILHO, A. B.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; JUNIOR, P. L.; 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.
- KRAMIDA, A.; RALCHENKO, Y.; READER, J.; NIST ASD Team. National Institute of Standards and Technology (NIST) Atomic Spectra Database (ver. 5.1). 2013. Disponível em: <http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html>. Acesso em: 06 maio 2014.
- LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, v. 66, n. 1, p. 104–115, 2006.
- MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V.; SCHECHTER, I. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): fundamental and applications. New York: Cambridge University Press, 2006. 640 p.
- NEVES, M.F. O retrato da citricultura brasileira. Ribeirão Preto: Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 2010. Disponível em: <http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/Apresentacao_Marcos_Fava_evento_valor.pdf>. Acesso em 30 abr. 2014.
- RUTEC: technical manual. The plant nutrients. 14 p. Disponível em: <<http://www.rutec.com/main.html>>. Acesso em: 27 maio 2014.
- SANTOS FILHO, H. P.; BARBOSA, F. F. L.; DO NASCIMENTO, A. S. Greening, a mais grave e destrutiva doença dos citros: nova ameaça à citricultura. Produto em Foco: citrus. 2009. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/Citros_31.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2014.
- UNITED STATES. Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. Citrus: world markets and trade: january/2014. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Acesso em: 2 maio 2014.
- ZEKRI, M.; OBREZA, T.A. Plant nutrients for citrus trees. University of Florida - IFAS Extension. p. 1–5, 2012. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/SS/SS41900.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2014.