

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**DETECÇÃO PRECOCE DA MORTE SÚBITA DOS CITROS  
USANDO FLUORESCÊNCIA**

Jean Carlos Corte Terencio

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Química de São  
Carlos, da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Mestre em Ciências (Química  
Analítica).

Orientador: Dr.<sup>a</sup> Débora Marcondes Bastos Pereira Milori  
Embrapa Instrumentação Agropecuária – São Carlos

São Carlos

2006

Terencio, Jean Carlos Corte  
Detecção Precoce da Morte Súbita dos Citros Usando Fluorescência , IQSC,  
2006.  
106 p.

Dissertação (Mestrado)-Instituto de Química de São Carlos/  
Universidade de São Paulo

Orientador: Dr. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

1.Morte Súbita dos Citros. 2. Fluorescência. 3. Metodologia I. Título

***“NÃO HÁ GARANTIA DE QUE A PESQUISA RESOLVERÁ TODOS OS PROBLEMAS,  
MAS NENHUM PROBLEMA SERÁ RESOLVIDO SEM PESQUISA”***

***ANTHONY H. PURCELL***

## À minha querida Família

*... meus pais Clóvis Terencio e Irene Olivia Corte Terencio...*

*...meus irmãos Paulo Eduardo Corte Terencio e Juliana Corte Terencio...*

*...minha sobrinha Anna Júlia Terencio Bartalini...*

*...minha orientadora Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori pela dedicação, confiança, amizade, incentivo e discussão...*

*...aos meus queridos avós paternos Sílvio Terencio e Geni Ressude Terencio...*

*...e maternos Francelino da Rocha Corte e Francisca da Rocha Corte...*

*...a minhas amigas especiais Kelly Mayumi Narimoto, Úrsula Rodriguez Zuniga pela amizade, incentivo e confiança..*

*...ao meu amigo João Batista Marson, pela amizade, discussão, incentivo e confiança...*

*...ao Dr Lúcio André de Castro Jorge pela discussão e amizade....*

*... Ao Dr. Ladislau Martin Neto pelo incentivo, confiança e amizade durante a realização deste trabalho...*

*... Ao Renê por sua valiosa e prestativa ajuda no laboratório de química e principalmente pela criatividade tecnológica...*

*...aos meus amigos Edimar Bartalini (cunhado), Marcelo Tadayuki Hiranobe, Marcos Dorigão Manfrinato, Cléber Hilário, Vanessa Zulaieta e Helder Avanço Galleti...*

*... A Embrapa Instrumentação Agropecuária pela infra-estrutura e pelo excelente ambiente de trabalho...*

*... Ao Fundo de Defesa da Citricultura pelas discussões e pelo envio do material utilizado neste trabalho...*

*... Ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.*

*...que sempre acreditaram em mim, me apoiando, aconselhando, e incentivando através de gestos de amor e carinho que fizeram parte desta importante etapa da minha vida.*

*Esta conquista é de todos vocês!*

*Amo todos vocês!*

*Dedico esta dissertação de mestrado.*

## Lista de Figuras

Figura 3.2.1 – Foto de amarelecimento interno da casca do porta-enxerto na região abaixo da enxertia.	10
Figura 3.4.1 – Estrutura Química das Clorofilas <b>a</b> e <b>b</b>	18
Figura 3.4.2- Espectros Característicos de Absorção de clorofilas <b>a</b> e <b>b</b> e de $\beta$ -Caroteno.	20
Figura 3.5.1 : Diagrama de Transição Eletrônica Fluorescência Molecular.	25
Figura 3.5.1.1.1: Esquema representativo do LASER.	27
Figura 3.5.2.1 – Passagem da radiação através de um material absorvente de comprimento $b$ .	31
Figura 3.5.3.1: Representação de uma onda senoidal.	34
Figura 4.4.2.1 – Diagrama básico de composição de um espectrofluorímetro .	49
Figura 4.4.2.2 – Imagem de porta-enxerto <i>in natura</i> utilizada nas medidas espectroscópicas.	51
Figura 4.5.1 Esquema de um sistema de montagem de aquisição de imagens.	54
Figura 5.1.1 - Espectros de Absorção de luz Ultravioleta-Visível de extrato de Pigmentos Fotossintéticos em acetona.	56
Figura 5.1.2 – Espectros de Emissão de Fluorescência de Extrato Foliar com Excitação em 420 nm (a) e 663 nm (b).	61
Figura 5.1.3 – Espectros de Emissão de Fluorescência de Extrato Foliar com Excitação em 435 nm (a) e 645 nm (b).	63
Figura 5.1.4 – Espectros de Emissão de Fluorescência de Extrato Foliar com Excitação em 458 nm.	65
Figura 5.1.5 – Espectros de Emissão de Fluorescência de Extrato	66

Foliar com Excitação em 576 nm.

Figura 5.2.1.1 – Espectros de Excitação com Emissão da Fluorescência em 629 nm de porta-enxertos com morte súbita dos citros, com declínio dos citros e saudáveis.	68
Figura 5.2.1.2 - Razão de Fluorescência entre as bandas em 466 nm/438 nm ( $I_2/I_1$ ) referente ao espectro da figura 5.2.1.1.	69
Figura 5.2.1.3 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 576 nm de amostras doentes e saudáveis.	70
Figura 5.2.1.4 – Razão de Fluorescência entre as bandas em 629 nm/822 nm ( $I$ ) referente ao espectro da figura 5.2.1.3.	71
Figura 5.2.1.5 – Razão de Fluorescência entre as bandas em 629 nm/683 nm ( $I_{629}/I_{683}$ ) referente ao espectro da figura 5.2.3.	72
Figura 5.2.2.1.1 – Espectroscopia no Ultravioleta-Visível de extrato hexânico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.	74
Figura 5.2.2.1.2. – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 576 nm de extrato hexânico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.	75
Figura 5.2.2.1.3 – Espectros de Absorbância usando FTIR de extrato hexânico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.	73
Figura 5.2.2.2.1 – Espectroscopia no Ultravioleta-Visível de extrato metanólico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.	78
Figura 5.2.2.2.2 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 662 nm de extrato metanólico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.	79
Figura 5.2.2.2.3 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 576 nm de extrato metanólico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.	80

Figura 5.2.2.2.4 – Espectros de Absorbância usando FTIR de extrato metanólico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.	81
Figura 5.2.2.3.1 – Espectroscopia de Ultravioleta-Visível de extrato aquoso de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.	83
Figura 5.2.2.3.2 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 275 nm de extrato aquoso de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.	84
Figura 5.2.2.3.3 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 320 nm de extrato aquoso de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.	85
Figura 5.2.2.3.4 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 576 nm de extrato aquoso de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.	86
Figura 5.3.1 – Espectro de Emissão de Fluorescência com Excitação em 576 nm de folhas com morte súbita dos citros, com declínio dos citros e saudáveis.	87
Figura 5.3.2 – Razão de Fluorescência de Folhas (735 nm/688 nm) referente ao gráfico da figura 5.3.1 de folhas com morte súbita dos citros, com declínio dos citros e saudáveis.	88
Figura 5.4.1 – Imagens de Fluorescência Folhas Sadias.	90
Figura 5.4.2 – Imagens de Folhas Sadias com Declínio dos Citros. e com Morte Súbita dos Citros na forma <i>In Natura</i> .	91
Figura 5.4.3 - Imagens de fluorescência de folhas sadias pós-extração.	93



## Lista de Tabelas

Tabela 3.5.2.1 – Exemplos de Grupos Cromóforos no Ultra-Violeta	30
Tabela 3.5.3.1 – Frequência Característica de Grupos Orgânicos	38
Tabela 5.1.1 – Cálculo das Concentrações das clorofilas <b>a</b> , <b>b</b> e total utilizando metodologia proposta por Arnon (1949)	57
Tabela 5.1.2 – Cálculo da Determinação do Teor de Clorofilas e Carotenóides por (Lichtenthaler, 1987)	58

## RESUMO

Atualmente o diagnóstico da morte súbita dos citros (MSC) é realizado através de inspeção visual e coleta do material do porta-enxerto o que confere ao método elevado grau de subjetividade e imprecisão, além de demandar muito tempo para o levantamento de dados de infestação. Este trabalho pretende estudar as mudanças nas propriedades físicas e químicas acarretadas pela MSC em folhas e porta-enxertos de laranjeira doces (*Citrus (L.) Osbeck*), e desenvolver uma nova metodologia de diagnóstico da doença. Para tanto, folhas, porta-enxertos e seus extratos foram analisados através das seguintes técnicas espectroscópicas: absorção de luz uv-visível, absorção de infravermelho com transformada de Fourier, fluorescência e fluorescência induzida por laser. Além do estudo utilizando técnicas espectroscópicas foram realizados estudos utilizando técnicas de imagem de fluorescência de folhas saudáveis e doentes. Foram coletadas amostras de folhas saudáveis, doentes com a MSC e doentes com o declínio dos citros (DC). A comparação entre estas doenças é primordial visto que no campo os sintomas são muito parecidos, confundindo muito o sistema de avaliação de contaminação. Foram observadas mudanças significativas nos espectros de emissão de fluorescência para os três tipos de amostras e baseados nestas diferenças foi definido um índice capaz de diagnosticar a MSC e o DC. A técnica de imagens de fluorescência também trouxe informações importantes permitindo diferenciar

plantas saudáveis e doentes de uma forma muito rápida. A junção da técnica de imagens com as espectroscópicas deu origem a uma nova metodologia de diagnóstico da MSC com potencial de ser muito mais rápida, precisa e não invasiva permitindo análises da folha *in natura*.

## **Abstract**

### ABSTRACT

Currently, the diagnosis of citrus sudden death (CSD) is carried out by visual inspection and collection of the rootstock, which causes the method to be inaccurate and allows for much subjectivity, besides demanding much time to examine the infestation data. The present work intends to study changes in the physical and chemical properties resulting in CSD of leaves and rootstock material of sweet orange trees (*Citrus (L.) Osbeck*), as well as developing a new diagnosis methodology of the disease. Thus, leaves, rootstock and their extracts were analyzed by means of the following spectroscopic techniques: absorption of uv-visible light, absorption of infrared with Fourier transform, fluorescence and laser-induced fluorescence. Besides employing spectroscopic techniques, studies using fluorescence images of healthy and sick leaves were carried out. Samples of healthy leaves, sick leaves with CSD and sick leaves with citrus decline (CD) were collected. Comparison of these diseases is primordial since in the field the symptoms are similar, causing much confusion in the evaluation system of contamination. Significant changes were observed in the spectra of fluorescence emissions for the three types of samples and based on such differences an index capable of diagnosing CSD and CD was defined. The fluorescence image techniques also brought important information, thus allowing to quickly differentiate between healthy and sick leaves. Joining the technique of images with spectroscopy originated a new methodology of CSD, which is

potentially much faster, precise and non-invasive, thus allowing *in natura* analysis of leaves.

## Sumário

Capítulo 1: Introdução	1
Capítulo 2: Objetivos	4
Capítulo 3: Revisão de Literatura	5
3.1 Origem Histórica dos Citros	5
3.2 Importância da Citricultura no Cenário Nacional	5
3.3 Morte Súbita dos Citros	9
3.3.1 Inspeção Visual do Parque Citrícula	12
3.3.2 Importância da utilização de porta-enxertos no mundo citrícula	13
3.4 Fluorescência Foliar	15
3.4.1 Fotografias Aéreas Aplicadas na Agricultura	21
3.5 Espectroscopia Aplicada a Diagnóstico de Doenças	22
3.5.1 Espectroscopia de Luminescência	23
3.5.1.1 Laser de Argônio: Principais Características	26
3.5.2 Espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-Vis)	29
3.5.3 Infravermelho com Transformada de Fourier	34
3.5.4 Processamento e Análise de Imagens	39
Capítulo 4: Materiais e Métodos	43
4.1 Amostras	43
4.2 Porta-Enxertos	44
4.2.1 Extratos de Porta-Enxertos	44
4.2.1.1. Processos de Extração	45
4.2.1.1.1. Extração com Hexano	45

4.2.1.1.2. EXTRAÇÃO COM METANOL	45
4.2.1.1.3 EXTRAÇÃO COM ÁGUA	46
4.2.2 Porta-Enxerto <i>in natura</i>	47
4.3 Folhas	47
4.3.1 Extração e Separação de Pigmentos Fotossintéticos de Folhas	47
4.4 Técnicas Espectroscópicas	48
4.4.1 A Espectroscopia de absorção Ultravioleta-Visível	48
4.4.2 Espectroscopia de fluorescência	49
4.4.2.1 Espectroscopia de Fluorescência dos Extratos	51
4.4.2.2 Espectroscopia de Fluorescência de Porta-Enxertos <i>in natura</i>	52
4.4.2.3 Espectroscopia de Fluorescência de Folhas <i>in natura</i>	52
4.4.3 A Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	52
4.5 Imagens de Fluorescência	53
Capítulo 5: Resultados e Discussões	55
5.1 Folhas	55
5.1.1 Extração dos Pigmentos Fotossintéticos	55
5.2 Porta-Enxertos	67
5.2.1 <i>In Natura</i>	67
5.2.2 Extratos de Porta-Enxertos	73
5.2.2.1 Extração com Hexano	73
5.2.2.2 Extração com Metanol	77
5.2.2.3 Extração com Água	82
5.3 FOLHA <i>IN NATURA</i>	86

5.4 – Imagens de Fluorescência de Folhas	89
Capítulo 6: Conclusão	94
Capítulo 7: Sugestões de Trabalhos Posteriores	96
Referências Bibliográficas	97



## Capítulo 1

### Introdução

As frutas cítricas encontram-se espalhadas por todo o globo terrestre e estão presentes como hábito de consumo na vida das pessoas. Os maiores produtores de laranja estão localizados em clima tropical e subtropical, destacando-se o Brasil, Estados Unidos (sul), Espanha, China, México e Itália.

Os citros são as frutas mais produzidas no mundo, num volume de 24% da produção total (Calixto, 2003), superando as culturas da uva, banana e maçã. Segundo Neves e Boteon (1998), as indústrias de suco concentrado de laranja para exportação comercializam, anualmente, 85% da produção paulista. No mundo, a cada dez copos de suco de laranja produzidos, oito são de procedência brasileira, e o Estado de São Paulo é responsável por 98% do montante de suco concentrado para exportação. Além da importância econômica, a citricultura tem uma grande importância social, pois as atividades da cadeia produtiva do citros empregam cerca de 400 mil pessoas, direta ou indiretamente (Neves & Boteon, 1998).

Brasil e Estados Unidos constituem duas das principais áreas da produção cítrica mundial (Bortolazzo, 2002). Os Estados de São Paulo e da Flórida cultivam mais de 1 milhão de hectares em citros (Calixto, 2003), produzindo anualmente cerca de 85% do volume total de suco de laranja natural ou concentrado. Juntas, estas indústrias movimentam algo em torno de 17 bilhões de dólares em todos os elos da cadeia produtiva, considerada estratégica para a economia destes países (Neves & Boteon, 1998).

Entretanto, uma nova doença surgiu em 1999 (Roman et al., 2004) no município de Comendador Gomes no Estado de Minas Gerais em um talhão de

---

laranjeiras Valênica/Limão Cravo com idade de doze anos. Dois anos depois, esta doença foi descrita pelos pesquisadores do Fundecitrus que a denominaram de Morte Súbita do Citros ou MSC.

Segundo o último levantamento realizado entre abril e junho de 2005 pelos técnicos do fundecitrus, estima-se que a doença já tenha afetado entre 800 e 1 milhão de plantas (Informativo Fundecitrus, 2006).

A doença causa grande preocupação, pois cerca de 85% da citricultura está instalada com o porta-enxerto de Limão 'Cravo' (*Citrus limonia* (L.) Osbeck) e isto poderá levar a grandes prejuízos econômicos e causar alguns impactos de cunho social como desemprego .

Esta doença de causa ainda desconhecida representa uma ameaça potencial para a citricultura paulista e nacional, uma vez que, afeta todas as variedades comerciais de laranjas doces e tangerinas Cravo e Ponkan enxertadas sobre o limão Cravo (cerca de 85% dos pomares paulistas e mineiros estão em cima de cavalos de limão Cravo). Combinações de laranja doce sobre limão Volkameriano, apresentaram sintomas de MSC na copa e na casca do cavalo, (Revista Fundecitrus nº 121, 2004), nas raízes e na parte interna da copa. A hipótese é que a doença tenha comportamento diferente no Volkameriano com um tempo maior de incubação e grau de severidade menor.

Além dos prejuízos causados pela redução de produção e morte de plantas afetadas, o controle da doença provavelmente acarretará maiores custos e adaptações no sistema de manejo de pomares subenxertados ou com outros porta-enxertos, cuja irrigação será muitas vezes necessária. Por tudo isto, a MSC tem causado grande preocupação e ansiedade em todos os setores do agronegócio brasileiro e necessita de soluções rápidas e precisas para o diagnóstico da doença.

---

No Brasil, existem muitas linhas de pesquisa que utilizam técnicas e objetivos diferentes para entender as causas e conseqüências provocadas pela Morte Súbita dos Citros.

O presente trabalho foi conduzido para verificar formas alternativas de detecção da Morte Súbita dos Citros usando técnicas espectroscópicas em plantas de laranjeiras doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) das variedades Pêra-Rio e Valência enxertadas sobre limão 'Cravo' (*Citrus limonia* (L.) Osbeck). A pesquisa é motivada pela necessidade técnica de desenvolver uma forma rápida, precisa e simples para que a cadeia de produção de citros tenha o menor impacto no seguimento da exportação.

---

## Capítulo 2

### OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Caracterizar folhas e porta-enxertos de plantas saudáveis e doentes com Morte Súbita dos Citros e com Declínio dos Citros utilizando técnicas espectroscópicas como Infravermelho com Transformada de Fourier,, Absorção de Luz na Região do Ultravioleta-Visível, Fluorescência Convencional e Induzida por Laser e técnicas de imagens de fluorescência.
- Analisar alterações químicas nos extratos de folhas e porta-enxertos de plantas com Morte Súbita do Citros em relação a plantas saudáveis;
- Desenvolver um método de diagnóstico da Morte Súbita dos Citros que fosse mais rápido e preciso em relação ao atual, que permitisse análises em campo

## Capítulo 3

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Origem Histórica dos Citros

Segundo os hermeneutas (contadores de fábulas), as plantas cítricas tiveram origem nas regiões subtropicais e tropicais da Ásia e do arquipélago Malaio, tendo sido cultivadas pelos chineses muito antes que os europeus as conhecessem. A primeira espécie conhecida pelos europeus foi a cidra (*Citrus medica*), mencionada por Teofrasto por volta de 300 a. C (Soost & Cameron, 1975).

Alguns séculos depois, os árabes introduziram a laranja azeda e os limões na África, Sicília, Sardenha e Espanha. As cruzadas disseminaram estas e outras espécies cítricas pela Europa. A laranja doce foi levada para o continente europeu por volta do século XV da era Cristã. Colombo, em 1493 trouxe sementes de laranja, limoeiro e cidreira que foram plantadas na Ilha de Haiti nas Antilhas (Malavolta e Viollante-Netto, 1989).

Desta maneira, as primeiras plantas cítricas foram introduzidas no Brasil pelas expedições colonizadoras, e em 1540 já existiam laranjas de norte a sul (Moreira, 1980).

#### 3.2 Importância da Citricultura no Cenário Nacional

A citricultura é uma atividade agrícola das mais importantes, pois oferece uma renda vultosa tanto para produtores de comércio nacional quanto de comércio internacional, além do seu valor social, no emprego de muitos trabalhadores em suas diversas atividades.

---

Na década de 80, marcada pelo final do regime militar, o país se tornou o maior produtor mundial de laranja (Abecitrus, 2002b), e no ano de 1998, na agricultura paulista, conforme dados da Sociedade Brasileira de Fruticultura, foram cultivados 867908 ha em laranja, 34712 ha em limão e 25361 ha em tangerina.

A citricultura brasileira destaca-se pela sua representação na balança comercial, com exportações de suco concentrado, acima de US\$ 1 bilhão/ano (Neves, 2000), principalmente a paulista, é uma das primeiras do agronegócio nacional, tendo o Estado de São Paulo como maior expoente nesta área, contando com 198 milhões de árvores (IEA,2000). Dentre os 645 municípios do Estado paulista, temos 330 municípios produtores de laranja; ocupando um dos primeiros lugares no valor da produção paulista agrícola, sendo superado pela cana-de-açúcar e pela pecuária. A produção de laranja emprega diretamente 400 mil pessoas, chegando a 1 milhão de trabalhadores empregados de forma direta e indireta; a demanda relativa, kg/ha, por defensivos e fertilizantes coloca a citricultura como uma das mais importantes e com maiores requerimentos por área cultivada. Estima-se que 80% das transações no mercado mundial de suco concentrado são realizadas com produto brasileiro.

O desenvolvimento da citricultura, no estado de São Paulo, é alavancado pelas condições climáticas favoráveis, pelo preço da terra nua, custo da mão-de-obra e garantia de mercado para as frutas cítricas (Amaro & Maia, 1997).

A produção brasileira representa 1/3 da produção mundial de laranja, e o estado de São Paulo, no ano de 2000, com área estimada em 672 mil ha de plantio com citros, contribuiu com 83,6% desse total (Neves et al., 2001), sendo a produção brasileira de 338 milhões de caixas de laranja, de 40,8 Kg, na safra de 1999/2000 (Abecitrus, 2002c).

---

Em relação aos setores de serviços e suporte para o escoamento da produção como transporte, pedágios, embalagem, serviços portuários, mão-de-obra e outros, movimentou cerca de US\$ 440 milhões. Em 1999, estes valores somados representaram cerca de US\$ 7,3 bilhões, demonstrando a importância do setor citrícola no Brasil (Neves et al., 2001).

A produção de suco concentrado brasileiro é praticamente destinada à exportação, pois somente 2% da laranja processada ficam no mercado interno, demonstrando que temos um mercado interno para ser explorado, com suco pronto para beber (Amaro & Maia, 1997).

O aniquilamento dos preços recebidos na década de noventa, em relação à década anterior, desestimulou novos plantios de citros (Amaro & Maia, 1997) refletindo na diminuição da oferta.

Na safra de 2000/2001 foram produzidos 355,0 milhões de caixas de laranja com 40,8 kg (Abecitrus, 2002c), portanto uma redução de safra em relação ao ano anterior, que foi da ordem de 388,0 milhões de caixas. Essa queda de oferta de frutas cítricas no mercado brasileiro, vem remunerando melhor o citricultor, e exigindo maior eficiência na produção (Tozatti, 2001).

Na safra de 2001/2002 houve queda da produção de laranja em relação ao ano anterior, chegando a 328,1 milhões de caixas de 40,8 kg (Abecitrus, 2003), portanto uma redução de 26,1 milhões de caixas em relação à safra anterior e 14,5% menos suco concentrado no mercado externo. Essa perda na produção das frutas se deve a descrição de novas patologias como a Morte Súbita dos Citros. Na safra seguinte observou-se um aumento na produção de laranjas, alcançando 361 milhões de caixas, sendo acrescentadas mais de 30 milhões de caixas em relação a safra anterior.

---

A quantidade de tangerinas exportadas, nos anos de 1980 a 1996, permaneceu estável, em torno de 6 mil toneladas, oscilando no período de 1980 e 1984. O Brasil exporta aproximadamente 1% da produção total de tangerinas, sendo a maior quantidade da variedade murcote.

Os maiores importadores de tangerinas são os países da União Européia, e tendo como mercados potenciais o Canadá e alguns países da Ásia (Amaro & Maia, 1997).

No ano de 2000, as exportações brasileiras de tangerinas totalizaram US\$ 4.977.133 (Simonetti, 2001).

Em geral, das frutas de mesas, as tangerinas são as preferidas pela população pela sua beleza, perfume e facilidade de serem descascadas com as mãos (Simonetti, 2001).

As espécies mais cultivadas no Brasil são a 'cravo', a 'poncã', a 'mexerica-do-rio' e 'murcote'.

A colheita das tangerinas se constitui na prática mais onerosa do pomar, exigindo maiores cuidados. É uma ótima opção para diversificação dos produtos oferecidos pelo produtor rural (Simonetti, 2001).

A tangerina poncã tem uma origem provável na Índia, tendo grande importância econômica naquele país. As árvores são de porte médio, esguias, típicas e com folhas lanceoladas. Seus frutos são destinados, principalmente, ao consumo in natura, no mercado interno. Um dos porta-enxertos recomendados para essa espécie é o limão cravo ( *Citrus limonia* Osbeck) (Figueiredo, 1991).

A citricultura paulista passa por uma fase de problemas sanitários, devido a fatores como envelhecimento dos pomares, a demora para sua substituição, aos



---

cuidados necessários para formação de mudas sadias, a proteção das plantas a CVC, Pinta Preta, Cancro Cítrico, Morte Súbita dos Citros e ao Greening.

### 3.3 Morte Súbita dos Citros

Na década de quarenta do século vinte, observamos o surgimento de doenças potencialmente destrutivas, como a Tristeza dos Citros (Kimati & Galli, 1980), o Declínio dos Citros e atualmente a Morte Súbita dos Citros e o Greening. Em contrapartida, notamos que os cientistas estão cada vez mais obstinados a descobertas de metodologias que possam destruir ou inativar, através da detecção precoce, a ação dos organismos patogênicos como as bactérias, os vírus e os fungos.

Assistimos no final do último século a descoberta de uma doença denominada de Morte Súbita dos Citros que afeta os pomares de laranjeiras doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] ‘Valência’, ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Westin’ e ‘Pêra’ e tangerineiras (*C. reticulata* Blanco) ‘Cravo’ e ‘Ponkan’ enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck). Bassanezi et al. (2003) descreve o prelúdio da doença, como sendo relatada em três municípios do Estado de Minas Gerais e quatro do Estado de São Paulo (Gimenes-Fernandes & Bassanezi, 2001). Nas variedades tardias Natal e Valência, entre os meses de setembro e dezembro podem ser encontradas plantas mortas com frutos ainda fixos às mesmas. Essas variedades também se mostram mais susceptíveis e com desenvolvimento mais rápido da doença do que Pêra Rio, Westin e Hamlin.

A MSC está associada à combinação laranjeira doce sobre limoeiro ‘Cravo’, uma vez que combinações de laranjeiras doces sobre porta-enxertos de tangerineiras ‘Cleópatra’ (*C. reshni* Hort. ex Tan.) e ‘Sunki’ (*C. sunki* Hort. ex

Tanaka), *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e citrumelo 'Swingle' [*P. trifoliata* (L.) Raf. X *C. paradisi* Macf.] são resistentes aos sintomas da doença como descreve Gimenes-Fernandes *et al.* (2002). As plantas afetadas apresentam sintomas de definhamento generalizado.

Inicialmente, a copa da planta afetada apresenta perda de brilho das folhas, poucas brotações, ausência de brotações internas e desfolha parcial. O sistema radicular apresenta grande quantidade de raízes podres e mortas, com poucas radículas (Junior & Bassanezi, 2004). O sintoma característico da doença é o amarelecimento (Bassanezi, 2003) podendo, como mostra a figura 2.2.1, em alguns casos, ficar alaranjado nos tecidos internos da casca do porta-enxerto abaixo da região da enxertia, contrastando com a coloração creme dos tecidos da casca da copa.



Figura 3.2.1 - Foto do amarelecimento interno da casca do porta-enxerto na região abaixo da enxertia característico da MSC. (Fundecitrus, 2004)

Estes tecidos amarelados correspondem, na maior parte, aos vasos do floema que se encontram obstruídos e degenerados como descrevem Gimenes-Fernandes & Bassanezi (2001). Todo este quadro sintomatológico pode ocorrer rapidamente, de um a mais de doze meses, dependendo da época do ano e da condição de

---

produção da planta (Bassanezi et al., 2002). Normalmente, a velocidade de aparecimento de novas plantas com sintomas é maior a partir do início da estação chuvosa e é reduzida no período de outono.

Até o momento, nenhuma planta com menos de 22 meses (Jesus Junior et al., 2004), em pomares na região com maiores incidências da doença, apresentou sintomas.

Isto leva a acreditarmos que o período de incubação da MSC deva ser de pelo menos dois anos em plantas jovens e que as plantas atualmente sintomáticas foram infectadas há algum tempo no passado. Como ainda não existe diagnóstico precoce para a MSC, as avaliações da doença, baseadas no aparecimento dos sintomas, subestimam o número de plantas infectadas. Nos pomares afetados, o progresso e a disseminação da doença são bastante rápidos, podendo atingir de 30 a 70% das plantas em apenas seis meses (Bassanezi et al., 2002; Bassanezi et al., 2003). O número de plantas sintomáticas tem aumentado rapidamente na região em que a doença foi detectada, partindo de 500 plantas em 1999 para mais de um milhão em dezembro de 2002 (Fundecitrus, 2002).

A disseminação é também rápida. De fevereiro a dezembro de 2001, a doença já havia sido constatada em 45 propriedades nos municípios de Comendador Gomes, Frutal e Uberlândia, no sul do Triângulo Mineiro, e em Altair, Barretos, Colômbia e Guaraci, no norte do Estado de São Paulo (Libanore et al., 2002). Em outubro de 2003, a doença já estava registrada em 29 municípios: 11 em Minas Gerais e 18 em São Paulo (Informativo Fundecitrus, 2003). Entretanto, a MSC atingiu 30 municípios dos Estados de Minas Gerais e São Paulo (Informativo Fundecitrus, Junho 2004), perfazendo as cidades de Monte Alegre de Minas, Prata, Campo Florido, Planura, Uberlândia, Comendador Gomes, Frutal, São Francisco de

Sales, Uberaba, Conceição das Alagoas, Ituiutaba e Fronteira no Estado de Minas Gerais, já no Estado de São Paulo temos relatos da doença nos municípios de Colômbia, Barretos, Olímpia, Guaraci, Altair, Nova Granada, Cajobi, Bálsamo, Onda Verde, Paulo de Faria, Riolândia, Ibirá, Segundo o último levantamento realizado pelos técnicos do Fundecitrus (Informativo Fundecitrus, 2006) mostrou que a MSC está restrita a 12 municípios paulistas identificando 86.595 plantas com sintomas da doença, quase o dobro de 2003, quando foram encontradas 44.459 árvores doentes. Por sua capacidade de definhando e matar as plantas sobre limoeiro 'Cravo', que representam 85% das 200 milhões de árvores do Estado de São Paulo, e da sua velocidade de progresso e disseminação, a MSC tem causado grande preocupação ao setor citrícola.

A hipótese mais provável, porém não confirmada (Jesus Júnior & Bassanezzi, 2004), é que a MSC seja causada por um vírus disseminado por um vetor, de maneira semelhante à tristeza dos citros na sua forma de declínio rápido, quando a laranjeira doce é enxertada sobre laranjeira 'Azeda' (*C. aurantium* L.). Por enquanto, somente foram observadas e detectadas, por testes serológicos e moleculares, partículas de vírus semelhantes ao Citrus Tristeza Vírus (CTV), gênero Closterovirus, família Closteroviridae, nas plantas com sintomas de MSC.

Estudos mais recentes realizados pela empresa Alellyx Applied Genomics sugerem que a provável causa da MSC esteja relacionada a pulgões verde e cinza *Toxoptera citricida* (Maccheroni et al.; 2005), responsáveis, segundo a pesquisa, pela transmissão de um vírus conhecido como Citrus Sudden Death Vírus (Alellyx, 2004).

### **3.3.1 Inspeção Visual do Parque Citrícola**

O último levantamento realizado pelo Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus, em abril e julho de 2005, inspecionou 448 talhões de 84 propriedades

contaminadas. Foram inspecionadas 12.221 propriedades e vistoriaram 79,1 milhões de plantas em 49.215 talhões, todos enxertados sobre limoeiros 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) e 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*). As inspeções foram feitas inicialmente em 20% das árvores de cada talhão para encontrar a doença.. No caso da doença ser encontrada, todo o talhão foi vistoriado, para contagem das plantas doentes. A análise desse levantamento identificou 86.595 plantas com sintomas de MSC no campo, quase o dobro de 2003, quando foram encontradas 44.459 árvores com a doença (Informativo Fundecitrus, 2004).

### 3.3.2 Importância da utilização de porta-enxertos no mundo citrícola.

Desde a introdução das laranjeiras no Brasil realizada pelos colonizadores na década de quarenta do século XVI, até o crepúsculo do século XIX, observamos a disseminação das plantas cítricas através das sementes (Pompeu Júnior, 1991).

Quando a indústria cítrica tornou-se importante no âmbito comercial, período que decorreu de grandes guerras no Brasil como a de Canudos e a de Contestado, observamos o uso de árvores enxertadas, que se iniciou com a laranja 'Caipira' (*C. sinensis* (L.) Osbeck) compreendia o porta-enxerto mais utilizado pelos citricultores. A baixa imunidade à seca e a gomose fez com que o porta-enxerto fosse substituído pelo laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) que perdurou até a década de quarenta (Pompeu Júnior, 2001). Este mesmo autor coloca que neste período o parque citrícola paulista continha 12 milhões de árvores, onde 90% estavam enxertadas sobre laranja azeda e outros 10% sobre limão cravo (*C. limonia*), laranja 'Caipira', limão Rugoso (*C. jambhiri* Lush) e lima doce da Pérsia (*C. limettiodes* Tan). Esta sólida representação do porta-enxerto laranja azeda era devido às condições favoráveis para sua adaptação climatológica, boa afinidade com a maioria das variedades comerciais, além da qualidade das frutas produzidas (Moreira, 1941).

---

A introdução do vírus da Tristeza dos citros (CTV) no Estado de São Paulo, em 1937 aliada a sua rápida disseminação pelo pulgão preto (*Toxoptera citricidus* Kirk) causou a morte de árvores enxertadas sobre laranja azeda e lima da Pérsia. Diante desta problemática situação da citricultura fez-se uso da pesquisa pelo Instituto Agrônomo de Campinas em colaboração com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) para renovação de porta-enxertos tolerantes a CTV e a outras doenças, obtendo-se limão 'Cravo', tangerina 'Cleópatra' (*C. reshni* Hort ex. Tanaka), limão 'Rugoso' e citrange 'Troyer' (*Poncirus trifoliata* L. Rafinesque x *C. sinensis* L. Osbeck) (Chapot, 1975; Pompeu Júnior, 1991 e 2001).

A partir da década de 70 surge uma doença de etiologia desconhecida tornando-se um problema bilateral, ou seja, tanto para os Estados Unidos quanto para o Brasil, e tendo como porta-enxertos suscetíveis *P. trifoliata*, limão 'Rugoso' e limão 'Cravo' (Gosser & Gmitter Júnior, 1990). Tal doença conhecida como Declínio dos Citros, vem causando a morte de inúmeras árvores sobre esses porta-enxertos levando a prejuízos de 200 milhões de dólares anuais para a citricultura mundial (Fundecitrus, 2003).

Atualmente, mais de 80% das árvores cítricas estão enxertadas sobre limão 'Cravo', e o restante está distribuído em tangerinas, limões, citrumelos, trifoliata, citranges (Abecitrus, 2003). Contudo, a utilização dos porta-enxertos limão 'Cravo' e limão 'Volkameriano' estão ameaçados com a Morte Súbita dos Citros.

A história da citricultura vem mostrando o quanto é importante a diversificação e qualidade dos porta-enxertos para o desenvolvimento citrícula. O uso generalizado de um único porta-enxerto para todas as variedades copa não atende as características peculiares de cada cultivar (Calixto, 2003).

O conhecimento de diferenças e o uso racional dos porta-enxertos permite maior produtividade, tanto na produção quanto na precocidade de maturação dos frutos (Pompeu Júnior, 1991). Segundo o autor, o uso do porta-enxerto induz a variedade copa alterações no seu crescimento, tamanho, precocidade de produção, produtividade, época de maturação e massa dos frutos, permanência dos frutos na planta, conservação da fruta após a colheita, transpiração das folhas, fertilidade do pólen, composição química das folhas, capacidade de absorção, síntese e utilização de nutrientes, tolerância a salinidade, resistência a seca e ao frio, resistência e tolerância à doenças e pragas, e resposta a produtos de abscisão.

A escolha do porta-enxerto adequado deve levar em consideração alguns parâmetros como o clima, o solo, a copa e o manejo a ser adotado, já que não existe um porta-enxerto ideal. Desta forma, torna-se indispensável um estudo detalhado sobre o campo que vai ser implantado o pomar, e desta forma definir qual o melhor porta-enxerto para uma maior produção e melhor qualidade dos frutos.

### **3.4 Fluorescência Foliar.**

A fluorescência da clorofila é uma técnica caracterizada, analogamente, por medidas rápidas e com grande precisão (DeEll et al., 1999), que vem sendo usada como indicador do stress ambiental de vários grupos de plantas, além de ser um método não-destrutivo de reações fotossintéticas in natura (Schreiber et al., 1994; Gray et al., 1997). A fluorescência da clorofila é originada através da excitação, com uma fonte de luz, das clorofilas **a** e **b** presentes nos cloroplastos associadas com o Fotossistema-II, refletindo as reações fotossintéticas primárias nas membranas tilacoideais (Papargorgiou, 1975; Schreider and Bilger, 1987), sendo uma medida capaz de demonstrar o estado fisiológico dos tecidos verdes (Krause e Weis, 1984,

1991; Schreiber e Bilger, 1987; Maxwell e Johnson, 2000) tanto em folhas verdes quanto para verificação do conteúdo clorofilático das frutas (Smillie et al., 1987; Song et al., 1997; DeEll et al., 1998; Mir et al., 1998 b; DeEll e Toivonen, 2000). Nos frutos, esta técnica é capaz de medir o amadurecimento, além da capacidade de nortear o processo de senescência ou envelhecimento do produto.

A fluorescência da clorofila representa uma pequena porção de energia absorvida re-irradiada e não utilizada nas reações fotoquímicas da fotossíntese (Krause e Weis, 1991; Maxwell e Johnson, 2000). Lang et al. (1992) cita que a emissão de fluorescência com máximos perto de 450nm e 525 nm em extrato de *Nicotiana tabacum* podem ser representados por uma mistura de sinal de várias substâncias fenólicas como coumarinas e ácidos hidroxi-cinâmicos e possivelmente outros compostos químicos não identificados (Goulas et al., 1990).

Schweiger, Lang e Lichtenthaler (1995) realizaram um estudo para diferenciar o espectro de excitação das folhas entre as plantas com stress e sem-stress, e relataram que a excitação das folhas na região do ultravioleta (320 nm -380 nm) resulta na emissão de fluorescência na região espectral no azul-verde. Dessa forma, quatro bandas podem ser diferenciadas nas plantas. Emissão de fluorescência perto do azul (440 nm a 450 nm), região perto do verde (520 nm a 530 nm), a fluorescência no vermelho (690 nm) e picos de emissão na região do infravermelho-próximo (730 nm a 740 nm). Esses autores citam que a razão entre 690/735 representa um excelente indicador do conteúdo de clorofila, *in vivo*, nas plantas. A emissão predominantemente no azul e verde relacionam-se com a epiderme das células e nervuras das folhas, e uma pequena parte da emissão de fluorescência no verde devem-se ao mesófilo das folhas.



---

A computação gráfica tem sido usada nas tarefas de classificação da forma, na detecção de defeitos, na classificação de níveis qualitativos. Desta maneira, desenvolveu-se um modelo padrão de comparação entre as imagens que foram implementadas pelo uso de algoritmos. O algoritmo surgiu como uma ferramenta, mostrando resultados satisfatórios, necessários para aumentar a resolução. Desta forma, Tao & Wen (1999) desenvolveram uma habilidade, por meio de algoritmos, capaz de selecionar defeitos no sistema.

Dewuff et al. (1999) usou uma técnica de processamento de imagens para obter um modelo geométrico, em um debate usando laranjas pêras, num estudo usando elementos de maneira limitada de análises para determinação de resolução. Na pesquisa de Singh e Delwiche (1994) uma câmera monocromática, possibilitou com o uso de um filtro, a demonstração de uma banda na região próxima ao infravermelho tendo sido interessante na captura de imagens de frutas para detectar e identificar maiores defeitos.

Heisel et al. (1996) destaca que através da técnica de imagem de fluorescência induzida por Laser torna-se possível a detecção da deficiência de nutrientes numa variedade de trigo (*Zea mays*) com a finalidade de corrigir em tempo a fertilização da cultura.

Todos os organismos fotossintéticos contêm um ou mais pigmentos orgânicos capazes de absorver a radiação visível que iniciará às reações fotoquímicas da fotossíntese. Esses pigmentos podem ser extraídos das folhas com solventes orgânicos. Em plantas superiores, os principais pigmentos fotossintéticos são as clorofilas (**a** e **b**) e os carotenóides.

As clorofilas são os pigmentos que dão às plantas a sua cor verde característica. A clorofila **a** é verde-azulada e a **b** é verde-amarelada. A clorofila **a**

ocorre em todos os organismos fotossintéticos que liberam  $O_2$  e tem como função realizar a etapa fotoquímica, primeiro estágio fotossintético (STREIT et al., 2005). A clorofila **b**, cujo teor é de cerca de 1/3 do da clorofila **a** (HALL e RAO, 1980) é sintetizada a partir da oxidação do grupo metil da clorofila **a** para um grupo aldeído (STREIT et al., 2005), e está presente nas folhas de plantas superiores e nas algas verdes.

A fórmula molecular da clorofila **a** é  $C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$ , e a da clorofila **b**  $C_{55}H_{70}N_4O_6Mg$ . A estrutura química da molécula de clorofila **a** é mostrada na figura 5.1. A molécula de clorofila contém uma "cabeça" porfirínica e uma "cauda" de fitol. O núcleo porfirínica polar (relativamente solúvel em água) é composto de um anel tetrapirrólico e um átomo de magnésio. Na clorofila **b**, o grupo  $-CH_3$  do segundo (II) anel pirrólico é substituído pelo grupo  $-CHO$  (Figura 3.4.1).

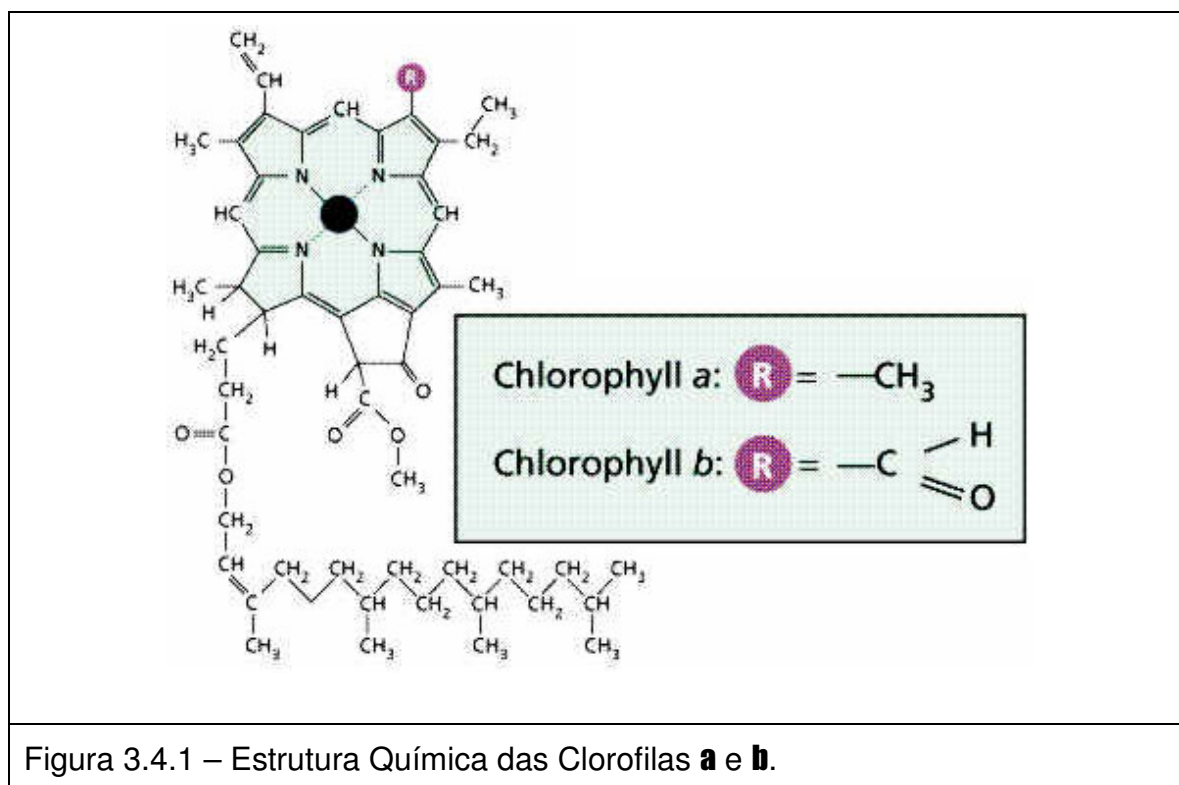


Figura 3.4.1 – Estrutura Química das Clorofilas **a** e **b**.

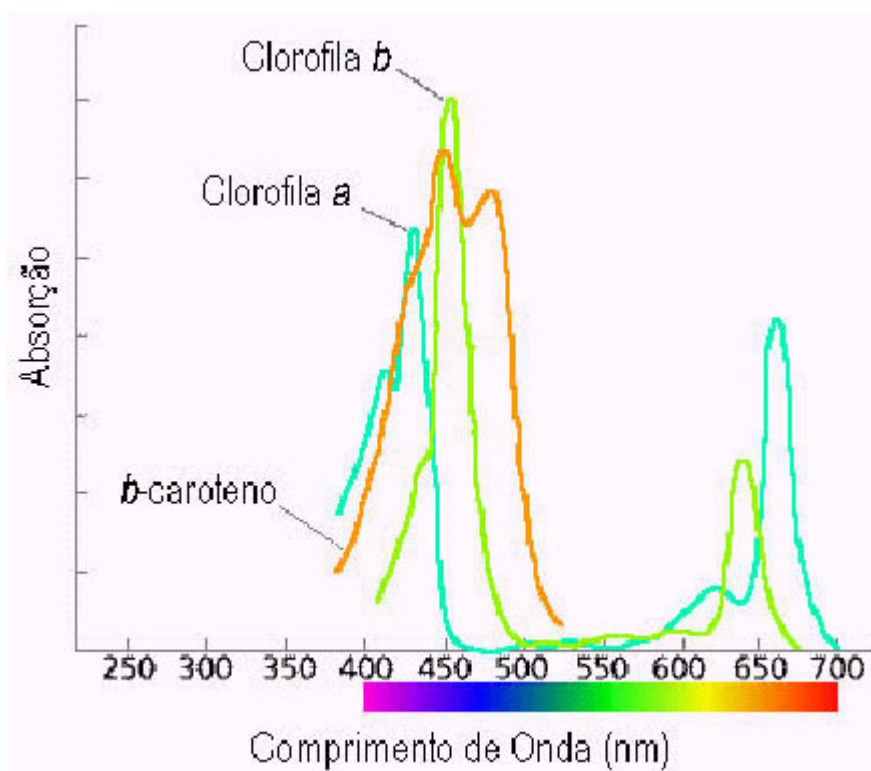
Os carotenóides são pigmentos amarelados ou alaranjados, denominados de pigmentos fotossintéticos acessórios, encontrados em todas as células fotossintetizantes. Normalmente, sua coloração nas folhas é mascarada pela clorofila. Os carotenóides contêm um sistema conjugado de dupla ligação do tipo poliênico. Geralmente, são hidrocarbonetos puros (carotenos) ou hidrocarbonetos oxigenados (xantofilas). Os carotenóides têm espectros de absorção de luz na região entre 400 a 550 nm. Os carotenóides situam-se nas membranas tilacoidais em íntima associação com as clorofilas. A energia absorvida por esses pigmentos acessórios pode ser transferida para a clorofila **a** durante a fotossíntese. Além disso, os carotenóides protegem as moléculas de clorofila e proteínas contra a fotoxidação sob luz excessiva (HALL e RAO, 1980).

As moléculas de clorofilas absorvem a energia luminosa (fótons) e alteram temporariamente as suas configurações eletrônicas. Dessa forma, esses pigmentos passam do estado fundamental para o estado excitado, com nível de energia maior. Como esse estado excitado é muito instável e de vida muito curta (1 bilionésimo de segundo), a energia pode ser dissipada através de três vias: fluorescência (F), dissipação fotoquímica (Ph) e dissipação não-fotoquímica (D).

Os três processos de dissipação da energia luminosa pelas moléculas de clorofilas (Ph+F+D) são competitivos, ou seja, alterações nas taxas fotossintéticas e na dissipação de calor causarão alterações complementares na emissão da fluorescência. Sendo assim, as alterações na fluorescência podem mostrar a ausência ou presença de comprometimentos no processo fotossintético.

A relação entre os três processos é expressa matematicamente:

$$\text{Dissipação total da energia} = (Ph + F + D)n \quad (3.4.1)$$



Em que:

$n$  = número de moléculas de clorofila

E como o objetivo deste trabalho é entender o comportamento espectral de amostras sadias e doentes quando submetidas a espectroscopia de fluorescência, o qual se verifica como um processo em que ocorre posteriormente a absorção de energia e sabendo que os máximos de absorção da clorofila **a** são em 420 nm e 660 nm, a clorofila **b** apresenta absorções em 435 nm e 643 nm e os carotenos mostra absorção característicos em 425 nm, 450 nm e 480 nm (HALL,RAO, 1980), verificados como mostra a figura 3.4.2.

Figura 3.4.2 – Espectros Característicos de Absorção das Clorofilas a e b e  $\beta$ -Caroteno em solução com acetona. (modificado de Lichtenthaler, 1987)

### 3.4.1 Fotografias Aéreas Aplicadas na Agricultura.

A utilização de fotografias aéreas aplicadas na agricultura podem ser capturadas tanto por fotografia quanto por vídeo (Araújo, 2004). Lueder (1959) relata que o uso de fotografias aéreas constitui uma ferramenta importante no levantamento de solos para possível avaliação da qualidade da terra.

Spurr (1960) comenta que o uso deste mecanismo de captura de imagens via fotografias aéreas simbolizam uma maneira de estudar a vegetação e os elementos que a constituem.

Simakova (1964) cita em seu trabalho que o uso de fotografias aéreas no mapeamento de grandes áreas surgiu da necessidade de diminuir o tempo e os custos destas análises.

Steiner (1970) comenta que as primeiras classificações de terras eram baseadas nos trabalhos realizados *in lócus*. Posteriormente a década de cinqüenta do último século, vários cientistas iniciaram suas primeiras pesquisas a cerca da identificação de culturas através do uso de fotografias aéreas.

Segundo Marchetti & Garcia (1988) a utilização de fotografias capturadas de determinadas áreas oferecem um grande de numero de informações, tal como qualidade do solo, controle de erosão, reflorestamento e por fim predizer a cultura que se adapta melhor naquele solo.

Blakhmer & Schepers (1996) utilizaram as fotografias aéreas para estimar a biomassa, e desta forma controlar aplicação de nitrogênio da cultura em estudo. E através deste estudo, concluíram que é possível estimar a biomassa através do uso de fotografias aéreas.

Outra vertente a cerca desta técnica, refere-se ao estudo proposto por Vellidis et al. (1997) que se direcionou para estudar a produtividade de uma área com

cultura de algodão. O autor concluiu neste que estudo que é possível entender a produtividade de uma cultura por meio do uso de fotografias aéreas.

Em outro trabalho, Carter (1999) estudou o uso de imagens aéreas para detecção de anomalias naturais e induzidas pelo homem. Desta forma, o uso desta ferramenta convergiria para identificação de áreas afetadas por ervas daninhas.

Koller et al. (1999) direcionou seu estudo para compreender o modelo do crescimento da cultura de tomate. Daberkow et al. (1999) pesquisaram uma possível correlação entre produtividade do milho irrigado com imagens multiespectrais, e concluíram que existe uma baixa correlação entre estes dois parâmetros apresentados anteriormente.

Sttagenborg et al. (2000) pesquisaram o uso de fotografias aéreas comuns com filtros de 35 mm, a partir de pequenas aeronaves, para prever a produção de grãos. Eles concluíram que existe uma baixa relação entre estas duas ferramentas analisadas no estudo.

### **3.5 Espectroscopia Aplicada a Diagnóstico de Doenças**

A fluorescência é um fenômeno que vem sendo aplicado com frequência na medicina para diagnóstico de doenças. Como por exemplo, podemos citar a biópsia óptica (Zângaro et al., 1996).

Recentemente, também foram publicados dois métodos utilizando imagens de fluorescência para se detectar, diagnosticar e quantificar o stress das plantas indicando deficiência de nutrientes ou presença de doença usando imagens tratadas por meios computacionais. A curva espectral característica da intensidade de fluorescência no tempo que mede a transferência da energia da fluorescência e a diminuição da fluorescência é utilizada no diagnóstico precoce do stress da planta.

Usando fluorescência, Bravo et al. (2002) objetivou detectar o stress na variedade de trigo causado por condições de campo. Através de imagens de fluorescência entre 450 e 900 nm desenvolveu-se um dispositivo óptico para identificar uma doença denominada de ferrugem amarela causada por *Puccinia striiformis*. Em seu dispositivo os autores capturam as imagens de fluorescência de plantas de trigo com a lâmpada de xenônio desligada e depois fazem a mesma imagem com a lâmpada ligada e subtraem as imagens pixel a pixel.

### **3.5.1 Espectroscopia de Luminescência**

Luminescência é o nome dado ao fenômeno relacionado à capacidade que algumas substâncias apresentam em converter certos tipos de energia em emissão de radiação eletromagnética, com um excesso de radiação térmica. A luminescência é observada para todas as fases da matéria, seja gasosa, líquida ou sólida, para ambos compostos orgânicos e inorgânicos. A radiação eletromagnética emitida por um material luminescente, ocorre usualmente na região do visível, mas esta pode ocorrer também em outras regiões do espectro eletromagnético, tais como ultravioleta e infravermelho.

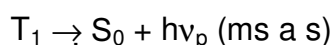
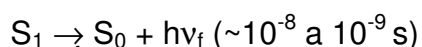
O objeto pode ser excitado com diversas fontes de energia, dentre as quais temos a fonte de irradiação que pode ser chamado de fotoluminescência (radiação eletromagnética), catodoluminescência (bombardeio com elétrons energéticos ou raios catódicos), luminescência de raios X (raios X), quimioluminescência (derivada de uma reação química), eletroluminescência (aplicação de voltagem) e termoluminescência (estimulação térmica de emissão luminescente).

O objeto pode ser excitado com diversas fontes de energia, dentre as quais temos a fonte de irradiação que pode ser chamado de fotoluminescência (radiação

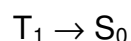
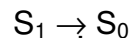
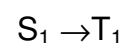
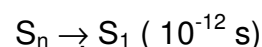
eletromagnética), catodoluminescência (bombardeio com elétrons energéticos ou raios catódicos), luminescência de raios X (raios X), quimioluminescência (derivada de uma reação química), eletroluminescência (aplicação de voltagem) e termoluminescência (estimulação térmica de emissão luminescente). A emissão luminescente envolve transições radioativas e não-radioativas entre níveis eletrônicos de energia, sendo uma propriedade intrínseca de cada material, como mostra um diagrama genérico abaixo:

Em seguida à absorção de luz,  $S_0 + hv_a \rightarrow S_n$ , diversos processos ocorrem:

Transições radioativas



Relaxações não-radioativas



Transições radioativas  $S_1 \rightarrow S_0$  são permitidas pela regra de conservação do spin; tipo de decaimento é chamado fluorescência; decaimentos radioativos  $T_1 \rightarrow S_0$  são proibidos pela regra de conservação do spin, este fenômeno é chamado de fosforescência. Dois importantes parâmetros são obtidos do espectro de fluorescência: o comprimento de onda de máxima emissão ( $\lambda_{\text{máx.}}$ ), sensível à polaridade do meio, e a intensidade.

A transição é originada num nível eletrônico excitado e conseguinte emissão de um fóton, através do retorno ao nível eletrônico de menor energia ou estado fundamental.

O fenômeno de luminescência tem sido classificado de acordo com a duração do tempo de decaimento para o estado fundamental. Desta classificação temos a



fluorescência e a fosforescência. Os dois fenômenos têm tempo de relaxação de  $10^{-8}$  s e de vários segundos, respectivamente. Esta divisão de métodos corresponde, de forma impreterível, a compostos orgânicos no estado fundamental.

A fluorescência dos compostos orgânicos envolve transições singleto-singleto onde não existem mudanças de spin, contudo, para a fosforescência é necessário um estado intermediário chamado tripleto (meta-estável), devido a inversão do spin entre o estado fundamental e o excitado, que retarda a emissão, devido as regras de seleção por spin.

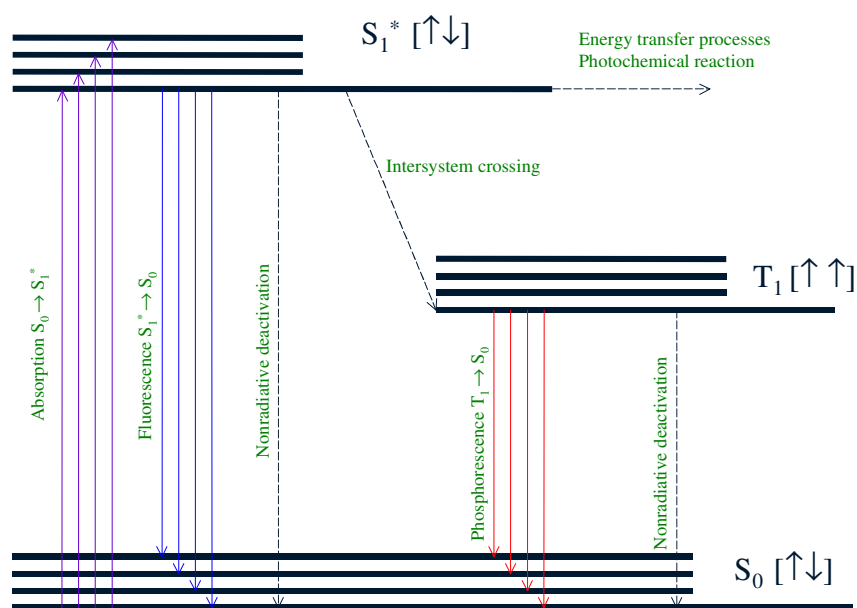


Figura 3.5.1 : Diagrama de Transição Eletrônica Fluorescência Molecular.

Os estados eletrônicos fundamental, primeiro e segundo estados excitados são representados por  $S_0$ ,  $S_1$  e  $S_2$ , respectivamente. Em cada nível de energia eletrônico existe uma série de níveis de energia vibracionais. Os espectros hipotéticos de

absorção e emissão de fluorescência e fosforescência, correspondentes às transições observadas no diagrama, encontram-se à esquerda.

Os experimentos foram realizados com pedaços de folhas *in natura* e casca (caule) *in natura* e seus extratos. O equipamento utilizado para as aferições de fotoluminescência é o modelo (SHIMADZU RF-5301PC) da Embrapa Instrumentação Agropecuária e um espectrômetro de fluorescência induzida por Laser cuja instrumentação foi estruturada no Laboratório de Óptica e Lasers da Embrapa Instrumentação Agropecuária.

As análises de espectroscopia de fotoluminescência, em porta-enxertos e em folhas na forma *in natura* e na forma de extrato, foram realizados espectros de emissão em 576 nm, além de espectros com emissão em 662 nm, 275 nm, 320 nm, e espectros de excitação com emissão em 629 nm, com os seguintes parâmetros para estes dois tipos de amostras: fenda de entrada de 5 nm e fenda de saída de 5 nm, velocidade de escaneamento média, intervalo de leitura de 0,2 nm e alta sensibilidade e intervalo espectral variável.

### **3.5.1.1 Laser de Argônio: Principais Características**

A Mecânica Quântica toca a Óptica em toda sua teoria, mas quando se fala em LASER, remete-se aos fenômenos de absorção e emissão de luz pelos átomos. O LASER é um dispositivo que funciona baseado num fenômeno: inversão de população, ou seja, absorção de energia para que a maior parte dos átomos se excitam (elétrons “saltem” para camadas mais distantes do núcleo atômico). Após a inversão de população, deve haver um regresso ao estado fundamental com liberação de fótons gêmeos (luz coerente). Processo similar ocorre em outras fontes primárias de luz, como uma lâmpada elétrica, que, por Efeito Joule, tem sua energia

transformada em calor. A energia térmica promove a inversão de população, mas quando os elétrons voltam para suas configurações estáveis, os fótons são liberados sem relação de fase (em várias direções com diferentes frequências). A esse processo denominamos *emissão espontânea*. Um LASER é montado de maneira que a emissão espontânea seja minimizada e substituída por uma forma “organizada” de emitir luz: emissão estimulada (LASER: Light Amplification by *Stimulated Emission* of Radiation. Amplificação de luz por *emissão estimulada* de radiação).

Para se conseguir tal emissão, os LASERS apresentam três componentes principais: o meio ativo (meio LASER ou de ganho óptico), o mecanismo de bombeio e o sistema de realimentação.



Figura 3.5.1.1.1: Esquema representativo do LASER.

O meio ativo sofre inversão de população através da energia fornecida pelo mecanismo de bombeio. Essa energia deve ser suficiente para que os elétrons “saltem” não apenas para o nível seguinte, mas, no mínimo, para dois níveis à frente, pois se o elétron estiver na camada imediatamente seguinte a de sua configuração estável, a emissão de luz será espontânea. Assim os LASERS podem ser classificados de acordo com o número de camadas envolvidas na inversão de população. Por exemplo: LASER de nível 3, LASER de nível 4, mas nunca LASER de nível 2. O sistema é “energeticamente alimentado” até atingir a saturação do ganho (volta para o estado fundamental. Inicialmente um átomo libera um fóton

através de emissão espontânea. Tal fóton passa a percorrer o meio ativo e quando encontra um átomo meta-estável (excitado), faz com que ele retome ao estado fundamental carregando o fóton liberado consigo. O processo continua até que quase todos os átomos tenham se tornado estáveis com a liberação de seus fótons. Diz-se que esse par de fótons é gêmeo, pois apresenta relação de fase, ou seja, ambos orientam-se mutuamente com mesma frequência. Vários fótons gêmeos passam a ser liberados após a saturação do ganho num trânsito pelo meio ativo patrocinado pelo sistema de realimentação. Este é composto por dois espelhos posicionados nas extremidades do meio ativo, paralelos entre si e de diferentes índices de reflexão ( $\gg 100\%$  e  $\gg 80\%$ , variando de acordo com o tipo de LASER). Quando os fótons gêmeos iluminam os espelhos, são refletidos e o sinal luminoso passa a ser amplificado. O LASER entra em regime estacionário de oscilação até que alguns fótons consigam emergir pelo espelho de menor reflexão, o que chamamos raio LASER. Devido a todo o processo, pode-se afirmar que a luz é: coerente uma vez que os fótons estão correlacionados; quase monocromática, pois a faixa de frequência no espectro eletromagnético é pequena; direcionada, por se espalhar pouco (um feixe de 1 cm de largura ao se deslocar por 1,5 km de extensão espalha-se, aproximadamente, apenas 3 cm); pode ser polarizada, pois como toda luz, o LASER também possui natureza eletromagnética.

Utilizou-se nas medidas realizadas nos porta-enxertos, nas folhas e nos frutos um sistema de fluorescência induzida por Laser encontrado no Laboratório de Espectroscopia da Embrapa Instrumentação Agropecuária no período de setembro à dezembro de 2004. O laser utiliza, neste experimento, o argônio como fonte de amplificação de luz por emissão estimulada de radiação (Laser).

Este laser apresenta linhas de emissão na região de comprimentos de onda do visível e ultravioleta. Contudo, não conseguimos encontrar o comprimento de onda mais adequado, até o momento, para a fluorescência dos porta-enxertos.

Paralelos a isto, foram realizadas medidas de fluorescência utilizando um equipamento modelo (SHIMADZU RF-5301PC) da Embrapa Instrumentação Agropecuária no Laboratório de Óptica e Lasers da mesma instituição de pesquisa para as medidas de porta-enxertos e folhas. Neste equipamento, nós fizemos uma varredura inexorável com o objetivo de encontrar o comprimento de onda mais adequado para as medidas. Destas medidas, foram observadas excitações no amarelo ( 576) nm apresentaram resultados de forma mais acentuada.

### **3.5.2 Espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-Vis)**

A espectroscopia na região do Ultravioleta (200 – 400 nm) e Visível (400 – 800 nm) permite a identificação de transições de elétrons dos orbitais  $\sigma$ -, $\pi$ -,  $\eta$ - de seu estado energético fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado.

Para muitas das estruturas eletrônicas, esta absorção ocorre em uma porção pouco acessível do ultravioleta. Na prática, a espectroscopia no ultravioleta é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados. Entretanto a seletividade da absorção no ultravioleta constitui uma vantagem permitindo que grupos característicos possam ser reconhecidos em moléculas de complexidade bastante variável (Silverstein et al., 1991).

Compostos contendo elétrons desemparelhados nos átomos de oxigênio ou enxofre mostram absorção de energia na região do UV-VIS, assim como sistemas

contendo duplas ligações conjugadas. Esses grupos são chamados cromóforos como são mostrados na tabela 3.5.2.1

Cromóforos	$\lambda_{\text{máx}}$ Comprimento de Onda	$\epsilon_{\text{máx}}$ Intensidade
C=C	177	13000
C≡C	178 196 225	10000 2000 160
C=O	180 186 280	grande 1000 16
-C=OOH	204	41

As medidas serão realizadas em um espectrômetro de UV-VISÍVEL SHIMADZU modelo UV-1601PC, pertencente à Empresa Instrumentação Agropecuária.

A luz proveniente da fonte, passa através do monocromador ( pode ser um prisma, um filtro ou uma grade de difração) para selecionar um comprimento de onda definido,  $\lambda$ . O feixe de luz com este comprimento de onda e potência radiante  $P_0$ , atravessa a amostra de comprimento  $b$ . A potência radiante (com o mesmo comprimento de onda) que emerge do outro lado da amostra é  $P$ , uma vez que uma fração de luz incidente é absorvida pela amostra, de modo que  $P \leq P_0$ . A transmitância,  $T$ , é definida como sendo a fração da luz original que passa pela amostra :

$$T = P/P_0 \quad (3.5.1)$$

É comum expressarmos em termos de porcentagem de transmitância, que simplesmente é dada por  $\%T = 100 \times T$ . Uma grandeza mais útil é a absorbância, definida como:

$$A = \log P_0/P = -\log T = 2 - \log \%T \quad (3.5.2)$$

A equação 3.5.2 mostra que a fração da luz que fica absorvida pela amostra está logaritmicamente relacionada com a transmitância. Em termos analíticos, é importante saber como a absorbância se relaciona com a concentração da amostra absorvente e o comprimento do percurso, ou percurso ótico,  $b$ . Considere o diagrama da figura 3.5. 2.1:

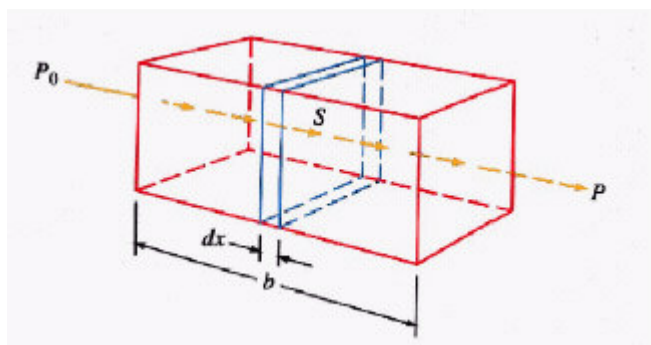


Figura 3.5.2.1 – Passagem da radiação através de um material absorvente de comprimento  $b$ .

Imagine um feixe de luz incidente de potência  $P_0$  passando através de uma fina camada de solução de espessura  $dx$ . A diminuição da potência,  $dP$ , é proporcional à potência incidente,  $P_0$ , à concentração de espécie absorvente,  $C$ , e à espessura da camada  $dx$ :

$$dP = -\beta P_0 C dx \quad (3.5.3)$$

onde  $\beta$  é uma constante de proporcionalidade. A equação 3.5.3 pode ser rearranjada e integrada sobre todas as camadas:

$$-dP/P_0 = \beta C dx \quad (3.5.4)$$

Os limites de integração são:  $P = P_0$  para  $x = 0$  e  $P = P$  para  $x = b$ . Resolvendo a integral e substituindo os valores limites, se obtém:

$$-\ln P - (-\ln P_0) = \beta b C$$

$$-\ln P/P_0 = \beta b C \quad (3.5.5)$$

Finalmente, convertendo para logaritmos de base 10, obtém-se a expressão,

$$A = \log P_0/P = (\beta/\ln 10) b C \quad (3.5.6)$$

ou,

$$A = \epsilon b C \quad (3.5.7)$$

é a equação de Lambert-Beer . A importância da absorvância é a sua relação linear com a concentração da espécie absorvente. É o coração da metodologia espectrofotométrica para a quantificação de espécies químicas que possuem grupos cromóforos.

As análises de espectroscopia no UV-Vis foi realizada usando-se os seguintes parâmetros: velocidade de escaneamento média, intervalo de leitura automático, intervalo espectral de 390 nm a 800 nm tanto para o extrato hidrofóbico quanto para o extrato hidrofílico. Na espectroscopia de fotoluminescência, foram realizados espectros de emissão em 445 nm, 576 nm e 680 nm com os seguintes parâmetros para estes dois tipos de amostras: fenda de entrada de 5 nm e fenda de saída de 5



nm, velocidade de escaneamento média, intervalo de leitura de 0,2 nm e alta sensibilidade

### 3.5.3 Infravermelho com Transformada de Fourier

Em meados do século XVII, o matemático francês J. Fourier provou matematicamente que qualquer forma de onda, independente da sua origem, é um somatório de ondas senoidais de diferentes frequências, amplitudes e fases. Ele mostrou que se a forma de onda se repete periodicamente, então as frequências das componentes senoidais são restritas a valores múltiplos da frequência de repetição da forma de onda, como é mostrado na figura 3.5.3.1:

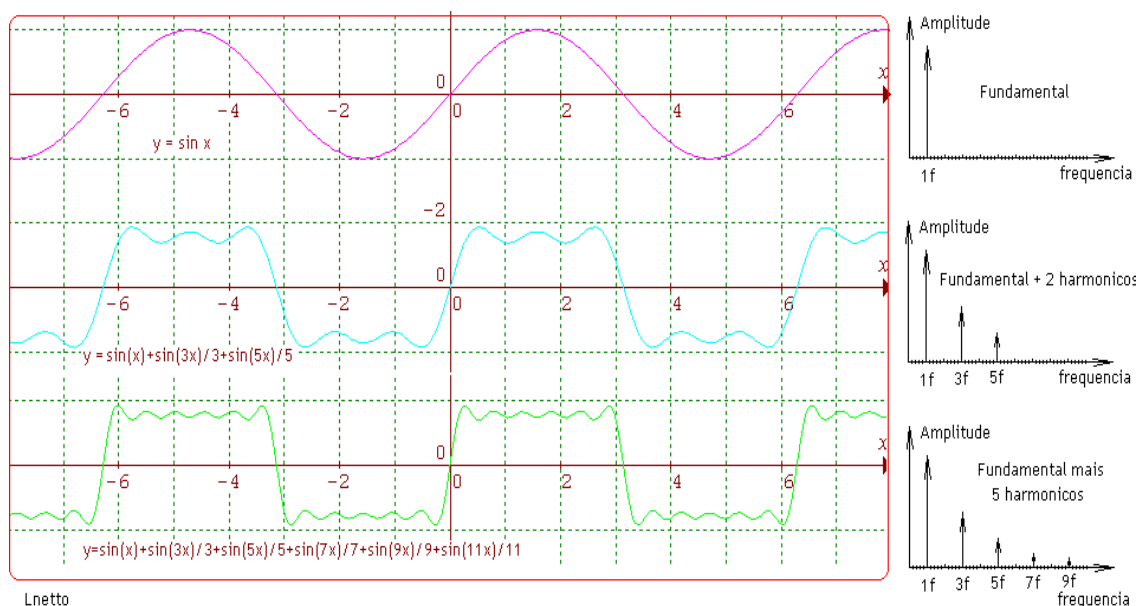


Figura 3.5.3.1: Representação de uma onda senoidal.

A transformada de Fourier representa a soma de uma série de formas de onda senoidais com diferentes amplitudes, fase e frequência. Observe o que Fourier descobriu: Qualquer sinal complexo pode ser decomposto em sinais senoidais com fases e amplitudes determinadas.

Entretanto a espectroscopia com transformada de Fourier desenvolveu-se inicialmente por astrônomos no início dos anos 50 com a finalidade de estudar os

espectros infravermelhos de estrelas distantes; somente com o uso da técnica de Fourier os sinais muito fracos dessas fontes podiam ser isolados do ruído ambiental. As primeiras aplicações químicas da espectroscopia com transformada de Fourier, que foram publicadas uma década depois, eram para as radiações de baixa energia do infravermelho distante; no final dos anos 60, já estavam disponíveis comercialmente instrumentos para estudos químicos tanto na região infravermelho distante ( $10$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ ) quanto na região infravermelha comum. Existem várias vantagens no uso de instrumentos com transformada de Fourier. A primeira é eficiência de transporte ou vantagem de Jaquinot, que é obtida porque os instrumentos com transformada de Fourier possuem poucos elementos ópticos e nenhuma fenda para atenuar a radiação. Como consequência, a potência de radiação que incide no detector é muito maior que em instrumentos dispersivos, e são observadas relações sinal - ruído muito melhores.

Uma segunda vantagem é seu alto poder de resolução e reprodutibilidade do comprimento de onda, que torna possível a análise de espectros complexos nos quais o número de linhas estreitas e a superposição espectral tornam difícil a interpretação dos espectros individuais.

Uma terceira vantagem vem do fato de que todos os elementos da fonte atingem o detector simultaneamente. Essa característica possibilita a obtenção de dados para um espectro inteiro em um segundo ou menos. Vamos analisar a consequência desta última vantagem em detalhes mais à frente.

Para esta discussão, é conveniente pensar em um espectro derivado de um experimento como composto de  $m$  medidas individuais de transmitância, em frequências ou intervalos de comprimentos de onda igualmente espaçados, chamados elementos de resolução. A qualidade do espectro – isto é, a quantidade

de detalhes espectrais – aumenta conforme o número de elementos de resolução torna-se maior, ou conforme o intervalo de frequência entre medidas tornam-se menores(referência). Assim, para aumentar a qualidade espectral, m deve ser grande; evidentemente, aumentando-se o número de elementos de resolução, aumenta-se também o tempo necessário para a obtenção de um espectro com um instrumento de varredura.

Considere, por exemplo, a obtenção de um espectro de infravermelho de 500 a 5000  $\text{cm}^{-1}$ . Se fossem escolhidos elementos de resolução de 3  $\text{cm}^{-1}$ , seria 1500; se fosse necessário 0,5 s para medir a transmitância de cada elemento de cada elemento de resolução, seriam necessários 750 s ou 12,5 min para a obtenção do espectro. Reduzindo se a largura do elemento de resolução para 1,5  $\text{cm}^{-1}$ , espera-se obter detalhes espectrais significativamente maiores, isto também dobraria o número de elementos de resolução, assim como o tempo necessário para sua medida.

Para a maioria dos instrumentos ópticos, particularmente aqueles projetados para a região do infravermelho, a diminuição da largura do elemento de resolução tem o efeito indesejável de diminuir a relação sinal - ruído, pois fendas mais estreitas têm que ser usadas, o que leva a diminuição de intensidade dos sinais que atingem o transdutor. Para detectores de infravermelho, a redução na intensidade do sinal não é, entretanto, acompanhada por ruído do detector.

A espectroscopia com transformada de Fourier difere da espectroscopia convencional porque todos os elementos de resolução para um espectro são medidos simultaneamente, reduzindo de forma significativa o tempo necessário para a obtenção de um espectro, para qualquer relação sinal - ruído escolhida.

---

A vantagem multiplex é suficientemente importante para determinar que quase todos os espectrômetros de infravermelho sejam do tipo transformada de Fourier. Entretanto, os instrumentos com transformada de Fourier são menos comuns para as regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo, porque as limitações da relação sinal – ruído nas medidas espectrais com esses tipos de radiação raramente se deve ao ruído do detector, mas sim ao ruído shot ou flicker associados com a fonte de luz, onde as magnitudes dos ruídos da fonte aumentam de acordo com o aumento da potência do sinal. Na figura 3.5.3.1 segue uma tabela resumida tratando da frequência dos grupos orgânicos:

Tabela 3.5.3.1 – Freqüência Característica de Grupos Orgânicos (Skoog et al., 2002).

Ligação	Tipo de Composto	Intervalo de Freqüência, $\text{cm}^{-1}$	Intensidade
C–H	Alcanos	2.850 – 2.970	Forte
		1.340 – 1.470	Forte
C–H	Alcenos	3.010 – 3.095	Média
		675 – 995	Forte
C–H	Alcinos	3.300	Forte
	Anéis aromáticos	3.010 – 3.100	Média
		690 – 900	Forte
O–H	Álcoois e fenóis aromáticos	3.590 – 3.650	Variável
O–H	Álcoois e fenóis com Ligações de hidrogênio	3.200 – 3.600	Variável, às vezes alargada
O–H	Ácidos carboxílicos monoméricos	3.500 – 3.650	Média
N–H	Aminas, amidas	3.300 – 3.500	Média
C=C	Alcenos	1.610 – 1.680	Variável
C=C	Anéis aromáticos	1.500 – 1.600	Variável
C≡C	Alcinos	2.100 – 2.260	Variável
C–N	Aminas e amidas	1.180 – 1.360	Forte
C≡N	Nitrilas	2.210 – 2.280	Forte
C–O	Álcoois, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres	1.050 – 1.300	Forte
C=O	Aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres	1.690 – 1.760	Forte
NO <sub>2</sub>	Nitro compostos	1.500 – 1.570	Forte
		1.300 – 1.370	Forte

Os espectros foram feitos utilizando-se extratos, com solvente evaporado, de porta-enxertos doentes com morte súbita dos citros e sadias. A medida foi realizada em um suporte denominado ATR, sendo depositado um filme sobre o suporte. Os espectros foram interpretados com relação às bandas de absorção dos principais grupos funcionais, dando-se destaque para as diferenças obtidas entre os extratos. Será utilizado um equipamento Perkin-Elmer, Paragon 1000, pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária.

As medidas de espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier foram realizadas usando os seguintes parâmetros: espectros de absorbância com varredura de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , número de scans igual a 32, resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e intervalo de  $1\text{ cm}^{-1}$ .

### **3.5.4 Processamento e Análise de Imagens**

Processamento e análise de imagens têm sido utilizados como ferramentas centrais na óptica computacional (Kruz, Gibson, Cassens, & Zhang, 2000). O processamento de imagens envolve uma série de operações matemáticas de tal forma que possa melhorar a qualidade dos objetos para remover os defeitos, assim como distorções geométricas, focos impróprios, ruídos repetitivos, luminosidade não-uniforme e movimentação da câmera. A análise de imagem baseia-se no processo de distinção de objetos (regiões de interesse) através da produção quantitativa de informação. Este processamento de imagens/análises envolve uma série de etapas, o qual pode ser, de modo geral, dividida dentro de três planos: baixo – intermediário e alto nível de processamento (Gunasekaran & Ding, 1994; Sun, 2000).

O baixo nível de processamento inclui aquisição das imagens e pré-processamento. A aquisição de imagens é a transferência do sinal eletrônico para um sensor em forma numérica. Refiro-me ao pré-processamento das imagens como um processamento inicial de uma imagem com baixa resolução para correção de distorções geométricas, remoção dos ruídos, correção de nível acinzentado e correção de manchas (Shirai, 1987). O pré-processamento tem como objetivo aumentar a qualidade das imagens para suprimir distorções ou para aprimoramento das principais ferramentas de interesse. O cálculo dos filtros Gaussianos são frequentemente usados para redução de ruídos com estas operações promovendo

---

uma homogeneidade das imagens, mas apresentando alguns efeitos de manchas nas extremidades. Além disso, torna-se necessário o uso de diferentes filtros ajustados para uma câmera CCD de imagens nas regiões particulares do espectro para ser coletadas. Rigney, Brusewitz e Kranzler (1992) utilizaram filtros de interferência num intervalo de 400 – 620 nm para examinar os contrastes entre os tecidos dos frutos doentes e sadios de aspargo. Um sistema de câmera multi-espectral com seis bandas utiliza filtros para a inspeção da estrutura de aves domésticas, como foi utilizado no trabalho de Park & Chen, (1994).

O processamento de nível intermediário envolve a segmentação, representação e descrição das imagens. A segmentação das imagens é uma das etapas mais importantes na técnica de processamento completo das imagens, pois esta extração dos dados promove uma melhor precisão da operação. Este objeto principal é útil para dividir as imagens dentro de regiões que tem uma alta correlação com objetos ou áreas de interesse. A segmentação pode ser executada através de três diferentes técnicas: thresholding, segmentação por extremidades e segmentação por região (Sonka et al; Sun, 2000). Thresholding é uma simples e rápida técnica utilizada na caracterização das regiões das imagens baseada na reflectância constante ou na absorção de luz de superfícies.

A segmentação baseada nas extremidades é realizada pelos operadores de extremidades. Os operadores de extremidades detectam descontinuidades nos níveis acinzentados, cor, textura e etc. A segmentação das regiões envolve um agrupamento de pixels similares para formar regiões representando simples objetos através das imagens. O critério para a uniformidade de pixels pode ser baseado nos níveis acinzentados, cor e textura. As imagens segmentadas podem ser representadas por limites ou regiões. A representação por limites é adequada para



---

análises de tamanho e características de forma, enquanto a representação por regiões é usada na avaliação da textura e de defeitos das imagens. A descrição do número de imagens com respeito à extração de informação quantitativa se verifica através das regiões de imagens anteriormente segmentadas. Vários algoritmos são usados para este processo em relação à morfologia, textura e características fotométricas quantificadas que posteriormente identificam e classificam os objetos como apresentados.

O alto nível de processamento envolve a identificação e interpretação, tipicamente usados como classificadores estatísticos ou multicamadas de redes neurais das regiões de interesse. Estas etapas fornecem uma informação imperiosa para o processo/controlado de máquina para a classificação de ordem e de conceito.

A interação com uma base de dados conhecidos em todos os estágios do processo é essencial para tomada de decisão precisa e é vista como parte integrante do processamento de imagens. A operação efetiva da tomada de decisão inteligente é baseada no fornecimento de uma base completa do conhecimento, assim como uma visão de máquina é incorporada dentro de um computador. Tal como um algoritmo de uma rede neural, lógica obscura e “genes” de algoritmos são apenas mecanismos de construção de base de conhecimento dentro de estruturas computacionais.

Redes neurais e operações complicadas de lógica têm sido implementadas sucessivamente como uma visão computacional nas diversas áreas industriais (Ying, Jing, Tao, & Zhang, 2003), e em diversos ramos da ciência, como está sendo realizado nesta pesquisa.

As análises de processamento de imagens foram realizadas usando-se os seguintes parâmetros: comprimento de onda de 458 nm com potência de 0.228W e corrente de 30,5 e uma câmera CCD modelo DCR-TRV27.

## Capítulo 4

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Amostras

Neste estudo trabalhou-se com amostras de porta-enxertos e folhas *in natura* e na forma de extratos. Os materiais sintomáticos com morte súbita dos citros tinham origem do Sul do Estado de Minas Gerais e Norte do Estado de São Paulo; já as amostras sadias e com declínio dos citros provinham da região central do Estado de São Paulo. Plantas doentes com declínio dos citros foram escolhidas devido a semelhança com árvores que apresentam sintomas de morte súbita dos citros e para singularizar o método de detecção das plantas com morte súbita. As amostras *in natura* das folhas e da casca do porta-enxerto utilizadas neste trabalho não sofreram processamento físico-químico.

As amostras foram coletadas pelos técnicos do Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus. As plantas diagnosticadas como doentes com a morte súbita dos citros apresentavam um amarelecimento no porta-enxerto. Para o diagnóstico das amostras com declínio dos citros foram realizados testes onde se observava a obstrução dos vasos do xilema. As amostras sadias não apresentavam sintomas de qualquer doença de citros e foram retiradas de regiões sem a infestação da MSC. As amostras retiradas das plantas foram armazenadas em sistema de refrigeração à temperatura absoluta de 278 K.

Foram analisadas folhas e casca de porta-enxertos saudáveis e doentes de mesma idade e mesma combinação copa/cavalo, mais especificamente de árvores

---

de laranjeira Pêra-Rio e Valência enxertadas sobre limão 'cravo' [ *Citrus limonia* (L.) Osbeck].

## **4.2 Porta-Enxertos**

Utilizando porta-enxertos limão 'cravo' [*Citrus limonia* (L.) Osbeck] doentes e sadios foram realizadas medidas de espectroscopia de fluorescência e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, no qual as amostras estavam *in natura* e na forma de extrato. Os extratos também foram caracterizados utilizando-se espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.

### **4.2.1 Extratos dos Porta-Enxertos**

A extração utilizando amostra de porta-enxertos doentes e sadios foi realizada utilizando-se três solventes diferentes na seguinte ordem: hexano, metanol e água. Os produtos obtidos através desse método com diferentes solventes devem ser hidrocarbonetos alifáticos, tanto de cadeias curtas quanto de cadeias longas, triterpenos, ésteres, ácidos graxos e óleos, e compostos fenólicos, como flavonóides, antocianinas e coumarinas.

A metodologia baseou-se no método clássico de Soxhlet (1879) utilizada para extração de lipídeos (Aelson, 2004), o qual apresenta algumas vantagens como: a amostra está sempre em contato, e envolta por um cartucho, com o solvente, o qual necessita de renovação periódica do volume; a temperatura do sistema mantém-se alta com algumas variações, pois o processo de evaporação do solvente é contínuo (Luque de Castro & García-Ayuso, 1998).

#### **4.2.1.1. Processos de Extração**

##### **4.2.1.1.1. Extração com Hexano**

Através desta extração, deve-se retirar produtos como hidrocarbonetos alifáticos, tanto de cadeias curtas quanto de cadeias longas, triterpenos, ésteres, ácidos graxos e óleos.

Para esta extração usou-se, em média, 3,00 g de casca do porta-enxerto, com a retirada do tecido suberoso que reveste o porta-enxerto externamente, seca e moída serão colocadas em extrator Soxhlet, usando hexano como solvente. O material foi transferido para o cartucho de extração, com um pedaço de algodão desengordurado e levemente umedecido com hexano. A amostra foi coberta, no cartucho, com este pedaço de algodão. A extração foi realizada em período de 24 h em aparelho de soxhlet com hexano como solvente. Neste período foram observadas sucessivas sifonagens do solvente por hora na câmara de extração. A temperatura foi mantida constante no aparelho extrator, dentro da faixa de ebulição do hexano (68°C-70°C). Balões de 250 mL foram usados no aparato e o volume de solvente usado para cada extração foi de aproximadamente 200 mL. O material resultante da extração foi concentrado e a massa resultante foi considerada como lipídeos totais. O material insolúvel será usado na extração alcoólica.

##### **4.2.1.1.2. EXTRAÇÃO COM METANOL**

Este segundo processo de extração, deve-se obter compostos fenólicos, como flavonóides, antocianinas e coumarinas (Horowitz, 1961; Zaat et al., 1987). Estes compostos são sintetizados durante o desenvolvimento normal de tecidos da

planta (Dey & Harbone, 1997) ou em resposta a ação física, infecção ou qualquer outro tipo de estresse (nutricional, hídrico, poda, etc) (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). A massa resultante da extração com hexano após secagem, será colocada em extrator Soxhlet, usando etanol ou metanol como solvente. O material foi transferido para o cartucho de extração, com um pedaço de algodão desengordurado e levemente umedecido com metanol. A amostra foi coberta, no cartucho, com este pedaço de algodão. A extração foi realizada em período de 24 h em aparelho de soxhlet com metanol como solvente. Neste período foram observadas sucessivas sifonagens do solvente por hora na câmara de extração. A temperatura foi mantida constante no aparelho extrator, dentro da faixa de ebulição do metanol (64°C-65°C). Balões de 250 mL foram usados no aparato e o volume de solvente usado para cada extração foi de aproximadamente 200 mL. O material resultante foi concentrado e a massa resultante foi considerada como extrato alcoólico total. O material insolúvel foi usado na extração aquosa.

#### **4.2.1.1.3 EXTRAÇÃO COM ÁGUA**

A massa resultante da extração com álcool após secagem foi utilizada na extração com a água. O material foi transferido para o cartucho de extração, com um pedaço de algodão desengordurado e levemente umedecido com água. A amostra foi coberta, no cartucho, com este pedaço de algodão. A extração foi realizada em período de 8 h em aparelho de soxhlet com água como solvente. Neste período foram observadas sucessivas sifonagens do solvente por hora na câmara de extração. A temperatura foi mantida constante no aparelho extrator, dentro da faixa de ebulição do água (95°C-100°C). Balões de 250 mL foram usados no aparato e o

volume de solvente usado para cada extração foi de aproximadamente 200 mL. a extração dos compostos polares iniciada com metanol, tais como compostos fenólicos, como flavonóides, antocianinas e coumarinas (Horowitz, 1961; Zaat et al., 1987). Após 8 horas de extração, o soluto concentrado foi considerado como extrato aquoso total.

#### **4.2.2 Porta-Enxerto *in natura***

As medidas baseavam-se na retirada de uma lâmina interna do porta- enxerto de cada tipo de amostra para cada tratamento, em seguida era disposta e fixada em um suporte aço. Neste arranjo foram realizadas medidas de espectros de excitação e emissão de fluorescência.

### **4.3 Folhas**

Foram retiradas folhas de árvores sadias, com declínio dos citros e com morte súbita dos citros, de forma a tangenciar os quatro lados de uma planta. Em cada lado as amostras foram retiradas aleatoriamente de tal forma que fosse extraída a última folha da laranjeira de cada lado, com alturas similares, e de plantas com porte semelhantes.

Foram realizadas medidas dos extratos das folhas e com as folhas *in natura*.

#### **4.3.1 Extração e Separação de Pigmentos Fotossintéticos de Folhas**

Neste processo de extração utilizou-se o procedimento descrito por Arnon (1949). Neste procedimento pesou-se 5,0 g de folhas, eliminando-se a nervura central, as quais foram colocadas em um becker contendo 50 mL de acetona 80%

(v/v) por um período de 12 horas no escuro com 0,5 g de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). O carbonato de sódio é utilizado com a finalidade de diminuir alterações provocadas nas clorofilas **a** e **b**. O material obtido foi diluído em balão volumétrico de 50 mL na proporção de 1 mL de material para 50 mL de acetona com o propósito de realização de medidas espectroscópicas de absorção de luz na região ultravioleta-visível, fluorescência ., .

## **4.4 Técnicas Espectroscópicas**

### **4.4.1 A Espectroscopia de absorção Ultravioleta-Visível**

A espectroscopia na região do Ultravioleta (200 – 400 nm) e Visível (400 – 800 nm) permite a identificação de transições de elétrons dos orbitais  $\sigma$ -, $\pi$ -,  $\eta$ - de seu estado energético fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado.

Foram realizadas medidas, nos porta-enxertos, de absorção de luz na região ultravioleta-visível para dos diferentes extratos com intervalo espectral de 340 nm a 800 nm para o extrato com hexano, medidas com extrato metanólico com intervalo de 350 nm a 800 nm, e medidas com extrato aquoso com intervalo espectral de 220 nm a 800 nm. A análise foliar foi realizada usando o intervalo espectral de 350 nm a 800 nm.

As análises de espectroscopia no UV-Vis foram realizadas através de um equipamento Shimadzu modelo UV-1601 PC pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária com os seguintes parâmetros: velocidade de escaneamento média e intervalo espectral variável para os três extratos.



#### 4.4.2 Espectroscopia de fluorescência

O fluorímetro utilizado tanto nas medidas com folhas, quanto nas medidas com porta-enxertos apresenta o esquema da figura 4.4.2.1:

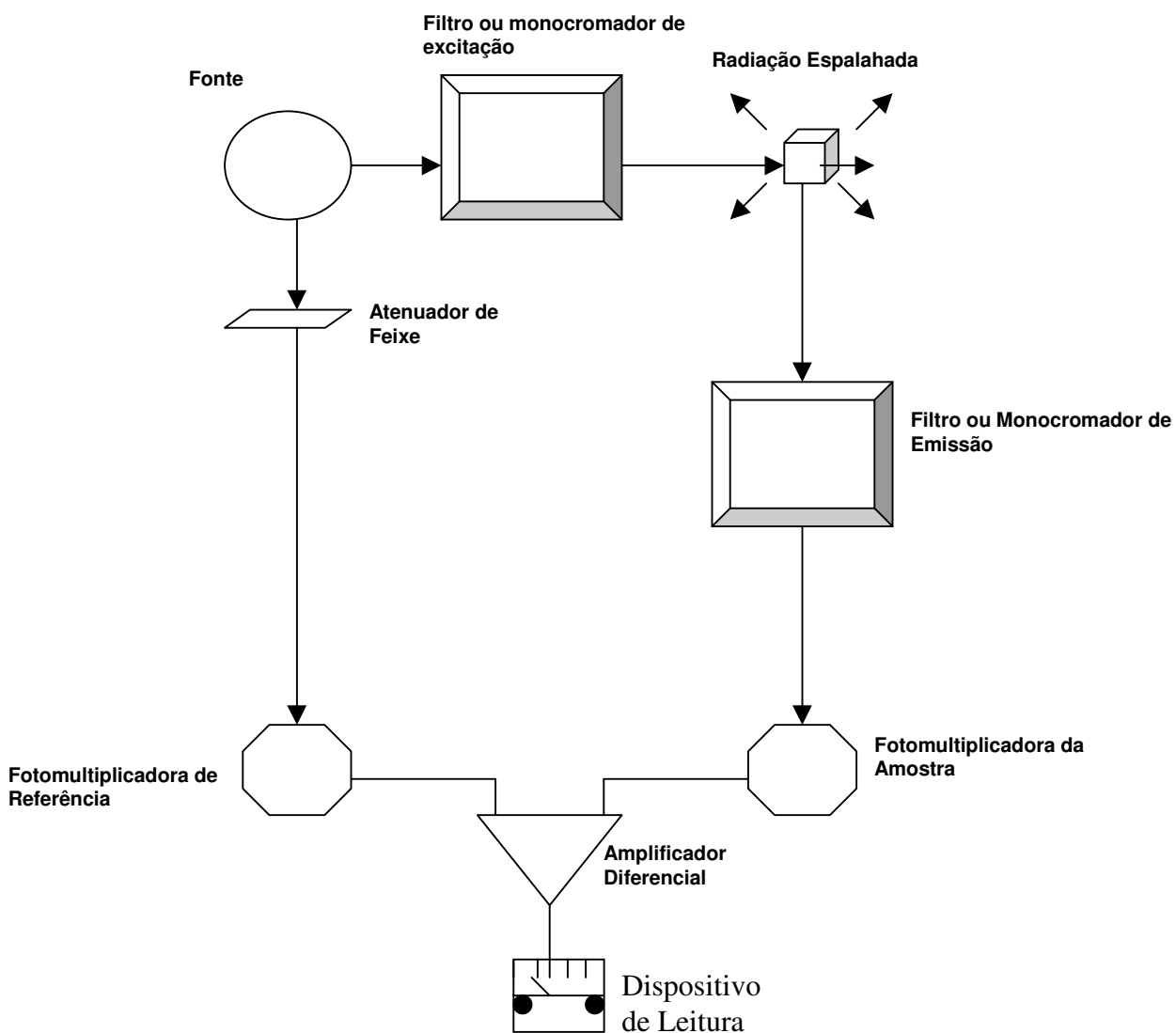


Figura 4.4.2.1 – Diagrama básico de composição de um espectrofluorímetro .

---

Neste tipo de espectrômetro a luz originada em uma fonte de xenônio / deutério é difratada através de um monocromador (excitação) de tal forma que se possa selecionar o comprimento de onda de excitação. Após atingir a amostra, a fluorescência é coletada através de um sistema óptico e enviada para outro monocromador (emissão). A excitação é filtrada para não interferir no sinal da fluorescência. Para amostras transparentes, como em geral ocorre com as soluções, a coleta do sinal é feita a 90°. Entretanto para amostras opacas, como é o caso das folhas *in natura*, optou-se em coletar o sinal a 45°.

Após passar pelo monocromador de excitação a luz é detectada por um fotodetector, usualmente uma fotomultiplicadora. Os sinais da referência e da amostra são enviados a um amplificador e posteriormente a um sistema de coleta de dados que controla também a varredura dos monocromadores . Na figura 4.4.2.2 verifica-se uma imagem demonstrativa do uso do suporte na realização das medidas espectroscópicas:

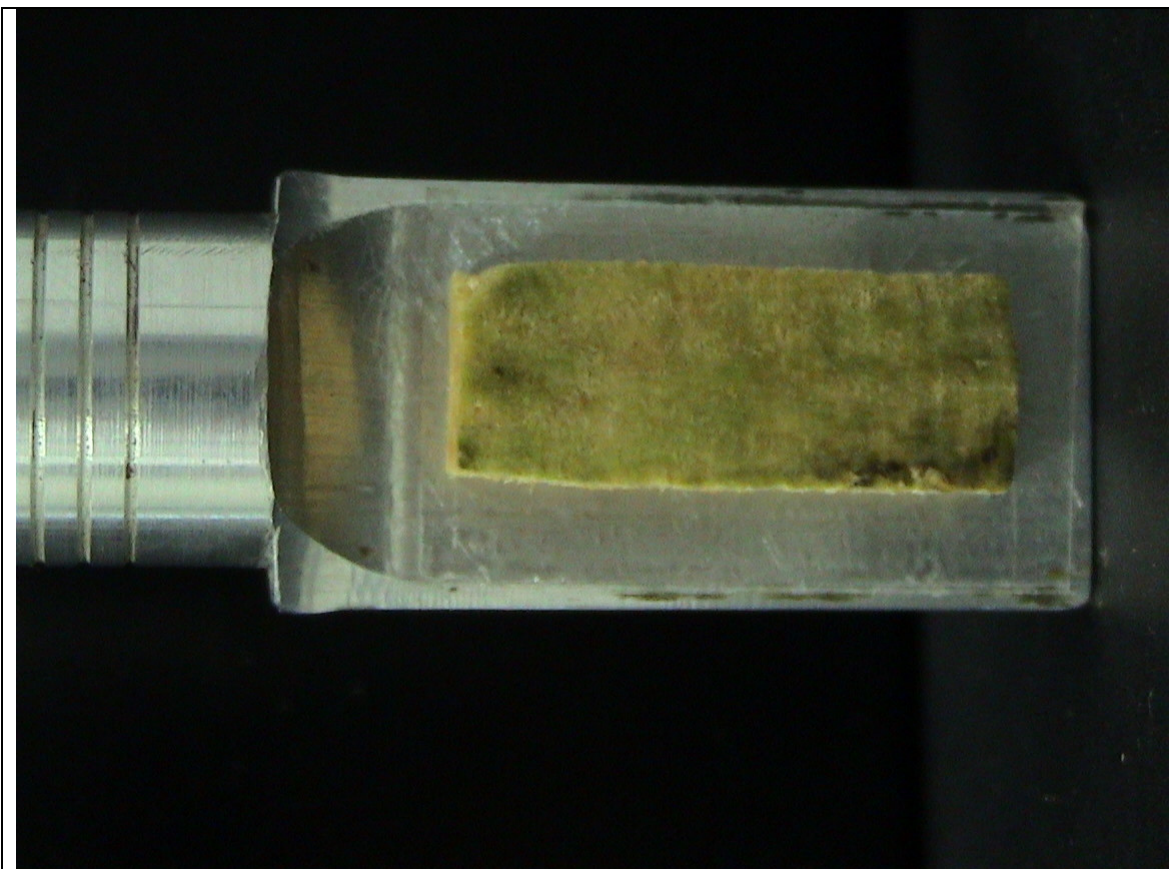


Figura 4.4.2.2 – Imagem de porta-enxerto *in natura* utilizada nas medidas espectroscópicas no equipamento de fluorescência modelo RF- 5301 PC.

Neste sistema é possível a realização de espectros de emissão, excitação e varredura sincronizada.

#### 4.4.2.1 Espectroscopia de Fluorescência dos Extratos

Na espectroscopia de fluorescência, foram realizados espectros de emissão com excitação em 275 nm, 320 nm, 576 nm e 662 nm usando os seguintes parâmetros para estes dois tipos de amostras: fenda de entrada de 5 nm e fenda de saída de 5 nm, velocidade de escaneamento média, intervalo de leitura de 0,2 nm e alta sensibilidade.

#### **4.4.2.2 Espectroscopia de Fluorescência de Porta-Enxertos *in natura***

Na espectroscopia de fluorescência, foram realizados espectros de excitação com emissão em 629 nm, e espectros de emissão com excitação em 576 nm usando os seguintes parâmetros para estes dois tipos de amostras: fenda de entrada de 5 nm e fenda de saída de 5 nm, velocidade de escaneamento média, intervalo de leitura de 0,2 nm e alta sensibilidade.

#### **4.4.2.3 Espectroscopia de Fluorescência de Folhas *in natura***

Na espectroscopia de fluorescência, foram realizados espectros de emissão com excitação em 576 nm usando os seguintes parâmetros para estes dois tipos de amostras: fenda de entrada de 5 nm e fenda de saída de 5 nm, velocidade de escaneamento média, intervalo de leitura de 0,2 nm e alta sensibilidade.

#### **4.4.3 A Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier**

Os espectros foram feitos utilizando-se extratos com solvente evaporado de porta-enxertos doentes com morte súbita dos citros e sadias. A medida foi realizada em um suporte denominado ATR, sendo depositado um filme sobre o suporte. Os espectros foram interpretados com relação as bandas de absorção dos principais grupos funcionais, dando-se destaque para as diferenças obtidas entre os extratos. Será utilizado um equipamento Perkin-Elmer, Paragon 1000, pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária.

As medidas de espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier foram realizadas usando os seguintes parâmetros: espectros de absorbância com

---

varredura de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , número de scans igual a 32, resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e intervalo de  $1\text{ cm}^{-1}$ .

#### **4.5 Imagens de Fluorescência**

Para este experimento foi montado um sistema de imagens de fluorescência conforme mostrado na figura 4.5.1.

Um laser de argônio sintonizado em 458 nm excita as folhas que emitem uma fluorescência característica. As imagens foram coletadas através de uma câmera CCD modelo DCR-TRV27. Para eliminar a excitação utilizou-se um filtro óptico da Melles Griot .

As folhas foram fotografadas na presença e ausência do laser. Num total de 276 imagens de folhas, 95 folhas eram sadias, 90 folhas foram diagnosticadas visualmente com morte súbita dos citros e 91 folhas com declínio dos citros. Em seguida, fez-se um tratamento destas imagens usando dois softwares, respectivamente, Image Pro-Plus 4.0 pertencente a Embrapa Instrumentação Agropecuária que auxiliou no realce da fluorescência e na diferenciação entre as folhas doentes utilizando os mesmos parâmetros como mostra a figura 4.5.1:

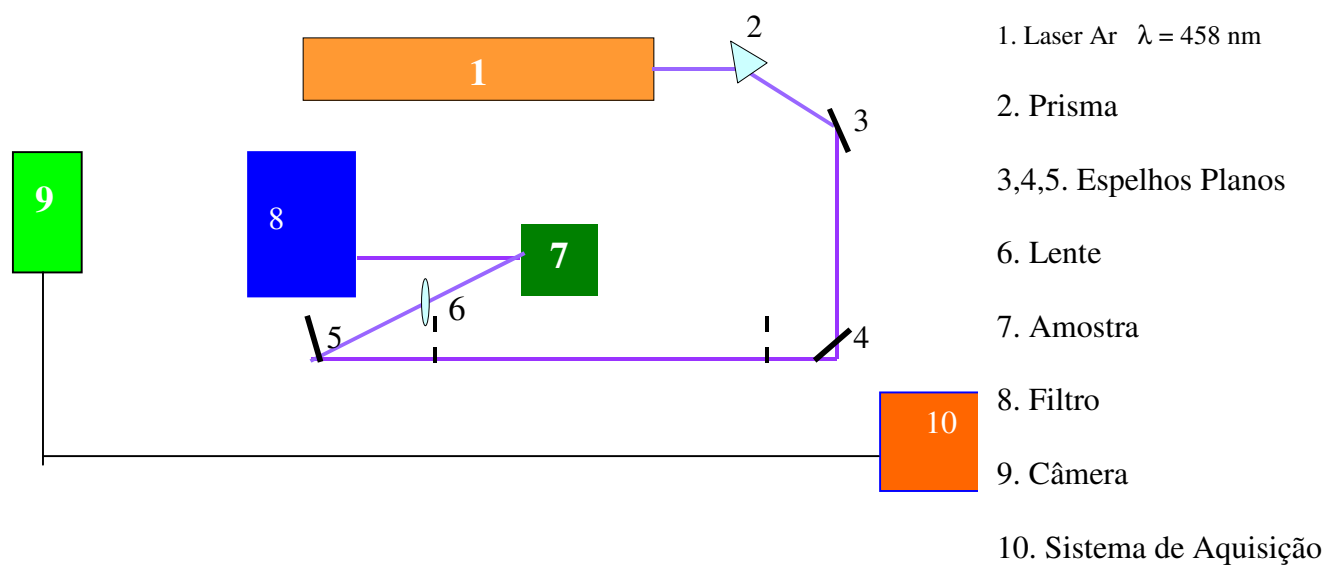


Figura 4.5.1 Esquema de um Sistema de Montagem de Aquisição de Imagens

## Capítulo 5

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 5.1 Folhas

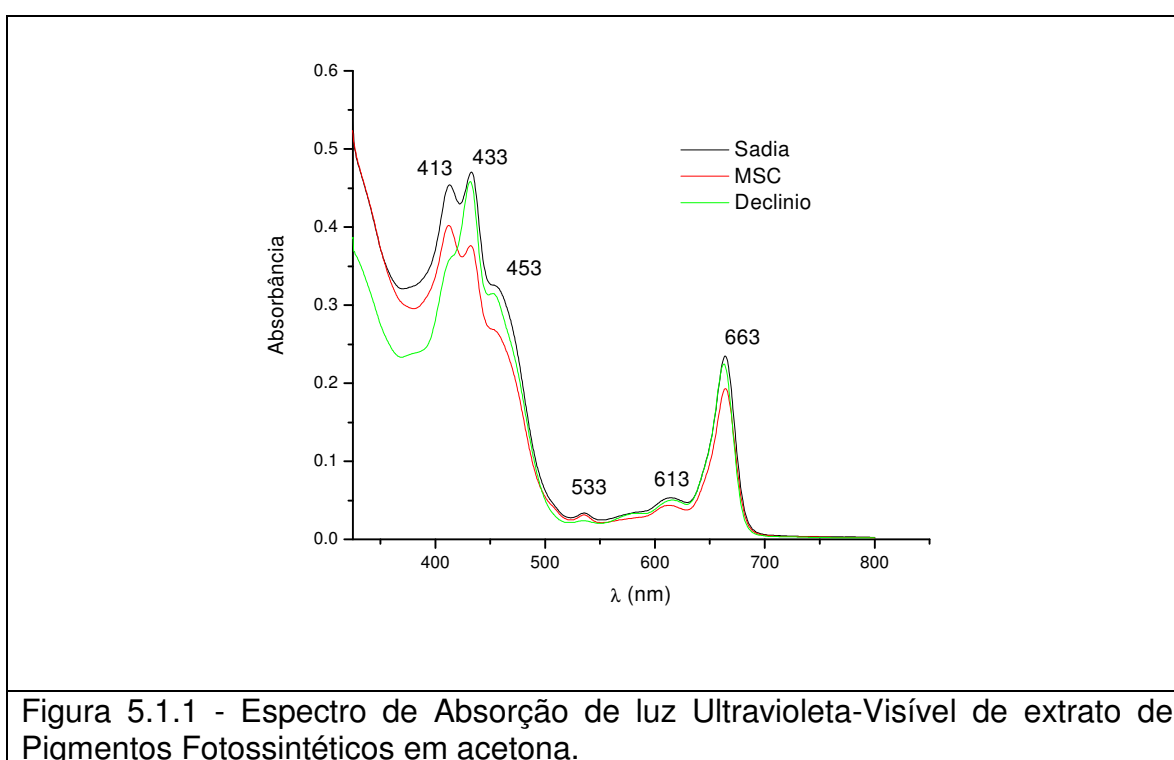
##### 5.1.1 – Extração dos Pigmentos Fotossintéticos

Existem diversos métodos e equações para a determinação do teor total de clorofilas como de Porra et al. (1989) usando metanol como solvente, o qual varia em função da concentração de acetona usada para a extração. A grande maioria deriva do método clássico para a estimativa das clorofilas **a** e **b**, desenvolvido por Arnon (1949).

Segundo Kramer & Koslowiski (1979) as clorofilas são periodicamente sintetizadas e destruídas na presença de luz. Esse efeito se acentua quanto maior a intensidade de luz incidente sob a folha. Inoue (1977) realizou um experimento utilizando espécies de *Cedrela fissilis* e *Cedrela odorata*, o qual obteve um conteúdo três vezes maior de clorofilas em plantas de sombra em relação a plantas sob luz.

A extração de pigmentos fotossintéticos usando acetona foi realizada porque representa um método rápido, porém pouco preciso na separação dos pigmentos fotossintéticos. A separação e purificação entre os pigmentos clorofilados é mais adequada através da cromatografia líquida de alta eficiência como propõe Barroso (1988). Esse procedimento foi realizado com o objetivo de entender o comportamento espectral dos pigmentos fotossintéticos isolados do material da folha em relação a uma radiação com frequência na região do ultravioleta-visível. Neste estudo foram analisadas possíveis alterações químicas em plantas sintomáticas com

morte súbita dos citros e com declínio dos citros em relação a plantas saudias, quanto à concentração e teor de clorofilas e carotenóides através dos métodos propostos por Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987). O extrato obtido foi analisado através das técnicas de espectroscopia de absorção de luz uv-visível e espectroscopia de fluorescência. Na figura 5.1.1 é mostrado o espectro típico de absorção dos pigmentos para folhas saudáveis, com Declínio e com MSC.



Nestes espectros podem-se observar regiões de absorção características da clorofila **a** em 663 nm, clorofila **b**, em 433 nm e carotenos, em 453 nm, e 533 nm baseados nos quais foram feitas às análises de concentração dos pigmentos.

Para a determinação da concentração de clorofilas **a**, **b** e total, Arnon sugere o uso das relações seguintes:

$$\text{Clorofila } \mathbf{a} \text{ (g.L}^{-1}\text{)} = 0,0127 \cdot A_{663} - 0,00269 \cdot A_{645} \quad (5.2)$$

$$\text{Clorofila } \mathbf{b} \text{ (g.L}^{-1}\text{)} = 0,0229 \cdot A_{645} - 0,00468 \cdot A_{663} \quad (5.3)$$



$$\text{Clorofila Total (g.L}^{-1}\text{)} = 0,0202 \cdot A_{645} + 0,00802 \cdot A_{643} \quad (5.4)$$

Baseados nesse método foram obtidos os seguintes resultados apresentados na tabela 5.1.1:

Tabela 5.1.1 – Cálculo das Concentrações das clorofilas **a**, **b** e total utilizando metodologia proposta por Arnon (1949):

Tipos de Clorofilas	Sadias (g.L <sup>-1</sup> )	Declínio (g.L <sup>-1</sup> )	MSC (g.L <sup>-1</sup> )
Clorofila <b>a</b>	2,73.10 <sup>-3</sup>	2,60.10 <sup>-3</sup>	2,23.10 <sup>-3</sup>
Clorofila <b>b</b>	1,04.10 <sup>-3</sup>	1,07.10 <sup>-3</sup>	8,35.10 <sup>-4</sup>
Clorofila total	3,77.10 <sup>-3</sup>	3,67.10 <sup>-3</sup>	3,07.10 <sup>-3</sup>
Clor <b>a</b> / Clor <b>b</b>	2,62	2,43	2,67

A análise sistemática da tabela 5.1.1 demonstra uma diminuição na concentração de clorofila **a** das folhas doentes com Declínio e com Morte Súbita em relação ao extrato das amostras sadias. O cálculo da média desse extrato não demonstrou diferenças significativas. Já em relação à clorofila **b**, observa-se um pequeno aumento da concentração no extrato foliar com Declínio em relação às folhas sadias e uma diminuição na concentração desse pigmento na amostra com MSC em relação à sadia. Sistemáticamente, esse resultado demonstra que o pigmento mais afetado pela presença de um patógeno é a clorofila **a**, com porcentagem de diminuição de 4,8% na concentração do extrato com declínio em relação ao sadio e 18, 3% de concentração de clorofila **a** inferior na folha com morte súbita em relação à sadia confirmando o resultado demonstrado na figura 5.1.1, o qual indica uma redução de clorofila **a** nos extratos de folhas doentes em relação aos extratos de folhas de folhas sadias.

Para a determinação do teor de clorofilas **a**, **b** e total e carotenóides, Lichtenthaler sugere o uso das relações seguintes:

$$\text{Clorofila } \mathbf{a} \text{ (C}_a\text{)} = 12,25 \cdot A_{663} - 2,79 \cdot A_{646} \quad (5.5)$$

$$\text{Clorofila } \mathbf{b} \text{ (C}_b\text{)} = 21,50 \cdot A_{646} - 5,10 \cdot A_{663} \quad (5.6)$$

$$\text{Clorofila Total (C}_t\text{)} = 7,15 \cdot A_{663} + 18,71 \cdot A_{646} \quad (5.7)$$

$$\text{Carotenóides (C)} = [1000 \cdot A_{470} - (1,82 \cdot C_a + 85,02 \cdot C_b)]/198 \quad (5.8)$$

Baseado nesse método obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 5.1.2:

Tabela 5.1.2 – Cálculo da Determinação do Teor de clorofilas e Carotenóides (Lichtenthaler, 1987):

Pigmentos	Sadias (mg/mL)	Declínio (mg/mL)	MSC (mg/mL)
Clorofila <b>a</b> (C <sub>a</sub> )	2,59	2,48	2,13
Clorofila <b>b</b> (C <sub>b</sub> )	0,914	0,95	0,74
Clorofila Total (C <sub>t</sub> )	3,50	3,43	2,87
Clor <b>a</b> / Clor <b>b</b>	2,83	2,61	2,88
Carotenóides ( C )	0,955	0,703	0,767

A análise detalhada da tabela 5.1.2 demonstra um comportamento semelhante ao método de Arnon, com diminuição na concentração de clorofila **a** das folhas doentes com Declínio e com Morte Súbita em relação ao extrato das amostras sadias. O cálculo da média desse extrato não demonstrou diferenças significativas. Já em relação à clorofila **b**, observa-se um pequeno aumento na concentração no extrato foliar com Declínio em relação às folhas sadias e uma diminuição na concentração desse pigmento na amostra com MSC em relação à sadia. O detalhe desse resultado indica que o pigmento mais afetado pela presença de um patógeno

é a clorofila **a**, com porcentagem de diminuição de 4,2% na concentração do extrato com declínio em relação ao da folha sadia e 17,8% de concentração de clorofila **a** inferior na folha com morte súbita em relação à sadia ratificando o resultado demonstrado na figura 5.1.1, o qual indica uma redução de clorofila **a** nos extratos de folhas doentes em relação aos extratos de folhas de folhas sadias.

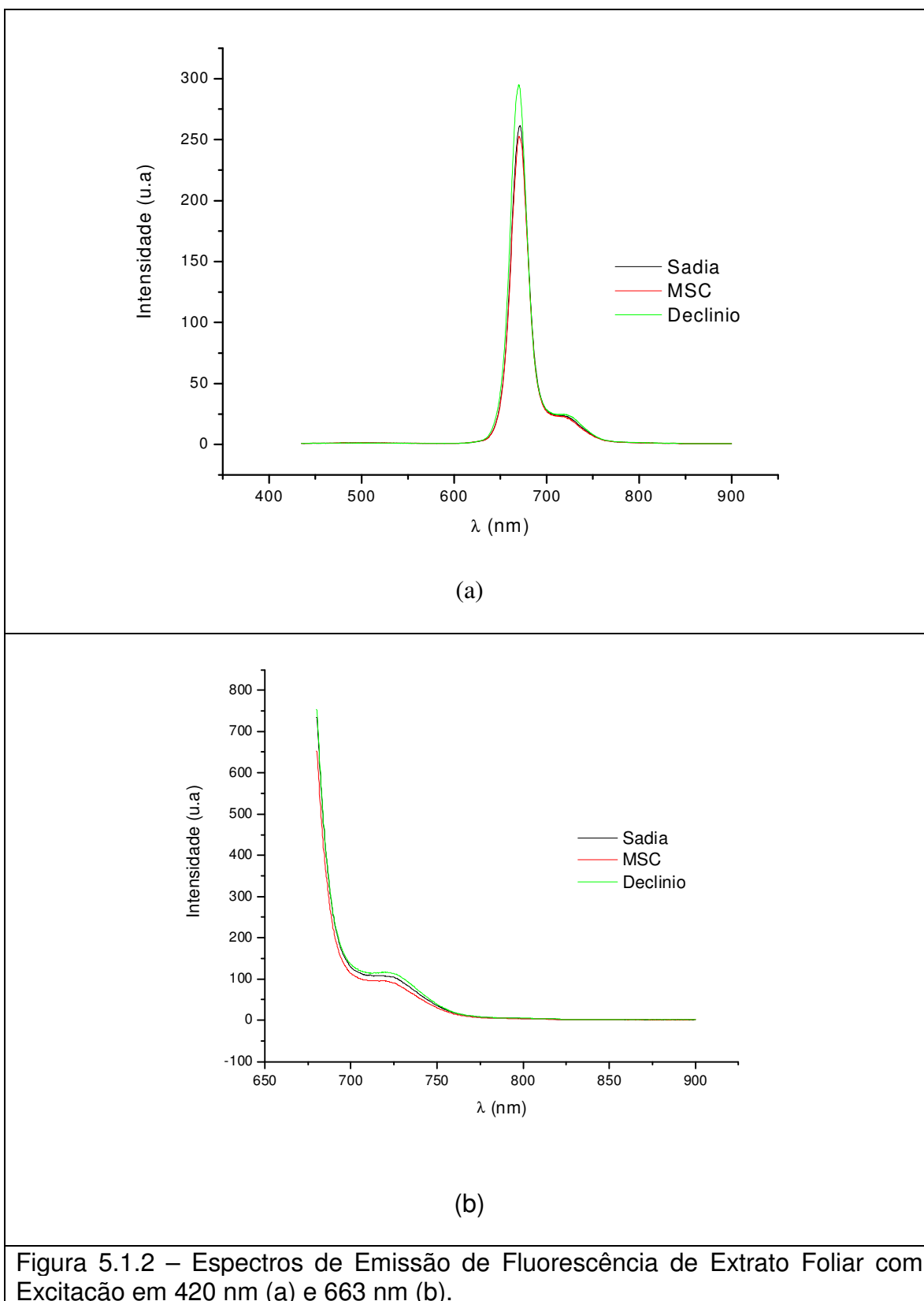
Quanto aos pigmentos acessórios denominados carotenóides, observaram-se uma diminuição no teor nas amostras com declínio dos citros e com morte súbita dos citros em relação à planta sadia. Hendry & Price (1993) citam que os carotenóides podem prevenir a foto-oxidação das clorofilas, e a relação entre as clorofilas e os carotenóides pode ser usada como um indicador potencial de perdas foto-oxidativas causadas por irradiações. A maior diminuição no extrato foliar com declínio deve estar relacionada ao fato de a planta com esse tipo de doença, apresentar-se em estágio avançado de definhamento. Sharma e Hall (1991) sugerem que o stress salino induz a degradação de  $\beta$ -caroteno e a redução na formação de zeaxantina, produzindo diminuição na concentração de carotenóides.

Com o objetivo de entender o comportamento espectral dos extratos foliares em análise quando submetidos à excitação nas regiões de máxima absorção de clorofila **a** (420 nm e 663 nm) e clorofila **b** (435 nm e 645 nm) foram realizados espectros de emissão de fluorescência com regiões de excitação acima mencionadas. Schreider e Bilger, (1987), destacam a fluorescência das clorofilas como medida capaz de demonstrar o estado fisiológico dos tecidos verdes (Maxwell e Johnson, 2000) tanto em folhas verdes quanto para verificação do conteúdo clorofilático das frutas (DeEll e Toivonen, 2000). Precursores e derivados das clorofilas podem ser usados na medicina para terapias fotodinâmicas (Britton, 1995; Schoefs, 2002). Além disso, fez-se necessário a excitação em 458 nm, linha do laser

---

de Argônio (figura 4.1.4) em que foi possível a diferenciação da fluorescência das folhas saudas e doentes com declínio e com morte súbita. Outro comprimento de onda de excitação foi em 576 nm o qual se tornou referência na detecção da morte súbita dos citros em porta-enxertos e folhas na forma *in natura*. Esta excitação se tornou referência por diferenciar o comportamento espectral das folhas com morte súbita dos citros em relação a folhas saudas e com declínio dos citros e por representar um método não-invasivo para a planta.

O comportamento espectral das amostras saudas, com declínio e com morte súbita usando espectroscopia de emissão de fluorescência de folhas com excitação em 420 nm e 663 nm na região de absorção de clorofila **a** segue na figura 5.1.2:

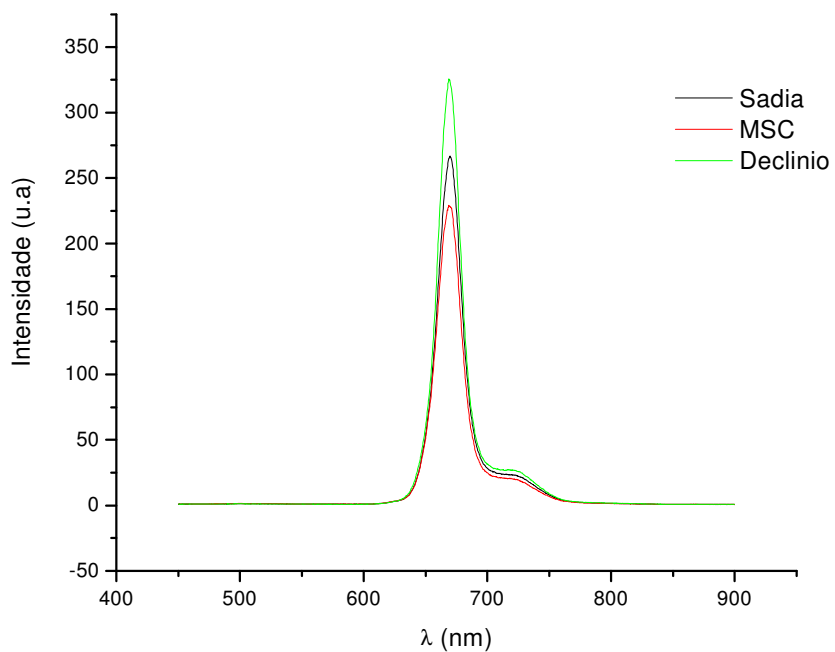


O gráfico (a) da figura 5.1.2 demonstra uma emissão de fluorescência em 669 nm e 726 nm para os três tipos de amostras com semelhanças quanto à intensidade

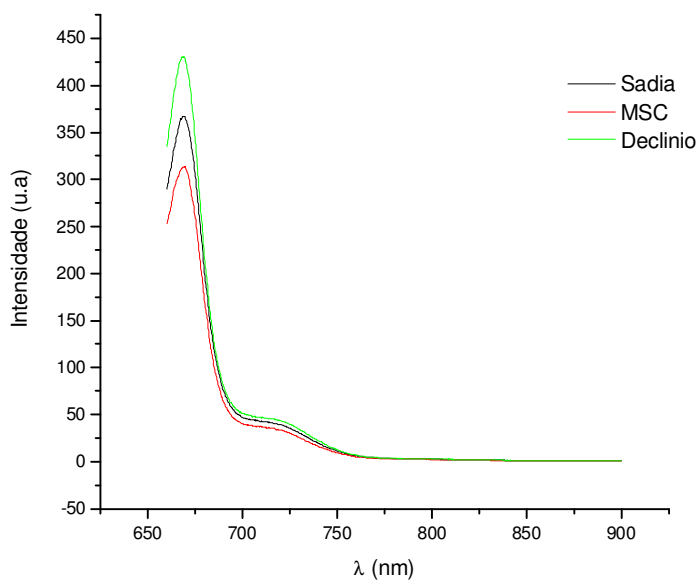
---

de emissão de fluorescência em 669 nm entre as amostras sadias e com morte súbita dos citros, e diferença na intensidade de emissão de fluorescência entre esses tipos de amostras. Esse resultado não corresponde ao observado no cálculo da concentração e do teor de clorofila **a** usando os métodos de Arnon (1949) e de Lichtenthaler (1987), pois se verifica a maior diferença entre as amostras sadias e com morte súbita em relação aos extratos de folhas sadias e com declínio dos citros. Em relação ao gráfico 2 da mesma figura (5.1.2), que se refere ao espectro de emissão de fluorescência com excitação em 663 nm observa-se a dois picos em 680 nm, de alta intensidade, e em 726 nm com intensidade semelhante entre as amostras analisadas. Falkowski & Kolber (1995) sugerem que a fluorescência da clorofila **a**, em baixíssima concentração de pigmentos fotossintéticos na água do mar, indica uma medida padrão para estimar a biomassa dos oceanos.

Quanto ao comportamento espectral das amostras sadias, com declínio e com morte súbita usando espectroscopia de emissão de fluorescência de folhas com excitação em 435 nm e 645 nm na região de absorção de clorofila **b** segue na figura 5.1.3 :



(a)



(b)

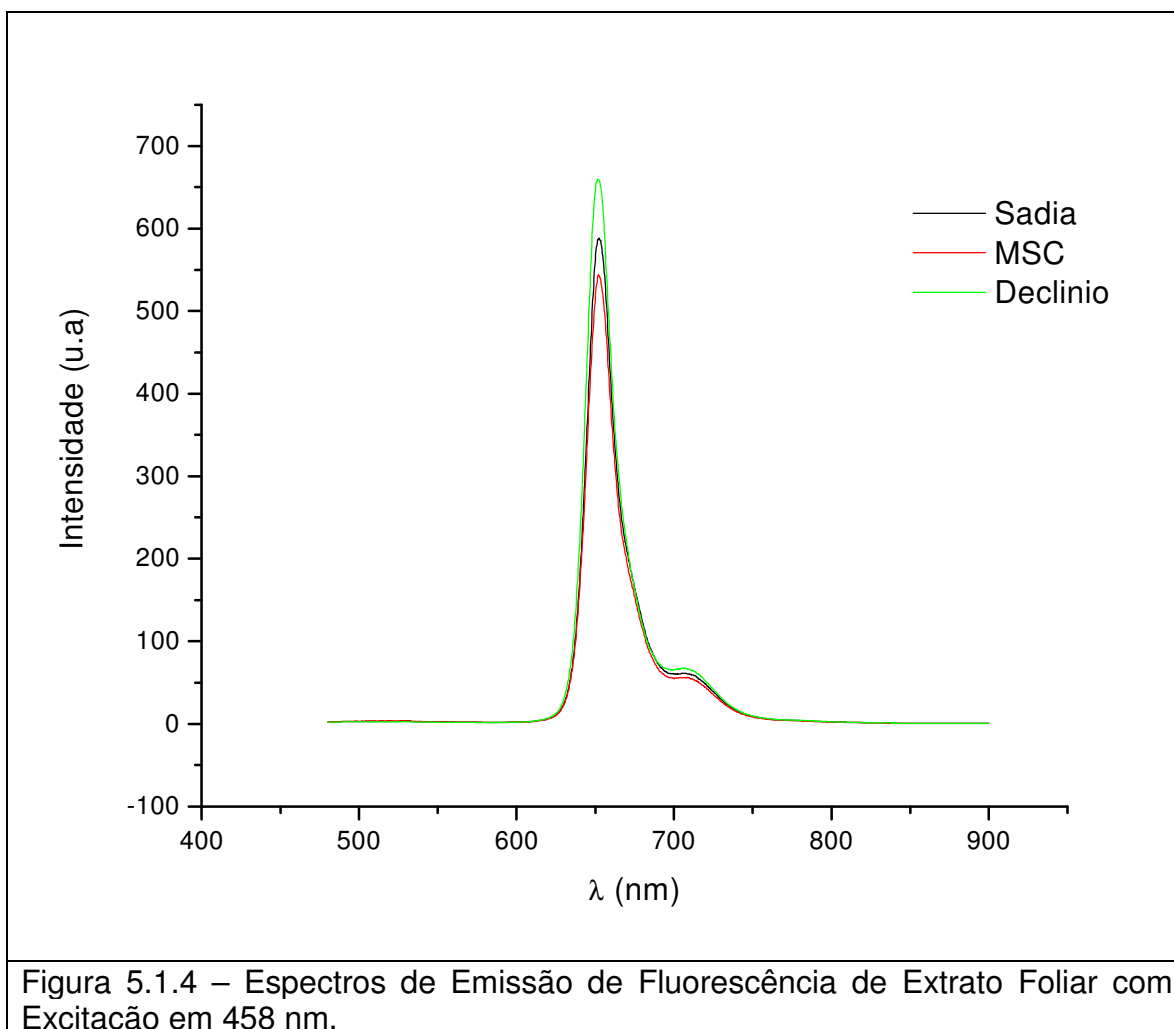
Figura 5.1.3 – Espectros de Emissão de Fluorescência de Extrato Foliar com Excitação em 435 nm (a) e 645 nm (b).

O gráfico (a) da figura 5.1.3 que se refere ao espectro de emissão de fluorescência de extrato foliar com excitação em 435 nm demonstra uma emissão de fluorescência para os três tipos de amostras em 669 nm e 726 nm com pequenas diferenças, quanto à intensidade, de emissão de fluorescência em 669 nm entre as amostras com declínio dos citros, as sadias e com morte súbita dos citros corroborando os cálculos da concentração de clorofila **b** pelos métodos de Arnon e Lichtenthaler serem decrescentes em relação às amostras com declínio, sadias e com morte súbita como se verifica no comportamento do gráfico da figura 5.1.3.(a). Já a emissão da banda em 726 nm demonstra um comportamento semelhante, em intensidade, para as amostras estudadas neste trabalho. Em relação ao gráfico (b) da mesma figura, que se refere ao espectro de emissão de fluorescência com excitação em 645 nm observa-se a emissão em dois picos em 680 nm com as mesmas diferenças citadas anteriormente na banda em 669 nm, de alta intensidade, e em 726 nm com intensidade semelhante entre as amostras analisadas.

Valentini et al., (1993) através de um estudo enfocando a determinação do stress por meio da fluorescência de clorofilas **a** e **b** utilizaram a razão de determinadas bandas espectrais para identificar stress natural (falta de água, deficiência de nutrientes e doenças).

Quanto ao comportamento espectral das amostras sadias, com declínio e com morte súbita usando espectroscopia de emissão de fluorescência de folhas com excitação em 458 nm que corresponde à linha do laser utilizada nas medidas de caracterização, através do uso de imagem, de fluorescência das folhas sadias, com declínio dos citros e com morte súbita dos citros, como é demonstrado na figura 5.1.4 :

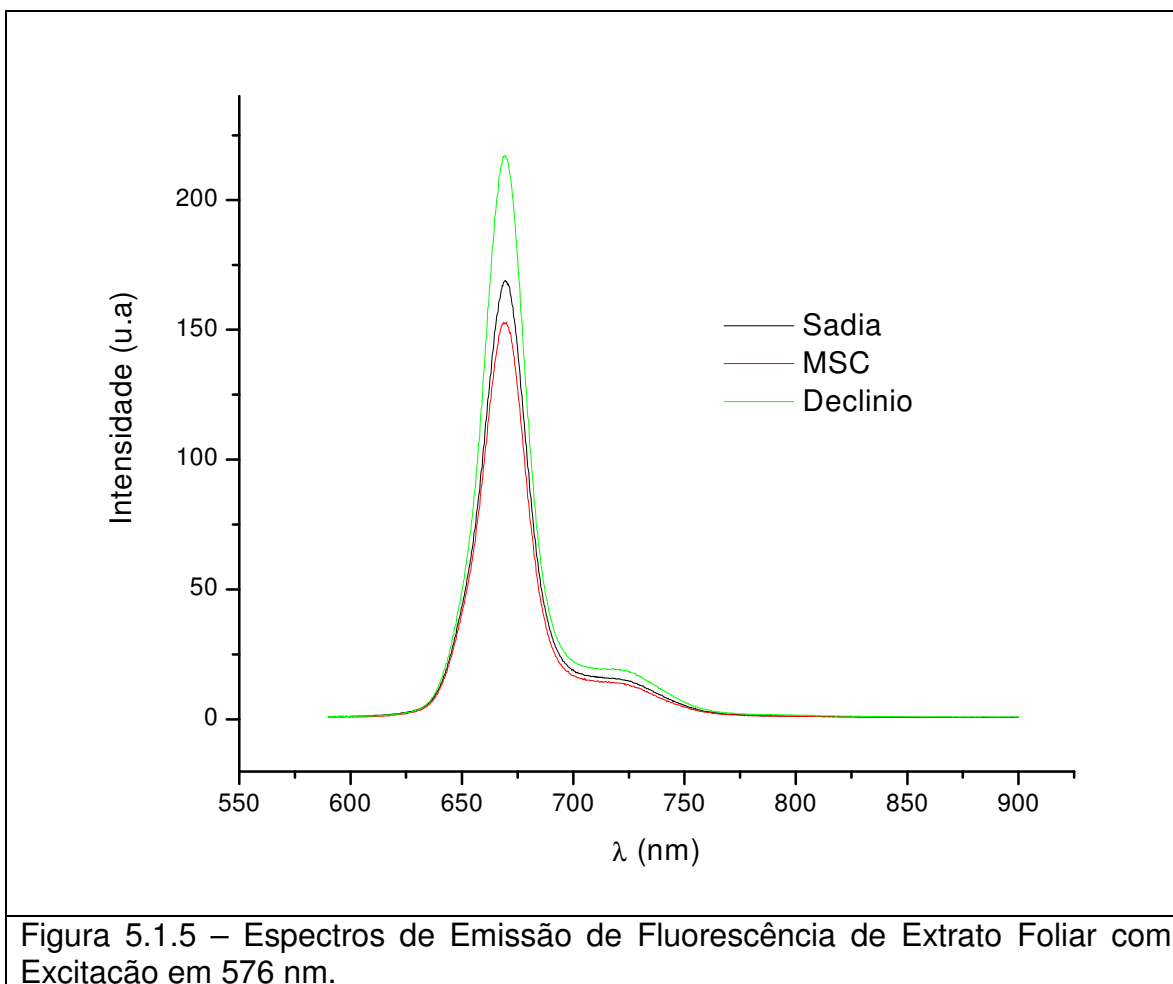




O resultado da figura 5.1.4 que se refere ao espectro de emissão de fluorescência de extrato foliar com excitação em 458 nm demonstra uma emissão de fluorescência para os três tipos de amostras em 669 nm e 726 nm com pequenas diferenças quanto à intensidade de emissão de fluorescência em 669 nm entre as amostras com declínio dos citros, as sadias e com morte súbita dos citros. Já a emissão da banda em 726 nm demonstra um comportamento semelhante, em

intensidade, para as amostras analisadas. O comportamento desse gráfico é muito semelhante ao apresentado no gráfico da figura 5.1.3 (a) que se refere à clorofila **b**.

Como foi extraído um índice para caracterização de amostras com MSC, com folhas e porta-enxerto na forma *in natura*, através do espectro de emissão de fluorescência com excitação em 576 nm fez-se necessário a realização desse mesmo tipo de espectro para compreensão nesse comprimento de onda usando extratos foliares com sadias, com declínio e com morte súbita como segue na figura 5.1.5:



O comportamento espectral da figura 5.1.5 que se refere ao espectro de emissão de fluorescência de extrato foliar com excitação em 576 nm demonstra uma emissão de fluorescência para os três tipos de amostras em 669 nm e 726 nm com

---

pequenas diferenças quanto à intensidade, de emissão de fluorescência em 669 nm entre as amostras com declínio dos citros, as sadias e com morte súbita dos citros. A emissão de fluorescência com a banda em 726 nm, demonstra um comportamento semelhante, em intensidade, para as amostras analisadas. O comportamento desse gráfico é muito semelhante ao apresentado no gráfico da figura 5.1.3 (a), o qual se refere à clorofila **b**.

## **5.2 Porta-Enxertos**

### **5.2.1 *IN NATURA***

Através de um estudo criterioso que buscava convergir para a eventual descoberta de uma região do espectro visível em que fosse possível a diferenciação de porta-enxertos doentes, e de porta-enxertos doentes e saudáveis, concluiu-se que através da realização de um espectro de excitação com emissão de fluorescência em 629 nm fosse possível esta diferenciação das amostras em estudo. Isto se deve a existência de uma banda característica dos porta-enxertos com morte súbita dos citros na região do amarelo, inexistentes nas amostras sadias e com declínio. Desta forma, a análise de porta-enxertos *in natura* compreende medidas de espectros de excitação com emissão de fluorescência em 629 nm para observar o comportamento das amostras, que se verifica na figura 5.2.1.1, e espectros de emissão com excitação em 576 nm como demonstra a figura 5.2.1.2.

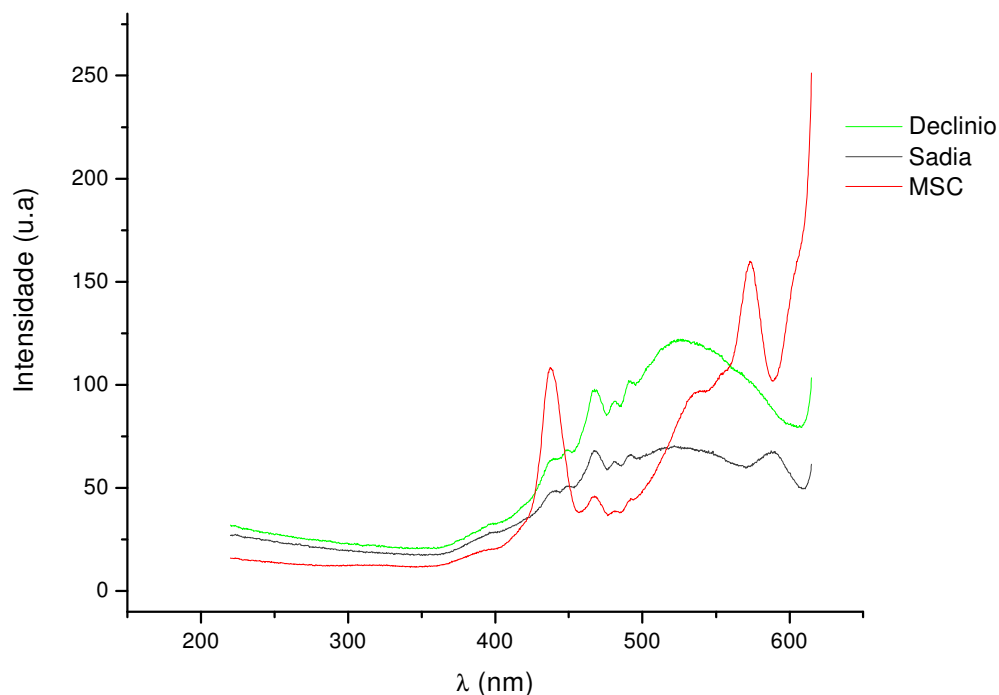


Figura 5.2.1.1 – Espectros de Excitação com Emissão da Fluorescência em 629 nm de porta-enxertos com morte súbita dos citros, com declínio dos citros e saudáveis.

Este espectro de excitação com emissão de fluorescência em 629 nm demonstra um comportamento semelhante entre as amostras com declínio dos citros e sadias, diferente das plantas com morte súbita dos citros. Porém, existem dois picos em comum entre as amostras, o qual foi utilizado para determinação deste terceiro índice. Este terceiro índice foi encontrado realizando-se a razão da intensidade de fluorescência em 466 nm por 438 nm. Do montante de 48 amostras, conseguimos definir esse índice com uma precisão de 96 % dos casos como mostra a figura 5.2.1.2.

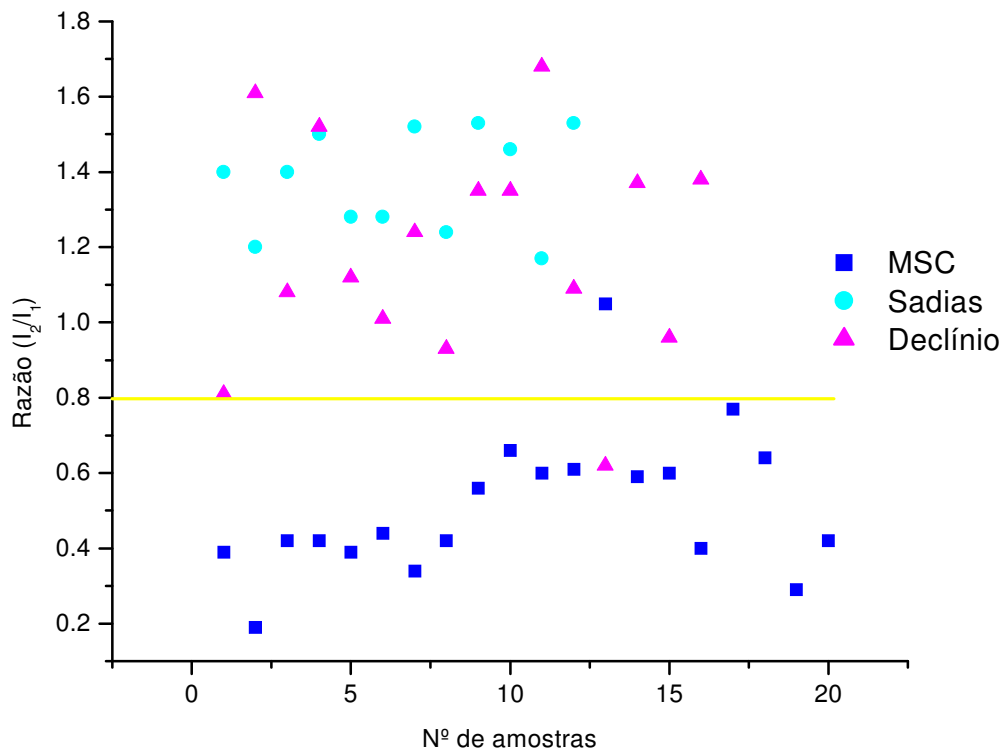


Figura 5.2.1.2 - Razão de Fluorescência entre as bandas em 466 nm/438 (I<sub>2</sub>/I<sub>1</sub>) nm referente ao espectro da figura 5.2.1.1.

Como os porta-enxertos com MSC apresentavam uma banda na região do amarelo, então se realizou um espectro de emissão com excitação em 576 nm como demonstra a figura 5.2.1.3. E através da razão de fluorescência  $F_{629 \text{ nm}}/F_{822 \text{ nm}}$  conseguimos diferenciar, com 86 % de acerto com índice superior a 6,4 plantas com morte súbita dos citros de plantas sadias como mostra a figura 5.2.1.4.

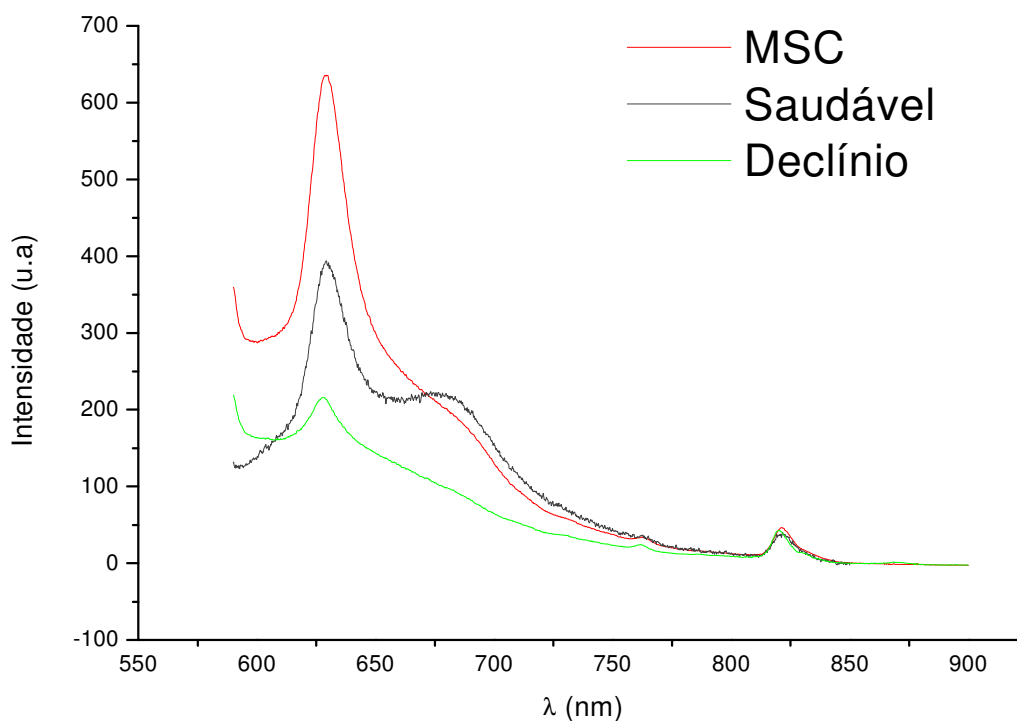


Figura 5.2.1.3 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 576 nm de amostras doentes e saudáveis.

Para verificarmos com mais detalhes o comportamento das amostras referentes ao gráfico anterior, fez-se necessário a construção do gráfico de dispersão na figura 5.2.1.4. O aumento na intensidade de emissão de fluorescência das plantas com morte súbita dos citros em relação a plantas saudáveis e com declínio deve estar relacionado com o aumento de ácidos graxos, triacilglicerídeos e polissacarídeos como mostra a figura 5.2.2.3.

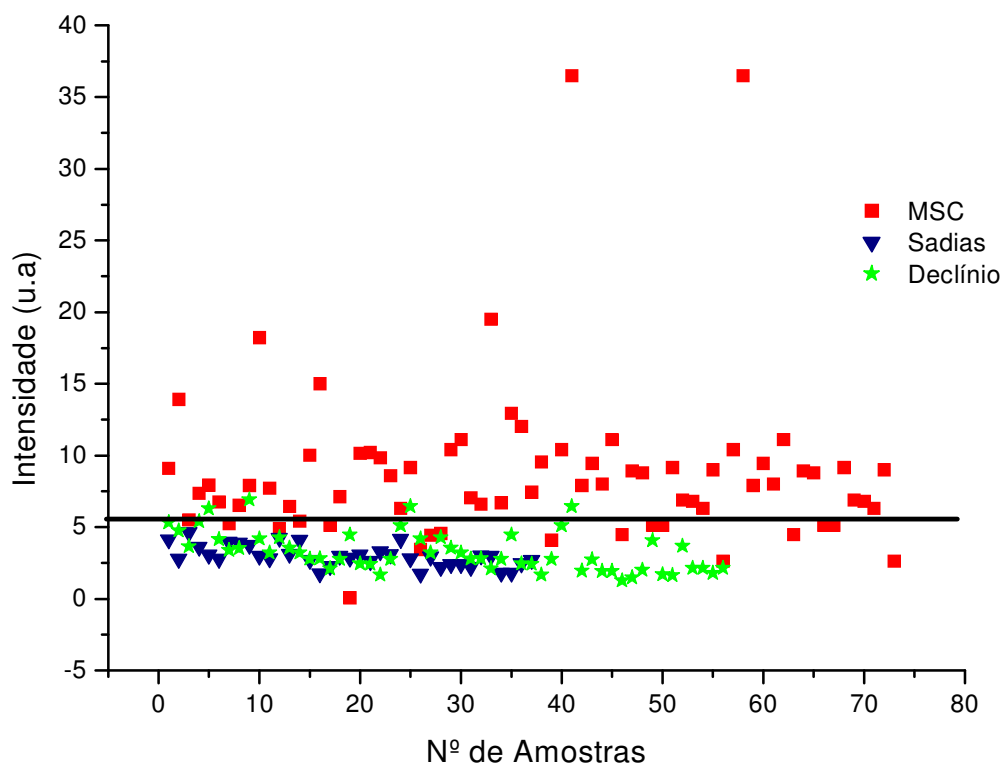
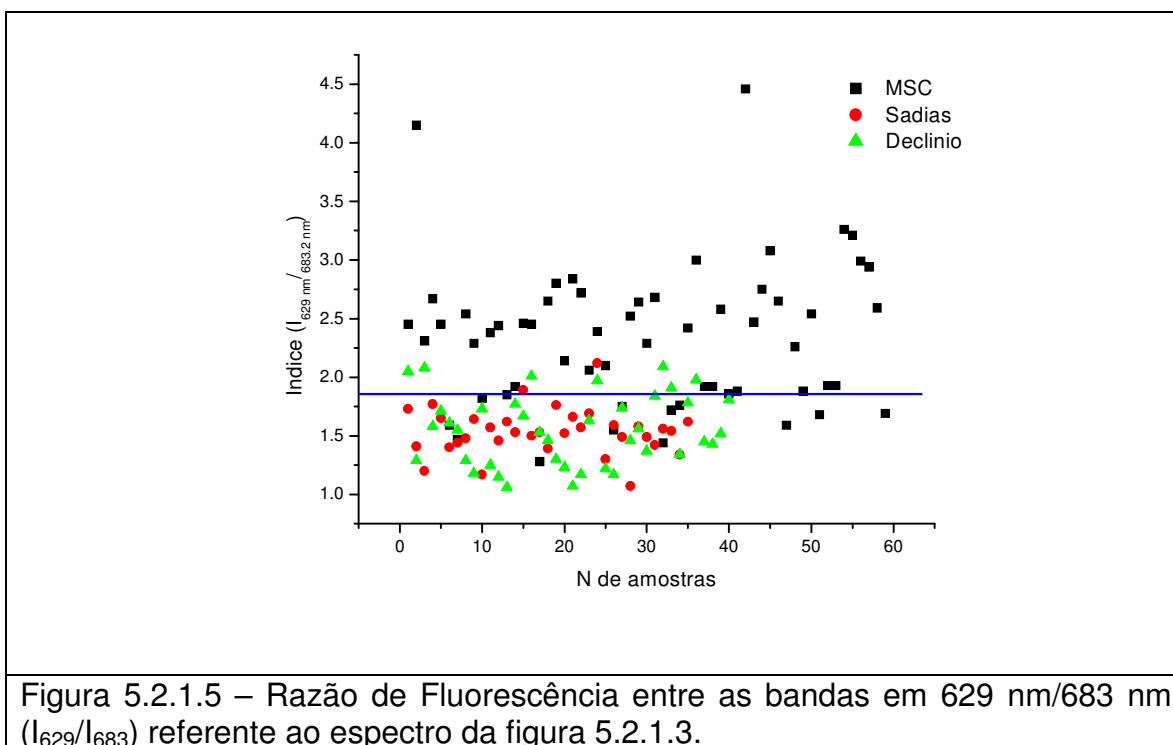


Figura 5.2.1.4 – Razão de Fluorescência entre as bandas em 629 nm/822 nm (I) referente ao espectro da figura 5.2.1.3.

Foi possível, ainda usando este último comprimento de onda, ou seja, 576 nm para a determinação de um segundo índice de caracterização de plantas com morte súbita dos citros, já que se observou que neste espectro ocorria uma emissão da fluorescência em 683 nm tanto nas plantas com morte súbita dos citros quanto nas sadias, não verificado nas amostras com declínio dos citros. Este novo índice (figura 5.2.1.5) utiliza a razão de intensidade de fluorescência em 629 nm por 683 nm, e com 81% de precisão. Para verificarmos com mais detalhes o comportamento das amostras referentes ao gráfico anterior, fez-se necessário à construção do gráfico de dispersão referente à figura 5.2.3:



Embora não existam trabalhos científicos que tratam da utilização de índices na caracterização de doenças de citros, existem alguns artigos relacionados a fluorescência usando índices na caracterização de substâncias húmicas . Através da espectroscopia de fluorescência, existem trabalhos que destacam a utilização na determinação no grau e humificação de solos. Zsolnay et al., (1999) obteve resultados importantes quando realizava espectros de emissão com excitação em 240 nm com intervalo de varredura entre 300 nm e 700 nm, na qual a área sobre o maior quarto da emissão (570-641 nm) dividido pela área do menor quarto (356-432 nm), denominado  $A_4/A_1$ , pode ser usado como índice de humificação ( $H_z$ ).

Outra metodologia usando índices através da fluorescência se verifica na proposta de Milori et al., (2002), em que mede o espectro de emissão com excitação em 465 nm e com intervalo de varredura entre 480 e 700 nm, em que a área total sobre o espectro de fluorescência é proporcional ao grau de humificação e será denominada de índice de humificação  $A_{465}$ .



## **5.2.2. Extratos de porta-enxertos**

Realizou-se medidas, com extratos de porta-enxertos com hexano e metanol, de espectroscopia de absorvância na região do ultravioleta-visível, espectroscopia de emissão de fluorescência e espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier. O extrato aquoso de porta-enxerto seguiu de análises de espectroscopia de absorvância na região do ultravioleta-visível, espectroscopia de emissão de fluorescência.

### **5.2.2.1 - Extração com Hexano**

A extração realizada com este solvente deve obter como produtos carboidratos ou glicídeos, cadeia apolar dos aminoácidos, cadeia apolar das proteínas, vitaminas lipossolúveis e lípídeos neutros. Sabe-se que os lípídeos são compostos instáveis, principalmente quando expostos à luz, calor e oxigênio. Desta forma, a espectroscopia no ultravioleta-visível mostrou o seguinte comportamento das amostras sadias e doentes como na figura 5.2.2.1.1

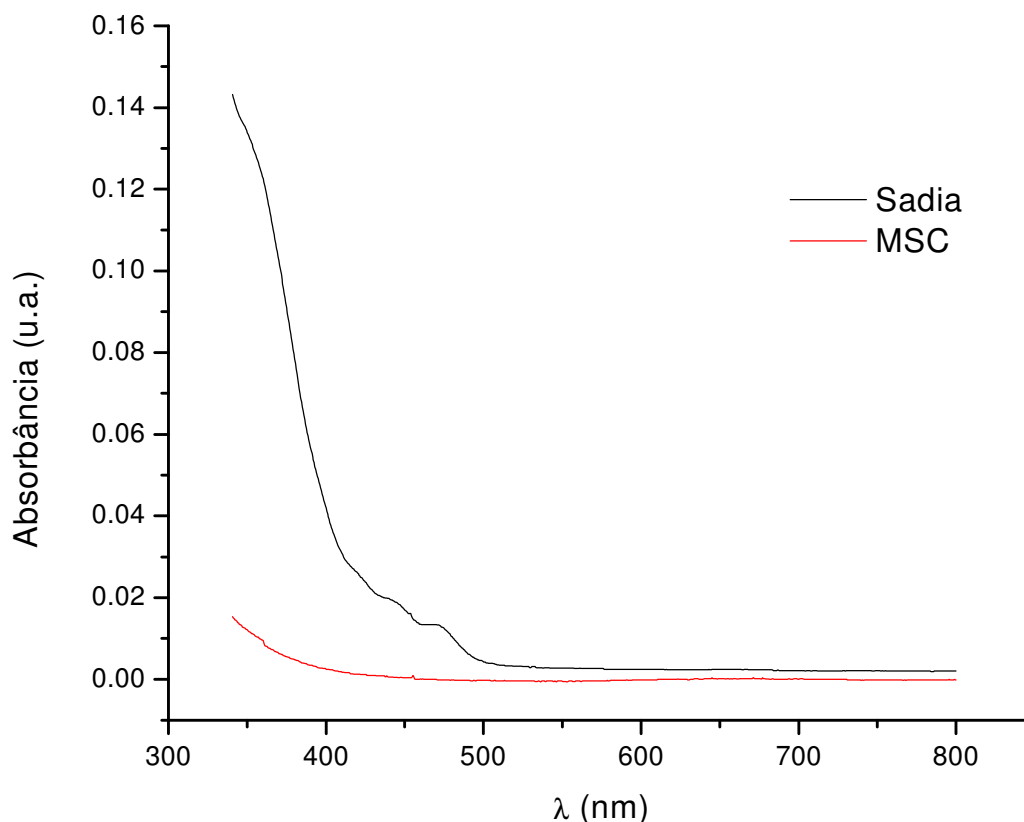


Figura 5.2.2.1.1 – Espectroscopia no Ultravioleta-Visível de extrato hexânico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.

Este gráfico demonstra uma semelhança entre as amostras no intervalo de 800 nm até 500 nm. Já na região entre 500 nm e 400 nm observa-se o surgimento de dois picos de absorção na amostra sadia, um em 471 nm e outro em 445 nm, que não aparecem na amostra doente com morte súbita dos citros. Entretanto, não existe absorvância alguma em 576 nm, região do espectro amarela em que definimos os dois índices usando a espectroscopia de fluorescência no porta-enxerto *in natura*.

Como o melhor resultado obtido, em amostra *in natura*, se verifica com espectro de emissão de fluorescência com excitação em 576 nm, questionou-se em qual extração conseguiríamos obter um espectro semelhante ao gráfico da figura

5.2.1..1. Nesta extração, com um solvente apolar, foi encontrado o seguinte resultado como mostra a figura 5.2.2.1.2.

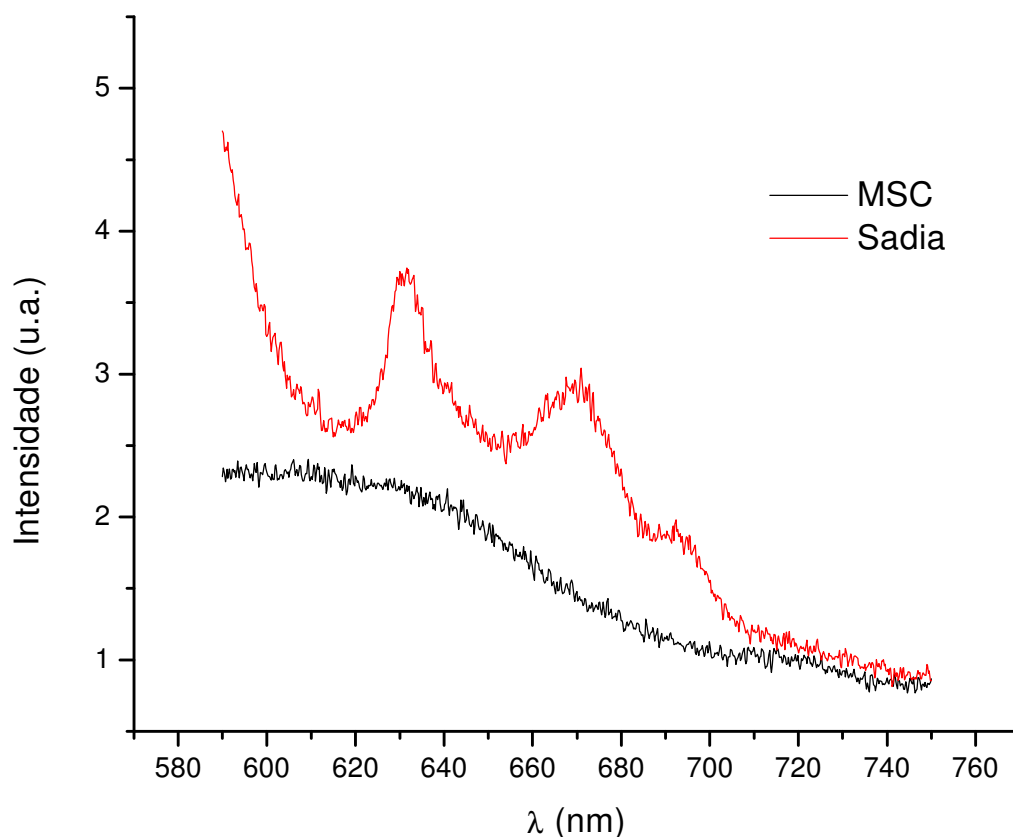


Figura 5.2.2.1.2 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 576 nm de extrato hexânico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.

Este gráfico demonstra que a amostra sadia emite a fluorescência, embora de pequena intensidade, em 629 nm e 670 nm. Porém, a amostra com morte súbita dos citros não exibe picos de emissão de fluorescência como se verifica na amostra sadia.

Para entender melhor qual composto ou grupo funcional poderia ter sido formado ou suprimido na extração das amostras sadias e doentes, tornou-se necessário a realização de um espectro de absorvância usando a espectroscopia de

infravermelho com transformada de fourier, como mostra o gráfico na figura 5.2.2.1.3.

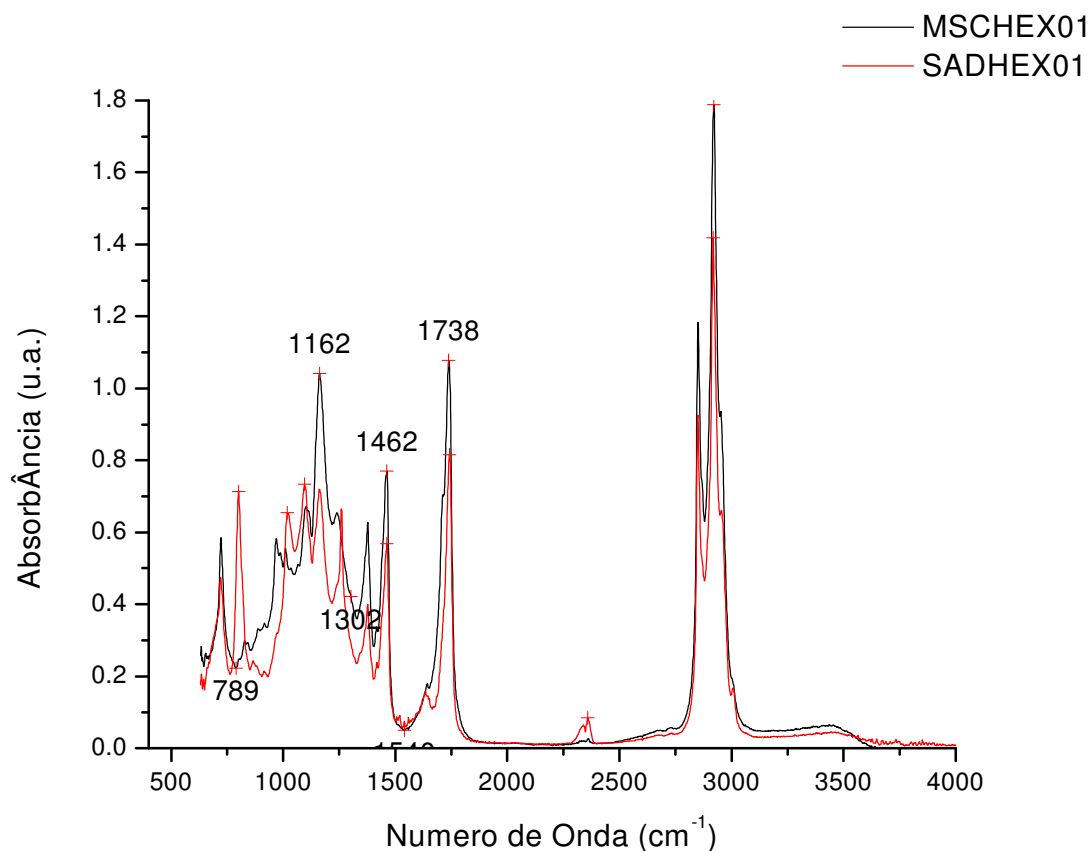


Figura 5.2.2.1.3 – Espectros de Absorbância usando FTIR de extrato hexânico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.

Este resultado (figura 5.2.2.1.3) mostra um aumento na absorvância em 1738 cm<sup>-1</sup> no extrato da planta doente com morte súbita dos citros em relação a planta sadia. Este número de onda indica a presença de vibração e deformação axial de grupos carbonilas (C = O) de ésteres alifáticos em maior número nas amostras doentes em relação às sadias. A banda com número de onda de 2918 cm<sup>-1</sup> correspondem a deformação axial de C — H de metila, e em 2849 cm<sup>-1</sup> indica a deformação axial simétrica de C — H (CH<sub>2</sub> — grupamentos metileno). A banda em

1462  $\text{cm}^{-1}$  refere-se à deformação angular de grupamentos metileno ( $\text{CH}_2$ ). A presença desses grupos no extrato com hexano corresponde a uma mistura de ácidos graxos e triacilglicerídeos de maior absorbância na amostra doente com MSC em relação à sadia. A banda em 1162  $\text{cm}^{-1}$  esta relacionada com a presença de polissacarídeos mais intensa em extratos de plantas com morte súbita em relação a plantas sadias. Osirio et al. (2000) em sua análise sobre a bactéria *Xylella fastidiosa* demonstrou um aumento do teor de polissacarídeos devido ao aumento do tempo no tempo de cultura dessa bactéria.

#### **5.2.2.2 – Extração com Metanol**

A extração realizada com este solvente deve obter como produtos principais as substâncias fenólicas como ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e quinonas, além da cadeia polar dos terpenos. Desta forma, a espectroscopia no ultravioleta-visível mostrou o seguinte comportamento das amostras sadias e doentes com morte súbita dos citros e declínio dos citros como na figura 5.2.2.2.1:

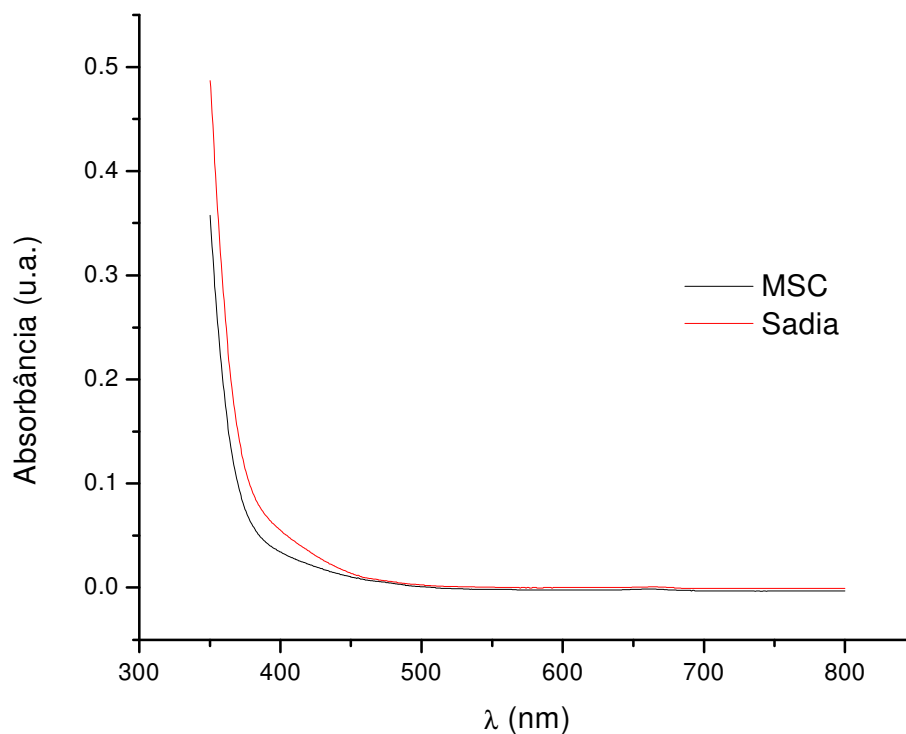


Figura 5.2.2.2.1 – Espectroscopia no Ultravioleta-Visível de extrato metanólico de amostras de porta-enxertos doentes e saudáveis.

Este gráfico demonstra uma semelhança entre as amostras em toda a faixa do espectro, desde 800 nm a 350 nm. Uma observação mais atenta, demonstra que existe uma absorção da radiação, muito pequena, em 662 nm. Desta maneira, realizou-se um espectro de emissão de fluorescência com excitação em 662 nm como mostra a figura 5.2.2.2.2. Entretanto, não existe absorbância alguma em 576 nm, região do espectro amarela em que definimos os dois índices usando a espectroscopia de fluorescência no porta-enxerto *in natura*.

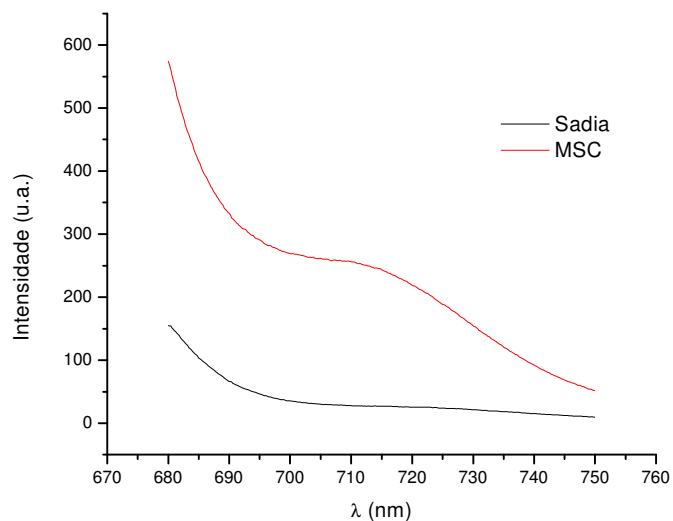


Figura 5.2.2.2.2 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 662 nm de extrato metanólico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.

Como o melhor resultado obtido em amostras in natura refere-se ao espectro de emissão de fluorescência com excitação em 576 nm, tornou-se necessário, para um melhor entendimento, a realização de um espectro de emissão, no extrato metanólico, de fluorescência com excitação em 576 nm como se verifica no gráfico da figura 5.2.2.2.3.

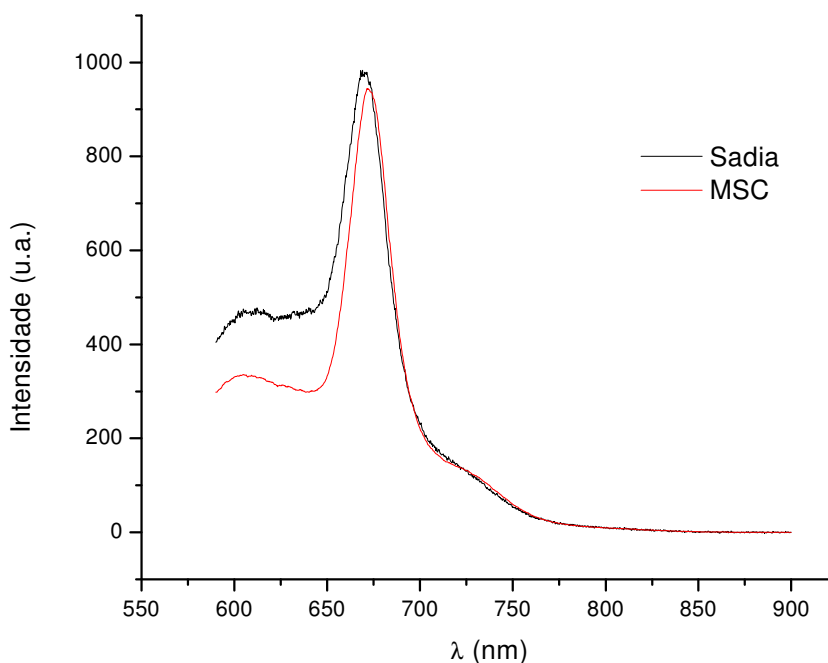


Figura 5.2.2.2.3 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 576 nm de extrato metanólico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.

Neste resultado observa-se uma semelhança entre os espectros das amostras doentes e sadias, apresentando pico em 672 nm e 729 nm . Desta forma, a emissão em 672 nm não confirma a emissão em 629 nm nas amostras de porta-enxerto *in natura*..

Para entender melhor, qual composto poderia ter sido formado ou suprimido na extração das amostras sadias e doentes, tornou-se necessário a realização de um espectro de absorvância usando a espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier, como mostra o gráfico na figura 5.2.2.2.4.



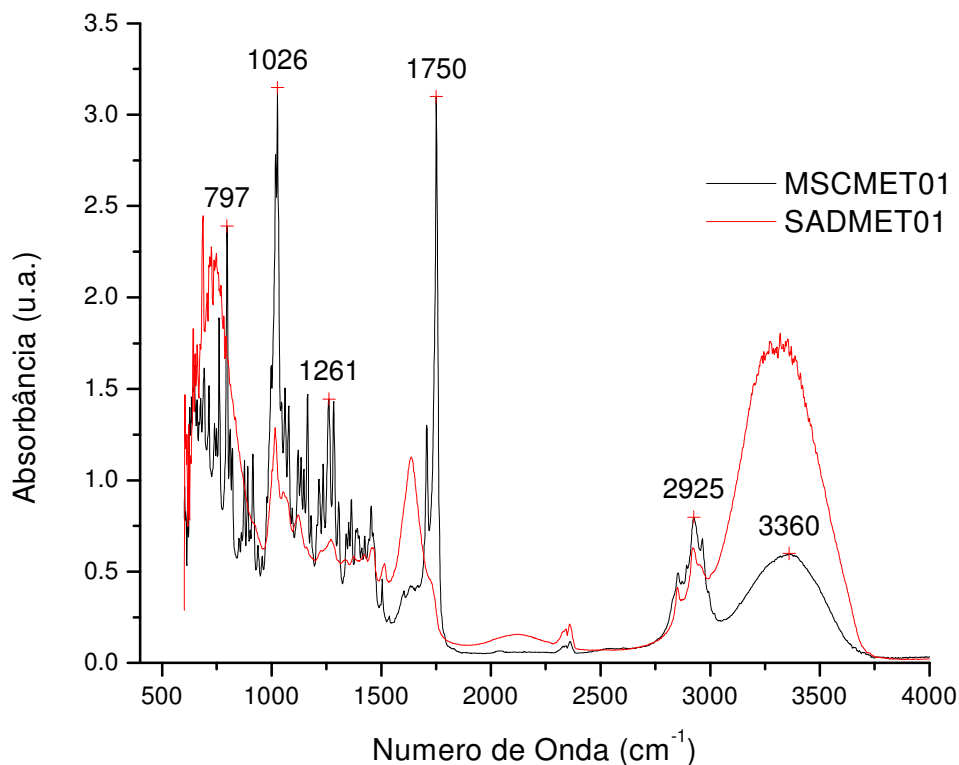


Figura 5.2.2.2.4 – Espectros de Absorbância usando FTIR de extrato metanólico de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.

Este resultado (figura 5.2.2.2.4) mostra uma alta absorvância em  $1750\text{ cm}^{-1}$  no extrato da planta doente com morte súbita dos citros que a planta sadia não apresenta. Este número de onda indica a presença de vibração de deformação axial de grupos carbonilas ( $\text{C} = \text{O}$ ) de ésteres alifáticos saturados característicos de amostras doentes que não demonstram as amostras sadias. O pico em  $2925\text{ cm}^{-1}$  indica a deformação axial assimétrica de grupamentos metileno. Em  $3051\text{ cm}^{-1}$  refere-se à deformação axial de  $\text{C} - \text{H}$  em aromáticos. Observa-se um pico em,  $1261\text{ cm}^{-1}$  que compreende deformação axial assimétrica de  $\text{C} - \text{O}$ . Em  $1026\text{ cm}^{-1}$  refere-se a deformação axial simétrica de  $\text{C} - \text{O} - \text{C}$ . Outro pico em  $3360\text{ cm}^{-1}$  representa a deformação axial de  $\text{O} - \text{H}$ , larga, em ligação de hidrogênio intermolecular. A presença desses grupos no extrato com metanol, e principalmente

com números de onda em  $3051 \text{ nm}^{-1}$  e  $3360 \text{ nm}^{-1}$  apresentando absorvância maior na amostra sadia em relação à com MSC, corresponde a presença de compostos fenólicos, os quais estão associados as defesas passivas e ativas da planta (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). Estes compostos são produtos do metabolismo secundário e resultante da interação planta e ambiente (Zaat et al., 1987).

Entre os compostos fenólicos que exercem ação antibacteriana encontrados em plantas, alguns atuam como inibidores pré-formados associados à resistência não hospedeira (Cadena-Gomes & Nicholson, 1987). Outros têm origem devido a resposta à entrada de fitopatógenos e são considerados como parte ativa das plantas (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

Em 1989, Fernandez & Health descreveram o caminho de reconhecimento de um fitopatógeno potencial no sitio de infecção, limitando a ação do patógeno resultando em uma rápida morte celular, o qual inclui a formação de lignina (Aist et al., 1988) e o acúmulo de compostos fenólicos dentro da parede celular das células hospedeiras (Niemann et al., 1991a).

### **5.2.2.3 Extração com Água**

A extração realizada com este solvente deve obter como produtos terpeno, flavonóides e etc, ou seja, bem semelhante a extração com metanol. Desta forma, a espectroscopia no ultravioleta-visível mostrou o seguinte comportamento das amostras sadias e doentes como na figura 5.2.2.3.1.

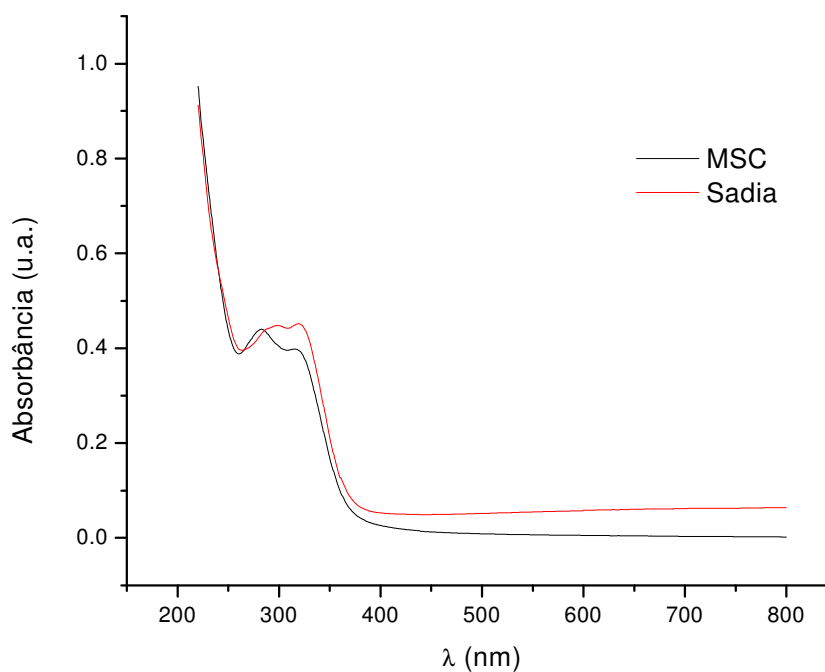


Figura 5.2.2.3.1 – Espectroscopia de Ultravioleta-Visível de extrato aquoso de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.

O gráfico da figura 5.2.2.3.1 mostra que dois picos de absorção, tanto na amostra sadia quanto na doente, em 275 nm e 320 nm, com absorbâncias semelhantes. Desta forma, realizaram-se dois espectros de emissão de fluorescência em 275 nm (figura 5.2.2.3.2) e em 320 (figura 5.2.2.3.3).

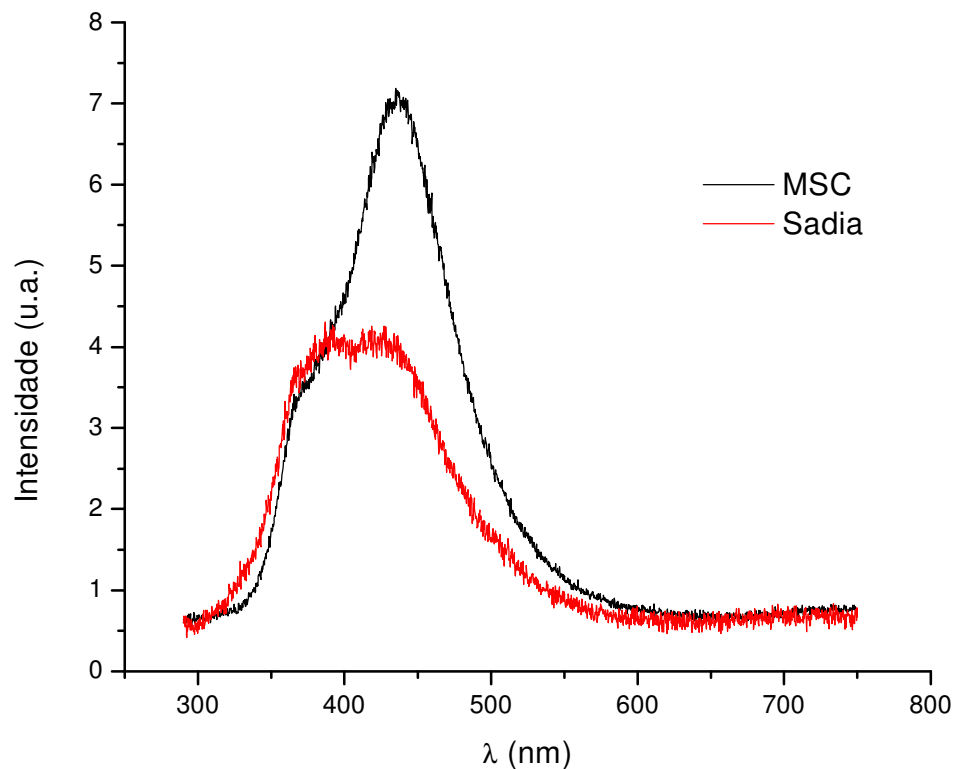


Figura 5.2.2.3.2 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 275 nm de extrato aquoso de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.

Embora a intensidade de emissão de fluorescência tanto na amostra sadia quanto na amostra doente seja muito pequena, existe diferença entre as duas plantas na relação entre as bandas em 372 nm e 436 nm diferente da amostra sadia.

No espectro de emissão de fluorescência com excitação em 320 nm, observou-se o seguinte comportamento entre os dois tipos de plantas estudadas, como mostra a figura 5.2.2.3.3.

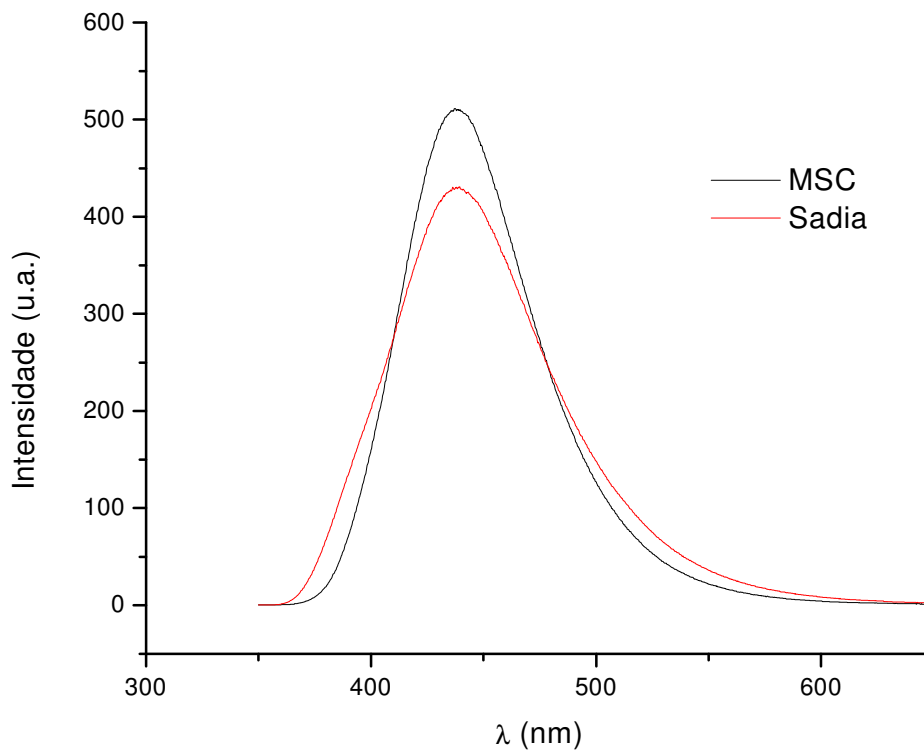


Figura 5.2.2.3.3 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 320 nm de extrato aquoso de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.

As duas amostras exibem uma banda com emissão da fluorescência em 450 nm, mas a planta doente com morte súbita dos citros emite com uma intensidade maior que a amostra sadia, tal como se verifica no gráfico da figura 5.2.2.3.3.

Quando realizamos um espectro de emissão de fluorescência com excitação em 576 nm observamos o seguinte comportamento das amostras como demonstra o gráfico da figura 5.2.2.3.4.

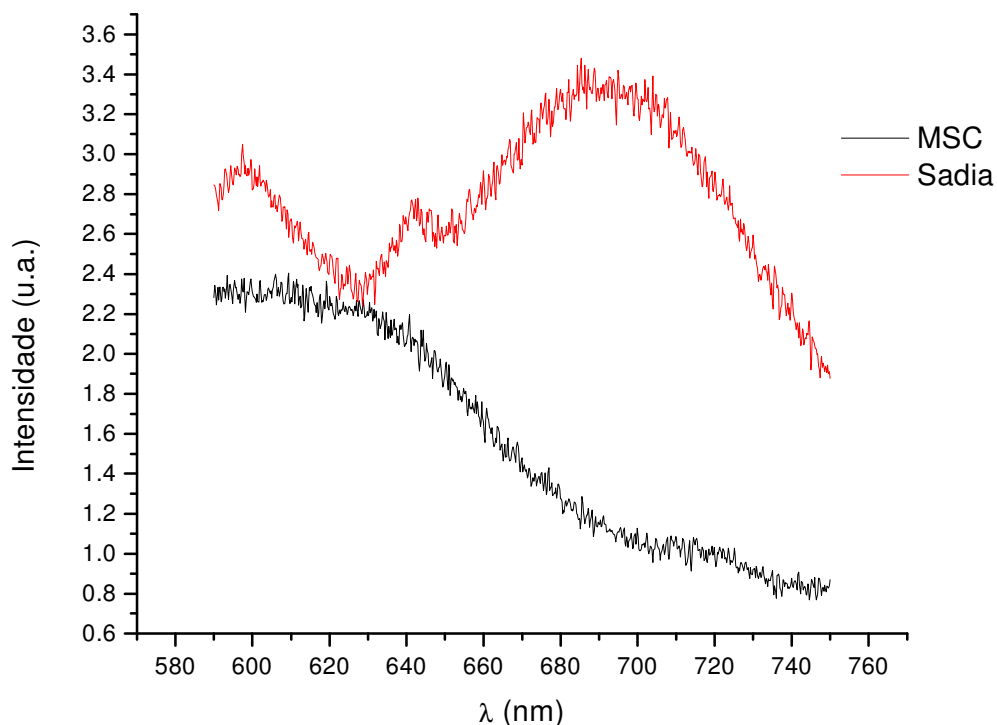


Figura 5.2.2.3.4 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 576 nm de extrato aquoso de amostras de porta-enxertos doentes e sadios.

Este gráfico demonstra que a amostra sadia apresenta uma emissão, embora de pequena intensidade, em 643 nm maior que a observada na amostra doente com morte súbita dos citros. Além disso, o extrato referente a planta sadia apresenta outra emissão em 695 nm que no extrato da planta com morte súbita dos citros não é observada.

### 5.3 FOLHA *IN NATURA*

Como se conseguiu encontrar a região do espectro em que fosse possível diferenciar amostras de porta-enxertos *in natura* na região do amarelo (576 nm), resolveu-se realizar nas folhas *in natura* análises de espectroscopia de emissão de fluorescência com excitação em 576 nm como se verifica no gráfico da figura 5.3.1:

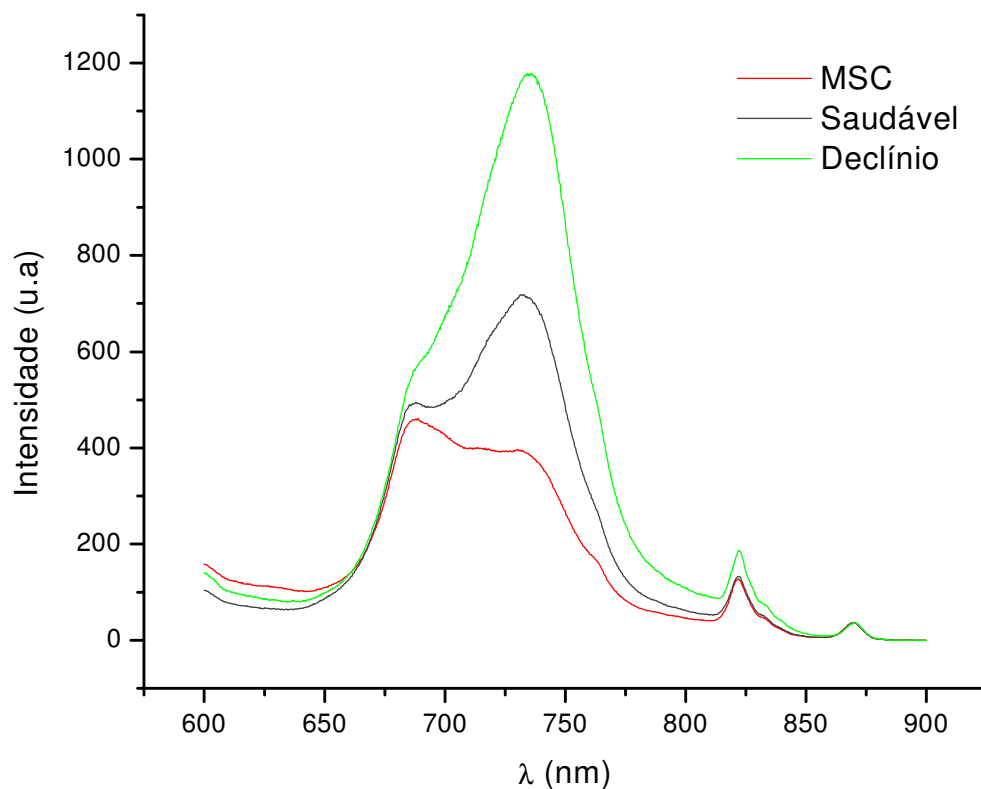


Figura 5.3.1 – Espectros de Emissão de Fluorescência com Excitação em 576 nm de folhas com morte súbita dos citros, com declínio dos citros e saudáveis.

Este resultado mostra um comportamento típico de uma amostra sadia, com Morte Súbita dos Citros e com Declínio dos Citros. Mostrando picos característicos em 688 nm, 735 nm, 823 nm e 870 nm, que correspondem a regiões do, respectivamente, vermelho e infravermelho.

Outra observação significativa a respeito deste resultado se verifica na inversão de intensidade dos picos em 688 nm e 735 nm nas folhas com MSC em relação às folhas sadias e com declínio. As folhas sadias e as com declínio apresentam o pico de 735 nm maior do que o de 688 nm. As folhas com MSC, entretanto, possuem o pico em 688 nm maior do que o de 735 nm. Schweiger, Lang e Lichtenthaler (1995) destacaram o uso de espectros de emissão de fluorescência como uma forma de

detecção do stress em plantas usando folhas de variedade *Fagus sylvatica* L. na forma *in natura*. A inversão das bandas do espectro das amostras com morte súbita dos citros em relação às amostras saudáveis e com declínio dos citros deve estar relacionado a diminuição da concentração e do teor das clorofilas e dos carotenóides como mostram as tabelas 5.1.1 e 5.1.2.

A análise sistemática deste espectro permitiu a definição de um índice baseado na razão de fluorescência  $I_{735\text{ nm}}/I_{688\text{ nm}}$ . Folhas com MSC apresentaram índice menor do que 1,3 em relação, enquanto que folhas saudáveis que apresentaram índice maior que 1,3. As folhas com declínio apresentaram um índice superior a 1,8. Na figura 5.1.2 temos o resultado do índice definido para um conjunto de 69 amostras. Nesta figura evidencia-se claramente a divisão em grupos de amostras saudáveis e doentes, sendo, portanto o índice indicado no diagnóstico da morte súbita dos citros por ser um método menos invasivo para a planta. Com esta divisão a percentagem de acerto estimada é de 83%.

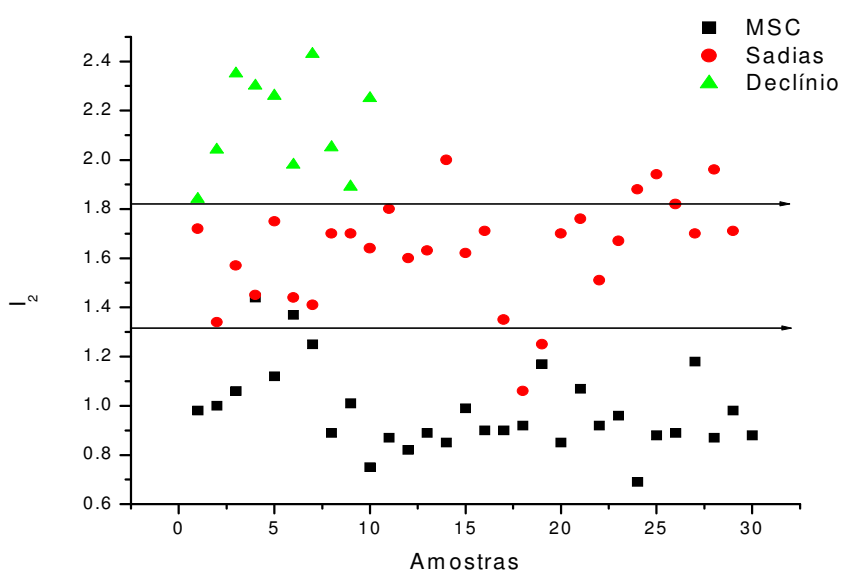


Figura 5.3.2 – Razão de Fluorescência de Folhas (735 nm/688 nm) referente ao gráfico da figura 5.3.1 de folhas com morte súbita dos citros, com declínio dos citros e saudáveis.



Através da definição deste índice torna possível a identificação de plantas com morte súbita dos citros, além de ser um método pouco invasivo em relação ao utilizado na caracterização da doença nos pomares mineiros e paulistas. Desta maneira, este índice torna-se o mais indicado para a confirmação de plantas com morte súbita dos citros no campo no período chuvoso. No período de seca, deve-se utilizar como índice a razão entre as bandas 629 nm/822 nm realizados nos porta-enxertos. Para uma confirmação laboratorial, deve-se utilizar o índice entre as bandas de 466 nm/438 nm.

#### **5.4 – Imagens de Fluorescência de Folhas**

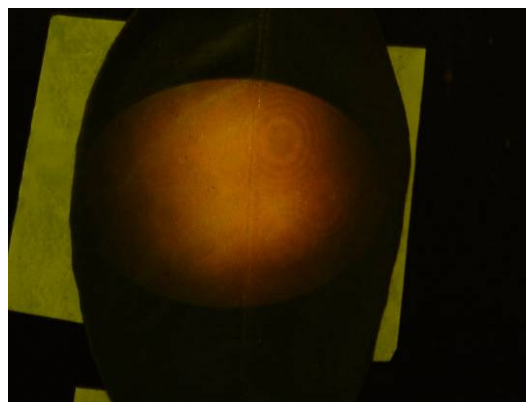
Foram analisadas 276 amostras de folhas saudáveis e doentes com morte súbita dos citros e com declínio dos citros. A Fluorescência Induzida por Laser pode ser utilizada como um indicador na detecção precoce de deficiências de nutrientes (Hak et al., 1993). Atualmente, vem sendo utilizado o sistema de fluorescência induzida por Laser (Lichtenthaler, 1997) conjunto com uma câmera de alta resolução espacial no sentido de permitir a realização de medidas na presença da luz (Lang et al., 1995). Milori et al. (2001) propõe a realização do cálculo de índice de humificação através da razão entre o valor da área (ACF) do espectro de emissão de fluorescência e o valor de carbono orgânico total (COT) presente na amostra de solo intacto. A espectroscopia de fluorescência induzida por laser (EFIL) é uma técnica que tem se mostrado promissora no diagnóstico precoce de uma grande variedade

de neoplasias, sendo capaz de distinguir com precisão tecido neoplásico de tecido normal (Engels et al., 1991).

Quando excitadas em 458 nm, as folhas saudáveis apresentaram uma fluorescência visível no vermelho enquanto que as folhas doentes fluoresciam intensamente no amarelo. Na figura 5.4.1 temos uma imagem típica da fluorescência de uma folha saudável.



Foto de Folha Sadia *in natura*.



Fluorescência de Folha Sadia.

Figura 5.4.1 – Imagens de Fluorescência Folhas Sadias.

Com a finalidade de intensificar esse efeito de fluorescência e tentar buscar padrões característicos das emissões, realizaram-se processamentos computacionais das imagens das folhas doentes e sadias. Na figura 5.4.2 temos um exemplo típico das imagens tratadas.

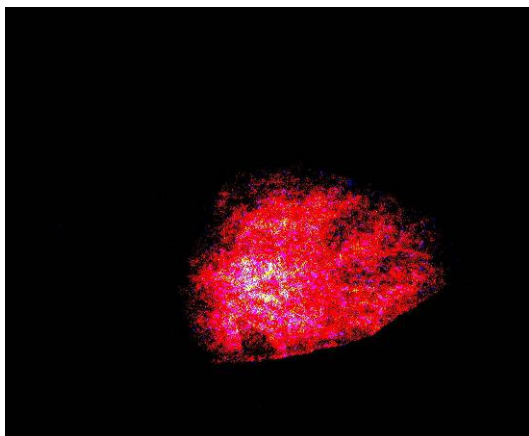


Imagem de fluorescência da folha sadia

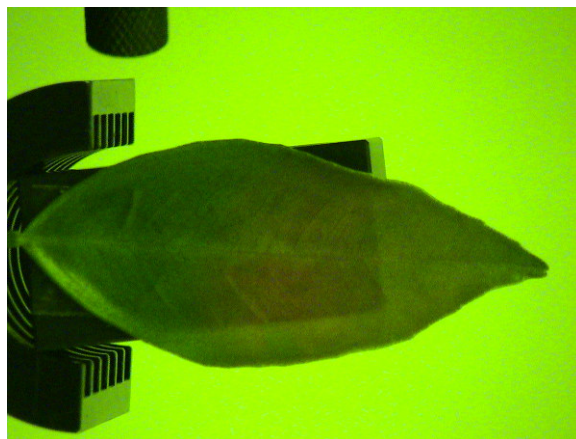


Imagem da folha sadia

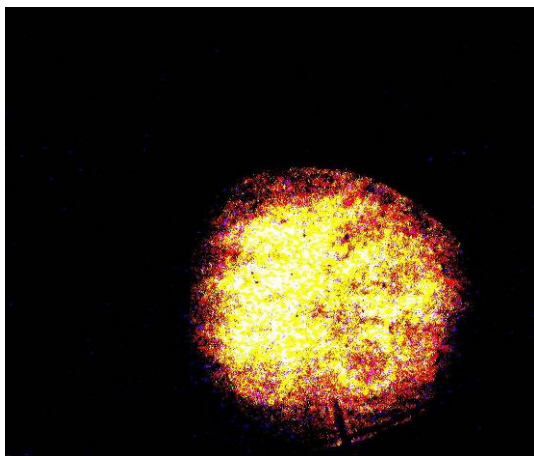


Imagem de fluorescência da folha com morte súbita dos citros

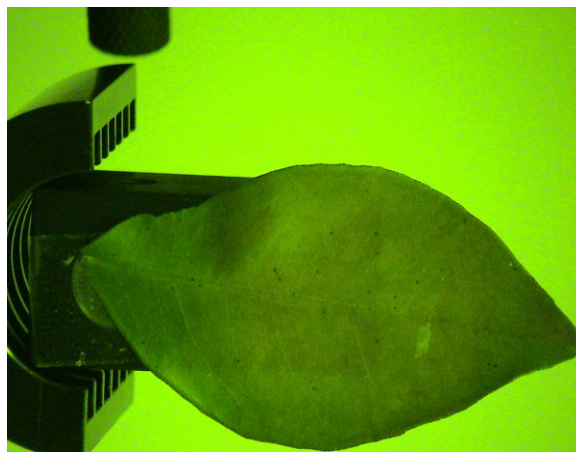


Imagem da folha com morte súbita dos citros

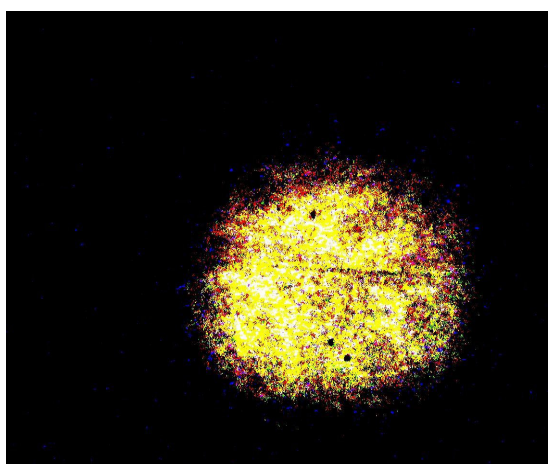


Imagem de fluorescência de folha com declínio dos citros

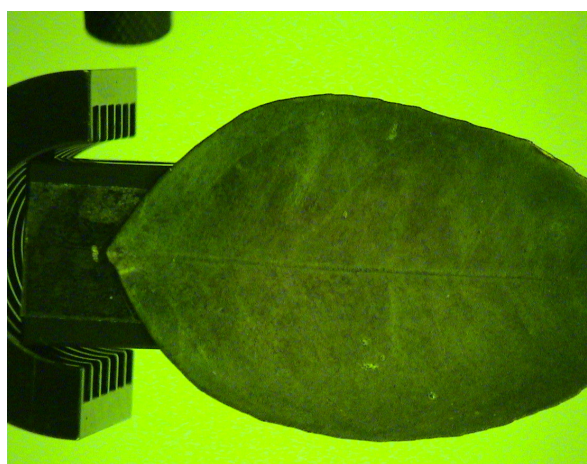


Imagem da folha com declínio dos citros

Figura 5.4.2 – Imagens de Folhas Sadias, com Declínio dos Citros e com Morte Súbita dos Citros na forma *In Natura*.

Em torno de 72% das folhas sadias apresentaram emissão de fluorescência na região do vermelho, como verificado na figura 5.4.1. Esta fluorescência é devida à fluorescência dos pigmentos fotossintéticos, principalmente das clorofilas **a** e **b**, cuja excitação é bem ressonante com a emissão do laser (458 nm). A divergência deste comportamento em 28% das folhas pode ser devida à incerteza no laudo do inspetor, visto que ele certifica a contaminação por MSC ou declínio, mas não avalia demais doenças ou problemas da planta. Portanto, folhas consideradas saudáveis e que floresceram no amarelo podem corresponder a folhas que estejam com outras doenças cujos sintomas ainda não se manifestaram. Há, portanto, um desafio a ser conquistado: utilizar como referência de planta saudável, exemplares cultivados em viveiros com rigoroso controle de sanidade.

Já as folhas doentes com morte súbita e com declínio apresentam emissão de fluorescência no espectro na região do amarelo em 65% das amostras. Através da avaliação do teor dos pigmentos realizada utilizando-se um processo de extração (Capítulo 5.1.1), foi observada uma diminuição na quantidade de pigmentos nas folhas doentes. Entretanto, isso não explica a intensa fluorescência no amarelo observada nas folhas doentes.

Heisel et al. (1996) destaca que através da técnica de imagem de fluorescência induzida por Laser torna-se possível a detecção da deficiência de nutrientes numa variedade de trigo (*Zea mays*) com a finalidade de corrigir em tempo a fertilização da cultura.

Com a finalidade de entender a mudança da emissão de fluorescência da folha sadia para a doente e confirmar os resultados obtidos na extração de folhas sadias, com declínio dos citros e com morte súbita dos citros, realizou-se um experimento

que se baseava na captura de uma imagem de folha sadia pós-extração em acetona durante 48 horas como seguem as fotos da figura 5.4.3.

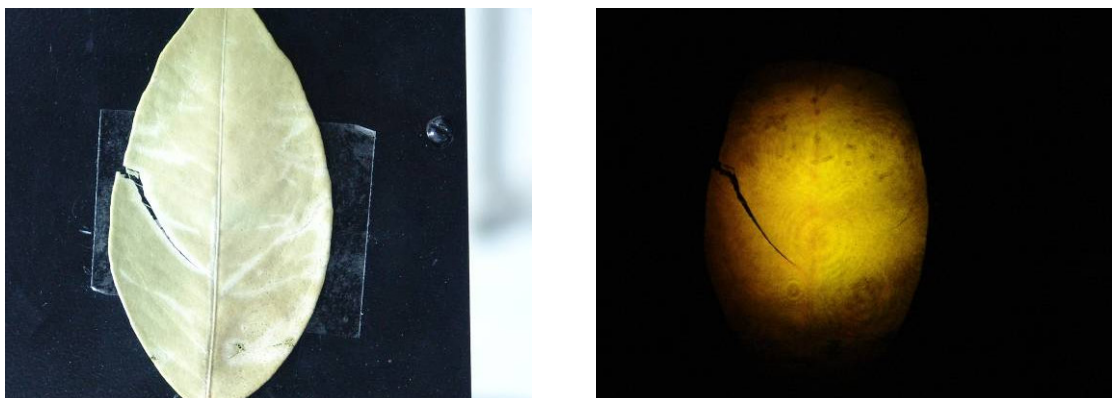


Imagem de folha sadia *in natura* pós-extração. Imagem de fluorescência de folha sadia pós-extração.

Figura 5.4.3 - Imagens de fluorescência de folhas sadias pós-extração.

Nesse resultado, observa-se que a folha sem os pigmentos fotossintéticos apresenta fluorescência no espectro visível na região do amarelo. Ou seja, o material que forma as paredes celulares da folha é responsável pela fluorescência no amarelo. Portanto, a mudança de fluorescência da folha sadia (vermelho) para a folha doente com morte súbita dos citros (amarelo) e com declínio dos citros (amarelo) deve-se à perda dos pigmentos fotossintéticos, confirmados pelos resultados obtidos nas tabelas 5.1.1 e 5.1.2, que se referem aos cálculos da concentração de do teor dos pigmentos fotossintéticos, resistindo apenas os pigmentos característicos das estruturas celulares. Esta fluorescência na região do verde/amarelo relacionada à epiderme das células 'vivas' e nervuras das folhas já foi sugerido por Schweiger, et al. (1995).

## Capítulo 6

### CONCLUSÃO

As análises utilizando espectroscopia de fluorescência no porta-enxerto *in natura* demonstraram ser possível detectar de forma rápida, e com maior porcentagem de confiança, a morte súbita dos citros, as quais foram observadas alterações tanto nos espectros de emissão quanto nos espectros de excitação, assim como, alterações espectrais através da espectroscopia de absorção de luz na região do ultravioleta-visível. Destas alterações foi possível se definir três índices de diagnóstico da doença. A porcentagem de acerto destes índices ficou no intervalo de 81% a 96% configurando ainda um método destrutivo. Outra forma de detecção da morte súbita dos citros seria através do método da inserção de uma fibra óptica que penetre nas camadas superficiais do porta-enxerto, embora a lesão necessária seja muitas vezes menor do que as atuais que são realizadas para a inspeção visual.

Através da espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier foi possível determinar alterações na composição química das plantas com morte súbita dos citros em relação as plantas sadias, tanto nos extratos de casca do porta-enxerto em meio com hexano quanto e em meio com metanol, como aumento na absorção de ácidos graxos, triacilglicerídeos e polissacarídeos nas plantas com MSC.

Usando a espectroscopia de fluorescência induzida por laser foi possível determinar alterações da emissão de fluorescência de folhas sadias em relação às folhas com morte súbita dos citros e com declínio dos citros. Entretanto, com o uso

---

desta técnica não foi possível diferenciar a emissão de fluorescência entre duas folhas com morte súbita e com declínio.

Com a finalidade de avaliar as mudanças químicas e físicas que ocorrem nos órgãos das plantas doentes e não interferir no desenvolvimento direto da mesma fez-se necessário à realização de medidas de espectroscopia de fluorescência nas folhas. Como havia sido verificada alteração química nas folhas através da diminuição de alguns pigmentos fotossintéticos nas plantas doentes em relação às plantas saudáveis, esperava-se que houvesse mudanças nas propriedades físicas, como a emissão de fluorescência. Estes resultados foram confirmados através dos espectros de emissão de fluorescência, dos quais foi possível a obtenção de um índice que apresentou 83% de acerto. Pelo caráter não invasivo deste método, ele torna-se o mais indicado para diagnóstico de plantas com MSC por ser mais factível e de maior aplicação em relação ao método de detecção utilizando a casca do porta-enxerto.

Desta forma, este trabalho trouxe alternativas de detecção da morte súbita dos citros usando formas diferentes de análise em relação às técnicas aplicadas atualmente. Devem-se iniciar e prosseguir muitos trabalhos científicos com a finalidade de detectar a morte súbita através de forma rápida, precisa e econômica e diminuir os gastos com as perdas provocadas por esta doença.

## Capítulo 7

### SUGESTÃO DE TRABALHOS POSTERIORES

- Identificação e caracterização das imagens de fluorescência de folhas sadias e doentes com morte súbita dos citros usando Redes Neurais.
- Estudo dos extratos fotossintéticos de folhas sadias e doentes com morte súbita dos citros usando espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.
- Análise química dos extratos de porta-enxertos através da fluorescência.



## Referências Bibliográficas

BASSANEZI, R.B.; BUSATO, L.A.; SANCHES, A.L. BARBOSA, J.C. Danos da Morte Súbita dos Citros sobre a produção de laranja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 497-503. 2005.

BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; GIMENES-FERNANDES, N. Progresso dos sintomas da 'morte súbita' em pomares de laranjeiras 'Valencia e Pêra. **Summa Phytopathologica**, p. 23 - 28, 2002.

BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIN, L.; GIMENES-FERNADES, N.; GOTTWALD, T. R.; BOVÉ, J. M. Spatial and Temporal Analyses of Citrus Sudden Death as a Tool to Generate Hypoteses Concerning is Etiology. **Phytopatology**, v. 93, p. 502-512, 2003.

BLACKMER, A. M.; SCHEPERS, J. S. Using DGPS to improve corn production and water quality. **GPS Wrold**, v. 2, n. 1, p. 44-52, 1996.

BORTOLOZZO, E. D. **Efeitos da área de controle de plantas daninhas (Coroamento ou Faixa) no desenvolvimento inicial de Tangerina 'Poncã' (Citrus reticulada Blanco)**. 2002. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

BOTEON, M.; VIDAL, A. J. Citricultura no Brasil e na Flórida. **Citricultura Atual**, n. 23, p. 3, 2001.

BRAVO, C.; MOSHOU, D.; OBERTI, R.; WEST, J.; McCARTNEY, A.; BODRIA, L.; RAMON, H. Detection of foliar disease in the field by the fusion of measurements made by optical sensors. **An ASAE Meeting Paper**, n. 023087, 2002.

BRITTON, G. UV/Visible Spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Eds.). **Carotenoids: Spectroscopy**. Basel: Birkhäuser, 1995. v. 1B, p. 13-62.

BRUM, A. A. S. **Métodos de Extração e Qualidade da Fração Lipídica**. 2004. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CADENA-GOMEZ, G.; NICHOLSON, R. L. Papila formation and associated peroxidase activity: a non-specific response to attempted fungal penetration of maize. **Physiological Molecular and Plant Pathology**, v. 31, p. 51-67, 1987.

CALIXTO, M. C. **Hibridação somática entre *Citrus sinensis* e *Citrus grandis***. 2003. 114 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CAPELATO, M.D. **Química Analítica Experimental : roteiro de laboratório**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2002. p. 67 - 72.

- CARTER, P. G. **Pattern recognition within crop vegetation: A crop anomaly classification system.** 1999. 146 f. Dissertation (Master Science) - Purdue University, Purdue, 1999.
- CHAPOT, H. The *Citrus* plant. In: CITRUS. Switzerland: Ciba-Geigy, 1975. p. 6-13. (Technical Monograph, 4).
- CRISTOFANI, M. **Mapas de ligação de Citrus sunki Hort. Ex. Tan. E Poncirus trifoliata (L.) Ref. Cv. Rubdoux e localização do gene de resistência ao vírus da tristeza.** 1997. 140 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- DABERKOW, S. G.; BRENNEMAN, V. E.; KIM, C. S. Exploring the economic potential of remotely sensed images: a case study of aerial of photography in irrigated corn precision agriculture. In: EUROPEAN CONFERENCE ON PRECISION AGRICULTURE CONGRESS CENTRE, 1., 1999, Copenhagen. **Proceedings...** Copenhagen: SCI Academic Press, 1999. p. 615-624.
- DeELL, J. R.; PRANGE, R. K.; MURR, D. P. Chlorophyll fluorescence techniques to detect atmospheric stresses in stored apples. **Acta Horticulture**, v. 464, p. 127-131, 1998.
- DeELL, J. R.; TOIVONEN, P. M. A. Chlorophyll fluorescence as a nondestructive indicator of broccoli quality during storage in modified-atmosphere packaging. **HortScience**, v. 35, p. 256-259, 2000.
- DeELL, J. R.; Van KOOTEN, O.; PRANGE, R. K.; MURR, D. P. Applications of chlorophyll fluorescence techniques in postharvest physiology. **Horticulture**, v. 23, p. 69-107, 1999.
- Da GLÓRIA, F. J. M.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; Da GLÓRIA, B. A. M. Morfologia de embriões nucleares de laranja valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) . **Acta Botânica Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 17–25, 2001.
- De JUAN, A.; TAULER, R.; DYSON, R.; MARCOLLI, C.; RAULT, M.; MAEDER, M. Spectroscopic imaging and chemometrics : a powerful combination for global and local sample analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 70–79, 2004.
- DAVIES, F.; ALBRIGO, L. **Citrus.** Wallingford: CAB International, 1994. p. 254.
- DERRICK, K.S., BARRETA, M. J., BARTHE, G. A., KAYIM, M. Identification of strains of citrus tristeza virus by subtraction hybridization. **Plant Disease**, v. 87 , p. 1355-1359, 2003.
- DU, C. J.; SUN, D. W. Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. **Food Science & Technology Review**, p. 230-249, 2004.

ENGELS, A. S.; ANDERSON-ENGELS, S.; JOHANSSON, J.; SVANBERG, K.; SVANBERG, S. Fluorescence imaging and point measurements of tissue: applications to the demarcation of malignant tumors and atherosclerotic lesions from normal tissue. **Photochemical Photobiological**, v. 53, p. 807-814, 1991.

FIELD, T. S.; LEE, D. W.; HOLBOOK, N. M. Why Leaves Turn Red in Autumn. The Role of Anthocyanins in Senescing Leaves of Red-Osier Dogwood. **Plant Physiology**, v. 127, p. 566–574, 2001.

FIGUEIREDO, J. O. Variedades copa de valor comercial. In: RODRIGUES, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. S. **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 228 - 244.

FORLI, F. **Produção de silagem de capim braquiária em pomar de laranja**. 2003. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

FUNDECITRUS. Cresce a morte súbita. **Revista do Fundecitrus**, v. 112, p. 4 - 6. 2002.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, v. 28 p. 72, 2001.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J. Árvores de limoeiro ‘Cravo’ não mostram sintomas de ‘morte súbita’ em área afetada. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 72, 2002.

GRAY, G. R.; CHAUVIN, F. S.; HUNER, N. P. A. Cold acclimation and freezing tolerance. A complex interaction of light and temperature. **Plant Physiology**, v. 114, p. 467-474, 1997.

GROSSER, J. W.; GMITTER JÚNIOR, F. G.; CHANDLER, J. L. Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus reticulata* and *Citropsis gillentiana*. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 656-659, 1990.

GUMASEKAN, S.; DING, K. Using computer vision for food quality evaluation. **Food Technology**, v. 6, p. 151-154, 1994.

HALL, D. O.; RAO, K. K. **Fotossíntese**. São Paulo: EPU, 1980. p. 80.

HASSE, G. **A laranja no Brasil 1500 – 1987**. São Paulo: Duprat & Iobe Propaganda, 1987. p. 296.

HÁK, R. U.; RINDERLE-ZIMMER, H. K.; LICHTENTHALER, L. N. Chlorophyll fluorescence signatures of nitrogen deficient barley leaves. **Photosynthetica**, v. 28, p. 151-159, 1993.

HEISEL, F.; SOWINSKA, M.; MIEHÉ, J. A.; LANG, M.; LICHTENTHALER, H. K. Detection of Nutrient Deficiencies of Maize by Laser Induced Fluorescence Imaging. **Journal Plant Physiology**, v. 148, p. 622 - 631, 1996.

HENDRY, G. A. F.; PRICE, A. H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G. A. F.; GRIME J.P. (Eds.). **Methods in comparative plant ecology**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 148-152.

HODGSON, R. W. Horticultural varieties of Citrus. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. p. 431-591.

INOUE, M. T. Bases Fisiológicas para a silvicultura de espécies nativas. In: A SILVICULTURA de Espécies Nativas. Curitiba: FUPEF, 1983. p. 1-18.

JESUS JUNIOR, W.C.; BASSANEZI, R.B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 399-405, 2004.

KIMATI, H.; GALLI, F. E. Doenças dos citros. In: GALLI, F. E. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. p. 213-235 .

KOLLER, O. C. **Citricultura**: laranja, limão e tangerina. Porto Alegre: Editora Rígel Melhoramento e Cultivares, 1994. p. 49 - 62.

KRAMER, P. J.; KOSLOWISKI, T.T. **Fisiologia da árvore**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1979. 745 p.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. **Photosynthesis Research**, v. 5, p. 139-157, 1984.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 42, p. 313-349, 1991.

KRUTZ, G. W.; GIBSON, D. L.; ZHANG, M. Colour vision in forest and wood engineering. **Landwards**, v. 55, p. 2-9, 2000.

LANG, M.; LICHTENTHALER, H. K.; SOWINSKA, M.; HEISEL, F.; MIEHÉ, J. A.; SUMM, P.; TOMASINI, F. Application of laser-induced fluorescence imaging in the detection of plant stress. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND EXHIBITION ON ENVIRONMENTAL CONTAMINATION IN CENTRAL AND EASTERN EUROPE, 2., 1995, Budapest. **Proceedings**...Budapest: Government Institutes (Ed.), 1995. p. 88-90.

LANG, M.; SIFFEL, P. Z. B.; LICHTENTHALER, H. K. Investigations of the Blue-green Fluorescence Emission of Plant Leaves. **Botanic Acta**, v. 105, p. 435-440, 1992.

- LEEMANS, V.; MAGEIN, H.; DESTAIN, M. F. Defects segmentation on 'Gold Delicious' apples by using colour machine vision. **Computers and Eletronics in Agriculture**, v. 20, p. 117-130, 1998.
- LIBANORE, A.C.; MASSARI, C.A.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; GIMENES-FERNANDES, N.; AYRES, A.J. Levantamento da ocorrência da "morte súbita dos citros" no Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 72-73, 2002.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. (Eds). **Methods in Enzymology**, v. 148, n. 2, p.350-382, 1987..
- LING, J-T.; NITO, N.; IWAMASA, M.; KUNITAKE, H. Plant regeneration from protoplast of Calamondin (*Citrus madurensis* Lour.). **Scientia Horticulturae**, v. 39, p. 325-333, 1989.
- LUEDER, D. R. **Aerial photographic interpretation: principles and applications**. New York: McGraw-Hill, 1959. p. 462.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid material: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, p. 1-10, 1998.
- MACCHERONI W.; ALEGRIA, M. C.; GREGGIO, C. C.; PIAZZA, J. P.; KAMILA, R. F.; ZACHARIAS, P. R. A.; BAR-JOSEPH, M.; KITAJIMA, E. W.; ASSUMPÇÃO, L. C.; CAMAROTTE, G.; CARDOSO, J.; CASAGRANDE, E. C.; FERRARI, F.; FRANCO, S. F.; GIACHETTO, P. F.; GIRASOL, A.; JORDÃO JR, H.; SILVA, V. H. A.; AGUILAR-FERRO, J. A.; SILVA, A. C. R. da. Identification and genomic characterization of a new vírus (Tymoviridae Family) associated with Citrus Sudden Death Disease. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 3028 - 3037, 2005.
- MALAVOLTA, E.; VIOLANTE NETTO, A. Nutrição mineral, calagem, gessagem e adubação dos citros. **Laranja**, v. 1, n. 9, p. 1-48, 1988.
- MARCHETTI, D. A. B.; GARCIA, D. J. **Princípios de fotogrametria e fotointerpretação**. São Paulo: Nobel, 1977. p. 183-189.
- MAXWELL, K., JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659–668, 2000.
- MC ELRONE, A. J.; FORSETH I. N. Photosynthetic responses of a temperate liana to *Xylella fastidiosa* infection and water stress . **Journal of Phytopathology**, v. 152 , p. 9–20, 2004.
- MEHL, P. M.; CHEN, Y-R.; KIM, D. S.; CHAM, D. E. Development of hyperspectral imaging technique for the detection of apple surface defects and contaminations. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 67–81, 2004.
- MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; VAZ, C. M. P.; BAGNATO, V. S. **Sensor de Teor e qualidade de matéria orgânica de solo**. BR n. PI 0106477-0, 18 dez. 2001.

- MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V. S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, v. 167, n. 11, p. 739-749, 2002.
- MIR, N. A.; PEREZ, R., BAUDRY. R. M. Chlorophyll fluorescence and whole fruit senescence in 'Golden Delicious' apple. **Acta Horticulture**, v. 464, p. 121-126, 1998.
- MÜLLER, G.W.; DE NEGRI, J.D.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MATTOS JR, D.; POMPEU JR., J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; CARVALHO, S.A.; GIROTTO, L.F.; MACHADO, M.A. Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura brasileira. **Laranja**, v. 23, p. 371-386, 2002.
- MOREIRA, S. Experiências de cavalos para citrus I. **Bragantia**, v. 1, p. 525-544, 1941.
- MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: FUNDAÇÃO CARGIL. **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargil, 1980. p. 1-28.
- MOREIRA, C. S.; PIO, R. M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. S. **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargil, 1991. p. 116-152.
- MOURÃO FILHO, F. A. A. Produção de híbridos somáticos em citros. **Laranja**, v. 17, p. 179-197, 1996.
- NEVES, E. M.; BOTEON, M. , Impactos alocativos e distributivos na citricultura. **Preços Agrícolas**, v. 12, p. 3-6, 1998.
- NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, H. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 369-399, 1992.
- NIEMAN, G. J.; VAN DER B. I. J. A.; BRANDT-DE BOER, B.; BOON, J. J.; BAAYEN, R. P. Differential response of four carnations cultivars to races 1 e 2 of *Fusarium oxysporum f. sp dianthi* and to *Phlatophora cinerescens*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 38, p. 117-136, 1991a.
- OSIRO, D. ; COLETA FILHO, E. D. ; MACHADO, M A ; COLNAGO, L. A. Análise da Xylella fastidiosa por FTIR e RMN. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000, Poços de Caldas, MG. **Livro de resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2000. v. 2. p. QB011-QB011.
- PAPARGEORGIU, G. Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. In: GOVINDJEE (Ed.). **Bioenergetics of Photosynthesis**. New York: Academic Press, 1975. p. 319-371.
- PAULUS, I.; SCHREVEENS, E. Shape characterisation of new apple cultivars by Fourier expansion of digital images. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 72, p. 113-118, 1999.

PARK, B.; CHEN, Y. R. Intensified multispectral imaging system for poultry carcass inspection. **Transactions of the ASAE**, v. 37, p. 1983-1988, 1994.

POMPEU JÚNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; JORGE, J. P.N.; JACON, J. R. Competição de clones de limão 'Cravo' e de limão 'Volkameriano' como porta-enxertos para laranja 'Natal'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8., 1996, Brasília. **Anais...** Brasília: SBF, 1986. p. 147-151.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-Enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. A. **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 01, p. 265 – 280.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extract with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 975, p. 384-394, 1989.

PRADE, R. A.; ZHANG, D. F.; AYOUBI, P.; MORT, A. J. Pectines, pectinases and plant-microbe interactions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 16, p. 361-391, 1995.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978. p. 724.

RIBEIRO, R. B.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F. Growth- and leaf-temperature effects on photosynthesis of sweet orange seedlings infected with *Xylella fastidiosa*. **Plant Pathology**, v. 53, p. 334 – 340, 2004.

RIGNEY, M. P.; BRUSEWITZ, G. H.; KRANZLER, G. A. Asparagus defect inspection with machine vision. **Transactions of the ASAE**, v. 35, p. 1873-1878, 1992.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; RAYMUNDO, L. C.; LEE, T.; SIMPSON K. L.; CHICHESTER, C. O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. **Annals of Botany**, v. 40, p. 615-624, 1976.

ROMAN, M. P.; CAMBRA, M.; JUAREZ, J.; MORENO, P.; DURAN-VILA, N.; TANAKA, F. A. O.; ALVES, E.; KITAJIMA, E. W.; YAMAMOTO, P. T.; BASSANEZI, R. B.; TEIXEIRA, D. C.; JESUS JUNIOR, W. C. ; AYRES, A. J.; GIMENES-FERNANDES, N.; RABENSTEIN, F.; GIROTTO, L. F.; BOVE, J. M. Sudden death of citrus in Brazil: A graft-transmissible bud union disease . **Plant Disease**, v. 88 , p. 453-467, 2004 .

SANCHES, A. C. Conservação do solo em pomares cítricos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS – TRATOS CULTURAIS, 5., 1998, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Fundação Cargill, 1998. p. 167-187.

- SCHWEIGER, J.; LANG, M.; LICHTENTHALER, H. K. Differences in Fluorescence Excitation Spectra of Leaves between Stressed and Non-Stressed Plants. **Journal Plante Physiology**, v. 148, p. 536-547, 1995.
- SCHREIBER, U.; BILGER, W. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In: TENHUNSEN, J. D.; CATARINO, F. M.; LANGE, O. L.; OECHEL, W. C. (Eds.). **Plant Response to Stress-Functional Analysis in Mediterranean Ecosystems**. Heidelberg: Springer Verlag, 1987. p. 27-57 (NATO Advanced Science Institute Series).
- SHIRAI, Y. **Three dimensional computer vision**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. p. 297.
- SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002.
- SIMAKOVA, M. S. **Soil mapping by color aerial photography**. Jerusalén: Israel Program for Scientific Translation, 1964. p. 80.
- SONKA, M.; HLAVAC, V.; BOYLE, R. **Image processing, analysis, and machine vision**. 2. ed. Pacific grave: PWS Publishing, 1996. 770 p.
- SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Eds.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507 - 540.
- SPURR, S. H. **Photogrammetric and Photointerpretation, whi a section on applications to forestry**. New York: Ronald Press, 1960. p. 472.
- STEINER, D. Time dimension for crop surveys from space. **Photogrammetric Engineering**, v. 36, n. 2, p 187-194, 1970.
- STAGGENBORG, S. A.; FJELL, D. L.; TAYLOR, T. Using infrared images as corn scouting tool. **Agronomic Abstract**, v. 12, n. 2, p. 90-116, 2000.
- STRASBURG, G. M.; LUDESCHER, R. D. Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research. **Trends Food Science Technology**, v. 61, p. 69-75, 1995.
- SUN, D.-W. Inspecting pizza topping percentage and distribution by a computer vision method. **Journal of Food Engineering**, v. 44, p. 245-249, 2000.
- VARDI, A. Protoplast derived from different citrus species and cultivars. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v. 1, p. 149-152, 1981.
- VARDI, A.; GALUN, E. Isolation and culture of citrus protoplasts. In: BAJAJ, P. S. (Ed.). **Plant protoplasts and genetic engineering I**. Heidelberg: Springer Verlag, 1989. p. 147-159.



VARDI, A.; SPIEGEL – ROY, P. Plant regeneration from Citrusprotoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 62, p. 171-176, 1982.

VARDI, A.; SPIEGEL – ROY, P.; GALUN, E. Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. **Plant Science Letters**, v. 4, p. 231-236, 1974.

VERDADE, F. da C.; DIAS, C. A.; SILVA, G. L. S. P. da; MELLO, M. D. H. de; VICTOR, M. A. de M. **Zoneamento agrícola do Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, 1974. v. 1.

VELLIDIS, G.; KVIEN, C. K.; PERRY, C. D.; WELLS, T.; THOMAS, D. L.; VALCO, T. Cotton yield maps created from aerial photographs. In: INTERNATIONAL MEETING SPONSORED BY ASAE. 1., 1997, Toronto. **Proceedings...** Toronto: ASAE, 1997. p. 35-38.

ZAAT, S. A. J.; BRUSSEL, A. A. N. VAN ; TAK, T. Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce nodDABC gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 3388-3391, 1987.

ZÂNGARO, R. A. ; SILVEIRA JR, L. ; MANOHARAN, R. ; ZONIOS, G. ; ITZKAN, I. ; DASARI, R. R. ; DAM, J. V. ; FELD, M. S. . Rapid multiexcitation fluorescence spectroscopy system for in vivo tissue diagnosis. **Applied Optics**, v. 35, n. 25, p. 5211-5219, 1996.

ZSOLNAY, A.; BAIGAR, E.; JIMENEZ, M.; STEINWEG, B.; SACCOMANDI, F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. **Chemosphere**, v. 38, n. 1, p. 45-50, 1999.

WULF, N. A. **Caracterização enzimática das células XF-810, XF-818 e XF-2708 Xylella fastidiosa e purificação da proteína XF-818 Expressas em Escherichia coli**. 2002. 208 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CITRICULTORES. A história da laranja. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso em: 01 mar. 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CITRICULTORES. Produção de laranja. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso em: 01 mar. 2002.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Informativo: Morte Súbita dos Citros. Disponível em: <[http://www.fundecitrus.com.br/informativo/nota\\_msc\\_0206.html](http://www.fundecitrus.com.br/informativo/nota_msc_0206.html)>. Acesso em: 03 abr. 2004.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Informativo: Morte Súbita dos Citros. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/msubita.htm>>. Acesso em: 01 set. 2004.

---

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Publicações do Fundecitrus: Revista. Disponível em:<[http://www.fundecitrus.com.br/revista/fundec\\_ed121\\_pag10e11.pdf](http://www.fundecitrus.com.br/revista/fundec_ed121_pag10e11.pdf)>. Acesso em: 05 abr. 2004.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Publicações do Fundecitrus: Revista. Disponível em:<[http://www.fundecitrus.com.br/revista/fundec\\_ed119\\_pag11.pdf](http://www.fundecitrus.com.br/revista/fundec_ed119_pag11.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2004.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Publicações do Fundecitrus: Revista. Disponível em:<[http://www.fundecitrus.com.br/revista/fundec\\_ed124\\_pag12a14.pdf](http://www.fundecitrus.com.br/revista/fundec_ed124_pag12a14.pdf)>. Acesso em: 17 set. 2004.

GRAVENA. Setor de Pesquisa. Disponível em:<[http://www.gravena.com.br/dicas\\_alellyx\\_vetor\\_MSC.htm](http://www.gravena.com.br/dicas_alellyx_vetor_MSC.htm)>. Acesso em: 23 abr. 2004.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Base de Dados. Disponível em:<<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=866>>. Acesso em: 13 out. 2004.

YING, Y., JING, H., TAO, Y.; ZHANG, N. Detecting stem and shape of pears using fourier transformation and an artificial neural network. **Transactions of the ASAE**, v. 46, p. 157-162, 2003.