



DISTINÇÃO NUTRICIONAL ENTRE FOLHAS DE SOJA SADIAS E COM SINTOMA DE SOJA LOUCA II UTILIZANDO A TÉCNICA ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR LASER

A.B. Magalhães¹, P.R. Villas-Boas¹, R. Briganti¹, A.C. Ranulfi¹, L.J. M. Campos², M.C. Meyer², E. Hirose², L.M. Neto¹, D.M.B.P. Milori¹

(1) Embrapa Instrumentação, Rua XV de novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, habibe.aida@gmail.com, paulino.villas-boas@embrapa.br, re_mbs@hotmail.com, aniranulfi@gmail.com, ladislau.martin@embrapa.br, debora.milori@embrapa.br.

(2) Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, Londrina, PR, 86001-970, leonardo.campos@embrapa.br, mauricio.meyer@embrapa.br, edson.hirose@embrapa.br

Resumo: LIBS é uma técnica espectro analítica que permite identificar vários elementos em uma única medida. A sua importância para o agronegócio está na possibilidade de efetuar análise elementar em qualquer parte da planta, raiz, fruto, folha *in natura* ou em pastilhas, sem ou com pouco preparo de amostra, o que reduz custo e tempo de análise. A técnica tem ainda um alto potencial de compactação, o que permite a aplicação *in situ*. Nesse trabalho, a técnica LIBS foi aplicada em pastilhas preparadas com folhas de soja saudáveis e com sintoma de Soja Louca II (SL-II) para avaliar quais elementos variam em relação ao estado da planta, e aliada a métodos de estatística multivariada, foi possível diferenciar o estado nutricional entre os dois tipos de folhas de soja além de ajudar fitopatologistas a entender os mecanismos de atuação da anomalia.

Palavras-chave: *Glycine max*, identificação nutricional, LIBS, fotônica.

NUTRITIONAL DISTINCTION SOYBEAN LEAVES WITH AND WITHOUT SYMPTOMS OF GREEN STEM DISORDER USING LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY

Abstract: LIBS is an analytical spectroscopy technique that allows the identification of several elements in a single measurement. Its importance for agribusiness is the possibility to perform the elemental analysis in any part of the plant, root, fruit, fresh leaves or in pellets, without or with little sample preparation, minimizing cost and time of analysis. Furthermore, the technique has a high potential to be portable, which enables the *in situ* application. In this work, the LIBS technique was applied to pellets prepared with soybean leaves from symptomatic and nonsymptomatic green stem disorder plants which element vary in relation to the plant state. In this work, the LIBS technique, together with multivariate statistical methods enabled identifying the soybean leaf status beside it can help plant pathologists to understand the mechanisms in which the disorder acts.

Keywords: *Glycine max*, nutritional identification, LIBS, photonics.

1. Introdução

O agronegócio brasileiro é responsável por 33% do Produto Interno Bruto (PIB). O país é um grande produtor e exportador do complexo de soja (grão, farelo e óleo) (MAPA, 2014). Para aumentar a produtividade e reduzir desperdícios é necessário desenvolver equipamentos e sensores capazes de tornar o processo de produção no campo mais eficiente, sustentável e que leve em conta a variabilidade espacial da propriedade agrícola.

Nesse trabalho enfatizaremos a aplicação da técnica LIBS para avaliar o seu potencial na diferenciação entre amostras de folhas de soja com sintomas de Soja Louca II (SL-II) e folhas de soja sadia por meio de sua análise nutricional. A SL-II é um problema de causa desconhecida e que pode levar a perdas de 40% na produção. Ela está mais concentrada nas regiões mais quentes do Brasil como Mato Grosso, Tocantins e Goiás, mas já está se espalhando para as regiões mais temperadas no sul. O LIBS tem a vantagem de não necessitar de preparo de amostra, ou exige muito pouco preparo de amostra (RANULFI, 2014; SANTOS Jr., 2012), de modo que é possível obter análises em tempo real e sem ocorrência de contaminações secundárias, diferente do que ocorre com outras técnicas de referência comumente utilizadas para análise elementar, como ICP-OES e ICP-MS, que exigem um laborioso preparo de amostra na forma líquida por meio da digestão ácida (YAO *et al.*, 2010). Além disso, o LIBS permite a detecção de todos os elementos da tabela periódica com uma quantidade muito pequena de material, em torno de 20 µg de material analisado.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação das amostras

As amostras de folhas de soja são provenientes da região de Pedro Afonso no Tocantins. Dois conjuntos de amostras foram avaliados: amostras sadias e amostras de folhas de soja com sintomas de SL-II. Todas as folhas foram limpas com algodão umedecido em água destilada e secas. Após o processo de limpeza, as folhas foram trituradas manualmente e colocadas em uma estufa à 60°C durante 36 horas. Uma vez seca, elas passaram por um processo de moagem criogênica manual. Por fim, 3g de folhas moídas foram introduzidas em um pastilhador e prensadas à alta pressão. Foram confeccionadas 19 pastilhas com amostras de folhas sadias e 19 pastilhas de amostras de folhas com sintoma de SL-II. Foram obtidos 20 espectros por pastilha, 10 tiros em cada face, de modo a minimizar problemas com relação à heterogeneidade da amostra, já que a quantidade de material analisado pela técnica é baixa e provém de uma região muito pequena da mesma.

2.2. Instrumentação LIBS

O modelo do equipamento utilizado foi um LIBS2500, da empresa Ocean Optics, composto por um *Q-switched* laser de Nd:YAG com pulsos de 8 ns, com comprimento de onda de emissão de 1064 nm e energia máxima em torno de 50 mJ. O sistema de detecção é composto por um conjunto de sete mini-espectrômetros de alta resolução (0,1 nm), que abrange a faixa espectral que vai do ultra-violeta profundo, 189nm, até o infravermelho médio, 966 nm. Por fim, um detector tipo CCD faz o registro de cada uma das linhas espectrais. Todas as medidas efetuadas com o nosso sistema LIBS foram realizadas em atmosfera ambiente.

2.3. Tratamento dos dados: Identificação dos picos

Foi feita a identificação dos picos típicos encontrados nas amostras de folhas de soja através da base de dados do NIST. Devido ao grande número de possibilidades de classificação dos picos, a análise se concentrou nos macronutrientes: N, P, K, Ca, Mg, e micronutrientes: Fe, Si, Mn e Zn. Para a identificação das linhas espectrais, os espectros foram normalizados pela área de cada um dos sete espectrômetros. Em seguida, a média por amostra foi calculada, uma vez que para cada pastilha foram obtidos 20 espectros. Para comparar as amostras e verificar a existência de diferenças estatísticas significativas entre as médias dos dois grupos de dados utilizou-se o teste de hipótese bilateral, Teste-t, com nível de significância de 5%, ponto a ponto do espectro. Em seguida, calculou-se a área embaixo de cada curva nas regiões que apresentaram diferenças estatísticas significativas a partir de um perfil Lorentziano. Os valores de áreas foram avaliados através da análise de componentes principais (PCA) para verificar se é possível separá-los por meio de suas similaridades e diferenças. Todos esses processamentos foram realizados por meio de rotinas no software Matlab 2012.

3. Resultados e Discussão

A Figura 1 exemplifica o espectro LIBS típico da primeira região espectral obtido a partir de pastilhas preparadas com folhas de soja com SL-II e sadias. Para ambas as amostras de folhas, os elementos identificados nessa região foram C I, Mg II, Mg I, Fe I, Zn I e Si I.

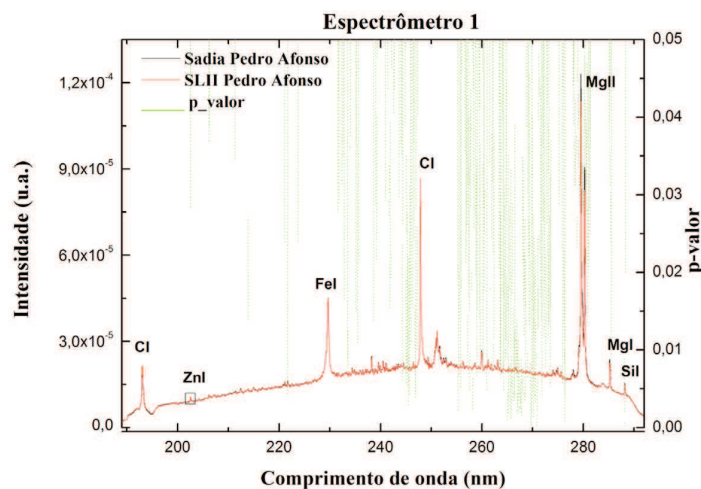


Figura 1. Espectro LIBS da primeira região espectral e alguns dos nutrientes identificados dentro desse intervalo. Em verde observa-se o resultado do $p\text{-valor} \leq 0,05$ obtido com o Teste-t.

Similarmente aos resultados da Figura 1, também foram identificados os elementos Ca, N, H, O, Na, Ti, K e Rb nas outras janelas espectrais. Uma vez que as intensidades das linhas registradas no espectro podem ser associadas à concentração desses elementos na amostra, observaram-se diferentes concentrações desses elementos entre pastilhas de folhas de soja saudias e as pastilhas de folhas com sintoma de SL-II. A Figura 2 ilustra as áreas dos picos de K I e Mg II. Observa-se que a concentração de K I é maior nas amostras de folhas com SL-II do que nas pastilhas preparadas com folhas Saudias de soja. No caso da análise das áreas do elemento Mg II, ela é maior para as amostras de folhas saudias do que para as pastilhas preparadas com amostras de folhas com SL-II.

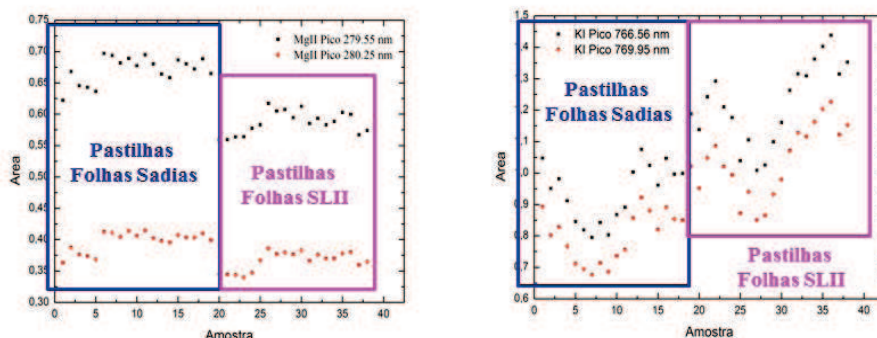


Figura 2. Área calculada através do perfil Lorentziano dos picos de K I e Mg II identificados nos espectros de folhas de soja sadia e com SL-II. Observa-se que a concentração de Mg II reduz-se na presença dos sintomas de SL-II e que a concentração de K I aumenta na folha com sintoma de SL-II.

Para o caso de elementos como Fe I, Ca I, Mg I e Si I também observou-se uma concentração maior nas pastilhas preparadas com folhas Saudias. Outros elementos como Na I e Zn I apresentaram concentração maior nas pastilhas preparadas com amostras de folhas SL-II. Dessa forma, após a aplicação do Teste-t e a determinação dos intervalos espectrais cuja média apresentou maiores diferenças estatísticas aplicou-se a análise de PCA como mostra a Figura 3, e foi possível diferenciá-las através do padrão espectral típico.

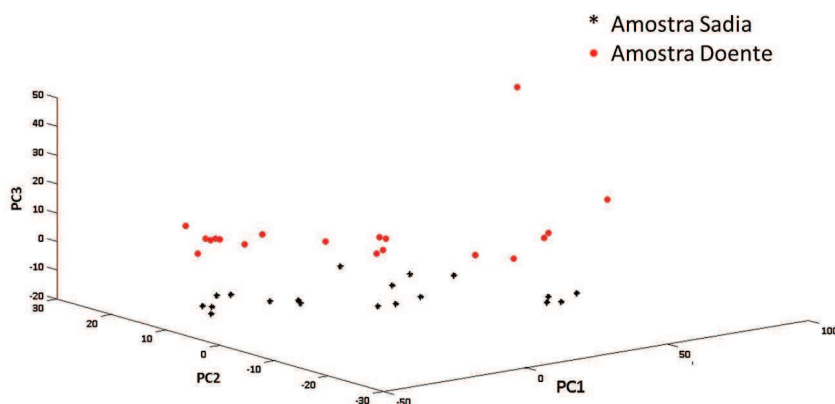


Figura 3. Análise dos componentes principais, PCA, dos dois tipos de amostras analisadas. É possível observar o reconhecimento de um padrão espectral específico de cada uma delas.

Por fim, foi construído um classificador induzido via regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) e avaliado por validação cruzada. Os resultados da classificação estão na matriz de confusão da Tabela 1. Nessa matriz, cada uma das linhas representa um tipo de amostra que está sendo classificada e a coluna representa como ela foi classificada. Através dos resultados da diagonal principal da matriz confusão, o acerto do classificador foi de 85%, mostrando o grande potencial da técnica em diferenciar a sanidade das folhas através do padrão espectral.

Tabela 1. Matriz de confusão obtida com o classificador induzido via PLSR. O acerto do classificador foi de 85%.

	Sadia	SL-II	
	85%	15%	Sadia
	15%	85%	SL-II

4. Conclusões

A utilização da técnica espectroscópica LIBS mostrou grande potencial na investigação da composição elementar das folhas e sua associação com a sanidade da planta. Foi possível encontrar um padrão típico de variação elementar característico de cada um dos grupos de folhas de soja analisadas através da análise de componentes principais. Com este estudo é possível inferir o grande potencial da técnica como uma forma alternativa de diagnóstico. Por ser uma técnica robusta e pouco complexa no que diz respeito à instrumentação, é possível o desenvolvimento de equipamentos portáteis LIBS para análises em campo. Dessa forma é possível obter resultados rápidos e em grande escala no campo, sem a necessidade de árduo e demorado preparo de amostras, e sem a produção de resíduos químicos, contribuindo para práticas sustentáveis na agricultura e facilitando o produtor no manejo diário e na tomada de decisão mais rápida.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq (projetos nº 403405/2013 e 479994/2013-7), à Fapesp (CEPOF - projeto nº 2013/07276-1) e à Embrapa (projetos 03.11.09.013.00.00 e 04.11.10.004.00.06.02) pelo apoio financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da pesquisa e das bolsas, à Embrapa Instrumentação pela infraestrutura e apoio fornecidos e à Embrapa Soja pelo fornecimento das amostras de sojas.

Referências

- MAPA. Plano Agrícola e Pecuário 2012/2013 da Secretaria de Política Agrícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.farsul.org.br/Slides/pdf/PAP2012.pdf>. Acessado em 3 de Junho de 2014.
- YAO, M.; LIU, M.; SHAO, J. and HUANG, L. Identification of Nutrition Elements in Orange Leaves by Laser Induced Breakdown Spectroscopy, Third International Symposium on Intelligent Information Technology and Security Informatics. IEEE Computer Society. 2010.
- RANULFI, A. C. Utilização de técnicas espectroscópicas no estudo e caracterização de doenças em citros: HLB (greening) e cancro cítrico. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Junho 2014.
- SANTOS, D. NUNES, L.C.; CARVALHO, G.G.A.; GOMES, M.S.; SOUZA, P.F.; LEME, F.O.; SANTOS, L. G.C.; KRUG, F.J. Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: A review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 71-72, p. 3-13, doi:10.1016/j.sab.2012.05.005, 2012.