

Capítulo 2

Aplicações agroambientais das técnicas fotônicas

Débora Marcondes Bastos Pereira Milori, Paulino Ribeiro Villas-Boas, Gustavo Nicolodelli, Aida Bebechibuli Magalhães, Jader Cabral, Bruno Marangoni, Aline Segnini, Michelle Matos Horta Tenca, Ladislau Martin-Neto

1. Introdução

Fotônica

A natureza da luz é apenas uma parte do que é necessário para vermos determinada cor de um objeto. A segunda parte da tríade tem a ver com a interação de luz e matéria, pois, quando vemos uma cor, o que estamos realmente vendo é um reflexo parcial da luz que incidiu sobre o objeto. A cor que vemos é o que sobrou do espectro incidente após parte dela ser absorvida pelo objeto. Finalmente, o terceiro e último ponto é como nossos olhos detectam essa luz refletida. Problemas de visão podem interferir na sua percepção da cor de um objeto.

Quando um feixe de luz incide sobre um objeto, ele pode sofrer os seguintes efeitos: ser total ou parcialmente transmitido; refletido ou absorvido, dependendo das propriedades físicas e químicas do material que o compõe. Esses efeitos são o resultado de processos que ocorrem a nível atômico e molecular da interação da luz (fótons) com a matéria.

A palavra “fotônica” é derivada da palavra grega *photon* que significa “luz”. Apareceu na década de 1960, após a invenção do laser, e destinava-se a descrever um novo campo de pesquisa cujo objetivo era utilizar a luz para desempenhar funções que tradicionalmente eram do domínio da eletrônica, tais como telecomunicações, processamento de informações etc. A luz ganhou força com outros desenvolvimentos como: o laser de diodo na década de 1970, as fibras óticas para a transmissão de informações e o amplificador de fibra ótica dopada com érbio. Essas invenções serviram de base para a revolução de telecomunicações do final do século 20 e como

infraestrutura para a Internet. Atualmente, a fotônica cobre uma enorme gama de aplicações da ciência e da tecnologia, incluindo a fabricação de lasers, sensores biológicos e químicos, diagnósticos médicos e terapias, tecnologia de *displays* e computação óptica.

A fotônica está intimamente relacionada com a óptica. No entanto, a óptica precedeu a descoberta de que a luz é quantizada (teorias propostas por Max Planck, Albert Einstein e Niels Bohr). Princípios fundamentais da óptica clássica, como Princípio de Huygens, as equações de Maxwell e equações de onda não dependem de propriedades quânticas da luz. Instrumentos ópticos podem incluir lentes, espelhos e vários componentes ópticos conhecidos antes de 1900. A fotônica, por outro lado, está intimamente relacionada à óptica quântica. Entretanto, a óptica quântica, muitas vezes, tem conotação de pesquisa fundamental, ao passo que a fotônica é usada para pesquisa aplicada e desenvolvimento de equipamentos. A fotônica abrange todas as aplicações técnicas da luz, considerada como radiação eletromagnética na região espectral do ultravioleta ao infravermelho, passando por todo o espectro visível.

Aplicações da fotônica estão presentes em muitas áreas, desde a vida cotidiana até a ciência mais avançada, como em viagens espaciais, telecomunicações, processamento de informações, metrologia, espectroscopia, holografia, medicina (cirurgia, correção da visão, endoscopia, fototerapia dinâmica), tecnologia militar, processamento de materiais a laser, arte visual, biofotônica, agricultura e robótica.

Assim como as aplicações da eletrônica têm se expandido desde a invenção do primeiro transistor em 1948, as aplicações de fotônica continuam a crescer desde a invenção do laser em 1960. Aplicações economicamente importantes para dispositivos fotônicos incluem gravação óptica de dados, telecomunicações por fibra óptica, impressão a laser, displays e lasers de alta potência. As aplicações potenciais de fotônica são praticamente ilimitadas e incluem a síntese química, diagnósticos médicos, comunicação de dados, defesa, energia de fusão, agricultura e meio ambiente.

Fotônica e aplicações agroambientais no Brasil

Mundialmente, muitas áreas da ciência têm se dedicado a trabalhar em problemas relacionados ao agronegócio visando tanto o aumento de produtividade quanto a sustentabilidade da produção. Biotecnologia, nanotecnologia, robótica e fotônica são exemplos de áreas de pesquisa que têm imenso potencial para alavancar ainda mais o setor.

Em particular a fotônica, considerada como uma das principais ciências do século 21, tem apresentado resultados expressivos e relevantes para o setor, que vão desde sensores ópticos simples com lasers de diodo acoplados

a tratores para controle de ervas daninhas até sofisticados sistemas de imagens hiper-espectrais via satélite para acompanhamento de produção e levantamento de propagação de doenças no campo.

Na literatura internacional o número de artigos científicos publicados para temas relacionados à fotônica aplicada à agricultura é aproximadamente dez vezes menor quando comparado a estudos direcionados na área de medicina. Os EUA lideram as pesquisas sobre fotônica aplicada à agricultura com aproximadamente 35% dos trabalhos publicados, seguido pela França (~15%) e pelo Canadá (~10%). Outra parte da produção científica está sendo desenvolvida principalmente em países como Alemanha, Austrália, Itália, Inglaterra, Japão e Espanha.

No Brasil, a aplicação da fotônica no agronegócio ainda é incipiente quando comparada aos países mencionados anteriormente. Existem poucos grupos atuando no tema dentro das universidades e dos centros de pesquisa nacionais. Dentre estes, a Embrapa Instrumentação, de forma pioneira, inaugurou o primeiro laboratório dedicado a aplicações da óptica e da fotônica na agricultura e meio ambiente, em outubro de 2003. Desde então, vem produzindo diversos trabalhos em parceria com universidades e centros de pesquisa, gerando publicações e patentes na área. A localização geográfica da Embrapa Instrumentação (sediada em São Carlos, na região central do Estado de São Paulo) permitiu que, inicialmente, houvesse uma forte interação com instituições como o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e outras unidades da Embrapa no Estado de São Paulo, viabilizando projetos em cooperação que aceleraram o desenvolvimento de pesquisas na área. Foram importantes também cooperações com universidades, tais como a Universidade de São Paulo (USP), Universidade Estadual Paulista (UNESP) e Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Atualmente, o Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação expandiu seu universo de cooperações para todo o Brasil e outros países, como os Estados Unidos, Peru, França e Itália.

Pesquisas Recentes

A agricultura de precisão vem se fortalecendo nos últimos anos, não apenas por aspectos econômicos, mas também por aspectos ambientais. Essa área da ciência preconiza que a gestão da produção agrícola considere a heterogeneidade das condições do campo e, conseqüentemente, da variabilidade espacial e temporal do sistema produtivo. Dessa forma, por exemplo, a aplicação racional de insumos, além de gerar economia para o produtor, é ambientalmente mais sustentável. Entretanto, para que seja possível mapear condições de solo, produtividade e infestação de doenças, além de sistemas georreferenciados, o desenvolvimento de instrumentação

específica para cada um desses fatores torna-se imprescindível. A instrumentação para aplicações em agricultura e precisão deve possuir características de portabilidade e pouco preparo da amostra, para que possa permitir medidas em campo, e se possível, medidas em sistemas embarcados. A demanda por esse tipo de instrumentação para acompanhar processos em todos os passos da agroindústria tem crescido muito nos últimos anos. Além disso, o monitoramento ambiental também tem demandado novas ferramentas que permitam o acompanhamento em tempo real para que se possa fazer intervenções rápidas visando a mitigação de impactos ambientais.

Neste capítulo serão abordados alguns tópicos relevantes voltados ao desenvolvimento de instrumentação com alto potencial de portabilidade e utilização em campo ligados à fotônica com aplicações nos setores agropecuário e ambiental.

2. Técnicas fotônicas disponíveis na Embrapa Instrumentação

Cada faixa de energia do espectro eletromagnético interage com a matéria de uma forma específica. Apenas como exemplo, as vibrações moleculares absorvem energia na região do infravermelho e as transições eletrônicas nas regiões do visível e ultravioleta. Quando se mede a intensidade da radiação absorvida ou emitida pela matéria como função da energia, tem-se um espectro característico da amostra, o qual está intimamente ligado às propriedades químicas do material analisado. Essa área da ciência se chama espectroscopia e é uma ferramenta muito poderosa, tanto na ciência como em desenvolvimentos tecnológicos. A seguir faremos uma descrição básica de algumas técnicas fotônicas que estão baseadas em espectroscopia e imagens que se destacam para aplicações agroambientais.

Espectroscopia de Absorção e Refletância de Luz UV-Visível

A espectroscopia de luz ultravioleta (UV) compreende a região espectral que vai de 100 nm a 700 nm. A luz nessa faixa espectral, aplicada a uma determinada amostra, permite extrair informações sobre a composição química desse material por meio da quantidade de radiação que é absorvida ou refletida (SKOOG et al., 2006). Dependendo do comprimento de onda da luz irradiada, os elétrons das moléculas do material podem absorvê-la efetuando transições para estados eletrônicos mais energéticos. Por esse motivo, a técnica também recebe o nome de espectroscopia eletrônica.

Quando o estado eletrônico da molécula sofre alteração devido à absorção de um fóton de luz, a intensidade total da luz transmitida diminui. As moléculas que absorvem luz na região do visível são chamadas de

cromóforas. A lei de Beer-Lambert, uma forma empírica de quantificar a absorção da luz em um determinado meio óptico, afirma que a quantidade de luz que é absorvida nesse processo é proporcional à concentração da molécula na substância, ao caminho total percorrido pela luz na amostra e a um coeficiente de absorção que é próprio para cada transição eletrônica molecular. Assim, quanto maior a concentração do elemento na substância em estudo, mais luz é absorvida. Podemos equalizar esse comportamento utilizando a equação 1 abaixo:

$$A = a \cdot c \cdot d \quad (1)$$

onde A é a absorbância da luz, quantificada pela expressão: $A = -\log\left(\frac{P_1}{P_0}\right)$ sendo respectivamente P_0 e P_1 a potência da radiação incidente e a potência depois de atravessar o meio. O valor c corresponde à concentração da molécula absorvente no meio, d a distância percorrida pela luz dentro do meio e a é o coeficiente de extinção molar, característico de cada substância.

Dessa maneira, considerando as amostras sempre em uma cubeta de tamanho fixo, a quantidade de luz absorvida dependerá somente da concentração da molécula de interesse e do coeficiente de extinção molar, que é uma constante para cada elemento. A Figura 1 ilustra a absorção da luz passando por uma amostra de tamanho “ d ”. A luz incidente com potência P_0 é atenuada para P_1 , sendo $P_1 < P_0$.

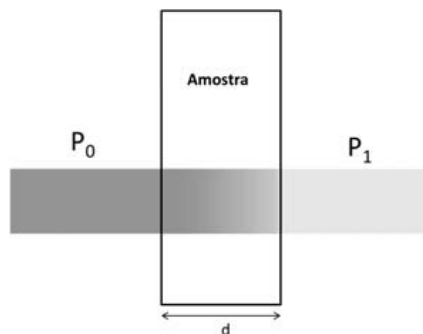


Figura 1. Esquema de absorção da luz incidente ao passar por uma amostra em uma cubeta. A potência incidente P_0 é maior que a absorvida ($P_0 > P_1$).

Assim, pela equação (1), medindo a absorbância “ A ”, sabendo o tamanho da cubeta utilizada “ l ” e o coeficiente de extinção molar “ a ”, é possível determinar a concentração molecular na substância analisada. Outra forma de quantificação é a realização de uma curva de calibração. Como a absorção depende de vários fatores, tais como: temperatura, natureza do solvente, pH da solução e da presença de uma outra substância que interfira no

processo, o método mais preciso é a realização de uma calibração. Devido a essa sensibilidade, as variáveis experimentais devem ser cuidadosamente controladas para possibilitar a identificação e a quantificação das substâncias.

Quando o comprimento da luz é condizente com a energia de transição do elétron na molécula, como visto, ocorre a absorção de energia. Utilizando uma radiação incidente com uma largura espectral grande o suficiente de modo a abranger uma região de interesse, é possível realizar uma varredura espectral e determinar qual região sofreu maior absorção. A Figura 2 ilustra um gráfico de absorção. Na imagem, temos uma região de aumento na absorbância com a representação de um ponto máximo, região onde ocorre uma transição molecular.

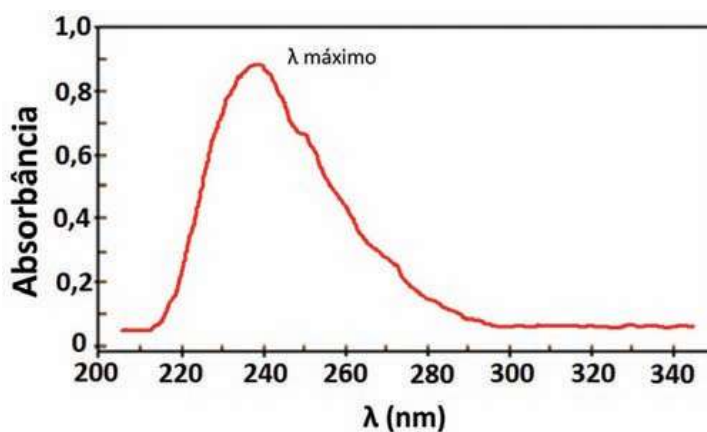


Figura 2. Imagem representando um gráfico de absorbância.

Os valores encontrados de λ_{\max} podem ser correlacionados às transições de uma dada molécula e são úteis para determinar os grupos funcionais dentro de uma molécula. As aplicações da técnica são utilizadas comumente na quantificação de diferentes analitos, como macromoléculas biológicas, íons de metais de transição e compostos orgânicos.

Espectroscopia de Fluorescência

Após a absorção de luz, uma molécula pode permanecer no estado excitado por um período de tempo da ordem de alguns nanosegundos (10^{-9} s). Nesse intervalo de tempo, se a molécula possuir muitos modos vibracionais e/ou rotacionais, ou se estiver numa solução em que a probabilidade de colisões seja muito alta, a energia pode ser totalmente dissipada. Entretanto, se ela for suficientemente rígida ou estiver numa solução em baixa concentração, de tal forma que pouca energia seja dissipada, haverá a emissão de luz com uma energia menor do que a incidente. Esse fenômeno se chama

fluorescência. Na Figura 3 (a) temos uma ilustração do processo físico. É importante ressaltar que o mesmo composto pode terminar o processo em um estado vibracional diferente, uma vez que a emissão de fluorescência tem uma certa probabilidade de ocorrer para cada estado vibracional, que é diferente de um estado para o outro. Desta forma, os espectros de emissão de moléculas orgânicas geralmente são bandas largas. Na Figura 3 (b) temos um exemplo de um espectro de emissão típico de uma molécula orgânica.

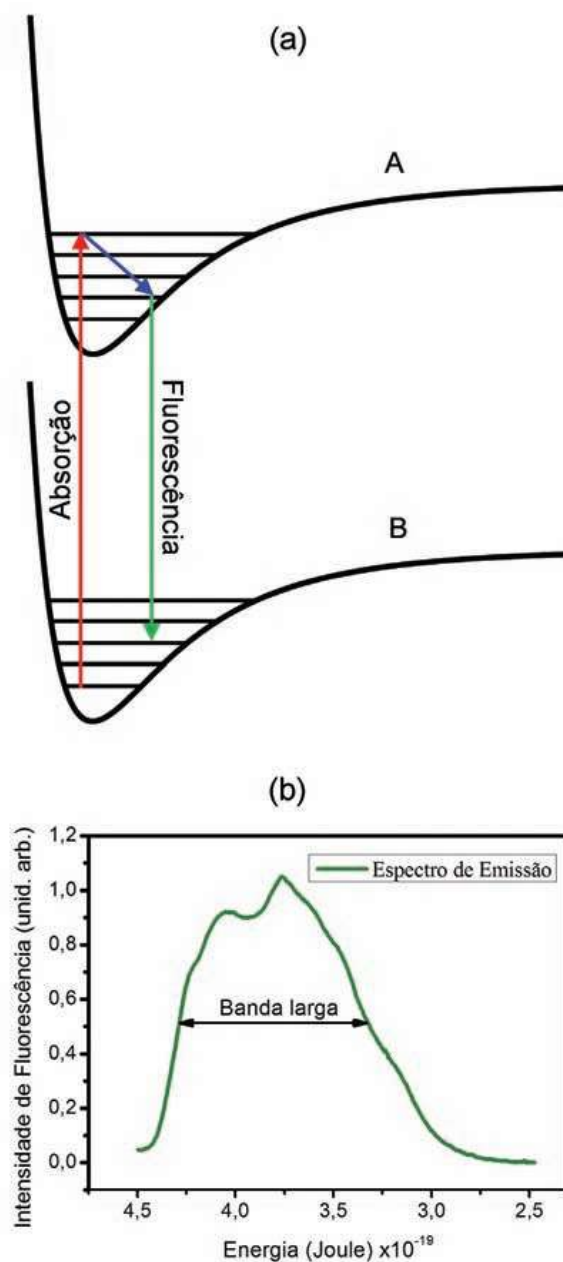


Figura 3. (a): Processo físico envolvido na espectroscopia de fluorescência, onde A e B representam o estado eletrônico fundamental e excitado, respectivamente. Os números representam os estados vibracionais. (b): Típico espectro de emissão de fluorescência para uma amostra de solo.

A espectroscopia de fluorescência é amplamente utilizada nos estudos de estruturas moleculares. Como vantagens, ela apresenta a não destruição da amostra além de sua alta sensibilidade. Seu campo de atuação em temas agroambientais é extremamente vasto, sendo utilizada no estudo de matéria orgânica do solo, no diagnóstico precoce de doenças em plantações, na identificação do grau de contaminação de recursos hídricos etc. As moléculas que emitem fluorescências são designadas por fluoróforos. Nos solos, os grupos funcionais que estão presentes nas substâncias húmicas (HS) representam os principais fluoróforos da matéria orgânica do solo (MOS) (MILLORI et al., 2006). No caso das folhas, eles são representados pelos pigmentos fotossintéticos, como a clorofila e carotenoides.

O termo espectroscopia de fluorescência convencional é utilizado na literatura quando a fonte de luz é uma lâmpada; já o termo LIFS, do inglês *Laser Induced Fluorescence Spectroscopy*, é utilizado quando a fonte é um laser. Nesse caso, uma melhor relação sinal-ruído é obtida devido às características peculiares dos lasers, como alta intensidade, direção e oscilação do campo eletromagnético bem definidos (polarização e coerência) (PARKER; REES, 1962).

O sinal de fluorescência possui uma forte dependência com as características moleculares da amostra (absortividade) e com concentração do fluoróforo. Além disso, para certos materiais, pode haver também uma redução do sinal de fluorescência devido a processos competitivos de absorção da luz por outros cromóforos existentes na amostra e/ou reabsorção da fluorescência pela própria molécula (efeito de filtro interno – *inner filter effect*).

Espectroscopia de Infravermelho (NIRS e FTIR)

Como as demais técnicas espectroscópicas, ela pode ser utilizada na elucidação de estruturas moleculares complexas, bem como na determinação de grupos funcionais e na identificação de compostos químicos.

Diferentemente das radiações nas regiões do ultravioleta e do visível, que, ao incidirem sobre uma molécula, causam transições eletrônicas, a radiação infravermelha promove alterações nos modos rotacionais e vibracionais das moléculas (SILVERSTEIN et al., 2006). Por meio dessa técnica espectroscópica podem ser observadas as oscilações do eixo (estiramentos) e do ângulo (deformações) das ligações entre os átomos de um grupo funcional (Figura 4). Esses grupos podem ser identificados no espectro desde que apresentem um momento de dipolo (diferença de polaridade entre os átomos de uma molécula), por exemplo, aqueles contendo oxigênio. A espectroscopia de infravermelho é, porém, difícil de ser interpretada diretamente pela combinação das suas bandas fundamentais, devido a vários problemas como: sobreposição de suas bandas, desvios da lei de Beer, irreprodutibilidade da linha de base, ruídos instrumentais elevados e baixa sensibilidade.

A Espectroscopia de Infravermelho próximo (NIRS) é uma técnica espectroscópica que detecta as vibrações harmônicas e combinações de vibrações fundamentais (SKOOG et al., 2006). O termo “*infravermelho próximo*” advém da faixa espectral em que a NIRS atua: depois do vermelho em 10.000 cm^{-1} até 4.000 cm^{-1} . Para resolver os problemas inerentes à espectroscopia de infravermelho, a calibração multivariada tem sido aplicada para análise quantitativa de amostras utilizando a técnica NIRS (MADARI et al., 2005; MILORI et al., 2011). Algumas aplicações relevantes com resultados promissores para a técnica são: predições de carbono e nitrogênio do solo (MADARI et al., 2005), avaliação da textura de solos (FERRARESI et al., 2012; MARTIN-NETO et al., 2009) e avaliação da densidade de solos (MOREIRA et al., 2009). Sendo assim, NIRS é um método reproduzível e de baixo custo para a análise quantitativa com alto potencial de aplicação em campo (MILORI et al., 2011; SHEPHERD; WALSH, 2007).

Deformações Axiais



Deformações Angulares

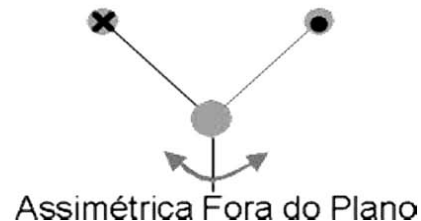
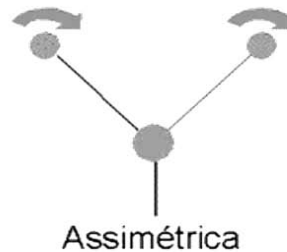
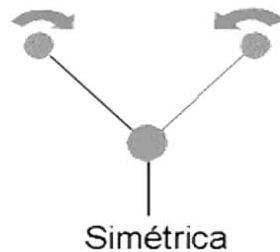


Figura 4. Modos de vibração molecular, característicos da Espectroscopia de Infravermelho. Os sinais X e • indicam movimentos para dentro e para fora do plano do desenho, respectivamente. Oscilações do eixo (estiramentos) e do ângulo (deformações) das ligações entre os átomos de um grupamento funcional.

No Infravermelho médio (região entre 4.000 cm^{-1} e 400 cm^{-1}), usualmente se utiliza a transformada de Fourier para tratamento dos dados, e assim essa técnica ficou conhecida pelo acrônimo FTIR. A utilização de equipamentos

mais modernos também favoreceu o avanço da técnica, permitindo acúmulo de vários espectros em poucos segundos e maior entrada de energia em relação aos instrumentos dispersivos, que são conhecidos como prismas, redes de difração, fendas etc. (BARBOSA, 2007). Aplicações agroambientais importantes da FTIR são: caracterização de substâncias húmicas de solos sob diferentes manejos agrícolas (GONZÁLEZ PÉREZ et al., 2004; MARTIN-NETO et al., 2009) e diagnóstico de doenças em plantas utilizando folhas *in natura* (CARDINALI et al., 2012).

LIBS - Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Laser

A técnica de espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser, LIBS, do inglês *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*, assume um papel emergente na análise e na identificação da composição elementar de materiais. Com a habilidade de analisar e identificar elementos químicos em tempo real em materiais sólidos, líquidos ou gasosos, a técnica LIBS se mostra versátil e com potencial de medidas *in situ*, uma vez que não necessita de um rigoroso processo de preparação da amostra, o que ainda elimina a produção de resíduos químicos ou produtos de combustão (SANTOS et al., 2012).

Na técnica LIBS, a amostra recebe energia de pulsos de laser extremamente curtos, que variam de um alguns femtossegundos (10^{-15} s) a alguns nanossegundos (10^{-9} s), em uma pequena região, da ordem de décimos de milímetro. Essa incidência energética remove uma pequena porção do material, tipicamente no intervalo de picogramas (10^{-12} g) até nanogramas (10^{-9} g), o que induz a produção de um plasma. Aos olhos do espectroscopista, o plasma é visto como uma faísca de luz branca vinda da região onde o laser incide no material.

Inicialmente, o plasma é gerado a uma temperatura de 100.000 °C e, após alguns microssegundos (10^{-6} s), atinge 5.000 °C a 20.000 °C. Essa alta temperatura inicial é capaz de quebrar as ligações químicas do material (breakdown), produzindo assim íons, espécies atômicas e moleculares neutras, excitadas e ionizadas que emitem luz em linhas bem definidas após algumas dezenas de nanossegundos da produção do plasma. Essa luz emitida é então coletada por uma lente e/ou fibra óptica e examinada por um monocromador (espectrômetro). Como resultado, obtemos “uma impressão digital do material”, um conjunto de linhas de emissão, que, juntas, formam o que chamamos de espectro de emissão LIBS.

A posição da linha de emissão identifica o elemento presente na amostra e, com uma calibração apropriada, a intensidade da linha nos permite quantificar esse elemento. A Figura 5 ilustra uma montagem experimental básica da técnica LIBS.

Geralmente, o espectro LIBS utilizado na análise é uma média de vários espectros adquiridos (vários pulsos de laser), uma vez que cada pulso de laser gera um plasma e um espectro. Desse modo, uma maior acurácia e precisão são obtidas (SILVA et al., 2008). A calibração do espectro LIBS pode ser feita utilizando algumas técnicas de referência, como o ICP (*Inductively coupled plasma*) ou CHNS, ou usar alguns picos do próprio espectro como referência, técnica conhecida como *calibration free* (PEREIRA et al., 2010).

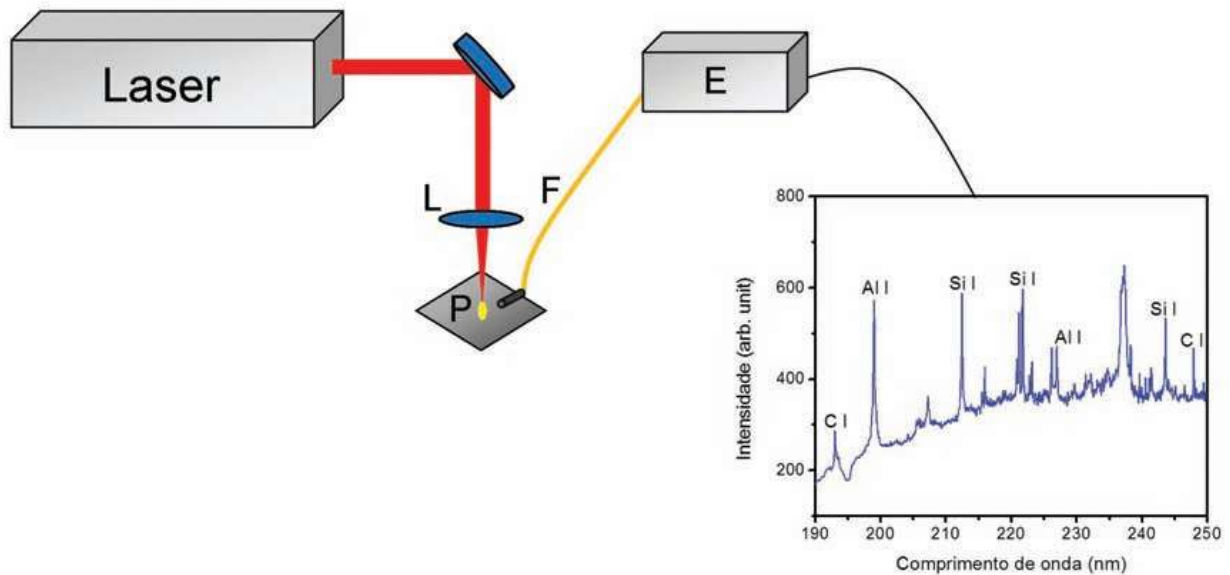


Figura 5. Montagem experimental básica da técnica LIBS. L: lente de focalização dos pulsos de laser; P: plasma gerado na amostra; F: fibra óptica de coleta da luz emitida pelo plasma e E: espectrômetro. Um típico espectro LIBS é mostrado após a detecção do espectrômetro com algumas linhas identificadas.

Imagens

Muitos estudos têm sido realizados para alavancar a instrumentação agropecuária e ampliar o entendimento de informações provenientes das alterações do metabolismo em plantas em decorrência de estresses bióticos e abióticos em lavouras ou para monitorar a qualidade de ambientes aquáticos por meio da distribuição de fluorescência de algas (CHAERLE et al., 2003; PEREIRA et al., 2011a, 2011b; WALKER et al., 2002). Existem diversos sistemas de imagens utilizados para esse fim, como: imagens de fluorescência, imagens termais, imagens multiespectrais e hiperespectrais. Esses métodos são interessantes por não serem invasivos e não necessitarem de preparo de amostra (JENSEN, 2009; KIM et al., 2003; LICHTENTHALER; MIEHÉ, 1997). Existem muitos tipos de dispositivos de

imagem que permitem o monitoramento ambiental como as câmeras digitais, microscópios de fluorescência, lupas, sensores multiespectrais e hiperespectrais, entre outros, utilizados para esse fim. Como exemplo, essas medidas podem ser feitas por meio do sensoriamento remoto via satélite, por sistemas embarcados em VANT's e por sistemas radar-laser acoplados em LIF-LIDAR (BARBOSA, 2003).

Cada tipo de imagem retorna dados característicos, cujas necessidades de uso dependerão das aplicações propostas. Por exemplo, uma rápida visualização de estresses bióticos em plantas pode ser definida por meio de uma análise conjunta de imagens de fluorescência e termal, pois podem informar as alterações de fotossíntese, transpiração ou ambas (CHAERLE et al., 2003). Alguns exemplos de informações extraídos de imagens são: as perdas de atividades fotossintéticas e o teor metabólico secundário; os crescimentos estruturais de uma superfície e as características de pigmentação; e as características de transpiração e congelamento (CHAERLE; STRAETEN, 2001).

O espectro de fluorescência medido em folha traduz a concentração dos pigmentos fotossintéticos como clorofilas e carotenoides, que são os fluoróforos da folha, e são um importante indicador da saúde e vitalidade da planta (PEREIRA et al., 2011a, 2011b). Além disso, a técnica tem pouca dependência com relação à morfologia e anatomia da folha de forma que qualquer alteração no espectro da fluorescência foliar obtido com esse sistema é com relação a alguma adversidade que acomete a planta, como pragas e doenças (KIM et al., 2003; LICHTENTHALER; MIEHÉ, 1997). Ao ser excitada no ultravioleta, a folha apresenta uma banda larga de emissão no azul e no verde, que está relacionada com alguns constituintes, como a lignina e o ácido ferúlico, e uma outra banda na região espectral do vermelho e infravermelho, em torno de 670-680 nm e 730-740nm (KIM et al., 2003; LICHTENTHALER; MIEHÉ, 1997), que correspondem à emissão característica da clorofila. Por meio da fluorescência foliar é possível diagnosticar e diferenciar doenças que apresentam características sintomáticas muito similares ou com período de latência muito prolongado, pois ela é capaz de detectar alterações químicas e físicas provocadas na planta. Dessa forma, a fluorescência foliar passa a ser uma impressão digital dos processos que estão ocorrendo na planta, uma vez que a manifestação de doenças e pragas apresenta características muito peculiares diferentemente de quando investigadas somente com inspeção visual.

O laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação possui dois sistemas para obtenção de imagens e já os utilizou para o diagnóstico de doenças em citros, demonstrando o potencial dessa técnica (PEREIRA et al., 2011a, 2011b). O primeiro sistema obtém as imagens de fluorescência com um estereomicroscópio modelo Lumar V12 (fabricante Zeiss), e as amostras de plantas saudáveis e doentes são excitadas na região do UV com uma

lâmpada de mercúrio e um filtro óptico passa banda que permite selecionar a banda de excitação com máximo em 365 nm e largura de 20 nm. O estereomicroscópio está conectado a um computador dedicado para essa análise e o programa computacional utilizado é fornecido pelo fabricante (PEREIRA et al., 2011a).

O segundo sistema obtém imagens de fluorescência induzida por laser (LIFI), como mostrado na Figura 6. Para isso, o sistema é constituído por um laser de diodo emitindo em 473 nm, uma lente divergente, um filtro passa banda e uma câmera digital Sony de 8 megapixels (PEREIRA et al., 2011b). O filtro passa banda impede a passagem da luz azul utilizada para excitar a clorofila e permite que as bandas verdes e vermelhas passem por ela. Esse sistema de imagem de fluorescência funciona da seguinte forma: a luz emitida pelo laser é expandida pela lente divergente, o que aumenta a área de incidência do feixe sobre a folha. Após ser excitada, a folha emite luz principalmente nas regiões espectrais verde, vermelho e infravermelho.

Aliado aos sistemas de imagem de fluorescência, o sensoriamento da radiação infravermelha termal, dentro do intervalo de 8-14 microm, auxilia na identificação específica de estresses em plantas a partir de suas características termais e poluição em corpos d' água.

As alterações térmicas devido a estresses bióticos em plantas correspondem principalmente às alterações no seu processo de transpiração. A transpiração e a troca de gases na planta são controladas pelos estômatos, que podem ser compreendidos como diminutas válvulas localizadas na epiderme das folhas da planta (CHAERLE; STRAETEN, 2001; CHAERLE et al., 2003). Em caso de estresse hídrico, por exemplo, os estômatos fecham para retenção da água, o que conseqüentemente reduz a transpiração da folha. Nesse caso, um pequeno aumento de temperatura na superfície da folha é observado. Dessa forma, a termografia é muito útil para monitorar instantaneamente e remotamente a funcionalidade dos estômatos da planta.

Os sistemas multiespectrais e hiperespectrais registram a energia refletida ou emitida de uma área de interesse em múltiplas bandas do espectro eletromagnético (JENSEN, 2009). Nessas imagens observa-se uma assinatura espectral para cada tipo de material analisado, ou seja, variações específicas de intensidade com o comprimento de onda (ALMEIDA, 2008; STEFFEN et al., 1996). A folha verde absorve luz na região visível do espectro solar preferencialmente nas bandas azuis e vermelhas, devido aos pigmentos da folha como as clorofilas e os carotenoides. Sendo assim, na região do visível, a maior reflectância está concentrada na banda do verde (ALMEIDA, 2008; STEFFEN et al., 1996). Na região do infravermelho, a maior reflectância está no infravermelho próximo e é o resultado da interação da radiação com a estrutura superficial da folha e com a água (ALMEIDA, 2008; STEFFEN et al., 1996; CHAERLE; STRAETEN, 2001; LENK et al., 2007). Portanto, alterações da curva

de reflectância resultam mudanças no desenvolvimento, estresses bióticos e abióticos da planta (ALMEIDA, 2008; STEFFEN et al., 1996; CHAERLE; STRAETEN, 2001; LENK et al., 2007).

Para o levantamento da curva espectral de folhas verdes, o laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação possui uma câmera espectral da Specim Imaging Ltda. que, integrada a ela possui um espectrômetro V10E, que trabalha dentro do intervalo 400-1.000 nm com resolução espectral nominal de 2,8 nm, e uma câmera Hamamatsu de 1.344 x 1.024 pixels. Tanto o espectrômetro como a câmera estão alinhados e calibrados a uma base comum. Na parte frontal desse sistema, foi incluído uma unidade de scanner que permite varrer objetos estacionários em um laboratório ou em campo. O scanner possui um motor de passo de grande precisão e gira um espelho de alta qualidade localizado em frente à lente da câmera de forma a construir, linha por linha, a imagem espectral completa do objeto.

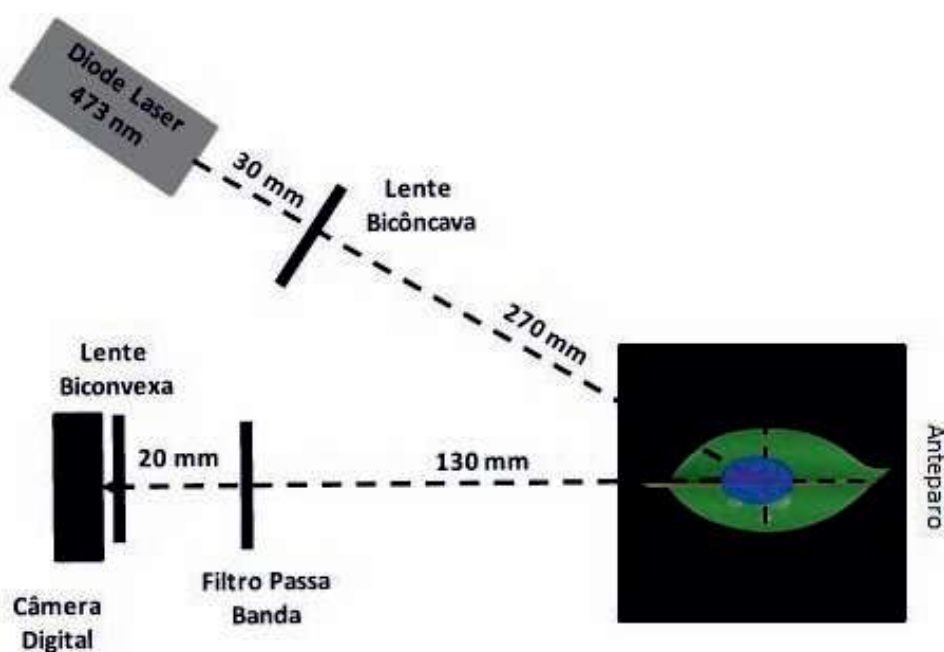


Figura 6. Esquema do sistema de Imagem de fluorescência montado nos laboratórios de Óptica e Laser da Embrapa Instrumentação.

3. Aplicações das técnicas fotônicas

Mudanças climáticas e carbono do solo

A importância dos estudos de matéria orgânica do solo (MOS) e substâncias húmicas vem crescendo de forma muito significativa no Brasil e no mundo. Esse crescimento deriva de várias questões relevantes e, entre elas, está a necessidade de um melhor entendimento sobre o ciclo de carbono

no planeta. A constatação é que, com o aumento da concentração de gás carbônico e de outros gases do efeito estufa por ações antrópicas, a temperatura do planeta está aumentando, por conseguinte, potencializando mudanças climáticas globais. Assim, o desafio para a redução das emissões dos chamados gases do efeito estufa é uma importante questão para a humanidade. O solo é o terceiro maior reservatório de carbono do nosso planeta, e por meio das atividades agrícolas, podemos utilizá-lo como sumidouro de carbono da atmosfera via fotossíntese e sequestro de carbono no solo. O sequestro de carbono caracteriza-se pela conversão do dióxido de carbono da atmosfera em massa vegetal por meio da fotossíntese das plantas. Por meio de um manejo adequado dessa biomassa pode-se reter parte do carbono no solo (LAL, 2004).

Devido à extensão do território brasileiro e o seu potencial agrícola, com relevantes atividades agrosilvopastoris, o manejo adequado do solo pode impactar positivamente o balanço de carbono do sistema produtivo brasileiro. A incorporação de carbono no solo e os mecanismos físico-químicos de sua estabilização demandam estudos sobre as substâncias húmicas, a porção mais recalcitrante da MOS. A avaliação quantitativa e qualitativa do carbono no solo tem sido fundamental em diversas áreas da ciência do solo, e as técnicas fotônicas merecem destaque por apresentar algumas vantagens comparadas com técnicas tradicionais. O potencial dessas técnicas para medidas *in situ* é enorme, podendo se transformar em ferramentas interessantes para análises ambientais. Além disso, a ausência ou o pouco preparo da amostra fazem dessas técnicas também um atrativo para aplicação em larga escala, seguindo os preceitos da Química Verde, ou seja, métodos analíticos nos quais é reduzido ou eliminado o uso e a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente. Métodos espectroscópicos, como NIRS, LIBS e LIFS, têm conseguido unir precisão, exatidão, simplicidade, rapidez, pequena geração de resíduos e custo acessível para a análise de solos.

Madari et al. (2005) utilizaram a NIRS na determinação quantitativa do carbono total e do nitrogênio em amostras de solos e estimaram o mecanismo de acúmulo de carbono afetado pela dinâmica estrutural do solo em sistemas de manejo convencional, conservacionista e em florestas naturais secundárias. A NIRS também foi avaliada na estimativa de distribuição do tamanho de partícula do solo e agregação. Ferraresi et al. (2012) utilizaram a espectroscopia de NIRS para quantificar matéria orgânica e textura de solos utilizando calibração multivariada, na qual foi possível diferenciar solos de classes distintas, locais de coletas, manejos dos solos e textura. Moreira et al. (2009) mostraram a potencialidade de aplicação da técnica para a estimativa da densidade de solo. Silva et al. (2008) utilizaram sistemas LIBS de bancada e portátil no desenvolvimento de metodologia para quantificação

de carbono em solo, empregando modelos de regressão linear simples e crescimento exponencial. A curva de calibração obtida conseguiu fazer a predição do teor de carbono de amostras desconhecidas com um erro em torno de 0,1%.

Dentro do contexto de caracterização da MOS e para obter informações estruturais do carbono, a LIFS tem se mostrado bastante sensível e com resultados bastante promissores (SEGNINI et al., 2010, 2013). Milori et al. (2006) estudaram o uso da LIFS em amostras de solo para avaliar o índice de humificação da MOS (H_{LIFS}) e obtiveram correlações significativas com os índices de humificação propostos anteriormente para ácidos húmicos dissolvidos (MILORI et al., 2002). Os autores concluíram que o sinal de fluorescência emitido por uma amostra de solo excitado com radiação entre o azul e o ultravioleta próximo é devido às estruturas mais complexas da matéria orgânica do solo, cuja concentração aumenta durante o processo de humificação da MOS. Segnini et al. (2010) mostraram que, para os solos de turfeiras andinas, o grau de humificação da MOS avaliado por um equipamento de LIFS portátil possui uma correlação de aproximadamente 90% com o número de radicais livres do tipo semiquinona dos ácidos húmicos extraídos desse solo medidos com a Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica. Em outro experimento, Segnini et al. (2013) utilizaram a LIFS para a avaliação da humificação da MOS em sistemas de manejo convencional e plantio direto em plantações de cana-de-açúcar crua do estado de São Paulo. Os resultados mostraram que o revolvimento do solo no sistema de plantio convencional foi responsável pelos maiores valores de H_{LIFS} , principalmente na camada de 0-20 cm, onde ocorreu o revolvimento. Os resultados mostraram que o plantio direto incorpora material orgânico, entretanto, o acúmulo de carbono observado é bastante frágil em função do baixo grau de humificação da MOS (Figura 7). A manutenção da palha na superfície do solo e a adoção de plantio direto nas plantações de cana-de-açúcar são estratégias que podem promover o sequestro de carbono, no entanto, o manejo não pode ser descuidado em função da labilidade do material incorporado. Esse tipo de sistema tende a crescer no Brasil com resultados promissores para o setor.

Quantificação de nutrientes e contaminantes no solo

Nutrientes em solos

O desenvolvimento de métodos precisos e rápidos para medir os nutrientes do solo e da planta é importante para aumentar a produtividade da agricultura, bem como reduzir os custos de produção. Para determinar a concentração de nutrientes no solo, a prática comum para os agricultores é coletar amostras do solo de lavouras e transportá-los aos laboratórios de

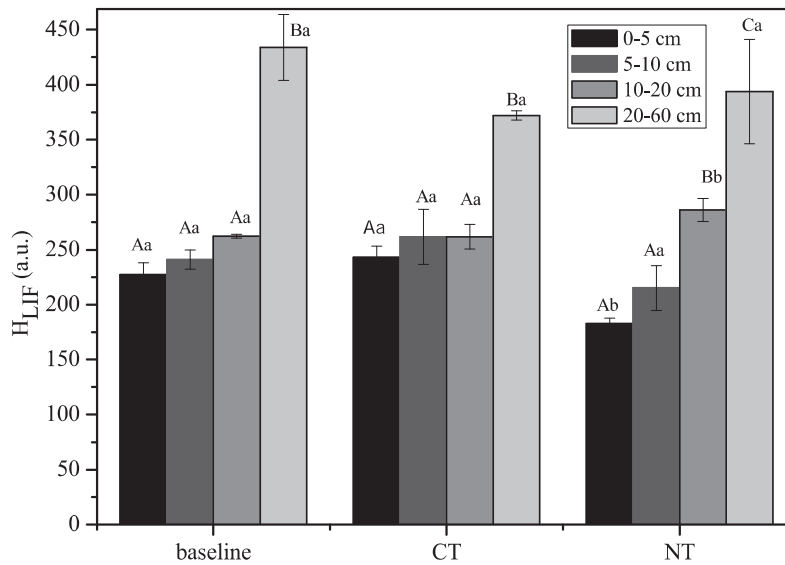


Figura 7. Valores de humificação da matéria orgânica do solo (H_{LIF}) obtidos por Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS) em diferentes profundidades de solo e sistemas de manejo: referência (amostragem anterior ao estabelecimento dos sistemas de manejo), plantio convencional (PC) e plantio direto (PD). Valores médios para 3 repetições. Letras maiúsculas comparam índices de todas as profundidades para cada sistema de manejo e letras minúsculas comparam os índices referentes à mesma profundidade para todos os sistemas de manejo. Valores médios seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente (pelo teste de Tukey: $p < 0,05$).

Fonte: Segnini et al. (2013).

análise de solo especializados. Uma vez que os resultados estão disponíveis (normalmente depois de uma ou duas semanas), os agricultores podem ajustar a aplicação de adubo conforme a necessidade de cada região. Técnicas convencionais para análises de solos são demoradas e caras, e as variáveis que afetam o rendimento das culturas não podem ser modificadas e otimizadas em tempo real.

Embora técnicas eletromagnéticas, óticas, mecânicas, acústicas e eletroquímicas estejam atualmente disponíveis para a caracterização de solos, são poucas as tecnologias que podem avaliar a concentração de nutrientes em solos em tempo real. Muitos pesquisadores concordam sobre a necessidade de novas tecnologias para determinar as propriedades do solo *on-the-fly*, de acordo com os requisitos da agricultura de precisão (AP). Tecnologias, tais como (LIBS), que obtêm os resultados em tempo real poderiam satisfazer as demandas analíticas da AP (DÍAZ et al., 2012).

Em um único espectro LIBS é possível obter informação qualitativa acerca da composição da amostra. Entretanto, a análise quantitativa exige um modelo confiável de calibração analítica. Métodos quimiométricos vêm sendo aplicados a diferentes métodos analíticos e a técnica LIBS tem sido

cada vez mais associada a esses métodos, a fim de melhorar o seu desempenho analítico em relação à curva de calibração padrão (SIRVEN et al., 2006). Técnicas quimiométricas, tais como: análise de componentes principais (PCA), mínimos quadrados parciais (PLS) e rede neural artificial (RNA) têm sido aplicadas para extrair informação espectral em diferentes técnicas analíticas (FERREIRA et al., 2008). Por exemplo, a utilização da RNA como uma estratégia de calibração para determinação de Cu em amostras de solo, utilizando um sistema LIBS portátil. Outro exemplo é o método Multilayer perceptron (MLP), um tipo de RNA que também pode ser utilizado como um modelo de calibração para as determinações analíticas. O método MLP associado à técnica LIBS foi aplicado com sucesso na estimativa de Ba, Co, Cu, Mn, Ni, V e Zn em dois tipos de solos para estudos de sustentabilidade (FERREIRA et al., 2011). Outras formas de análise quantitativas são aplicadas em LIBS, como os métodos que empregam algoritmo *calibration free* (sem o uso de curvas de calibração), proposto em (CIUCCI et al., 1999), têm sido aplicados para reduzir os efeitos da matriz em solos.

Contaminantes em solos

O termo “traços de elementos” é amplamente utilizado na literatura e existe um consenso geral em considerar como traço de um elemento a ocorrência no ecossistema em concentrações mínimas (menos do que 0,1%) (SENESI et al., 2009). Muitas vezes, esse termo refere-se a elementos que são essenciais ou tóxicos em pequenas quantidades para microrganismos, organismos vegetais e animais, incluindo seres humanos. No caso dos contaminantes ou poluentes, a definição de traço de elemento é usada quando suas concentrações, apesar de pequenas, são superiores aos seus níveis naturais. Entre os traços de contaminantes mais prejudiciais para o solo são Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn e vários outros.

O solo é unanimemente considerado como um dos reservatórios mais importantes dos metais pesados liberados por atividades humanas. Análise de metais pesados de solos naturais e poluídos é geralmente realizada por meio da utilização de espectroscopia de absorção atômica (AAS) ou espectroscopia de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) em extratos de solos adequadamente obtidos. Nos últimos anos, a técnica emergente (LIBS) tem sido amplamente aplicada, com o aumento do sucesso para a análise qualitativa e quantitativa de um certo número de metais pesados em amostras de solo, com simplificação relevante das metodologias convencionais (SENESI et al., 2009). Porém, a técnica ainda requer mais estudos antes ser aplicada para qualquer tipo de amostras de solo. Senesi et al. (2009) mostraram que a presença do teor de metais pesados, principalmente cromo, em solos e lamas de depuração pode ser medida de forma

adequada pela técnica LIBS. Também foi demonstrada a linearidade existente entre os sinais de LIBS normalizados e as concentrações de diversos metais pesados determinados por ICP.

Sirven et al. (2006) investigaram a concentração de cromo de um solo usando uma análise de redes neurais de espectros LIBS. O potencial de redes neurais para a classificação qualitativa de três solos diferentes foi investigada e comparada com PCA. As redes neurais mostram-se ser mais eficazes com uma taxa de identificação correta de 100%.

Avaliação de fertilizantes

O uso de fertilizantes na agricultura tem crescido substancialmente nos últimos anos. O principal motivo é a necessidade de aumento na produtividade agrícola para acompanhar o crescimento populacional. Os fertilizantes podem ser de origem orgânica ou inorgânica e são responsáveis por repor os principais nutrientes necessários à planta, como o nitrogênio (N), o fósforo (P) e o potássio (K). A maior parte do fertilizante produzido vem de recursos não renováveis e sua aplicação de forma otimizada é muito importante. Para isso, é muito importante o desenvolvimento de técnicas que informem a quantidade de nutrientes nos fertilizantes.

Uma das técnicas que são utilizadas para tal finalidade é a espectroscopia de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). O processo se dá por meio de um plasma de argônio à temperatura de aproximadamente 7.000 K. A amostra de fertilizante é então lançada no interior do plasma em forma de neblina e, ao entrar em contato direto com o plasma, ocorrem as emissões de luz com comprimentos de onda característicos dos átomos presentes no material. Analisando a luz que é emitida, conseguimos precisar quais elementos e em que quantidade estão presentes no material. Apesar dessa técnica apresentar um resultado confiável, não é uma medida ágil e barata, pois a amostra passa por um processo de digestão em ácido e em forno micro-ondas, demorando algumas horas e gerando resíduos que não são de simples descarte.

Outra técnica que vem sendo bastante empregada é o LIBS, acrônimo para *laser induced breakdown spectroscopy*. A Embrapa Instrumentação tem dado grande atenção ao potencial dessa técnica com a obtenção de um LIBS comercial e a montagem de um LIBS duplo pulso, que aumenta em até uma ordem de grandeza a sensibilidade da medida.

Em um trabalho recente, desenvolvido em 2012 por pesquisadores da Arábia Saudita (FAROOQ et al., 2012), foi feito um estudo específico utilizando LIBS em fertilizantes. Com apenas alguns tiros de laser, foram capazes de detectar as abundâncias relativas de mais de quinze elementos químicos presentes em um determinado tipo de fertilizante (DAP – *Diammonium*

phosphate). Isso foi feito por meio da análise de várias linhas de emissão para os vários elementos presentes nos fertilizantes. Ponderando a intensidade de cada linha medida em relação aos cálculos da mecânica quântica que indicam a intensidade prevista para cada transição, é possível descobrir um valor que será proporcional a sua concentração relativa no fertilizante. Assim, por exemplo, é possível descobrir que a concentração de fósforo em uma determinada amostra é duas vezes mais alta que a de manganês, apenas dividindo os valores obtidos para duas linhas de transição correspondentes a cada elemento. Se fizermos a razão para todos os elementos e assumirmos que a soma da concentração desses elementos é 100%, é possível descobrir a distribuição completa dos elementos no fertilizante com apenas alguns tiros de laser. Esse é um resultado muito importante para a análise de fertilizantes, contudo esse tipo de análise se restringe a amostras não muito complexas, ou seja, com poucos elementos químicos presentes. Para análises no Brasil, há grande interesse em se trabalhar com fertilizantes orgânicos também, que apresentam maior complexidade na sua composição, necessitando de uma abordagem diferenciada.

Com o intuito de incluir fertilizantes orgânicos e organominerais nas quantificações elementares, a Embrapa tem se dedicado com afinco nas pesquisas em LIBS. Nosso objetivo é utilizar uma abordagem diferenciada ao analisar o espectro fornecido pelo LIBS de forma a incluir tanto amostras mais complexas como as simples nas análises, englobando todo o tipo de fertilizante existente. Com uma abordagem mais robusta, o foco do estudo se baseia na análise dos macronutrientes para a planta, que são N (nitrogênio), P (fósforo) e K (potássio). Nesse processo, os fertilizantes são triturados, peneirados e prensados formando pastilhas antes de serem submetidos ao LIBS. Após pastilhado, o fertilizante é inserido em uma câmara protegida na qual ocorrem os disparos do laser e a aquisição do espectro. Em seguida são selecionadas as regiões do espectro onde estão as linhas dos elementos para efetuar a análise. A Figura 8 mostra a região para os três macronutrientes em questão (N, P, K).

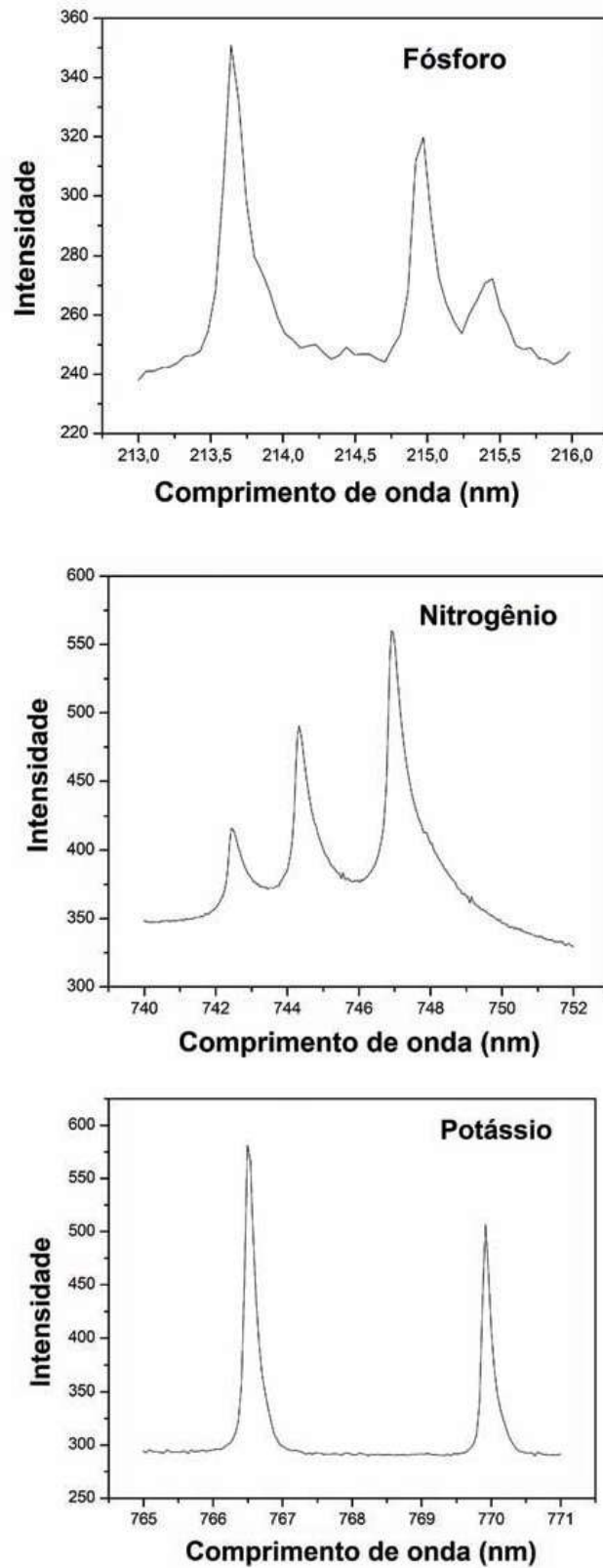


Figura 8. Linhas de emissão para N, P, K.

A linha de emissão, como dito anteriormente, é proporcional à concentração do elemento na amostra. Com análises que envolvem a normalização e a correção dos espectros para a obtenção da área de cada linha, é possível correlacionar o valor da área com a concentração do elemento no fertilizante, que é obtida por meio de uma técnica padrão (geralmente o ICP) e assim montar uma curva de calibração. Uma vez determinada a curva de calibração, a concentração dos elementos é medida diretamente no LIBS de maneira rápida e barata, sem a necessidade de preparo complexo das amostras. Assim, por meio dessa correção das linhas, consegue-se eliminar a influência da complexidade da amostra e medir a concentração dos elementos para fertilizantes orgânicos, organominerais e minerais. O próximo objetivo é utilizar essas técnicas de análise para montar um equipamento portátil que execute tais medidas em solo *in situ* e forneça ao produtor rural a medida dos principais componentes dos fertilizantes e possibilite também o mapeamento da propriedade rural, identificando as deficiências e permitindo o uso consciente do fertilizante, aumentando a produtividade.

Diagnóstico de estresses bióticos e abióticos em plantas

Atualmente, devido às doenças causadas por bactérias e vírus, as alternativas dos produtores são as inspeções das áreas agrícolas, eliminação de plantas contaminadas e pulverizações para controle de vetores. Todas essas medidas acarretam aumento no custo de produção. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoce de doenças, valendo-se de técnicas que permitam respostas rápidas e de baixo custo, visando o monitoramento e o controle da infestação. Quando uma planta está doente, as propriedades físicas e químicas de suas folhas são alteradas. Essas alterações podem ser monitoradas por técnicas fotônicas aplicadas em órgãos da planta (CHAERLE et al., 2003; LICHTENTHALER; MIEHÉ, 1997).

As plantas são constituídas por importantes fluoróforos, como os pigmentos fotossintéticos, clorofila, carotenoides e outros metabólitos secundários, como cafeína e flavonoides. Ao excitar uma folha com luz ultravioleta ou azul, ela emitirá uma fluorescência alargada com um máximo em 450 nm e um pico em 530 nm, além dos dois picos característicos da emissão da clorofila em 680 nm e 740 nm (KIM et al., 2003; LICHTENTHALER; MIEHÉ, 1997). O estudo da fluorescência emitida por uma folha traz informações valiosas a respeito da distribuição e irregularidades da atividade fotossintética da folha, além de ser capaz de monitorar a captação de herbicidas pela planta ou simplesmente como um indicador de estresses bióticos e abióticos das plantas (CHAERLE et al., 2003).

Há 10 anos, o Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação vem testando com sucesso algumas técnicas fotônicas para

diagnosticar algumas doenças dos citros, como CVC, HLB e cancro (CARDINALI et al., 2012a; PEREIRA et al., 2010, 2011a, 2011b). Essa cultura foi escolhida por ser alvo constante de pragas e doenças capazes de causar danos irreversíveis ao setor. Entretanto, essas técnicas também estão sendo expandidas para outras culturas, como soja (BEBEACHIBULI et al., 2013), feijão, mamão, cana-de-açúcar e algodão.

Atualmente, o diagnóstico mais confiável para o *Citrus Greening* é a análise de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Nesse método o diagnóstico da doença é feito baseado na análise molecular das folhas de plantas suspeitas em busca do DNA (ácido desoxirribonucleico) da bactéria causadora do *Citrus Greening* (*Candidatus Liberibacter ssp*). Entretanto, a detecção do DNA da bactéria por PCR convencional só é possível em folhas sintomáticas. Para o diagnóstico em folhas assintomáticas (sem sinais visíveis da doença), existe uma variação mais sensível da técnica, chamada PCR de tempo real, cuja sensibilidade é pelo menos 2.000 vezes maior comparada à técnica convencional, e consegue diagnosticar a doença dois meses antes de os sintomas aparecerem (TEIXEIRA et al., 2008).

As principais técnicas fotônicas utilizadas no laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação para determinar estresse biótico em plantas foram: Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS), Imagens de Fluorescência (LIFI), Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) e por Espectroscopia de absorção infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Para a avaliação do potencial de cada técnica fotônica, as medidas foram realizadas com três classes de folhas: saudáveis (controle), doentes sintomáticas e doentes assintomáticas. Os espectros de cada classe foram armazenados em um banco de dados e por meio de mineração de dados e modelos de classificação os dados foram avaliados para diferenciar as três classes. Para a validação, outro conjunto de amostras foi utilizado para testar o modelo.

O princípio do LIFS está fundamentado em avaliar a emissão de fluorescência de folhas de citros (parte representativa da planta para estudo de metabolismo) como indicativo da condição da planta (saudável ou contaminada) (CARDINALI, 2012). O método permite diagnosticar precocemente a doença de forma rápida e viável em larga escala. Resultados dessa técnica apontam taxa de acerto em torno de 83% na capacidade de diferenciação entre as doenças CVC e HLB e 93% de diferenciar entre uma planta doente HLB e uma saudável.

A técnica de imagem de fluorescência foi testada em folhas de citrus saudáveis, doentes sem sintoma e doentes com sintoma de HLB. A técnica foi muito promissora em diferenciar folhas saudáveis, com e sem sintoma de HLB (PEREIRA et al., 2011a, 2011b). A Figura 9 apresenta um exemplo de imagem

de fluorescência obtida com o sistema experimental LIFI. Por meio da análise de 10 descritores de cores, R, G, B, H, S, V, Rr, rG, rB e L das imagens de fluorescência, foi calculado o valor-t pelo teste-t de Student. As informações obtidas a partir dos valores médios para o descritor verde, G, forneceram variações suficientes para determinar a condição da planta. Com a técnica foi possível diagnosticar plantas doentes após o primeiro mês de inoculação.

Em outro trabalho foi utilizada a Espectroscopia de absorção infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e um classificador PLS para diagnosticar duas doenças: *Huanglongbing* (HLB) e *Citrus Variegates Chlorosis* (CVC) em folhas *in natura* (CARDINALI et al., 2012; CARDINALI, 2012). A combinação FTIR e PLS permitiu identificar cada uma das classes com um acerto de 94%, diferenciando folhas saudáveis de HLB-assintomáticas com uma taxa de acerto superior a 95%.

Por meio da investigação de alterações nutricionais do citros usando o LIBS, é possível não apenas diagnosticar, mas também diferenciar doenças de déficits nutricionais, como ocorre entre os sintomas do HLB e os de déficit nutricional por Zn (PEREIRA et al., 2010). Utilizando o sistema LIBS de bancada, foram investigados os constituintes inorgânicos de folhas de citros saudáveis e doentes inoculadas com HLB. A novidade do método proposto é que a composição inorgânica obtida com o LIBS torna-se uma impressão digital das folhas saudáveis e doentes. Utilizando ferramentas de quimiometria, foi possível construir um modelo de calibração capaz de diagnosticar efetivamente 90% das amostras com nível de significância de 95%.



Figura 9. Imagens de fluorescência obtidas com o sistema experimental LIFI.

Sistemas aquáticos

A produção de pescados cresce em importância no cenário internacional por ser a fonte de proteína animal que mais cresce em consumo no mundo. Estudos da FAO indicam que o consumo mundial de pescados cresceu 13% entre 2004 e 2009, e as estimativas dos Estados Unidos – 2012, indicam que a demanda global por esses produtos irá aumentar 70% em 30 anos. O aumento de renda e a demanda por proteínas vem assegurando o crescimento do consumo mundial de pescados. Estimativas do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e da Organização Mundial de Alimentos (FAO, 2012), citadas por Sidonio et al. (2012), indicam que a capacidade de produção do Brasil poderá atingir até 20 milhões de toneladas por possuir grande potencial produtivo para a aquicultura, considerando a sua extensão costeira e dimensão territorial. O Brasil dispõe de 13% da água doce do planeta, incluindo áreas alagadas artificialmente pela construção de barragens de hidroelétricas que possibilitam a produção em tanques-rede em águas da União, bem como áreas para produção de viveiros escavados (ITUASSÚ, 2013; SIDONIO et al., 2012).

A criação de peixes surge como uma opção de diversificação para o produtor rural. No Brasil, a maior parte das atividades relacionadas com piscicultura ocorre em propriedades rurais comuns e, na grande maioria, em fazendas dotadas de açudes e represas (ITUASSÚ, 2013). Além dos viveiros de rede dos açudes, os viveiros escavados vêm ganhando destaque. Com seis meses o produtor já começa a ter sua primeira produção e a rentabilidade gira em torno de 30%, já que não requer muita mão de obra.

Segundo o autor Daniel Rabello Ituassú (2013), um dos requisitos fundamentais para garantir a sobrevivência, o desenvolvimento dos peixes e a boa qualidade da proteína que será consumida é certificar a qualidade da água, assegurando que diferentes parâmetros de qualidade de água, como pH, transparência, oxigênio dissolvido, quantidade regulada de Ca^{+2} e Mg^{+2} , amônia, nitrito, estejam dentro dos limites recomendados.

O uso crescente de fertilizantes na agricultura pode causar um enriquecimento artificial nos ecossistemas aquáticos por aporte de nutrientes, como nitrogênio e fósforo. Essa eutrofização propicia a proliferação excessiva de algas e cianobactérias potencialmente tóxicas nos corpos hídricos usados nos viveiros e leva a mudanças em todos os níveis tróficos do ecossistema. As cianobactérias, por exemplo, são microrganismos procariontes e fotossintetizantes (com fotosistema I e fotosistema II) e frequentemente encontradas sobre o ambiente aquático eutrofizado com coloração verde azulada. Elas oferecem sérios riscos à saúde do viveiro, uma vez que são hidrossolúveis, e passam pelo sistema de tratamento convencional. Elas, inclusive, são resistentes à fervura (LONDE et al., 2005; OGASHAWARA et al., 2013).

O transporte de elementos químicos dos pesticidas das áreas cultivadas até rios e lagos pela água da chuva culmina no processo de contaminação das águas, uma vez que pesticidas possuem metais pesados que causam efeitos ecotoxicológicos cumulativos ao longo da cadeia alimentar. Esses contaminantes possuem a particularidade de adsorver as partículas mais finas do solo, e os efeitos desses agentes ao longo do tempo representam um grande risco para a saúde pública, sendo necessários o monitoramento e a vigilância desses produtos em águas (JAVARONI et al., 1999).

Deste modo, é de suma importância a realização de monitoramento e estudos ambientais (FERREIRA et al., 2009; FERREIRA et al., 2011; MILORI et al., 2011; PEREIRA et al., 2010), que podem ser feitos por meio do diagnóstico óptico, pelo uso de sistemas de imagem de fluorescência (BARBOSA, 2003; PEREIRA et al., 2011a, 2011b) e pela técnica LIBS. As imagens de fluorescência permitem, em tempo real, entender a dinâmica dos organismos fotossintéticos, como fitoplâncton e cianobactérias em ambientes de água doce, enquanto que a técnica LIBS permite análise elementar de amostras de água e sedimentos para determinação de contaminantes. Ambas as técnicas são rápidas e ambientalmente limpas, pois não requerem o uso de reagentes para o preparo de amostras e apresentam grande potencial para aplicação em campo. Particularmente para o Brasil, é muito importante iniciativas de pesquisas associadas ao desenvolvimento de sensores e sondas para monitoramento de sistemas aquáticos, que tenham foco nos contaminantes oriundos das atividades agrícolas do país.

4. Considerações finais

As técnicas ópticas e fotônicas possuem um potencial enorme para o desenvolvimento de instrumentação para campo. Os trabalhos científicos de desenvolvimento de métodos, as provas de conceito das aplicações na agricultura e monitoramento ambiental podem ser encontrados em número crescente, tanto na literatura internacional como em bancos de dados de patentes. Atualmente, o maior desafio para o Brasil nessa área é promover a criação de empresas e recursos humanos que atuem no desenvolvimento de produtos fotônicos para as aplicações agroambientais, para que se possa fechar o ciclo da inovação. Somente quando esses desenvolvimentos ganharem os mercados e os campos é que se poderá avaliar os impactos dessas pesquisas científicas. Conceitualmente, a racionalização da aplicação de insumos, o diagnóstico precoce de doenças e o monitoramento ambiental é um benefício econômico e ambiental, mas como será o futuro com sensores embarcados que efetivamente permitam essas análises rápidas? Somente a prática vai responder. São os produtores que irão definir quais tecnologias realmente podem

fazer a diferença no setor produtivo. Mas para isso, elas precisam ser testadas. O Brasil precisa valorizar o trabalho realizado em suas universidades e institutos de pesquisa que trabalham com as demandas locais, pois serão essas inovações que poderão fazer a diferença competitiva no cenário econômico mundial.

Referências

- ALMEIDA, T. S. **Respostas espectrais da soja sob diferentes condições hídricas e de preparo do solo**. 2008. 100 p. Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- FERREIRA E. C., ANZANO J. M., MILORI D. M., FERREIRA E. J., LASHERAS R. J., BONILLA B., MONTULL-IBOR B., CASAS J., MARTIN NETO L. Multiple Response Optimization of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Parameters for Multi-element Analysis of Soil Samples. **Applied Spectroscopy**, New Market, v. 63, n. 9, p. 1081-1088, 2009.
- BARBOSA, P. C. C. **Aplicações de Fluorescência Induzida por Laser em Monitoramento Ambiental**. 2003. 139 p. Tese (Doutorado em Física) – Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2003.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 189 p.
- BEBEACHIBULI, A. et al. Potencialidades da Fluorescência Induzida por Laser para a Detecção de Stress Biótico e Abióticos em folhas de soja: primeiros resultados experimentais. In: 2º CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOSSANIDADE – 2º CONBRAAF, 2013, Jaboticabal, SP. **Resumo dos Anais...** Jaboticabal, SP: [s.n.], 2013.
- CARDINALI, M. C. D. B. et al. Infrared spectroscopy: a potential tool in huanglongbing and citrus variegated chlorosis diagnosis. **Talanta**, [S. l.], v. 91, p. 1-6, 2012. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.01.008.
- CARDINALI, M. C. do B. **Diagnóstico de Huanglongbing (HLB) em citros utilizando técnicas fotônicas**. 2012b. 117 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Física, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- CHAERLE, L.; STRAETEN, D. van der. Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. **Biochimica et biophysica acta**, [S. l.], v. 1519, n. 3, p. 153-66, 2001.
- CHAERLE, L.; VALCKE, R.; STRAETEN, D. van der. Imaging Techniques in Plant Physiology and Agronomy: from simple to multispectral approaches. In: HEMANTARANJAN, A. (Ed.). **Plant Physiology and Plant Molecular: Biology in the New Millennium**. [S. l.]: Scientific Publishers (India), 2003. p. 422.
- CIUCCI, A. et al. New Procedure for Quantitative Elemental Analysis by Laser-Induced Plasma Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, New Market, v. 53, n. 8, p. 960-964, 1999. DOI: 10.1366/0003702991947612.
- DÍAZ, D.; HAHN, D. W.; MOLINA, A. Evaluation of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) as a Measurement Technique for Evaluation of Total Elemental

Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura

Concentration in Soils. **Applied Spectroscopy**, New Market, v. 66, n. 1, p. 99-106, 2012. DOI: 10.1366/11-06349.

FAROOQ, W. A. et al. Elemental analysis of fertilizer using laser induced breakdown spectroscopy. **Optics and Spectroscopy**, [S. l.], v. 112, n. 6, p. 874-880, 2012. DOI: 10.1134/S0030400X12060082.

FERRARESI, T. M.; SILVA, W. T. L.; MARTIN-NETO, L. Espectroscopia de infravermelho na determinação da textura do solo (1). **Revista Brasileira de Ciência de Solo**, Viçosa, v. 36, p. 1769-1777, 2012.

FERREIRA, E. C. et al. Artificial neural network for Cu quantitative determination in soil using a portable Laser Induced Breakdown Spectroscopy system. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [S. l.], v. 63, n. 10, p. 1216-1220, 2008. DOI: 10.1016/j.sab.2008.08.016.

FERREIRA, E. C. et al. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for multielemental determination in soils under sewage sludge application. **Talanta**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 435-440, 2011. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.04.001.

GONZÁLEZ PÉREZ, M. et al. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ¹³C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. **Geoderma**, Amsterdam, v. 118, n. 3-4, p. 181-190, 2004. DOI: 10.1016/S0016-7061(03)00192-7.

ITUASSÚ, D. R. O cultivo de peixes em pequenas propriedades. In: GUERIN, N.; ISERNHAGEN, I. (Eds.). **Plantar, criar e conservar: unindo produtividade e meio**. 1. ed. São Paulo: ISA, Embrapa, 2013. p. 123-137.

JAVARONI, R. C. A.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. **Química nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 58-64, 1999.

JENSEN, J. R. **Remote Sensing of the Environment on earth resource perspective**. Tradução José Carlos Neves Epiphânio. 2. ed. São José dos Campos, SP: [s.n.], 2009. p. 598.

KIM, M. S.; LEFCOURT, A. M.; CHEN, Y.-R. Multispectral Fluorescence Imaging Techniques for Nondestructive Food Safety Inspection. **SPIE**, Providence, v. 5271, 2003. Disponível em: <<http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=834097>>. Acesso em: 5 dez. 2013.

LAL, R. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. **Geoderma**, Amsterdam, v. 123, n. 1-2, p. 1-22, 2004. DOI: 10.1016/j.geoderma.2004.01.032.

LENK, S. et al. Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 807-814, 2007. DOI: 10.1093/jxb/erl207.

LICHTENTHALER, H. K.; MIEHÉ, J. A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. **Trends in plant science**, Maryland Heights, v. 2, n. 8, p. 6-10, 1997.

- LONDE, L. R.; NOVO, E. M. L. M.; CALIJURI, M. C. Avanços no estudo do comportamento espectral do fitoplâncton e identificação remota de algas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 12., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: INPE, 2005.
- MADARI, B. E. et al. Mid and Near-Infrared Spectroscopic Determination of Carbon in a Diverse Set of Soils from the Brazilian National Soil Collection. **Spectroscopy Letters**, Oxfordshire, v. 38, n. 6, p. 721-740, 2005. DOI: 10.1080/00387010500315876.
- MARTIN-NETO, L. et al. EPR, FTIR, Raman, UV-visible light absorption and fluorescence spectroscopies in studies of humic substances. In: SENESI, N.; B. XING, B.; HUANG, P. M. (Eds.). **Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009. p. 651-728.
- MILORI, D. M. B. P. et al. Humification degree of soil humic acids determined by Fluorescence Spectroscopy. **Soil Science**, [S. I.], v. 167, n. 11, p. 739-749, 2002.
- MILORI, D. M. B. P. et al. Organic matter study of whole soil samples using Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy. **Soil Science Society of America Journal**, [S. I.], v. 70, n. 1, p. 57, 2006. DOI: 10.2136/sssaj2004.0270.
- MILORI, D. M. P. B. et al. Emerging techniques for soil carbon measurements. In: WOLLENBERG, E. et al. (Eds.). **Climate change, mitigation and agriculture**. Londres: Earthscan, 2011. p. 252-262.
- MOREIRA, C. S. et al. Near infrared spectroscopy for soil bulk density assessment. **European Journal of Soil Science**, [S. I.], v. 60, n. 5, p. 785-791, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2389.2009.01170.x.
- OGASHAWARA, I.; ALCÂNTARA, E. H.; TUNDISI, J. G. Detecção de ficocianina por meio de imagens Landsat TM e ETM+ em no reservatório de Guarapiranga, SP. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO – SBSR, 2013, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: INPE, 2013.
- PARKER, C.; REES, W. Fluorescence spectrometry. A review. **Analyst**, [S. I.], v. 87, n. 10, p. 83-111, 1962.
- PEREIRA, F. M. V. et al. Evaluation of the effects of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on inoculated citrus plants Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) and chemometrics tools. **Talanta**, [S. I.], v. 83, n. 2, p. 351–356, 2010. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.09.021.
- PEREIRA, F. M. V. et al. Fluorescence images combined to statistic test for fingerprinting of citrus plants after bacterial infection. **Analytical Methods**, [S. I.], v. 3, n. 3, p. 552, 2011a. DOI: 10.1039/c0ay00538j.
- PEREIRA, F. M. V. et al. Laser-induced fluorescence imaging method to monitor citrus greening disease. **Computers and Electronics in Agriculture**, [S. I.], v. 79, n. 1, p. 90-93, 2011b. DOI: 10.1016/j.compag.2011.08.002.

SANTOS, D. et al. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for analysis of plant materials: A review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [S. l.], v. 71-72, p. 3-13, 2012. DOI: 10.1016/j.sab.2012.05.005.

SEGNINI, A. et al. Spectroscopic assessment of soil organic matter in Wetlands from the High Andes. **Soil Science Society of America Journal**, [S. l.], v. 74, n. 6, p. 2246, 2010. DOI: 10.2136/sssaj2009.0445.

SEGNINI, A. et al. Carbon stock and humification index of organic matter affected by sugarcane straw and soil management. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 5, p. 321-326, set./out. 2013.

SENESI, G. S. et al. Heavy metal concentrations in soils as determined by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), with special emphasis on chromium. **Environmental research**, [S. l.], v. 109, n. 4, p. 413-420, 2009. DOI: 10.1016/j.envres.2009.02.005.

SHEPHERD, K.; WALSH, M. Review: Infrared spectroscopy — enabling an evidence-based diagnostic surveillance approach to agricultural and environmental management in developing countries. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, Chichester, v. 15, n. 2, p. 1, 2007. DOI: 10.1255/jnirs.716.

SIDONIO, L. et al. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 35, p. 421-463, 2012.

SILVA, R. M. et al. Total carbon measurement in whole tropical soil sample. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [S. l.], v. 63, n. 10, p. 1221-1224, 2008. DOI: 10.1016/j.sab.2008.09.003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. Tradução Ricardo Bicca De Alencastro. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. p. 508.

SIRVEN, J.-B. et al. Qualitative and quantitative investigation of chromium-polluted soils by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy combined with neural networks analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, [S. l.], v. 385, n. 2, p. 256-262, 2006. DOI: 10.1007/s00216-006-0322-8.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. 6. ed. Belmont, CA: Thomson Brooks, 2006.

STEFFEN, C. A.; MORAES, E. C.; GAMA, F. F. Radiometria Óptica Espectral. In: SIMPÓSIO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 1996, Salvador. **Anais...** Salvador: INPE, 14-19 de abril, 1996.

TEIXEIRA, D. C. et al. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and cellular probes**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 139-50, 2008. DOI: 10.1016/j.mcp.2007.12.006.

WALKER, R. F.; ISHIKAWA, K.; KUMAGAI, M. Fluorescence-assisted image analysis of freshwater microalgae. **Journal of microbiological methods**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 149-162, 2002.