



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

NELSON FELIPE OLIVEROS MESA

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA EM MUDAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR POR MEIO DE IMAGENS
ESPECTRAIS**

CAMPINAS – SP

2018

NELSON FELIPE OLIVEROS MESA

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA EM MUDAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR POR MEIO DE IMAGENS
ESPECTRAIS**

Dissertação de mestrado submetida à
banca examinadora para obtenção do
título de Mestre em Engenharia
Agrícola, na área de concentração de
Água e Solo.

Orientadora: Prof. Dr. Barbara Janet Teruel Mederos

Coorientador: Prof. Dr. Rodolpho César Dos Reis Tinini

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO NELSON
FELIPE OLIVEROS MESA, E
ORIENTADA PELA PROF. DR.
BARBARA JANET TERUEL MEDEROS

CAMPINAS - SP

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 132405/2016-4
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1782-7082>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

M56a Mesa, Nelson Felipe Oliveros, 1992-
Avaliação do teor de clorofila em mudas de cana-de-açúcar por meio de
imagens espectrais / Nelson Felipe Oliveros Mesa. – Campinas, SP : [s.n.],
2018.

Orientador: Barbara Janet Teruel Mederos.
Coorientador: Rodolpho Cesar dos Reis Tinini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Engenharia Agrícola.

1. Processamento de imagens. 2. Reflectância. 3. Fluorescência. 4.
Quimiometria. 5. Cana-de-açúcar. 6. Mudas. I. Teruel Mederos, Barbara Janet,
1966-. II. Tinini, Rodolpho Cesar dos Reis, 1987-. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Chlorophyll content evaluation in sugarcane seedlings through
spectral images

Palavras-chave em inglês:

Images processing

Reflectance

Fluorescence

Chemometrics

Sugarcane

Seedlings

Área de concentração: Água e Solo

Titulação: Mestre em Engenharia Agrícola

Banca examinadora:

Barbara Janet Teruel Mederos [Orientador]

Edson Eiji Matsura

Caio Bruno Wetterich

Data de defesa: 08-03-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Agrícola

Este exemplar corresponde a redação final da **dissertação de mestrado** defendida por **Nelson Felipe Oliveros Mesa**, aprovada pela Comissão Julgadora em 08 de março de 2018, na Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

FEAGRI

**Prof. Dr. Barbara Janet Teruel Mederos – Presidente e
Orientador
FEAGRI/UNICAMP – Campinas**

**Prof. Dr. Edson Eiji Matsura – Membro Titular
FEAGRI/UNICAMP – Campinas**

Faculdade de
Engenharia Agrícola
Unicamp

**Prof. Dr. Caio Bruno Wetterich– Membro Titular
IFNMG – Januária**

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do discente.

DEDICATÓRIA

A mis padres y mi hermano: Yolanda, Nelson y David
por su apoyo incondicional y ejemplo de constancia.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me abençoar durante o meu caminho e me presentear com todo o que conquistei até agora.

A **minha família**, em especial aos meus pais pelo apoio incondicional, suporte e valioso conselho.

Aos **amigos** Nicolás e Iván, que ao longo deste caminho se converteram em minha segunda família e sempre brindaram seu apoio, dentro e fora da vida acadêmica.

A **Prof. Dra. Barbara Janet Teruel Mederos**, pela orientação, confiança, apoio e ensinamentos durante o mestrado.

Ao **Prof. Dr. Rodolpho César dos Reis Tinini**, pela co-orientação, constante apoio, amizade e discussões pertinentes durante a realização deste trabalho.

A **Faculdade** de Engenharia Agrícola (FEAGRI/UNICAMP) pela disponibilização de sua estrutura para a realização deste trabalho.

A **CNPQ** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

O teor de clorofila é um parâmetro amplamente utilizado para o diagnóstico do estado nutritivo da cana-de-açúcar, pois tem correlação com a concentração de nitrogênio que por sua vez é indicativo do rendimento da cultura. Consequentemente, a relação já demonstrada do teor de clorofila com as propriedades óticas das folhas permite a sua estimativa a partir de imagens. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um modelo de predição do teor de clorofila em mudas de cana-de-açúcar, baseado no processamento de imagens digitais e espectrais, na região visível do espectro eletromagnético. Para alcançar o objetivo foram utilizadas técnicas de modelagem multivariada correlacionando a resposta espectral da muda com o teor de clorofila. O experimento foi executado em duas etapas com o intuito de, 1) identificar o comportamento espectral das mudas de cana-de-açúcar sob diferentes fontes de excitação; e 2) correlacionar a resposta espectral da folha com o teor de clorofila usando métodos quimiométricos para desenvolver o melhor modelo preditivo do teor de clorofila aplicável para o monitoramento das mudas de cana-de-açúcar. Obtiveram-se correlações fortes e significativas entre a informação tricromática das imagens e o teor de clorofila. A partir da resposta espectral em absorvância obteve-se um modelo de predição multivariado com métricas satisfatórias de ajuste e erro com o método analítico, quando comparado com o medidor portátil de clorofila SPAD.

Palavras-chave: processamento de imagens, reflectância, absorvância, fluorescência, modelos multivariados, quimiometria.

ABSTRACT

The chlorophyll content is a parameter widely used for the sugarcane nutritive state diagnosis, because of being correlated to the nitrogen content which by his side is a yield indicative of the crop. Consequently, the relationship, already demonstrated, between chlorophyll content and leaf optical properties allow its estimation through imagery. The present work has as objective to develop a chlorophyll content predictive model for sugarcane seedlings, based on digital and spectral images processing, in the visible spectra. To achieve the objective, multivariate modelling techniques were implemented, correlating the seedling spectral response with the chlorophyll content. The experiment was executed in two stages aiming to, 1) identify the spectral behavior of the sugarcane seedling under several sources of excitation, and 2) correlate the leaf spectral response with the chlorophyll content using chemometrical methods to develop the best chlorophyll predictive model applicable to the sugarcane seedlings monitoring. Strong and significant correlations were obtained between the images trichromatic information and the chlorophyll content. Through the absorbance spectral response was obtained a multivariate predictive model with better fitting whit the analytical method, when compared to the SPAD chlorophyll meter, for the chlorophyll content measurement.

Keywords: images processing, reflectance, absorbance, fluorescence, multivariate models, chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro do coeficiente de extinção molar para carotenoides, clorofila e antocianinas (Lichtenthaler, 1987).	26
Figura 2. Esquema de componentes do sistema de aquisição de imagens (adaptado de ELMASRY et al., 2007). a- CCD, b- filtros óticos, c- LEDs, d- amostras, e- Computador.	27
Figura 3. Representação esquemática de uma seção vertical de uma folha típica mostrando as interações com a luz. Fonte: Liew et al. (2008).	32
Figura 4. Representação do sistema de MPB com mesas de subirrigação na casa de vegetação, adaptado de Rodrigues, (2016).	41
Figura 5. Representação esquemática da mesa de subirrigação (FILHO, FERRAREZI, <i>et al.</i> , 2011).	41
Figura 6. Vista de planta do esquema experimental.	43
Figura 7. Sistema de numeração de folhas no sistema estabelecido por Kuijper (CASAGRANDE, 1991), mostrando em detalhe a região de união da folha com o caule (A) e a numeração das colhas (B).	46
Figura 8. Princípio de funcionamento do medidor SPAD-502 Plus, apresentando as regiões para iluminação (LEDs) e recepção (Fotodiodos), para a quantificação do teor de clorofila.	47
Figura 9. Esquema de instalação do sistema de aquisição de imagens espectrais, adaptado de Tinini (2015).	48
Figura 10. Fluxograma do método de aquisição das imagens espectrais.	49
Figura 11. Disposição das amostras foliares com DMSO para a extração dos pigmentos.	50
Figura 12. Fluxograma do algoritmo de processamento das imagens coloridas.	53
Figura 13. Fluxograma do algoritmo de processamento de imagens espectrais.	54
Figura 14. Caracterização das medições de clorofila separadas em variedades para: A) Tratamento da dose completa, B) Tratamento da metade da dose e C) Tempo de desenvolvimento.	62
Figura 15. Relação entre o teor de clorofila e a medição com o sensor de clorofila SPAD para as 144 amostras do experimento.	64
Figura 16. Interface da ferramenta computacional para o processamento das imagens digitais RGB.	66
Figura 17. Interface da ferramenta gráfica na apresentação dos resultados da análise tricromática RGB.	67
Figura 18. Modelo de calibração relacionando o valor medido de clorofila para cada amostra e o valor predito usando o modelo respectivo para o caso de RGB.	73
Figura 19. Modelo de calibração relacionando o valor medido de clorofila para cada amostra e o valor predito usando o modelo respectivo para o caso de rgb (normalizados).	73
Figura 20. Validação do modelo de predição RGB do teor de clorofila total usando a fonte de excitação branca.	74
Figura 21. Validação do modelo de predição rgb do teor de clorofila total usando a fonte de excitação branca.	75
Figura 22. Calibração do modelo de predição RGB na condição de fluorescência 405 nm.	77

Figura 23. Calibração do modelo de predição rgb na condição de fluorescência de 405 nm.	78
Figura 24. Validação do modelo RGB na condição fluorescência de 405 nm.	78
Figura 25. Validação do modelo rgb na condição fluorescência de 405 nm.	79
Figura 26. Calibração do modelo de predição RGB na condição de fluorescência de 470 nm.	80
Figura 27. Calibração do modelo de predição rgb na condição de fluorescência de 470 nm.	80
Figura 28. Validação do modelo RGB na condição fluorescência de 470 nm.	81
Figura 29. Validação do modelo rgb na condição fluorescência de 470 nm.	81
Figura 30. Passos do processo de criação da máscara binária para segmentação usando a interface da ferramenta computacional criada.	83
Figura 31. Espectros de refletância para cada uma das classes, sendo a variedade (A), doses (B) e tempo de desenvolvimento fisiológico (C).	85
Figura 32. Resultado da PCA dos dados de refletância, para os tempos de desenvolvimento fisiológico e a condição de estresse fisiológico, para todas as amostras.	86
Figura 33. Resultado da PCA dos dados de absorbância, para os tempos de desenvolvimento fisiológico e a condição de estresse fisiológico, para todas as amostras.	87
Figura 34. Espectros de absorbância para cada classe, sendo variedade (A), a doses (B) e tempo de desenvolvimento fisiológico (C).	88
Figura 35. Espectros de fluorescência para 405 nm visualizando cada uma das classes, sendo variedade (A), doses (B) e tempo de desenvolvimento fisiológico (C).	90
Figura 36. Espectros de fluorescência para 470 nm visualizando cada uma das classes, sendo variedade (A), doses (B) e tempo de desenvolvimento fisiológico (C).	91
Figura 37. Espectro médio de refletância.	93
Figura 38. Seleção de número de fatores (14) a serem trabalhados no modelo de refletância para clorofila total pelo método PLS.	94
Figura 39. Identificação de <i>outliers</i> para conjunto de calibração de refletância pelo método PLS.	94
Figura 40. Melhor modelo de regressão (PLS) para a predição de clorofilas usando refletância, apresentando o desempenho na calibração (A), validação cruzada (B) e predição (C).	97
Figura 41. Espectro de correlação de refletância.	98
Figura 42. Espectro médio de absorbância.	101
Figura 43. Correlograma para o método PLS em absorbância.	103
Figura 44. Melhor modelo de predição de clorofilas (método PLS usando seleção de variáveis) usando absorbância, apresentando o desempenho na calibração (A), validação cruzada (B) e predição (C).	105
Figura 45. Espectro de fluorescência correspondente a uma excitação de 405 nm.	107
Figura 46. Espectro de correlação para a resposta em fluorescência 405 nm.	108
Figura 47. Melhor modelo de predição de clorofilas (método PLS) com fluorescência 405 nm, apresentando o desempenho na calibração (A), validação cruzada (B) e predição (C).	110
Figura 48. Espectro de fluorescência correspondente à excitação de 470 nm.	112

Figura 49. Melhor modelo para predição de clorofilas (PLS) usando fluorescência 470 nm, apresentando o desempenho na calibração (A), validação cruzada (B) e predição (C).	114
Figura 50. Espectro médio de absorbância classificado por tempo de desenvolvimento...	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise de correlação para a fonte de iluminação branca, os coeficientes de correlação indicados com ** não foram significativamente diferentes de zero.	69
Tabela 2. Análise de correlação para a fonte de iluminação de 405 nm. Os coeficientes de correlação indicados com ** não foram significativamente diferentes de zero.	70
Tabela 3. Análise de correlação para a fonte de iluminação de 470 nm. Os coeficientes de correlação indicados com ** não foram significativamente diferentes de zero.	71
Tabela 4. Parâmetros dos modelos de regressão PLS e PCR na predição usando refletância.	95
Tabela 5. Parâmetros após a seleção de variáveis para os dos métodos de regressão em absorbância.	104
Tabela 6. Parâmetros para os modelos selecionados para fluorescência 405.	109
Tabela 7. Parâmetros dos modelos de predição para fluorescência 470 nm.	112
Tabela 8. Matriz de confusão da calibração do método kNN (k = 3) usando todas as variáveis.	117
Tabela 9. Matriz de confusão da predição do método kNN (k = 3) usando todas as variáveis.	117
Tabela 10. Matriz de confusão da calibração do método kNN (k = 4) com seleção de variáveis.	118
Tabela 11. Matriz de confusão na predição do método kNN (k = 4) usando seleção de variáveis.	118
Tabela 12. Figuras de mérito (%) correspondentes a predição dos modelos kNN.	119
Tabela 13. Matriz de confusão na predição do método SIMCA.	120
Tabela 14. Figuras de mérito da predição usando o método SIMCA.	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP (*Adenosine Triphosphate*): trifosfato de adenosina

BF (*Blue Fluorescence*): Fluorescência do azul

BGF (*Blue-Green Fluorescence*): Fluorescência do azul-verde

GF (*Green Fluorescence*): Fluorescência do verde

Chl_a: Clorofila *a*

Chl_b: Clorofila *b*

ChlF: Fluorescência da clorofila

Chl_t: Clorofila total

Embrapa: Empresa brasileira de pesquisa agropecuária

FAD: Flavina Adenina Dinucleotídeo

F_m: Fluorescência máxima

FRF (*Far Red Fluorescence*): Fluorescência do vermelho distante

FSI: Fotossistema I

FSII: Fotossistema II

F_v: Fluorescência variável

HSB (*Hue, Saturation and Brightness*): Matiz, Saturação e Brilho

HSL (*Hue, Saturation and Lightness*): Matiz, Saturação e Luminosidade

IAC: Instituto Agronômico de Campinas

LAB: Luminosidade e canais de cor A e B.

MIR (*Middle Infrared*): infravermelho médio.

MPB: Mudas Pré-Brotadas.

NADP⁺ (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*): Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma oxidada.

NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase*): Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, com íon hidrato.

NIR(*Near infrared*): Infravermelho próximo.

NPQ (*non-photochemical quenching*): Extinção não fotoquímica.

RF (*Red Fluorescence*): Fluorescência do vermelho.

RGB (*Red, Green, Blue*): Vermelho, verde, azul.

rgb: Componentes de cor vermelho, verde e azul normalizados.

RMSE (*Root Mean Square Error*): Raiz do erro médio quadrático.

RMSEC (*Root Mean Square Error of Calibration*): Raiz do erro médio quadrático de calibração.

RMSECV (*Root Mean Square Error of Cross-Validation*): Raiz do erro médio quadrático de validação cruzada.

RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*): Raiz do erro médio quadrático de predição.

SWIR(*Short Wavelength Infrared*): Infravermelho de onda curta.

UV: Ultravioleta.

VIS: Região Visível do espectro eletromagnético.

Φ_{exc} : eficiência do PSII intrínseca.

Φ_{PSII} : eficiência atual do PSII.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. HIPÓTESE.....	19
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
4.1 Produção de mudas de cana-de-açúcar.....	20
4.2 Irrigação e adubação de mudas de cana-de-açúcar	21
4.3 Avaliação do teor de clorofila	24
4.4 Aplicação de imagens espectrais na Agricultura	26
4.4.1 Uso de imagens tricromáticas RGB na quantificação características físico-químicas	29
4.4.2 Espectroscopia de reflectância	31
4.4.3 Espectroscopia de fluorescência	33
4.4.4 Uso de espectroscopia na quantificação de teor de clorofila.....	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
5.1 Descrição da área de estudo	40
5.2. Unidades experimentais.....	42
5.3. Etapas do experimento	44
5.3.1 Etapa de caracterização espectral	45
5.3.2 Modelagem espectral.....	58
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1 Análise exploratória da clorofila.....	61
6.2 Caracterização espectral	65
6.2.1 Processamento e Análise das imagens tricromáticas RGB	65
6.2.2 Processamento das imagens e análise exploratória dos dados espectrais.....	82
6.3 Modelagem espectral	92
6.3.1 Refletância.....	92
6.3.2 Absorbância.....	101
6.3.3 Fluorescência 405 nm.....	106

6.3.4 Fluorescência 470 nm.....	111
6.4 Classificação usando caraterísticas espectrais	115
7. CONCLUSÕES.....	123
8. Considerações finais	124
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	125

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma produção de 736 mmt (milhões de toneladas métricas) que representa 39 % da produção mundial, seguido por Índia (18%) e China (7%) (FAO, 2017). Para o período 2017/18 a safra de cana-de-açúcar estimada no Brasil é de 645 mmt, em uma área total de produção de 9,9 milhões de hectares e destas, 5,569 milhões de hectares se encontram no Estado de São Paulo (GAIN, 2017). O setor sucroalcooleiro, responsável pela produção de açúcar e álcool, destina mais da metade (53,8%) da produção de cana-de-açúcar à fabricação de etanol (CONAB, 2017); tornando o Brasil o segundo maior produtor de etanol do mundo, com uma produção de 7,29 bilhões de galões (ano 2016), que representam 27,44% da produção mundial, superado unicamente pelos Estados Unidos (57,66%) onde o etanol é extraído do milho (RFA, 2018).

Com o objetivo de manter o Brasil como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e aumentar sua contribuição à produção mundial de etanol, o setor sucroalcooleiro vem buscando alternativas para otimizar o sistema de produção da cana-de-açúcar. Uma das tecnologias inovadoras que está em crescimento entre os produtores é o sistema de mudas pré-brotadas (MPB) que se apresenta como uma nova alternativa de multiplicação de mudas. De acordo com Gomes (2013), esse sistema combina elevado padrão de fitossanidade, uniformidade de plantio e vigor; sendo também acorde ao princípio de impulsionar a produtividade dentro do enfoque de uma maior produção com menor gasto de insumos, ou seja, “mais com menos”.

O sistema MPB ou *bud chips*, consiste em plantar gemas de colmos pré-germinadas em condições adequadas para garantir plantas com melhores características fisiológicas. Essas gemas são menos volumosas, facilmente transportáveis, tornando o material mais econômico. Além disso, esta tecnologia é uma grande promessa na multiplicação rápida de novas variedades de cana-de-açúcar (FRAGA, 2015).

No cultivo de MPB o sistema de subirrigação *ebb and flow* (encher e drenar) se apresenta como uma promissória opção para a fertirrigação, sendo um dos mais comuns para a produção em ambientes protegidos. Neste sistema a solução nutritiva é bombeada dentro

da mesa que contém o substrato por um tempo determinado, depois propicia-se a drenagem de volta ao tanque de nutrientes, quando a bomba é desligada. Os substratos são usados como meio para umedecimento por capilaridade disponibilizando água para a planta. (RESH, 2001).

O teor de clorofila das folhas das mudas é um parâmetro amplamente utilizado em estudos fisiológicos e agrônômicos para o diagnóstico do estado nutritivo. O teor de clorofila correlaciona-se com a concentração de nitrogênio na planta e também é indicativo do rendimento da cultura (BLACKMER e SCHEPERS, 1994). A relação do teor de clorofila com as propriedades óticas das folhas já foi amplamente demonstrada, constatando-se a variação das propriedades óticas (refletância, transmitância e absorbância) que ocorre devido ao decrescimento da concentração de clorofila (CARTER e KNAPP, 2001).

Desta forma a determinação do teor de clorofila baseado nas propriedades óticas das folhas, permite que a predição dos pigmentos seja realizada a partir do imageamento, e com isto a resposta da determinação da clorofila combina maior abrangência espacial e menor tempo entre a tomada das imagens e obtenção da resposta (valor do teor de clorofila). Pode-se afirmar então que, se comparado com a determinação do teor de clorofila utilizando instrumentos portáteis como o SPAD, têm-se vantagens que justificam a sua implementação.

2. HIPÓTESE

É possível gerar um modelo multivariado para a predição do teor de clorofila em mudas de cana-de-açúcar, através de correlações obtidas da resposta de imagens digitais, dos tipos tricromáticas RGB e espectrais, previamente processadas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um modelo de predição do teor de clorofila em mudas de cana-de-açúcar, baseado no processamento de imagens digitais, dos tipos tricromáticas RGB e espectrais.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um algoritmo de processamento das imagens digitais e espectrais para obter a resposta da planta.
- Implementar a modelagem multivariada, para prever o teor de clorofila em função da informação obtida no processamento das imagens.
- Identificar o melhor modelo de predição de clorofila a partir dos espectros de resposta na região do visível.
- Verificar a relação do teor de clorofila com a dose de fertirrigação, variedade e tempo de desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar a partir da resposta espectral.
- Baseado na informação espectral, desenvolver um modelo de classificação das mudas para diferentes variedades, doses de fertilização e tempo de desenvolvimento.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Produção de mudas de cana-de-açúcar

A produção de mudas de cana-de-açúcar baseia-se no processo de micropropagação assexuada, onde o rápido desenvolvimento das gemas depende do estado nutricional do tolete, que influenciará também o desenvolvimento da cultura (CLEMENTS, 1980), e a partir da técnica de micropropagação se podem produzir plantas com alta qualidade fitossanitária e com excelente homogeneidade genética (TEIXEIRA, 2001). Segundo Barrueto Cid (2000), é uma técnica para propagar plantas dentro de tubos de ensaio ou similares (*in vitro*), sobre adequadas condições de assepsia e nutrição associados a fatores ambientais (luz, temperatura, oxigênio e dióxido de carbono). Essa técnica deve ser empregada em locais que garantam controle de esterilidade e rastreabilidade, chamados de biofábrica.

Segundo Gerald e Lee (2011), biofábrica é um conceito de produção de plantas que utiliza métodos de biotecnologia para a produção contínua de plantas. Para um processo de produção ser classificado como uma biofábrica, o processo produtivo precisa ser bem definido e tratado com tecnologia adequada, com o fim de permitir a produção em escala industrial (comercial) como no caso da cana-de-açúcar, com produção em massa baseada no método de micropropagação.

Existem diversos sistemas de multiplicação que podem ser aplicados à cultura da cana-de-açúcar, que são divididos em sistemas de micropropagação ou multiplicação a partir de partes vegetativas da planta (LANDELL *et al*, 2012). Dentre esses diferentes sistemas de multiplicação, encontra-se o sistema de multiplicação de cana-de-açúcar usando mudas pré-brotadas (MPB) que atualmente está ganhando espaço rapidamente no mercado. Como explicado por Landell *et al.*, (2012) é um sistema de multiplicação que poderá contribuir para produção rápida de mudas, associando elevado padrão de fitossanidade, vigor e uniformidade de plantio.

A tecnologia está direcionada a aumentar a eficiência e os ganhos econômicos na implantação de viveiros, replantio de áreas comerciais e possivelmente renovação e expansão

de áreas de cana-de-açúcar. O sistema aumenta a uniformidade nas linhas de plantio e, conseqüentemente, a redução de falhas, diminui o número de gemas e de toneladas de colmos na operação de plantio mecanizado.

Conforme explicado por Xavier (2014) as etapas que se seguem na produção de MPB são: inicia-se corte do minirrebolo onde esta ação permite a redução ampla de material da reserva, o que pressupõe uma maior necessidade de controle nas seguintes etapas; continua-se com o tratamento químico para promover a ação de controle de agentes causais de podridões e promotores de enraizamento e outros produtos que permitam aumentar a sanidade, velocidade de brotação e aumento de massa de raízes durante o período de produção; os colmos são levados para a câmara de brotação que consta de uma estrutura vertical com possibilidade de controle de temperatura, umidade e irrigação, com o intuito de reduzir os fatores de desuniformidade presentes no colmo semente e facilitar a transformação da estrutura de brotação, gema em plântula no período de até dez dias e posteriormente em muda pré-brotada.

O sistema de multiplicação é a base de uma apropriada produção de cana de açúcar, assim, o sistema MPB tem a capacidade de gerar mudas com características apropriadas de uniformidade e fitossanidade definindo o potencial inicial do plantio. Para atingir o potencial das mudas, um fator de produção que é fundamental na qualidade é o requerimento hídrico. De forma que, com o objetivo de fornecer a água necessária deve implementar-se um sistema de irrigação adequado para o aproveitamento eficiente do recurso hídrico.

4.2 Irrigação e adubação de mudas de cana-de-açúcar

Segundo Silva *et al.*, (2012), o requerimento hídrico da cana de açúcar é influenciado por fatores inerentes às condições ambientais, técnicas agrícolas, período de plantio e cultivares, normalmente reduzindo com a sucessão dos ciclos de cultivo (cana-planta, cana-soca e ressoça). Da mesma forma, o requerimento hídrico das plantas é governado pelos balanços de radiação e de energia à superfície da cultura, que fornecem informações sobre a evapotranspiração da cultura (ET_c) e, em seguida, através da relação ET_c/ET_o (ET_o é a evaporação de referência), permitindo obter o coeficiente de cultivo (K_c) a ser utilizado no

manejo da irrigação (KJAERGAARD *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2009; ZHAO, GLAZ e COMSTOCK, 2010; ZINGARETTI, RODRIGUES, *et al.*, 2012).

A evapotranspiração média da cultura de cana-de-açúcar é de 4,7 mm no dia, a qual tem uma ligeira redução na fase de crescimento máximo e no final do ciclo totaliza em 1710mm; o coeficiente de cultura da cana-de-açúcar (K_c), durante o ciclo de soca, varia de 0,65 a 1,10 entre as fases de brotação e estabelecimento e crescimento máximo, reduzindo para 0,85 na fase de maturação da cultura (LANDELL *et al.*, 2012).

Para a cultura de cana-de-açúcar, consideram-se três tipos de irrigação em função dos seus regimes, segundo Rezende e Andrade Junior (2012): O primeiro tipo é a irrigação plena, que tem como objetivo aumentar a produtividade da lavoura, aplicando lâminas acumuladas que podem superar os 450 mm por ano, sempre mantendo a cultura suprimida hidricamente. O segundo tipo é a irrigação com déficit: que consiste em aplicar lâminas menores que, acumuladas, chegam de 200 a 300 mm por ano, dando a possibilidade de ocorrência de déficit em fases de menor sensibilidade. O terceiro tipo é a irrigação de salvamento ou complementar, onde a irrigação visa o uso da água apenas por um período curto ou estágio de cultivo, consistindo em aplicar lâminas de 40 a 80 mm por ano, com intuito de “salvar” a lavoura.

Assim, considerando viveiros de cana-de-açúcar de mudas de micropropagação pela qual a planta já possui parte aérea, deve-se adotar um tipo de irrigação que permita o desenvolvimento vegetativo das plantas e crescimento dos colmos, deixando disponibilidade hídrica no solo positiva durante estes períodos, coincidindo também, com os períodos de maiores temperaturas (SCANAVINI, 2014).

No sistema de mudas pré-brotadas, a umidade adequada para a brotação pode variar conforme a região, a classe de solo ou o substrato na pré-brotação, sendo fatores principais as condições físicas de aeração, densidade e condutividade hidráulica. Aplicando lâminas correspondentes à capacidade de campo se proporcionam melhores taxas de desenvolvimento inicial (XAVIER, LANDELL, *et al.*, 2014).

Quanto a lâminas e frequências de irrigação, Landell *et al.* (2012) recomenda uma lâmina de 8 mm por dia durante a primeira fase de aclimação e com 4,4 mm por dia na segunda fase de aclimação. No caso de biofábrica, Scanavini (2014) demonstrou que pode

se manter uma lâmina correspondente a evapotranspiração acumulada, o que corresponde a uma irrigação plena das mudas com o intuito de maior manutenção da umidade do solo.

Contando com as ferramentas necessárias para um monitoramento climático, é possível realizar a irrigação em função da evapotranspiração, ou é possível estabelecer uma rede de sensores para monitoramento da umidade do solo e realizar a irrigação em função da umidade presente no solo. Fornecer uma lâmina de irrigação suficiente para as mudas abrange o fator hídrico de produção, mas ainda é necessário garantir a presença necessária de nutrientes no substrato para o correto desenvolvimento fisiológico das mudas.

No sistema de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, a brotação e o desenvolvimento inicial de gemas é influenciado por diversos fatores, dentre os mais importantes encontram-se: o substrato e a nutrição. O substrato é uma combinação de dois ou mais componentes com o intuito de caracterizar o meio que servirá como sustento da planta, com as propriedades químicas e físicas adequadas para o processo de brotação, sendo as propriedades físicas as mais relevantes pois estas são dificilmente modificáveis (MILNER, 2001).

Assim um bom substrato deve ter uma composição uniforme, com baixa densidade, porosidade adequada, elevada capacidade de troca de cátions, boa capacidade de retenção de água, isento de pragas e organismos patogênicos, isento de sementes de plantas daninhas, boa coesão entre partículas, boa aderência junto às raízes, abundante e economicamente viável. Dessa forma, sugere-se uma densidade base seca de 0,1 a 0,3 kg m⁻³, espaço de aeração em torno de 20 – 30% e água facilmente disponível em volume, em torno de 30 a 40% (XAVIER, LANDELL, *et al.*, 2014). Desta forma temos a alternativa da fertirrigação que se trata da injeção de soluções fertilizantes via água de irrigação, a qual difere significativamente da aplicação sólida de adubo, principalmente porque acelera o ciclo dos nutrientes; assim, por meio desta técnica, o tempo de chegada do fertilizante às raízes das plantas é significativamente reduzido, já que infiltra no solo em solução de forma uniforme, garantindo máximo alcance pelo sistema radicular (EMBRAPA, 2009).

Sendo o aspecto nutricional o foco principal da fertirrigação, é a técnica empregada para fornecer à planta todos os elementos essenciais. Esta prática, além de se constituir em um dos fatores indispensáveis para o desenvolvimento de mudas, com um manejo apropriado pode acelerar de forma considerável o crescimento da muda, refletindo isso em reduções dos custos de produção e diminuindo os períodos de tempo nos viveiros (MALVOLTA, 1980).

Desse modo, o manejo da adubação das mudas de cana-de-açúcar desenvolvidas no processo de mudas pré-brotadas (MPB) pelo Programa Cana IAC associa a aplicação de adubos minerais simples e compostos, fertilizantes de liberação lenta e a prática de parcelamento da adubação (XAVIER, LANDELL, *et al.*, 2014).

O manejo da adubação para mudas em ambientes protegidos é um fator de alto impacto para o desenvolvimento de mudas, e tendo presentes as vantagens da fertirrigação quanto a eficiência no uso dos nutrientes e na velocidade de absorção pela planta, se apresenta como uma tecnologia de otimização dos insumos. Existem várias metodologias e ferramentas para monitorar a solução nutritiva (condutividade elétrica, pH, etc) e de igual forma várias medições para avaliar a resposta da planta a os diferentes tratamentos como as medições biométricas de altura total da planta, altura da primeira lígula, número de folhas, número de colmos, peso da região aérea, peso das raízes, área folhar, clorofila, etc. Especificamente a medição de clorofila é empregada devido a sua relação com o estado nutricional da planta, pois tem uma relação direta com o teor de nitrogênio nas folhas e com a presença de déficit hídrico, de forma que a clorofila é uma das variáveis de resposta que são monitoradas (com os sensores óticos como o SPAD e o Clorofilog) na avaliação de tratos culturais.

4.3 Avaliação do teor de clorofila

As clorofilas (clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total) são pigmentos que estão integralmente relacionados as funções fisiológicas das folhas. As clorofilas têm a função de absorver energia luminosa e transferi-la ao aparato fotossintético (SIMS e GAMON, 2002), de forma que o potencial da atividade fotossintética e as clorofilas mantem uma associação direta (SILVA, SANTOS, *et al.*, 2014). A alta eficiência fotossintética pode levar ao incremento de produtividade agrícola, demonstrando uma relação direta com o aproveitamento da radiação disponível por esses pigmentos, como verificado por Bernardes (1987) em gramíneas tropicais.

A eficiência fotossintética quantifica a conversão da radiação solar a fotossintato, ou seja, a eficiência do processo de fotossíntese, sendo definida como a massa de sucrose produzida pela fotossíntese por unidade de radiação fotossinteticamente ativa interceptada

pela cultura, excluído as perdas por respiração (SINGELS, DONALDSON e SMIT, 2005). A radiação fotossinteticamente ativa é definida como a radiação com comprimento de onda maior que 400 nm e menor que 700 nm, com valor de unidade no intervalo definido e zero fora do mesmo, sendo assim uma função especial no processo de quantificação da irradiância (KENDRICK e KRONENBERG, 1994).

Por sua parte, a fotossíntese, que é uma das conquistas mais significantes da vida na terra, é o complexo processo por meio do qual a energia luminosa é convertida em energia química estável, a qual é o combustível da maioria do ecossistema no planeta (EATON-RYE, TRIPATHY e SHARKEY, 2012). Quanto a sua definição, na atualidade esta é apresentada por Gest (2002) como: "Fotossíntese é uma série de processos nos quais a energia eletromagnética é convertida em energia química usada para a biossíntese de materiais celulares orgânicos; um organismo fotossintético é aquele no qual a maior fração da energia requerida para a síntese celular é fornecida pela luz".

O processo de fotossíntese pode ser dividido em três etapas: A etapa fotoquímica, dependente da energia luminosa para a produção de NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) e ATP (entendido como a energia química armazenada) na cadeia transportadora de elétrons; etapa difusiva responsável pela entrada de dióxido de carbono nas folhas através dos estômatos; e bioquímica que é responsável pela fixação de dióxido de carbono pela ação de enzimas e a utilização do ATP e NADPH na formação dos carboidratos (DE OLIVEIRA, 2003).

Os pigmentos envolvidos na fotossíntese são as clorofilas *a* e *b*, os carotenoides e as ficobilinas. A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica, o qual é entendido como o primeiro estágio do processo fotossintético (SILVA, SANTOS, *et al.*, 2014), enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência de energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios (STREIT, CANTERLE, *et al.*, 2005).

As clorofilas têm fortes picos de absorção nas regiões do vermelho e do azul do espectro eletromagnético (Figura 1). Uma vez que o pico do azul se sobrepõe à absorbância dos carotenóides, o pico geralmente não é usado para a estimativa do teor de clorofila (SIMS e GAMON, 2002). A absorbância máxima na região do vermelho ocorre entre 660 e 680 nm, entretanto, a reflectância nesses comprimentos de onda não tem sido provada tão útil para a

predição do teor de clorofila como a reflectância em comprimentos de onda ligeiramente maiores ou menores; devido a que teores de clorofila relativamente pequenos são suficientes para saturar a absorção na região entre 660 e 680 nm, portanto reduzindo a sensibilidade a altos teores de clorofila. Consequentemente, modelos empíricos para a predição do teor de clorofila baseando-se na reflectância nas regiões de 550 o 700 nm, nas quais a saturação da absorbância requer de maiores conteúdos de clorofila, fazendo que sejam mais plausíveis para a quantificação (LICHTENTHALER, GITELSON e LANG, 1996; SCHEPERS, BLACKMER, *et al.*, 1996; DATT, 1999).

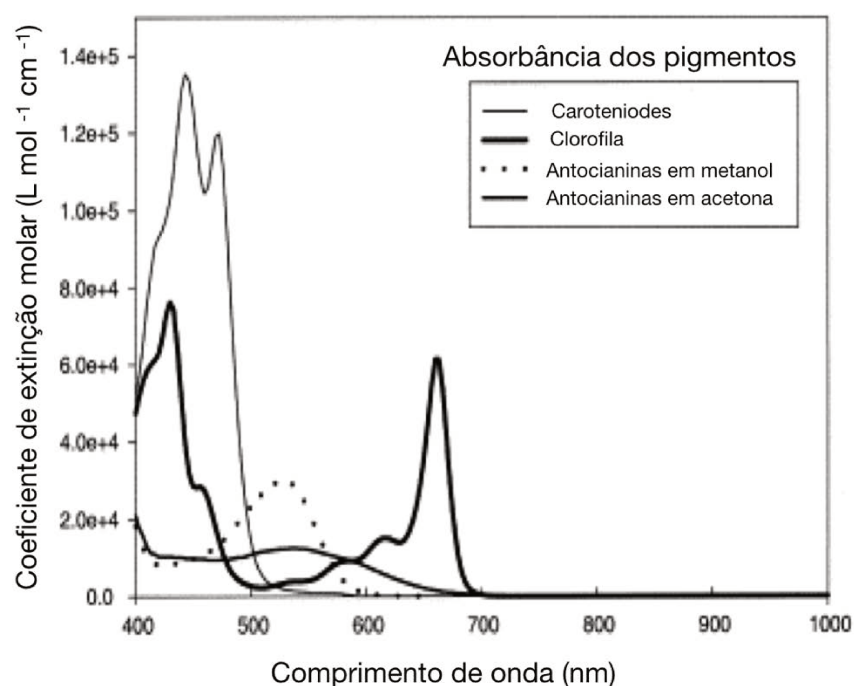


Figura 1. Espectro do coeficiente de extinção molar para carotenoides, clorofila e antocianinas (Lichtenthaler, 1987).

4.4 Aplicação de imagens espectrais na Agricultura

Definem-se imagens espectrais como a aquisição de imagens espaciais em diversas bandas do espectro de forma contínua, com a combinação de imagens e espectroscopia de forma a extrair simultaneamente características físicas e geométricas do produto (forma, tamanho, aparência e cor), bem como a composição química do produto através da análise espectral. As imagens espectrais são divididas em duas classes: imagens multiespectrais e

hiperespectrais. A diferença entre as classes está no número de bandas e a forma do espectro obtido (SCHAEPMAN, 2007; ELMARSY *et al.*, 2012; WU e SUN, 2013). Na Figura 2 Apresenta-se esquematicamente os componentes comumente usados num sistema de aquisição de imagens espectrais a nível de bancada.

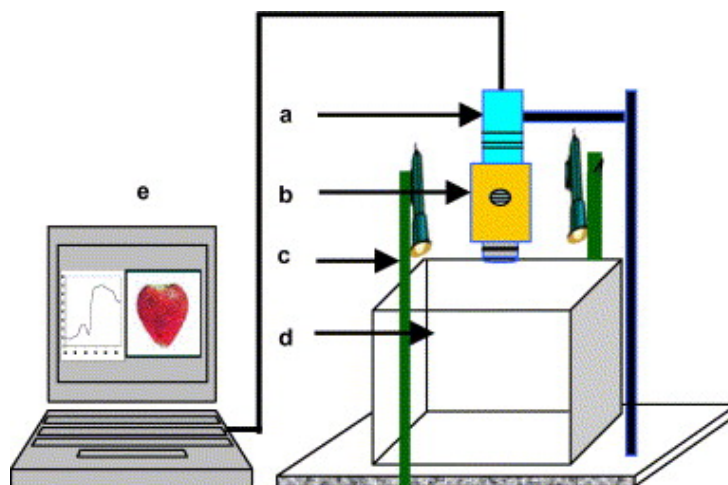


Figura 2. Esquema de componentes do sistema de aquisição de imagens (adaptado de ELMARSY *et al.*, 2007). a- CCD, b- filtros óticos, c- LEDs, d- amostras, e- Computador.

A utilização de análise de imagens espectrais baseia-se no fato de que os materiais apresentam diferentes composições químicas e estruturas físicas. Assim, tem a capacidade de refletir, absorver, apresentar dispersão e emitir energia eletromagnética em padrões e comprimentos de ondas diferentes, chamada de assinatura espectral. E a partir dessa assinatura espectral é possível identificar, mensurar, classificar o material na imagem (ELMARSY, KAMRUZZAMAN, *et al.*, 2012). Ou seja, as imagens espectrais são resultantes das atividades físico-químicas do produto após a absorção ou reflexão de um curto comprimento de onda emitido por uma fonte de luz (TININI, 2015).

No caso das plantas, cada folha atua como meio pelo qual a radiação eletromagnética trafega, portanto, dependendo do comprimento de onda da radiação incidente, componentes da folha exercem uma influência no processo de interação entre eles que devem ser analisados separadamente (PONZONI, SHIMABUKURO e KUPLICH, 2012; CARTER e KNAPP, 2001; ZULETA BONILLA, 2015; ARAÚJO, 2010). No processo de interação entre a radiação eletromagnética (espectro ótico) e uma folha, além do fator estrutural (organização

dos tecidos da folha), fatores químicos (pigmentos fotossintetizantes e água) podem ser analisados sob os pontos de vista da absorção, da transmissão e da reflexão de radiação (MOREIRA, 2011).

Vários métodos para detecção de estresse hídrico na planta têm sido investigados com o uso de visão de máquina (SEGINER *et al.*, 1992; KURATA & YAN, 1996 e KACIRA, LING, & SHORT, 2002). Métodos fisiológicos na folha também foram usados para avaliação de estresse hídrico por análise do tecido foliar para conteúdo relativo de água (PU *et al.*, 2003) e análise de área folhar para espessura equivalente de água (MAKI, ISHIAHRA e TAMURA, 2004) entre outros métodos de laboratório limitados pelo ambiente do laboratório e pelo consumo de tempo do processo (KIM, GLENN, *et al.*, 2011). O conteúdo de água é um dos parâmetros da vegetação que tem alcançado resultados promissores em relação às suas descrições quantitativas através de informações hiperespectrais (CHENG, RIVARD e SÁNCHEZ-AZOFEIFA, 2011).

Segundo Carter e Knapp (2001) a qualidade espectral da luz refletida pelas folhas, manifestada na cor da folha, tem sido amplamente utilizada como indicador do estresse da planta. Porém, as características espectrais da radiação refletida, transmitida ou absorvida pelas folhas podem prover um maior entendimento das respostas fisiológicas às condições de crescimento da planta e da adaptação ao meio ambiente; assim, as investigações dessas características espectrais intensificaram-se fortemente desde 1960, conjuntamente com o desenvolvimento de instrumentação e interesse no potencial do sensoriamento remoto.

Tem-se demonstrado o potencial de combinar dados espectrais e métodos lineares / não lineares multivariados para prever o conteúdo de água da vegetação (MIRZAIE, DARVISHZADEH, *et al.*, 2014). Os mesmos autores explicam que os dados espectrais são influenciados por multi-colinearidade pelo grande número de bandas espectrais (independentes) sendo modeladas por um pequeno número de variáveis biofísicas (dependentes).

Existem diferentes métodos de captura de imagens como são as imagens RGB (coloridas) e as imagens espectrais (multiespectrais e hiperespectrais), as imagens RGB podem fornecer informação das cores primárias (vermelho, verde e azul) e se podem converter a diferentes espaços de cor; assim como para as imagens espectrais existem

diferentes métodos de captura em função da fonte de excitação para obter informação precisa ao longo do espectro.

4.4.1 Uso de imagens tricromáticas RGB na quantificação características físico-químicas

A cor das folhas tem sido demonstrada como um bom indicativo do conteúdo de clorofila nas folhas (GADDANAKERI, D.P. BIRADAR e NYAMGOUDA, 2007; ISLAM e HOSSAIN, 2007). Ali, Al-ani, *et al.* (2012) propuseram uma técnica baseada no processamento de imagens digitais para determinar clorofila nas plantas. Usaram plantas de tomate, alface e brócolis nas quais se aplicaram cinco diferentes tratamentos variando o nitrogênio e com um scanner portátil capturaram a imagem das folhas. O algoritmo proposto cria mapas não lineares do valor normalizado do G (verde), com respeito ao R (vermelho) e B (azul) para predição do teor de clorofila, usando uma função de transferência sigmoide logarítmica. Obtiveram valores altos do coeficiente de correlação, sendo de 0,968; 0,896 e 0,914 (para tomate, alface e brócolis respectivamente), alcançando melhor desempenho que outros índices baseados no RGB.

Já Yadav, Ibaraki e Gupta (2010) obtiveram as imagens a partir de um scanner, e desenvolveram um modelo de estimação de teor de clorofila em plantas de batata micro propagadas, obtendo um coeficiente de determinação (R^2) de 0,77 a partir do índice b/L (brilho/luminosidade). A análise tricromática proposta demonstrou uma boa concordância entre o teor de clorofila predito e o teor de clorofila real e a partir do resultado da regressão concluíram que a análise é confiável e eficiente para a estimação do teor de clorofila.

Sala, Boldea e Gergen (2013) analisaram imagens digitais capturadas no espectro visível em correlação com o teor de clorofila, como uma expressão do estado nutricional em milho. Os autores converteram os valores de RGB para os espaços de cor HSB e HSL e desenvolveram correlações individuais, baseadas em pares de valores de índices e correlações em múltiplos parâmetros. Obtiveram altos valores de correlação para os parâmetros H (Matiz), S (saturação) e B (brilho) com valores de 0,886, -0,815 e -0,930 respectivamente, concluindo que existe uma dependência entre a variação no sistema de fertilização, o estado nutricional das plantas, o conteúdo de clorofila e os espaços de cor HSL

e HSB; e a partir da análise de agrupamentos foi possível assegurar a correspondência de dose de nutrientes, clorofila e informação de cor na imagem digital.

Em casa de vegetação Riccardi, Mele, *et al.* (2014) avaliaram de forma não destrutiva o conteúdo de clorofila em folhas de quinoa a amaranto por meio de análises de regressão simples e multivariada dos componentes RGB da imagem. A técnica de análises de imagem proposta é baseada na aquisição de imagens com uma câmera digital montada num tripé adquirindo a imagem sem retirar a folha da planta, desenvolveram diferentes combinações das cores RGB identificando e avaliando modelos de regressão simples e múltipla para as duas espécies. Alguns dos modelos de regressão propostos apresentaram melhor desempenho ($R^2 = 0,93$) de clorofila quando comparado com o método SPAD ($R^2=0,85$).

No intuito de desenvolver um método para a estimação do teor de clorofila da soja usando um smartphone e análises de imagens, constatou-se confiabilidade e precisão na estimação de teores de clorofila e carotenoides além de poupar tempo e reagentes químicos usados nos procedimentos convencionais. Foram empregados diferentes espaços de cor (HSB e LAB) e vários índices baseados no espaço de cor RGB para desenvolver os modelos, avaliar e comparar a precisão. A determinação de clorofila e carotenoides obteve valores de R^2 entre 0,86 e 0,87 respectivamente (RIGON, CAPUANI, *et al.*, 2016).

Especificamente na cana de açúcar, um método de análise de imagem é usado para a determinação do teor de clorofila nas folhas usando o espaço de cor HSV (Matiz, Saturação, Valor); assim, um modelo matemático linear em função do HSV foi proposto para correlacionar com o teor de clorofila, adicional à análise de correlação simples. A imagem foi capturada com uma imagem digital e os valores de RGB foram transformados nos parâmetros espectrais de HSV, fazendo uma regressão linear múltipla para chegar num modelo preditivo de clorofila em função dos parâmetros HSV. No algoritmo se seguem os passos de: 1. Aquisição da imagem da folha; 2. Pré-processamento da imagem para convertê-la ao formato apropriado, fazendo redimensionamento da imagem e conversão de RGB a HSV; 3. Segmentação da região da folha com uma suavização da imagem; 4. Extração de características, computando os parâmetros do modelo e estimando o valor de clorofila pela fórmula. Como resultado o trabalho apresentou boa correspondência entre o teor de clorofila predito e o real, com RMSE (Raiz quadrada do erro médio quadrático) entre a clorofila

predita e medida de 1,9334 indicando que a análises por espaço de cor proposta atinge uma estimação eficiente e confiável do teor de clorofila (PATIL e PATIL, 2014).

A aquisição de imagem RGB, seu processamento e análise, mesmo com seus casos de sucesso, representa menor precisão na informação já que cada faixa de cor está abrangendo uma grande porção do espectro, assim só pode se chegar até identificar qual dessas faixas tem melhor resposta e capacidade de preditiva. Dessa forma, as técnicas espectroscópicas oferecem um maior potencial de detecção das alterações biológicas com a capacidade de identificar com maior detalhe a resposta espectral.

4.4.2 Espectroscopia de reflectância

Espectroscopia de reflectância é uma técnica recente, rápida e não destrutiva aplicada para a avaliação da qualidade de produtos agrícolas, que fornece informações para a análise e controle da qualidade de plantas e produtos alimentícios (CEN e HE, 2007), dentre eles, os produtos hortícolas.

As plantas são capazes de utilizar a energia luminosa para converter substâncias simples, como gás carbônico e água, em substâncias complexas que servirão de fonte de energia tanto para animais como para plantas e moléculas estruturais (LINS, 2005). Em geral, elas absorvem a radiação luminosa na região visível do espectro eletromagnético, mais precisamente na faixa entre 400 e 750 nm. A absorção da luz é realizada através de pigmentos que compõe a planta, sendo os principais as clorofilas *a* e *b* e os carotenoides. Além de absorverem a luz, os pigmentos refletem a luz não absorvida em cores diferentes. No caso das clorofilas, estas apresentam máxima absorção na região espectral do azul e do vermelho e refletem na região do verde (CEROVIC, SAMSON, *et al.*, 1999).

Como apresentado na Figura 3, a interação da luz incidente com a folha é aproveitada na propriedade de absorbância pela clorofila, e graças a absorção da radiação por parte da clorofila, ocorre o processo de fotossíntese para a conversão da radiação em ATP; no entanto, também uma parte significativa da energia é refletida pela folha (propriedade de reflectância). A reflectância ocorre devido à absorção e espalhamento da luz pela estrutura eletrônica da matéria, e pode informar sobre as condições da superfície ou internas do material. No estudo das plantas, a reflectância tem sido utilizada para informar sobre a variação na concentração

de pigmentos, sendo uma ferramenta eficiente na detecção de qualquer alteração do seu estado fisiológico (CEROVIC, SAMSON, *et al.*, 1999).

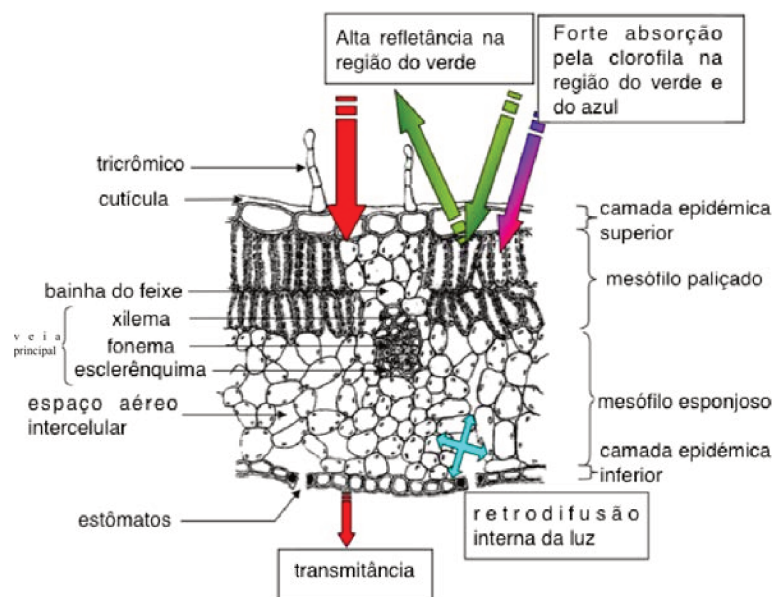


Figura 3. Representação esquemática de uma seção vertical de uma folha típica mostrando as interações com a luz. Fonte: Liew et al. (2008).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de sistemas óticos capazes de formar imagens com resolução espectral tem possibilitado maior precisão no diagnóstico de doenças que afetam as culturas agrícolas. Neste contexto, imagens de reflectância na região do visível e/ou do infravermelho permitem a detecção de defeitos e doenças em frutas, além de sintomas de estresses em folhas (CHEN, CHAO e KIM, 2002). Imagens de reflectância estão associadas com as características visuais das amostras, sendo exploradas cores e intensidades advindas destas.

Estudos hiperespectrais realizados usando índices para estimar parâmetros da vegetação são úteis para prever conteúdo de água a partir de reflectância (KIM *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012; MIRZAIE *et al.*, 2014). Pigmentos fotossintetizantes absorvem luz na região do visível (VIS), a região dos 800-1000 nm caracteriza-se pela alta reflectância das folhas (Região chamada de Patamar do NIR). Várias bandas de absorção podem ser observadas dos 1100-2500 nm, algumas influenciadas pela água (1440-1900 nm) onde as condições de seca diminuem a absorção da luz no “comprimento de onda da água”, enquanto que, a senescência diminui a absorção da luz na região do visível (ECARNOT, COMPAN e ROUMET, 2013).

As técnicas espectroscópicas apresentam elevado potencial para detecção rápida e eficiente de alterações em tecidos biológicos das plantas. Sendo assim, as análises por espectroscopia de imagem se divide em duas frentes experimentais óticas: a reflectância já abordada nesta secção e a fluorescência, com cuja excitação a clorofila tem resposta de emissão (TININI DOS REIS, 2015).

4.4.3 Espectroscopia de fluorescência

A técnica da espectroscopia de fluorescência demonstra potencial de aplicação em diferentes processos nos mais diversos ramos do conhecimento (SANKARAN, MISHRA, *et al.*, 2010). A aplicação desta técnica na agricultura, a partir da análise da emissão de fluorescência pelos pigmentos da folha, permite estudar indiretamente os estados fotossintéticos da planta e dessa forma identificar a influência das variáveis externas à cultura sobre o rendimento da mesma.

A análise de imagens de fluorescência trata-se de um método espectroscópico no qual um determinado alvo de interesse é submetido a excitação luminosa, para posteriormente medir a emissão de fluorescência do alvo (TININI, 2015). Devido a absorção de energia luminosa, a molécula de clorofila vai para um estado mais excitado e mais instável por um curto intervalo de tempo, liberando posteriormente o excesso de energia acumulada ocorre a transição para um estado mais estável (WETTERICH, 2012).

A energia absorvida pode ser dissipada através de três processos: fluorescência (F), dissipação fotoquímica (Ph) e dissipação não-fotoquímica (D); sendo cada processo de dissipação responsável por alterações nas taxas fotossintéticas e na dissipação de calor. Esses processos de dissipação da energia luminosa são competitivos, ou seja, alterações nas taxas fotossintéticas e na dissipação do calor implicarão em alterações na emissão da fluorescência. Logo, alterações na emissão da fluorescência podem mostrar a ausência ou presença dos processos fotossintéticos (WETTERICH, 2012). Consequentemente, a técnica permite a avaliação dos processos fotossintéticos a partir da análise da emissão de fluorescência.

No espectro visível existem dois tipos de fluorescência: A fluorescência da região verde-azul (400-600 nm) e a fluorescência da clorofila (650-680 nm). A análise das fluorescências anteriores são empregadas para o monitoramento do estado fisiológico e

identificação do estresse (BELASQUE, GASPAROTO e MARCASSA, 2008). Para a realização dessas análises de fluorescência, as regiões do espectro eletromagnético que são comumente usadas são: o azul (440 nm), o verde (520 – 550 nm), o vermelho (690 – 740 nm) e o infravermelho próximo (800 nm) (CHAERLE, LEINONEN, *et al.*, 2006).

Diversos estudos científicos da espectroscopia de fluorescência em plantas e culturas agrícolas têm sido desenvolvidos, estudando diferentes biomoléculas de interesse para o conhecimento fisiológico. Entre elas se destacam o ácido ferúlico, NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma reduzida), FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo), rubisco, e clorofilas *a* e *b*. Biomoléculas presentes na estrutura das folhas, que são responsáveis pela absorção da luz do ambiente para os processos de fotossíntese das plantas, como transformação da energia luminosa em ATP e transporte de energia metabólica entre as moléculas, além de exercerem outras funções bioquímicas (CEROVIC *et al.*, 1999).

Os principais pigmentos estudados na espectroscopia de fluorescência são as clorofilas *a* e *b* e os carotenoides, devido a que, por estarem presentes principalmente e em maior quantidade na estrutura das folhas, são os que absorvem maior quantidade de energia. Esses pigmentos são divididos em dois grupos segundo à sua funcionalidade, os pigmentos acessórios e o pigmento principal. Os pigmentos acessórios têm a função de absorver a luz do ambiente e entregar a energia para o pigmento principal; esse grupo é constituído pelos pigmentos da clorofila *b* e dos carotenoides. O pigmento principal é a clorofila *a*; ela também absorve luz do ambiente, mas sua principal função é capturar a energia dos pigmentos acessórios e entregá-la aos centros de reação para ocorrência da fotossíntese (LINS, 2009). Os centros de reação da fotossíntese são formados por dois fotossistemas, chamados fotossistema I (FSI) e fotossistema II (FSII).

A radiação UV é a principal fonte de radiação para induzir a fluorescência do ácido ferúlico, NADPH, FAD e do rubisco. A fluorescência destes pigmentos ocorre na região entre 400 e 550 nm, enquanto que as clorofilas absorvem fortemente entre 400 e 500 nm (azul-verde) e entre 600 e 700 nm (vermelho). Além disto, é importante notar que as próprias clorofilas reabsorvem a sua fluorescência emitida na região espectral do vermelho (CEROVIC, SAMSON, *et al.*, 1999).

Vale ressaltar que a emissão da fluorescência da clorofila *a* ocorre na região entre 650-800 nm denominada na literatura como ChlF (*Chlorophyll Fluorescence*) (CEROVIC *et*

al., 1999; BELASQUE JUNIOR *et al.*, 2008). Esta região de fluorescência da clorofila *a* é dividida em outras duas regiões, a região da fluorescência no vermelho RF (*Red Fluorescence*) compreendida entre 680 nm e 700 nm e que a sua vez depende da transferência de energia da clorofila para o fotossistema FSII; e a região da fluorescência do vermelho distante FRF (*Far Red Fluorescence*) compreendida entre 730 nm e 750 nm e depende da transferência de energia da clorofila para os fotossistemas FSI e FSII (CEROVIC *et al.*, 1999; TERCENIO, 2006; BARBAGALLO, KEVIN OXBOROUGH e BAKER, 2003; WETTERICH, 2012).

A excitação ultravioleta em folhas verdes induz duas respostas distintas: a BGF (do inglês, *Blue-Green Fluorescence*) na região entre 400-600 nm, e a ChlF mencionada anteriormente (CEROVIC *et al.*, 1999; BELASQUE JUNIOR *et al.*, 2008). As intensidades relativas destes dois tipos de fluorescência são altamente sensíveis às propriedades intrínsecas das folhas e de fatores ambientais. Os espectros de emissão de fluorescência induzido por UV podem ser considerados como uma assinatura revelando o estado fisiológico da planta (CEROVIC, SAMSON, *et al.*, 1999).

O BFG é dividido em duas regiões, a primeira é a região do azul, compreendida no intervalo entre 400 e 500 nm; a fluorescência emitida nesta região é chamada fluorescência do azul (BF, *Blue Fluorescence*). Os principais pigmentos fluorescentes nessa região são ácido ferúlico, NADP⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma oxidada) e NADPH. A outra banda ocorre na região do verde (GF, *Green Fluorescence*), compreendida entre 500 e 600 nm. Nesta região vários pigmentos são responsáveis pela fluorescência, sendo as clorofilas e os carotenoides os principais pigmentos absorvedores (CEROVIC *et al.*, 1999; LICHTENTHALER e SCHWEIGER, 1998; MORALES, CEROVIC e MOYA, 1996; BUSCHMANN, LANGSDORFH e LICHTENTHALER, 2000).

A intensidade relativa, obtida entre essas diferentes regiões de fluorescência, fornece informações essenciais para a análise das propriedades das folhas (SCHAEFER, 2011). Nestas regiões encontram-se os picos de emissão da fluorescência das folhas; na região do BGF têm-se regiões de máxima emissão em 440 nm e 520 nm, enquanto que na região da ChlF têm-se regiões de máxima emissão em 690 nm e outro em 740 nm.

Na literatura, a análise dos espectros se dá verificando as mudanças de intensidade dos picos BF, GF, RF e FRF ou ainda compondo razões entre elas. Em geral a RF/FRF é

utilizada para estudos sobre a eficiência fotossintética da planta; já a BF/ChlF ou a GF/ChlF são sensíveis aos estresses que as plantas estão sofrendo, especialmente por déficit de minerais (LINS, 2009; CEROVIC *et al.*, 1999).

4.4.4 Uso de espectroscopia na quantificação de teor de clorofila

Na literatura a clorofila tem sido indicada como indicador pré-visual do estresse devido à forte correlação demonstrada entre fluorescência de estado estacionário de clorofila F_s e condutância estomatal, a partir da emissão de fluorescência da clorofila induzida pelo sol (FLEXAS *et al.*, 2002; MOYA *et al.*, 2004). Adicionalmente, vários estudos têm avaliado a relação de fluorescência de clorofila com a fotossíntese, estado fisiológico da planta, deficiência de nitrogênio e a infecção de patógenos (LICHTENTHALER, 1992; LARCHER, 1994; SCHREIBER *et al.*, 1994; GODESBERG, 2010; LYSENKO, VARDUNI, *et al.*, 2013). A fluorescência de clorofila é usualmente descrita pelos parâmetros F_v/F_m (Fluorescência variável e Fluorescência máxima), ΦPSII que representa a eficiência atual do fotossistema, qP (*photochemical quenching*), Φ_{exc} (eficiência PSII intrínseca), e NPQ (*non-photochemical quenching*) os quais caracterizam o funcionamento do aparato fotossintético sob condições de estresse ou condições favoráveis (MORALES, ABADIA e ABADIA, 1998).

Estudos realizados para quantificar o conteúdo de água na planta, usando reflectância espectral em folhas de algodão, obtiveram coeficientes de determinação (R²) aceitáveis, na ordem de 0,6 a 0,9 para a região do infravermelho próximo (ZHANG *et al.*, 2012). Sendo esses resultados promissórios na quantificação de forma não destrutiva, evidenciam o potencial do sensoriamento remoto espectral para o monitoramento agrícola.

Já em laboratório Mirzaie *et al.*, (2014) obtiveram um alto valor de correlação para os comprimentos de onda de 825 nm (NIR) e 1443 nm (SWIR), visando estimar o conteúdo de água da vegetação para quatro variedades de plantas. Na região do MIR (*Mid InfraRed* – 2900, 4650 e 6080 nm) Ullah *et al.* (2014) obtiveram um alto coeficiente de correlação traz submeter varias espécies de plantas a desidratação progressiva, sendo a região mais sensível para estimar o conteúdo de água na planta. ZYNGIELBAUM *et al.* (2009) após a realização de estudos em campo, concluíram que a região do visível (400 – 750 nm) fornece os meios

para detectar estágios iniciais de estresse hídrico e estimar o conteúdo relativo de água, quando realizaram o estudo em folhas de milho, obtendo $R^2=0,96$.

O sensoriamento proximal oferece uma boa oportunidade para o mapeamento do estresse na vegetação e monitorar o seu comportamento no tempo; assim, desde o ponto de vista do sensoriamento proximal, o estado de estresse tem sido expressado por mudanças nos sinais ópticos relacionados a algumas variáveis vegetativas, entre as quais se destaca a concentração de clorofila. Em uma fase anterior do estresse e antes do que os danos fisiológicos ocorram, a fotossíntese decresce; em estas condições a luz absorvida excede a demanda fotossintética, aquela luz excedente é dissipada pelas plantas para evitar o dano oxidativo induzido pela luz, assim dois processos de dissipação são completados para esta luz excedente: fluorescência de clorofila e temperatura não fotoquímica, (non-photochemical quenching, NPQ) (MERONI, ROSSINI, *et al.*, 2008). A fluorescência é o processo pelo qual energia de luz absorvida pelos pigmentos de clorofila, em um comprimento de onda, é reemitida em um comprimento de onda diferente (PAPAGEORGIOU, 2004).

Têm sido apresentadas as mudanças consistentes nas propriedades óticas das folhas (reflectância, transmitância e absorvância) que ocorrem comumente devido ao estresse da planta, que podem ser explicados pelo decréscimo da concentração de clorofila induzida por estresse e, desta forma, o estresse geralmente se espera que resulte na redução de clorofila (CARTER & KNAPP, 2001). Assim, a capacidade das imagens de fluorescência da clorofila de revelar mudanças espaciais e temporais durante o desenvolvimento do estresse das plantas tem sido amplamente demonstrado (SOUKUPOVÁ *et al.*, 2008) é validado para os efeitos ambientais na fisiologia da planta. Além disso, os sistemas no campo baseados em sensores de reflectância podem oferecer um método de detecção de estresse com uma resolução espacial aprimorada quando comparada com sistemas aéreos ou sistemas de satélite.

As imagens de fluorescência da clorofila têm demonstrado capacidade de revelar mudanças espaciais e temporais durante o desenvolvimento do estresse na planta (Chaerle e Van Der Straeten, 2001; Soukupova *et al.* 2003, Berger *et al.* 2007). Os atuais sistemas de imagens a partir de fluorescência da clorofila podem monitorar as características fisiológicas de várias plantas em paralelo, porém, todos estes sistemas de imagens de fluorescência da clorofila precisam de sistema dedicado à iluminação.

A capacidade de prever o conteúdo de clorofila na folha, com base nas leituras de fluorescência ou de reação instantânea a um feixe de luz, tem sido demonstrada para diferentes espécies vegetais incluindo *Ficus benjamina* L, *Populus deltoides* Marsh, pastagem e sorgo (CECHIN, 1998; FENECH-LARIOS *et al.*, 2009). O conteúdo de clorofila na folha a partir de espectroscopia de fluorescência pode ser usado como uma medição ótica alternativa à reflectância, usando a região compreendida entre o vermelho e o vermelho distante, das bandas de fluorescência da clorofila (BUSCHMANN, 2007).

As mudanças na fluorescência da clorofila em resposta ao déficit hídrico devem-se ao processo de absorção e transdução de energia nas plantas, uma porção de luz é reemitida de volta, a quantidade de luz reemitida (fluorescência de clorofila, 685 nm) depende das condições ambientais que estejam afetando a planta (DIB *et al.*, 1994). A fluorescência variável (Fv) principalmente originada pelos fotossistemas II (PSII) e suas flutuações, principalmente refletem o estado de PSII; assim, quando as plantas estão sob estresse, os fotossistemas são afetados e reflete-se na quantidade de fluorescência da clorofila (BOLHAR-NORDENKAMPF, LONG, *et al.*, 1989). O anterior suporta que o déficit hídrico tem efeitos significativos diferenciáveis nas plantas causando a redução de clorofila a e b como o conteúdo total de clorofila (NYACHIRO, BRIGGS, *et al.*, 2001).

Tomando em conta os trabalhos citados na revisão bibliográfica apresentada, o sistema de mudas pré-brotadas MPB está se estabelecendo como uma opção promissória para a produção de mudas de alta qualidade fitossanitária e com um alto padrão de uniformidade. Para complementar o sistema produtivo é necessário realizar uma irrigação que atinge o patamar de eficiência requerido para cumprir com suficiência os requerimentos da cultura de forma que o sistema de subirrigação é um dos principais avanços que estão sendo pesquisados na atualidade e traz consigo um grande potencial para melhorar a produção de mudas de cana-de-açúcar.

Com o intuito de aprimorar as características do sistema produtivo fazendo um melhor uso da fertilização, a integração da tecnologia do sistema de subirrigação com a fertirrigação representa uma solução para a otimização de insumos pois quando os fertilizantes são diluídos na água de irrigação eles vão ter um menor tempo para atingir as raízes, menor tempo de absorção e maior resposta na planta; de igual forma, quando aplicados na subirrigação essas vantagens são maximizadas.

Quanto a avaliação e monitoramento do desenvolvimento das mudas durante a sua permanência na casa de vegetação ainda existe deficiências na falta de padronização das medições. Dessa forma quando realizadas as medições, se podem apresentar diferentes discrepâncias e também muitas das amostragens comuns, ou são destrutivas ou são pontuais e dependem de um adequado tratamento para garantir a representatividade da população na casa de vegetação. Assim, os métodos óticos brindam a possibilidade de estabelecer um protocolo de amostragem objetivo e preciso, sem ser destrutivo e ainda sentando bases para monitoramento geral da área.

Nos estudos citados tem se referenciado o potencial preditivo das imagens, tanto como para RGB como para espectrais, de parâmetros relacionados à clorofila em culturas diferentes a cana-de-açúcar. A clorofila por sua parte está sendo pesquisada por sua capacidade de assessorar o estado nutricional da planta, principalmente de nitrogênio. Esse potencial preditivo é explorado com o uso do processamento de imagem junto com a incorporação de modelos preditivos. Dessa forma, se propõe uma metodologia para a avaliação de clorofila nas mudas de cana-de-açúcar por meio de imagens RGB e espectrais (reflectância e fluorescência), com um processamento de imagens e um tratamento dos dados de forma multivariada com o intuito de obter modelos preditivos de clorofila e parâmetros de classificação por variedades e estados nutricionais.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Descrição da área de estudo

O experimento foi desenvolvido entre os dias 16 de agosto e 15 de setembro do ano 2017, no campo experimental da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no município de Campinas-SP, cujas coordenadas geográficas são: 22° 48' 57" de latitude sul 47° 03' 33" de longitude oeste e altitude de 640 m. O clima é classificado como tropical de altitude com inverno seco e verão úmido, entre os tipos Cwa e Cfa da classificação Köppen.

A pesquisa foi executada em parceria com estudos desenvolvidos pelo Prof. Dr. Edson Eiji Matsura (UNICAMP - FEAGRI) e limitou-se à coleta de amostras do esquema experimental na casa de vegetação do modelo *Poly House* com cobertura de polietileno, no decorrer do experimento da mestranda Natalia Fortuna (Figura 4 e Figura 5). Dentro da casa de vegetação foram dispostas um total de 4 mesas de subirrigação, projetadas para o desenvolvimento de mudas de cana-de-açúcar empregando o sistema MPB, cada mesa contava com 3 cultivares diferentes de cana-de-açúcar, sendo as cultivares IAC1099, IAC 5000 e IAC 5094.

A instrumentação para o sistema de fertirrigação é composto por um sistema de controle *ON-OFF* temporizado, atuando unicamente na bomba que aplica as soluções nutritivas de forma simultânea nas mesas de irrigação, o qual é controlado em função da umidade no substrato (monitorada com sensores capacitivos) e o nível de solução nas mesas.

Trabalharam-se duas doses diferentes para a composição da solução nutritiva, duas mesas foram submetidas a da dose completa (60 % da dose recomendada para adubação da cana-de-açúcar totalmente desenvolvida em campo): N 194,0 mg/L; P 100,4 mg/L; K 233,6 mg/L; Ca 133,6mg/L; Mg 33,0 mg/L; S 41,9 mg/L; B 0,333 mg/L; Cu 0,033mg/L; Fe 1,993mg/L; Mn 1,005 mg/L; Mo 0,052mg/L; Zn 0,199. As duas mesas restantes foram submetidas tratamento que consta de uma solução com a metade da dose recomendada (30 % da dose completa recomendada para adubação em campo) de: N 97,0 mg/L; P 50,2 mg/L;

K 116,8 mg/L; Ca 66,8 mg/L; Mg 16,5 mg/L; S 21,0 mg/L; B 0,167 mg/L; Cu 0,016mg/L;
Fe 0,997 mg/L; Mn 0,503 mg/L; Mo 0,026mg/L; Zn 0,100.

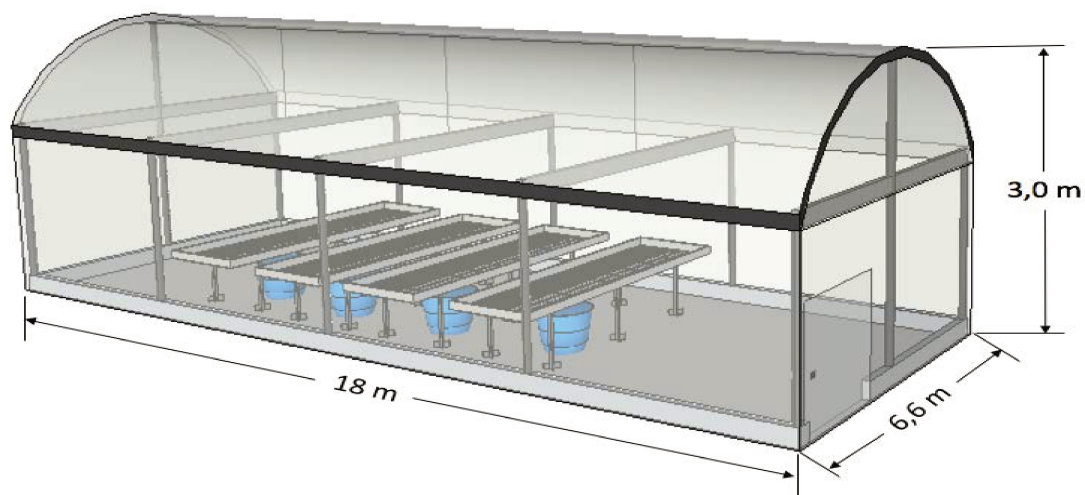


Figura 4. Representação do sistema de MPB com mesas de subirrigação na casa de vegetação, adaptado de Rodrigues, (2016).

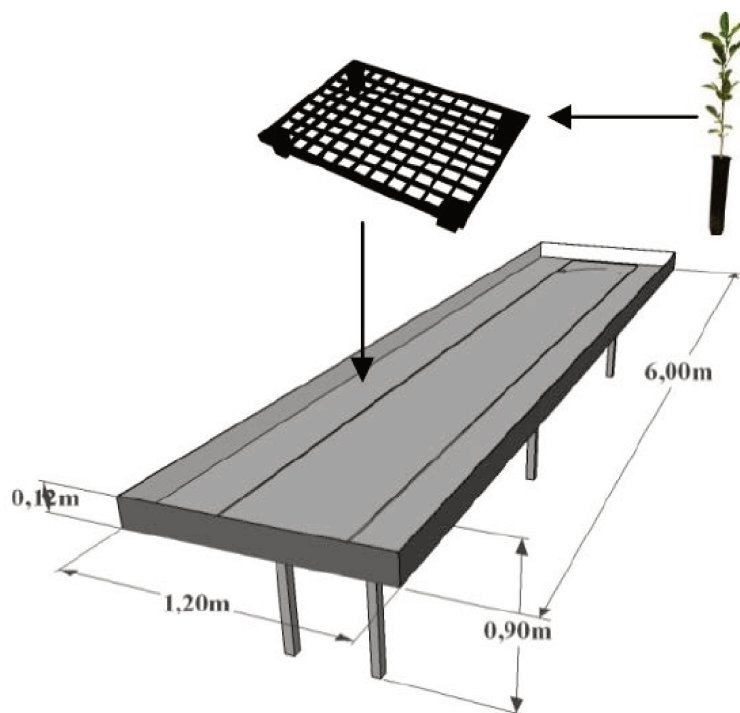


Figura 5. Representação esquemática da mesa de subirrigação (FILHO, FERRAREZI, *et al.*, 2011).

5.2. Unidades experimentais

As amostras de mudas de cana-de-açúcar são retiradas da casa de vegetação experimental da FEAGRI, as quais previamente foram brotadas no centro de pesquisa do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) no centro de cana em Ribeirão Preto (SP). No experimento trabalhou-se com as variedades IACSP95-5000, IAC91-1099 e IACSP95-5094, todas as variedades do programa de cana do IAC.

A variedade IAC91-1099 é caracterizada por ter uma excelente produtividade ao longo dos ciclos, estando bem adaptada ao plantio mecânico, com fechamento rápido, com uma ótima colheabilidade por ser ereta, apresentando florescimento e sendo uma variedade favorável aos ambientes de inverno (LANDELL, CAMPANA, *et al.*, 2007).

A variedade IACSP95-5000 destaca-se por ser responsiva com alta produtividade, está bem adaptada ao plantio mecânico, alta população de colmos em socas, diâmetro de colmos uniforme e estável, elevado teor de sacarose, com ótimo comportamento em áreas com manejo e caracterizada por sua ótima colheabilidade por ser considerada uma variedade ereta. Os ambientes mais favoráveis são o inverno e a primavera em regiões ou áreas com déficit hídrico menor a 400 mm por ciclo (LANDELL, CAMPANA, *et al.*, 2007).

A variedade IACSP95-5094 tem as características de ser estável, responsiva com elevada produtividade, bem adaptada ao plantio mecânico, contando com ótima colheabilidade sendo ereta e resistente ao acamamento e apresenta um bom comportamento em área orgânica. É uma variedade favorável principalmente aos climas de inverno e primavera sendo ligeiramente desfavorável para ambientes de outono (LANDELL, CAMPANA, *et al.*, 2007).

O esquema experimental implementado no experimento para a espacialização das unidades experimentais foi de fatorial em parcela subdividida com blocos ao acaso, sendo três variedades, cada uma com 6 repetições e 2 doses com 2 repetições. Os tratamentos foram repetidos de forma intercalada nas mesas de forma que a primeira e a terceira mesa foram submetidas ao tratamento da dose completa e a segunda e quarta mesa foram submetidas ao tratamento da metade da dose recomendada (Figura 6).

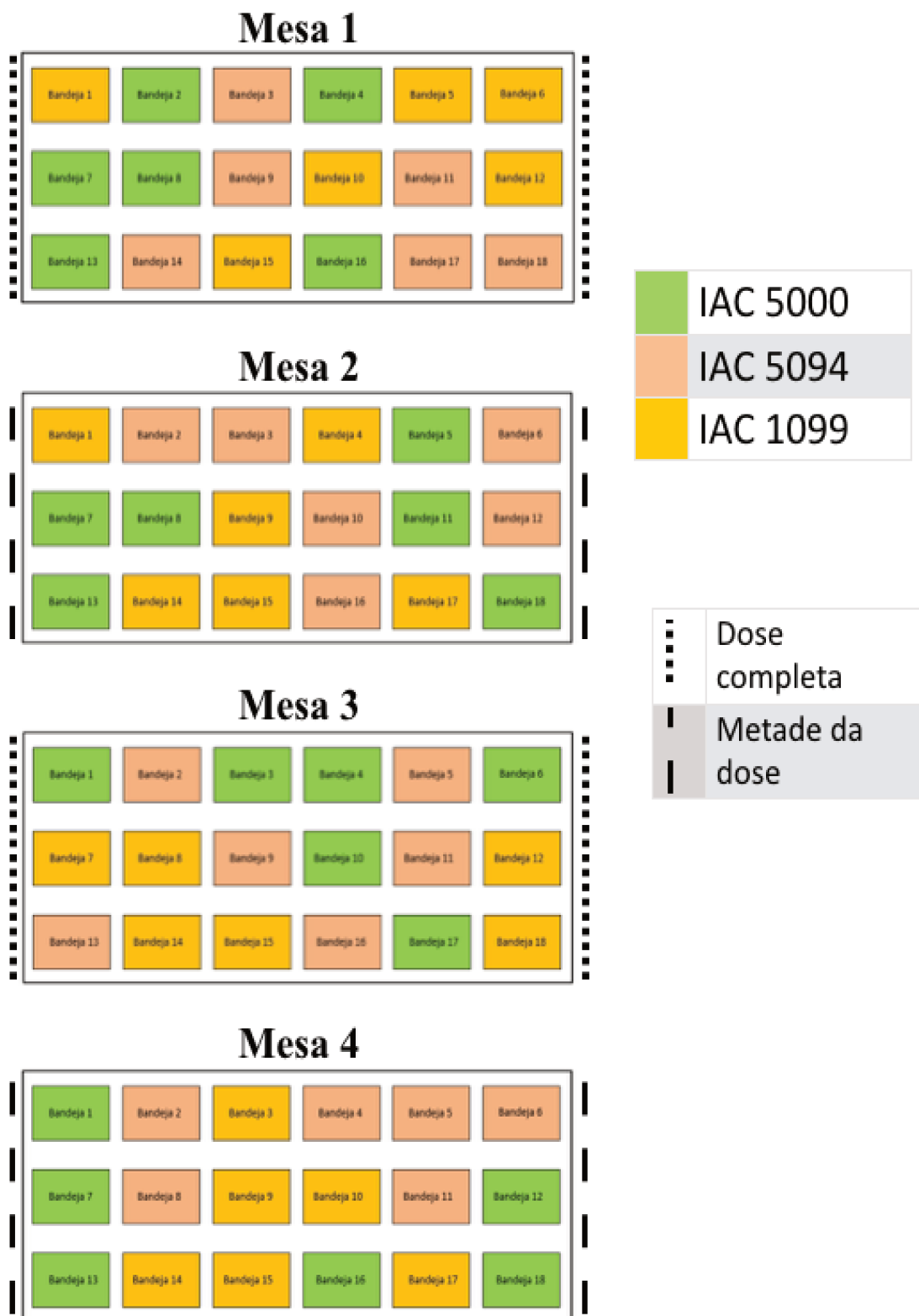


Figura 6. Vista de planta do esquema experimental.

Foi realizada uma amostragem semanal durante as quatro semanas de permanência das mudas na casa de vegetação, onde na última semana as amostras foram retiradas das mesas de subirrigação para induzir estresse e obter dessa forma maior variação da clorofila, obtendo finalmente um total de 144 amostras em total para o experimento. Cada dia de amostragem as folhas foram retiradas na casa de vegetação, armazenadas e etiquetadas em sacolas plásticas e imediatamente transportadas ao laboratório. Chegando no laboratório foi retirado o tercio meio da folha, região da qual foi retirada uma porção com peso de 30 mg, de cada uma dessas amostras foi medido o teor de clorofila com o medidor de clorofila SPAD (502 Plus – Konica Minolta) em três regiões diferentes e foi calculada a média como valor representativo de cada amostra, em cada uma dessas amostras de 30 mg posteriormente foram realizados os procedimentos de medição de clorofila e aquisição de imagem.

5.3. Etapas do experimento

Para o desenvolvimento do estudo foi seguida a metodologia proposta por Tinini (2015), de forma que o experimento foi realizado em duas etapas, com o intuito de: 1) caracterizar o comportamento espectral das mudas de cana-de-açúcar e 2) correlacionar as imagens espectrais com o teor das clorofilas para criar o melhor modelo de predição das clorofilas. Os procedimentos desta pesquisa foram realizados nas dependências do Laboratório de Termodinâmica e Energia (LTE) e no laboratório de saneamento (LABSAN) da FEAGRI.

A primeira etapa teve como intuito identificar o comportamento espectral das mudas de cana-de-açúcar das diferentes variedades submetidas a diferentes doses de fertirrigação, usando técnicas de processamento de imagens para a obtenção da informação espectral, e a partir da anterior, analisar a possibilidade de discriminação entre cultivares, tratamento e tempo de desenvolvimento das mudas através do uso de imagens digitais tricromáticas (RGB) e imagens espectrais de refletância, absorbância e fluorescência no espectro visível, usando técnicas quimiométricas de exploração dos dados.

Já a segunda etapa pretendeu correlacionar os dados espectrais e os teores de clorofila, usando métodos quimiométricos de análise e regressão multivariada baseados nas imagens digitais e espectrais de refletância, absorbância (realizando uma transformação das imagens

de refletância para absorbância) e fluorescência para finalmente obter o melhor modelo para predição do teor de clorofila.

5.3.1 Etapa de caracterização espectral

A etapa de caracterização espectral teve como intuito identificar o comportamento espectral das mudas, de diferentes cultivares submetidas a doses de fertirrigação diferenciadas e durante os tempos de desenvolvimento. Posteriormente foi analisado o comportamento das amostras e avaliada a distribuição e agrupamentos em função das classes, partindo dos espectros de refletância, absorbância e fluorescência no espectro visível, e através de imagens digitais coloridas.

Para a identificação do comportamento espectral a partir de imagens, foi instrumentado um sistema de aquisição, garantido condições adequadas para a aquisição de imagens, o qual foi controlado por meio de um supervisor, com interface gráfica para o usuário, implementado no software Labview ® (*National Instruments*) para o ajuste e controle dos parâmetros da aquisição das imagens espectrais. As imagens digitais devem ser processadas para obter informação suficiente para a análise, de forma que dois algoritmos de processamento de imagens foram desenvolvidos, para o processamento de imagens digitais coloridas e imagens espectrais respectivamente.

5.3.1.1 Instrumentação da medição de clorofila e da aquisição de imagens

A aquisição de imagens foi planejada de forma que nas folhas de amostragens, nas quais foram realizados os métodos para medição da clorofila, fossem minimamente alteradas. Como já foi informado anteriormente, foram realizados dois métodos de medição de clorofila, o método analítico de laboratório fazendo extração da clorofila, e o método usando o medidor de clorofila portátil SPAD. Como o método analítico de laboratório é destrutivo, primeiro foram realizadas as medições com o sensor SPAD, posteriormente a aquisição das imagens e por último o método destrutivo.

Mediu-se o teor de clorofila utilizando o medidor portátil de clorofila SPAD-502 Plus, na folha diagnóstico “folha +1” (Figura 7 B), sendo a primeira folha de cima para baixo do

talo com barbelas (Figura 7 A) vistas claramente (MAGRO, TAKAO, *et al.*, 2011), no terço meio da folha, de cada uma das três mudas de amostragem por variedade. As mudas foram selecionadas aleatoriamente na bandeja de amostragem de cada mesa de irrigação; dessa forma, para cada dia de amostragem se tomaram três amostras para cada uma das três variedades de cada mesa, fazendo o anterior para as quatro mesas resultando em trinta e seis amostras para cada dia de amostragem.

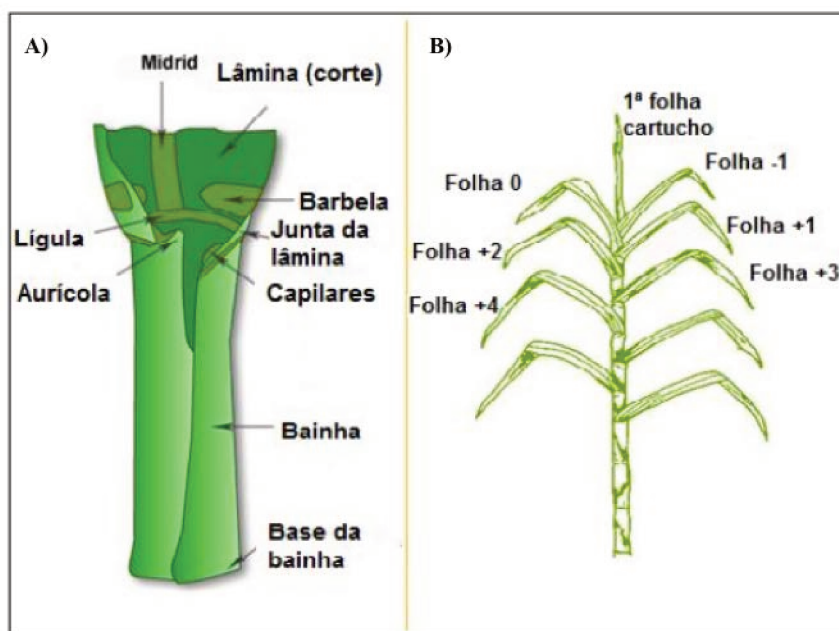


Figura 7. Sistema de numeração de folhas no sistema estabelecido por Kuijper (CASAGRANDE, 1991), mostrando em detalhe a região de união da folha com o caule (A) e a numeração das colhas (B).

O medidor SPAD-502 Plus tem como princípio de funcionamento (Figura 8) o cálculo do teor de clorofila presente na porção da folha, baseando-se na quantidade de luz transmitida pela folha em duas regiões do espectro eletromagnético, nas quais a absorbância da clorofila é diferente. Dessa forma, o equipamento está equipado com dois LEDs, um vermelho (650 nm aproximadamente) e um infravermelho (940 nm aproximadamente) os quais emitirão luz sob a folha, para depois, a partir de receptores (fotodiodos) converter o sinal em elétrico. Com a relação de intensidades da luz transmitida é calculado o teor de clorofila.

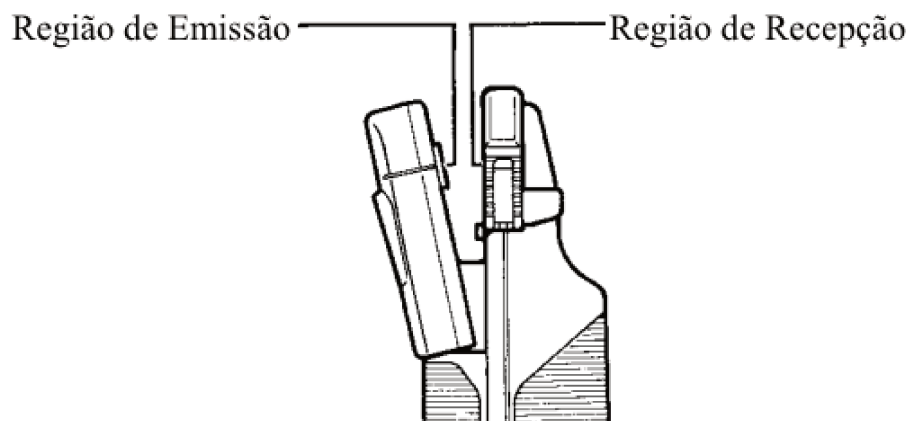


Figura 8. Princípio de funcionamento do medidor SPAD-502 Plus, apresentando as regiões para iluminação (LEDs) e recepção (Fotodiodos), para a quantificação do teor de clorofila.

O sistema de aquisição de imagens espectrais de refletância e fluorescência, apresentado na Figura 9, foi projetado no Laboratório de Fotônica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC – USP) na cidade de São Carlos –SP, é composto por: a) sistema de câmera e filtros (com uma câmera CCD, lentes e filtro ótico), b) um suporte para o sistema de iluminação e c) um sistema de iluminação (com LEDs).

O sistema de iluminação é composto por LEDs (diodos emissores de luz) de alta potência, com aproximadamente 200 mW por diodo. Três tipos de LEDs compõem o sistema: LEDs de emissão de luz branca (para a aquisição de imagens de refletância) com potencia de 10W e temperatura de cor de 3050K (CREE LEDs ®) e LEDs de fluorescência nos comprimentos de onda nos espectros de 405 e 470 nm (para aquisição de imagens de fluorescência) com variação de luminosidade de ± 5 nm (CREE LEDs ®). Os LEDs do sistema de aquisição são alimentados com uma tensão de 10 V, e estão fixados a um suporte metálico com disposição adequada para a distribuição homogênea da luz sobre as superfícies do produto.

Para a aquisição de imagens espectrais é necessário isolar a incidência de luminosidade externa à produzida pela praça de iluminação, pelo qual foi construída uma estrutura para isolar a luminosidade interna e foi disposto um fundo de alumínio anodizado preto fosco para evitar ruído gerado pela resposta da placa na qual foram dispostas as amostras.

Realizou-se a captura da imagem usando a câmera digital (RGB) com as diferentes fontes de excitação e depois se procedeu a realizar a aquisição das imagens espectrais. No

sistema de aquisição de imagens foram utilizadas duas câmeras com características diferentes, uma câmera digital RGB da referência Canon PowerShot SX510 HS com sensor tipo CCD com resolução de 4000 x 2248 pixels (Aprox. 12 MP); e uma câmera CCD científica da marca mvBlueFox 223G(Matrix vision ®, Alemanha), com resolução de 1360 x 1024 pixels na área ativada do sensor e um sistema de lentes de 25 mm da marca Edmund Optics ®, além de uma roda de filtros motorizada da marca Thorlabs ®, modelo FW102C com capacidade para 6 filtros, na qual foram colocados os filtros com os comprimentos de onda de interesse, entre 480 a 710 nm (comprimento de onda que abrange a região visível do espectro eletromagnético).

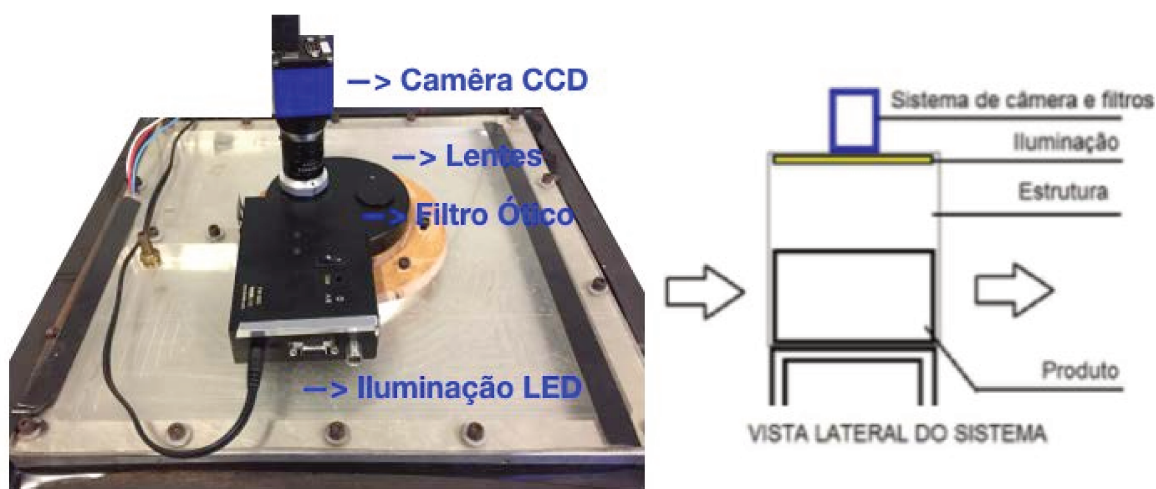


Figura 9. Esquema de instalação do sistema de aquisição de imagens espectrais, adaptado de Tinini (2015).

O método de aquisição das imagens, ilustrado no fluxograma apresentado na Figura 10, foi baseado no sistema descrito por Wetterich (2012), que consiste em deixar o ganho da câmera CCD em 30dB (valor máximo suportado pelo sistema) e variar o tempo de exposição de modo a não saturar a imagem até o máximo de 10000ms (limite suportado pela CCD). Após este ajuste da imagem inicia-se a captura da imagem, em que primeiro se excita o produto por dois minutos com uma das luzes de excitação, mantém a luz ligada e procede-se o ‘*snapshot*’ (aquisição propriamente dita). Após a captura e a imagem salva desliga-se a luz, muda o comprimento de onda através da roda de filtros e estações de luz, para realizar uma nova aquisição. Este procedimento foi repetido para todos os comprimentos de onda e fontes

de excitação.

Para a realização da aquisição das imagens espectrais, foi utilizando um aplicativo de supervisão e controle no software Labview®, previamente desenvolvido pelo Tinini (2015) que conta com interface gráfica para o usuário. O aplicativo de supervisão tem a funcionalidade de aquisição das imagens espectrais, controle do ganho da câmera CCD e do tempo de exposição do sensor.

As avaliações do teor de clorofila nas folhas foram realizadas através da análise de refletância, absorbância e fluorescência no espectro visível, e análise colorimétrico tricromático das imagens digitais RGB. Junto com as metodologias de determinação destrutivas dos parâmetros anteriores foram validadas as técnicas óticas de predição do teor de clorofila.



Figura 10. Fluxograma do método de aquisição das imagens espectrais.

5.3.1.2 Procedimentos de laboratório

As amostras foliares, depois da aquisição das imagens, foram transportadas de volta para o laboratório em que se realizou a extração e quantificação das clorofilas (Chl *a*, Chl *b* e Chl *T*) usando o método analítico de laboratório. Imediatamente após a chegada ao laboratório LABSAN, as amostras foram retiradas da placa de aquisição e foram dispostas individualmente em tubos de ensaio tipo *falcon*. Para a extração dos pigmentos e quantificação dos teores de clorofilas, foi seguido o procedimento proposto por Hiscox e Israelstam (1979), sendo modificado para 30 mg de amostra, mantendo a mesma relação entre peso da amostra e volume do reagente. Em cada tubo *falcon* foi disposta uma amostra foliar previamente identificada, em seguida foram medidos, com micropipeta, 3 ml de Dimetil-Sulfoxido (DMSO) e acrescentados em cada um dos tubos, como apresentado na Figura 11. Tendo feito o anterior para todas as amostras, foram cobertas em papel alumínio e dispostas no respectivo suporte, para posteriormente, serem postas em mesa de agitação por 24 h a uma agitação baixa.

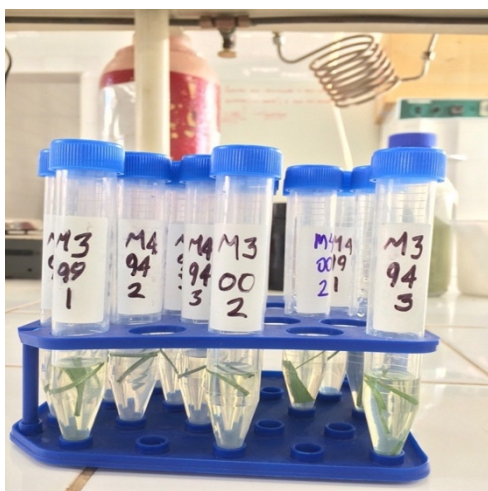


Figura 11. Disposição das amostras foliares com DMSO para a extração dos pigmentos.

Passadas às 24 horas em agitação no escuro, o sobrenadante de cada uma das amostras foi retirado (micropipeta) para ser levado para uma cuba de quartzo com dois lados foscos e realizar a medição no espectrofotômetro *Genesys 10S UV-VIS (Thermo Scientific)*. O branco da medição foi realizado com DMSO puro e a continuação cada uma das amostras foi retirada do tubo e vertida na cuba para realizar a medição nos comprimentos de onda de 645 e 663

nm de absorvância de cada uma das amostras, sendo esses comprimentos de onda empregados no método descrito devido a que está amplamente demonstrado que são as regiões de maior absorção da clorofila. Havendo feito todas as medições de absorvância para todas as amostras, os teores de clorofila *a*; clorofila *b* e clorofila total foram calculados como mostrado a continuação:

$$Chl\ a\ (g\ l^{-1}) = 0.0127A_{663} - 0.00269A_{645} \quad (1)$$

$$Chl\ b\ (g\ l^{-1}) = 0.0229A_{645} - 0.00468A_{663} \quad (2)$$

$$Chl\ a + b\ (g\ l^{-1}) = 0.0202A_{645} - 0.00802A_{663} \quad (3)$$

Onde:

Chl *a*: Teor de clorofila *a*.

Chl *b*: Teor de clorofila *b*.

Chl *a* + *b*: Teor de clorofila total.

A₆₄₅: Absorvância medida no comprimento de onda de 645 nm.

A₆₆₃: Absorvância medida no comprimento de onda de 663 nm.

5.3.1.3 Processamento das imagens e análise de dados

Na análise exploratória busca-se explorar a variação do teor de clorofila foliar nas mudas das variedades IAC 1099, IAC 5000 e IAC 5094, submetidos aos tratamentos de fertirrigação com a dose completa recomendada e com a metade da dose recomendada. Com o anterior se pretende uma análise inicial exploratória do comportamento da clorofila em relação aos fatores de variação correspondentes à variedade e a dose.

Para a análise exploratória da clorofila, inicialmente foi realizada uma comparação dos teores de clorofila medidos, pelo método de referência e o sensor SPAD, com os valores obtidos em outros trabalhos de avaliação de clorofila em cana-de-açúcar. Posteriormente, foi verificado o comportamento da clorofila em função das diferentes variedades e das doses de fertirrigação, por meio do cálculo de médias e desvios padrões, buscando quantificar a uniformidade respeito a cada um dos fatores de variação.

Realizou-se também, a verificação da relação entre o teor de clorofila e a medição usando o medidor portátil de clorofila SPAD. Para isto, foi realizada uma análise de regressão entre o teor de clorofila e o valor da medição usando a totalidade das amostras avaliadas no

experimento. Realizaram-se análises de regressão para cada um dos teores de clorofila (*a*, *b* e total) respeito à medição do medidor portátil.

O processamento das imagens obtidas foi realizado logo após a aquisição; o processamento consiste no conjunto de operações a serem realizadas para melhorar a visibilidade de recursos e obtenção de informação para facilitar a análise subsequente, sendo composto pelos processos de pré-processamento, segmentação e extração de características (ZHANG, HUANG, *et al.*, 2014).

Para processar as imagens RGB foi realizado um algoritmo (Figura 12) capaz de executar a segmentação da imagem, separar as componentes de cor de cada ROI e calcular as componentes normalizadas, e finalmente calcular a média de cada componente de cor para cada uma das regiões de interesse. A segmentação foi realizada de forma automática a partir de limiares estabelecidos especificamente para as folhas de cana-de-açúcar e o fundo do sistema de aquisição, e teve como objetivo de separar a região em estudo do fundo, identificando a ROI (região de interesse) para possibilitar o processamento da imagem. Após a segmentação, no algoritmo foi implementada a separação das componentes de cor de cada pixel e a normalização de cada uma das componentes de cor RGB calculando as componentes de cor normalizadas *rgb* (equações 4-6) (RIGON, CAPUANI, *et al.*, 2016). Posteriormente foi calculada a média de todos os pixels da ROI, para cada uma das componentes de cor RGB e nas componentes normalizadas *rgb*. Usando o algoritmo descrito foi possível obter o valor de resposta para cada uma das amostras em cada componente de cor (RGB), com e sem normalização das componentes (*r*, *g* e *b* após a normalização, equações 4 - 6).

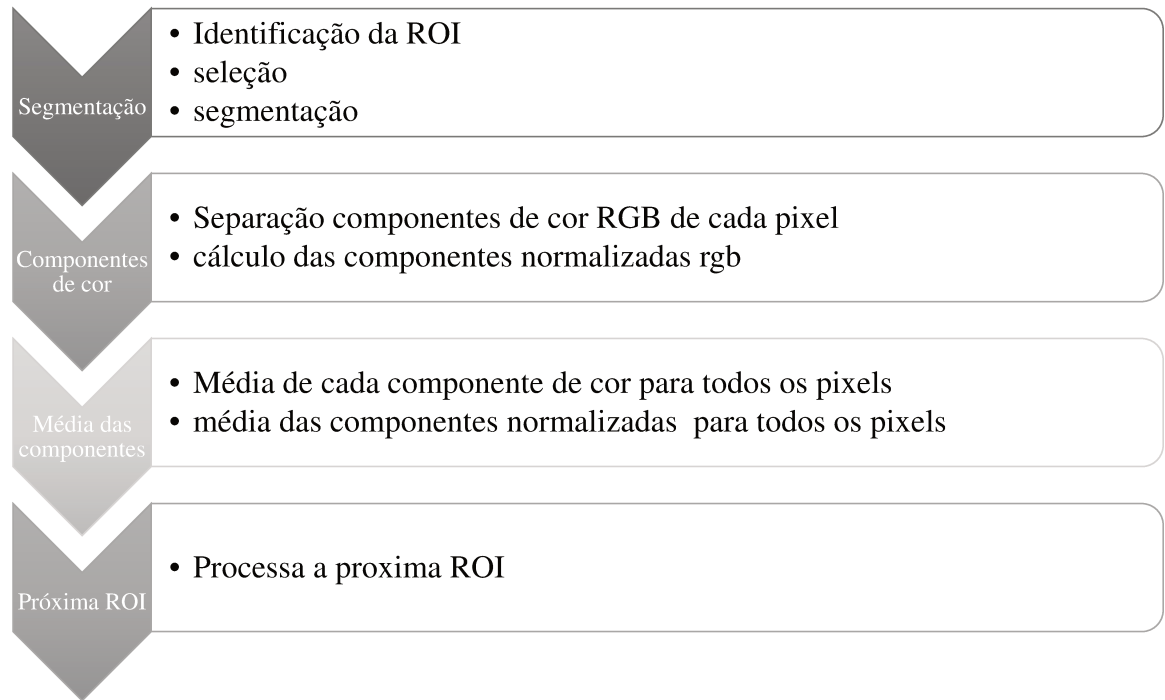


Figura 12. Fluxograma do algoritmo de processamento das imagens coloridas.

$$r = \frac{R}{R + G + B} \quad (4)$$

$$g = \frac{G}{R + G + B} \quad (5)$$

$$b = \frac{B}{R + G + B} \quad (6)$$

No processamento espectral, foi desenvolvido um algoritmo de processamento espectral (Figura 13) com a capacidade de normalizar as imagens espectrais em função da curva de resposta da câmera CCD, segmentar as imagens espectrais usando a imagem máscara de referência, organização de todos os valores dos pixels das ROIs na matriz *Dataset*, e criação da matriz espectral.

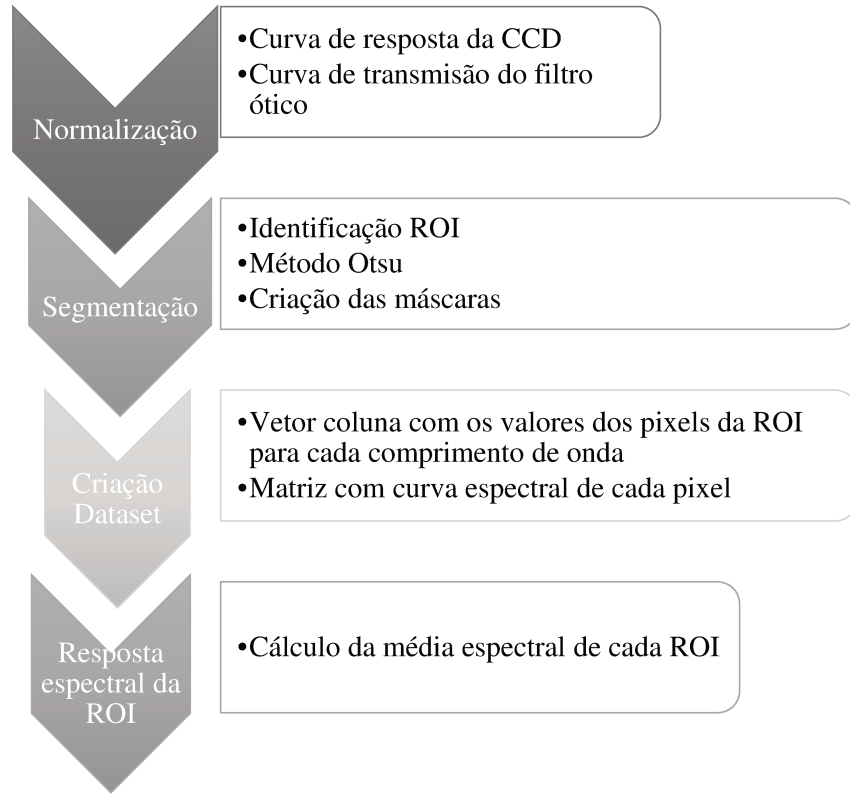


Figura 13. Fluxograma do algoritmo de processamento de imagens espectrais.

A normalização das imagens foi realizada de acordo à curva de resposta da câmera CCD e da curva de transmissão do filtro ótico. Esta normalização consiste em multiplicar as funções de resposta de ambos os equipamentos nos comprimentos de onda em que foram adquiridas as imagens. Em seguida, aplica-se às imagens para eliminação da informação espectral e da informação do tempo de exposição, o que retira a saturação das imagens normalizadas (TININI, 2015) conforme:

$$E = T_c \times T_f \quad (7)$$

$$I_s(\lambda) = \frac{I(\lambda)}{E_n(\lambda)} \quad (8)$$

$$I_f(\lambda) = I_s(\lambda) \times \frac{t_{min}}{t(\lambda)} \quad (9)$$

Onde:

E – Curva de resposta após multiplicação das curvas de resposta.

T_c – Curva de resposta da CCD.

T_f - Curva de resposta do filtro ótico.

I_s - Imagem com eliminação da informação espectral.

I_f - Imagem final.

I – Imagem original.

E_n - Função E normalizada.

t_{min} - Tempo de exposição mínimo (ms).

t – Tempo de exposição no comprimento de onda específico (ms).

λ - Comprimento de onda (nm).

Seguindo o procedimento proposto por Tinini (2015), o processo de segmentação foi baseado em regiões, usando o método de Otsu, no qual se selecionam as imagens dos comprimentos de onda que apresentam maior diferença entre o fundo e a região de interesse para a fonte de excitação (iluminação) e usando também uma seleção manual das regiões de interesse a partir de uma interface gráfica para a criação das mascaras binárias. O método de Otsu maximiza a variância entre classes a partir do histograma, assumindo uma distribuição normal de frequências entre a intensidade do fundo e a intensidade de cada amostra, com o qual se faz possível a discriminação da ROI do fundo (MIZUSHIMA e LU, 2013).

Posterior a segmentação da imagem, é realizada uma multiplicação da máscara binária (resultado da segmentação) com todas as imagens pré-processadas correspondentes ao intervalo de comprimentos de onda abrangido pela imagem máscara. Lembrando que cada máscara binária é aplicada às 5 imagens que foram capturadas na mesma rodada de filtros. Com o procedimento anterior resulta em uma imagem segmentada com apenas as regiões de interesse, para cada imagem correspondente a cada comprimento de onda.

Sendo segmentada corretamente a ROI, procedesse a organizar os dados, em que foi construído um vetor coluna com os valores dos pixels da região de interesse, ou seja, referentes a região da imagem que contém as amostras de folhas da cana-de-açúcar (onde cada pixel da amostra será uma linha), para cada uma das imagens correspondentes a cada comprimento de onda.

A continuação, os vetores coluna de todos os comprimentos de onda são asignados a coluna correspondente dentro a matriz *Dataset* resultado do processamento, onde o vetor correspondente ao primeiro comprimento de onda (480 nm) é a primeira coluna, 490 nm a segunda coluna e assim sucessivamente, mantendo as amostras nas linhas, conforme a equação (10).

$$Dataset = \begin{bmatrix} x_{\lambda_1 1} & \cdots & x_{\lambda_n 1} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{\lambda_1 n} & \cdots & x_{\lambda_n n} \end{bmatrix} \quad (10)$$

Após a segmentação e a criação do *Dataset*, composto pelos valores de cada pixel da ROI, foi realizada uma exploração para achar a ROI de menor tamanho e que, consequentemente contém o número mínimo de pixels (nmp) usando um algoritmo simples com esse propósito. Em função desse tamanho mínimo no algoritmo foi implementada uma função para calcular a média dos nmp pixels de cada ROI. Com o anterior foi possível dar um valor de resposta único para cada uma das amostras em cada comprimento de onda, dando passo a construção do espectro de resposta. Tomando em consideração que será avaliada a resposta em absorbância, os dados de refletância foram transformados conforme a equação:

$$A = -\log \frac{1}{R} \quad (11)$$

Onde:

A = Absorbância

R= Refletância

O processamento espectral foi desenvolvido no ambiente de programação MATLAB®, para quantificar a diferença da resposta espectral para cada fonte de excitação no espectro visível, entre as mudas de cana. Para isso foi realizada uma análise quimiométrica através da análise multivariada de componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*). A diferença entre as mudas de cana estudadas em cada fonte de excitação foi observada a partir do gráfico de *scores*, que consiste na composição das principais componentes em relação às amostras sendo possível examinar as relações entre amostras. Para verificar qual comprimento de onda é mais importante para a representação espectral dos dados, analisou-se o gráfico de *loadings* (peso de cada variável normalizada).

O PCA é um método utilizado para projetar dados multivariados em um espaço de dimensão menor reduzido, assim a dimensionalidade do espaço original do conjunto dos dados sem que as relações entre as amostras sejam afetadas. Consequentemente, as informações relevantes serão separadas e ampliadas, tornando-se mais evidentes à inspeção visual. A utilização dessa metodologia tem a vantagem de que possibilita descobrir, visualizar e interpretar as diferenças existentes entre as variáveis e examinar as relações que podem existir entre as amostras (FERREIRA, 2015).

A redução de espaço dimensional é feita através das componentes principais, de modo que se determinam autovetores e autovalores da matriz de covariância dos dados originais e cria-se uma matriz em que o primeiro elemento corresponde ao vetor com maior autovalor, assim sucessivamente até o último elemento da matriz sendo o auto vetor com menor valor (equação 12). Dessa forma são selecionadas as componentes principais com a maior variância acumulada e descartar as componentes que tem menor informação dos dados que são objeto de estudo (WETTERICH, 2012).

$$X = U \times S \times V^T \quad (12)$$

Onde:

X – Matriz de dados.

U – Autovalores.

S – Autovetores.

V – Matriz de *loadings*.

T – Representa a transposta.

A equação anterior representa o método de Decomposição por Valores Singulares (SVD) o qual é o mais usado pelos químicos, sendo considerado a técnica numérica mais acurada e estável para o cálculo das componentes principais. A decomposição SDV pode ser aplicada a qualquer matriz real e as matrizes U, S e V são determinadas simultaneamente (FERREIRA, 2015).

5.3.2 Modelagem espectral

O objetivo da etapa de modelagem foi correlacionar os dados espectrais e parâmetros de cor com os teores de clorofila nas folhas, variedade, tempo de desenvolvimento e tratamento nutricional das mudas, com o uso de regressão multivariada através de imagens espectrais de refletância e fluorescência no espectro VIS (visível), usando também o software MATLAB®.

Para a quantificação dos parâmetros relacionados com os teores de clorofila na folha (*chl a*, *chl b* e *chl T*) se realizaram modelos de predição. Os métodos empregados para realizar a regressão multivariada foram os métodos de Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS por sua sigla em inglês *Partial Least Squares*) e o método de Regressão por Componentes Principais (PCR pela sigla em inglês *Principal Components Regression*).

A regressão por quadrados mínimos parciais é um método, que é tendência nos tempos atuais de grande aceitação na comunidade científica, que emprega a análise de fatores, sendo de longe o método de regressão multivariada mais popular em quimiometria. A motivação do método é aproximar o espaço das médias originais por um de dimensão reduzida, com restrições na decomposição da matriz de dados direcionando-a para uma solução cujo alvo é a propriedade de interesse (FERREIRA, 2015).

O método de Regressão por Componentes Principais utiliza as mesmas etapas da análise PCA. A construção do modelo usando PCR envolve as etapas de fazer a compressão da matriz de dados e depois é feita a projeção do vetor da variável resposta, no subespaço gerado pelas componentes principais. Os componentes principais têm a capacidade de capturar outras fontes de variação além daquelas causadas por mudanças na matriz de variáveis dependentes (FERREIRA, 2015).

As amostras foram divididas em dois conjuntos de dados, um conjunto com os dados correspondentes a 2/3 das amostras para realizar a calibração e a validação cruzada, e um conjunto com os dados correspondentes a 1/3 das amostras para a validação externa (predição). A subdivisão em conjuntos de dados na relação anterior segue a recomendação de Ferreira (2015) de que o tamanho do conjunto de validação externa deve ser pelo menos de 30% do número de amostras no conjunto de calibração para análise multivariada. A relação trabalhada além de cumprir com a recomendação da literatura, foi selecionada para aproveitar que os dados foram levantados em triplicata.

Assim, a análise de regressão multivariada ocorreu em três etapas, a calibração multivariada (treino de previsão) e a validação cruzada ou interna (desempenho de previsão) e a validação externa (predição). Para obtenção dos modelos multivariados utilizamos sempre o número de componentes principais que representa mais de 90% dos dados, cujos modelos PLSR e PCR obedecem a Equação 13:

$$y = X.b \quad (13)$$

Onde:

y = Valor da variável de interesse (teor de clorofila);

X = Resposta instrumental espectroscópica;

b = Vetor de regressão obtido através da análise de regressão PLSR ou PCR;

Os parâmetros utilizados para avaliar a eficácia dos modelos construídos serão o RMSECV (*Root Mean Square Error of Cross Validation* – raiz da média quadrática de validação cruzada) e o R^2_{cal} (coeficiente de determinação do modelo de calibração). Um bom modelo de regressão multivariada deve ter valores baixos de RMSEC (Raiz do erro médio quadrático de calibração) e RMSECV e alto valor de R^2_{cal} e R^2_{val} . Procedera-se à validação dos modelos através da aplicação dos dados separados para validação ao modelo de calibração construído.

A validação dos modelos se realizou através da aplicação dos dados externos, previamente separados no conjunto de validação externa, ao modelo de calibração construído. Após a aplicação dos dados de validação ao modelo de calibração multivariada, foram avaliados os modelos através dos valores de Erro médio Quadrático de predição RMSEP, e coeficiente de determinação de predição R^2_P .

As reflectâncias espectrais das três variedades, os dois tratamentos nutritivos e os tempos de desenvolvimento fisiológico foram discriminados a partir análise de agrupamentos (*cluster analysis*), no software MATLAB®, que consiste em um conjunto de técnicas que têm como objetivo identificar e agrupar objetos segundo a similaridade sobre algum atributo ou característica particular que possuem, possibilitando uma melhor análise dos dados e a identificação de padrões de comportamento (ARAÚJO, 2010). Desta forma a análise de

agrupamentos terá como atributos os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total, valores de refletância e fluorescência e parâmetros de cor, para realizar a classificação em variedades e soluções nutritivas.

A partir da metodologia proposta, se tem o intuito de obter um modelo de predição de clorofila nas mudas de cana-de-açúcar aplicando técnicas óticas tanto para imagens RGB como para as imagens espectrais resultando de aquisição por refletância e fluorescência. Com o processamento de imagens e o tratamento multivariado dos dados, além de conseguir os modelos preditivos será possível também identificar os comprimentos de onda ou faixas de resposta das diferentes variedades avaliadas para a predição a partir do sensoriamento, bem seja proximal ou remoto.

Com a implementação desta tecnologia também será possível obter o comportamento espectral das variedades de cana de açúcar no espectro visível, possibilitando a caracterização e classificação de variedades e estados nutricionais das mudas de cana-de-açúcar. Com o anterior se sentam bases para um monitoramento, em casa de vegetação, mais preciso e abrangente, de forma coerente com o conceito de agricultura de precisão, pois se conseguirá monitorar a cultura, espacial e temporalmente; dando sustento a tomada de decisão.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise exploratória da clorofila

Inicialmente no experimento, para identificar o comportamento das amostras foliares das três variedades de cana de açúcar submetidas aos dois tratamentos diferentes de fertirrigação, foram analisadas as três variedades IAC1099, IAC 5000 e IAC 5094 com duas doses diferentes e em 4 tempos de desenvolvimento fisiológico diferentes, sendo o último num estado de estresse fisiológico. O primeiro passo depois de terminar a coleta de amostras, que teve duração de 4 semanas, foi aplicar estatística descritiva com o objetivo explorar diferenças entre variedades, tratamentos e tempo de desenvolvimento, conforme apresentado na Figura 14.

Os valores encontrados se mostram próximos a valores apresentados em trabalhos realizados para a avaliação da clorofila em cana-de-açúcar (SILVA, JIFON, *et al.*, 2007; BOARETTO, CARVALHO, *et al.*, 2014). Para a estatística descritiva os valores das amostras foliares foram considerados individualmente e não como repetição, tendo em conta que o objetivo do experimento é a criação de um modelo de predição de clorofila. Tomando em conta o anterior, explicam-se os altos desvios padrões das medições, mostrando uma grande variância para cada uma das condições experimentais.

Quanto aos valores de clorofila, em base a os valores de média e desvio padrão, pode se argumentar que não houve diferença estatística dos intervalos de valores para as médias dos valores de clorofila para as variedades (Figura 14). Quanto a variação como resultado dos tratamentos de doses de fertirrigação (Figura 14 A e B), observou-se o mesmo comportamento, ou seja, os dois tratamentos. O tratamento estatístico demonstra que, nas condições experimentais, a clorofila, sem ser uniforme, se manteve dentro de um mesmo intervalo.

Seguindo a mesma linha de raciocínio e entendendo o tempo de desenvolvimento fisiológico como um fator de variação para a clorofila, realizou-se a análise descritiva para as medições ao longo do tempo e na condição de estresse (Figura 14 C). Observa-se que com

a variável temporal como fator de variação se consegue uma aproximação maior à discretização das condições.

Os resultados da análise estatística descritiva mostram que os fatores de variação, de variedade e dose de fertirrigação, não mostram diferença significativa no intervalo de valores do teor de clorofila, além de um elevado desvio padrão demonstrando uma alta variação do teor de clorofila em cada fator de variação. No entanto, o tempo de desenvolvimento fisiológico apresenta uma maior influência no intervalo de valores do teor de clorofila em comparação aos fatores de variação de cultivar e dose de fertirrigação, demonstrando um aumento do teor de clorofila com o tempo, o qual é associado a uma maior atividade fotossintética da planta para maior conversão de energia luminosa em ATP, consequência do desenvolvimento fisiológico da mesma.

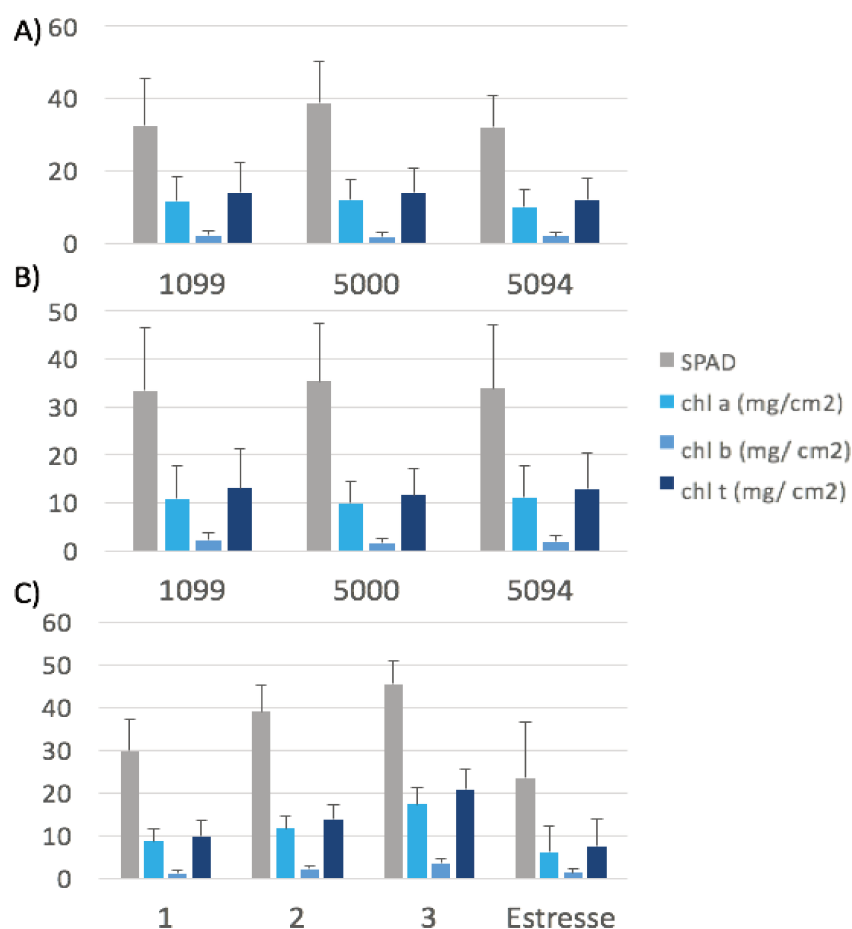


Figura 14. Caracterização das medições de clorofila separadas em variedades para: A) Tratamento da dose completa, B) Tratamento da metade da dose e C) Tempo de desenvolvimento.

Quanto à relação entre o teor de clorofila e a leitura com o sensor SPAD os coeficientes de determinação foram calculados para todas as amostras, fazendo três medições do índice de clorofila com o sensor ao longo do comprimento de cada amostra e tomando a média das leituras anteriores como valores representativos da amostra. A relação entre o método destrutivo e o medidor de clorofila portátil SPAD foi expressada por um modelo linear (Figura 15).

Obtiveram-se coeficientes de determinação (R^2) positivos e significativos com valores de 0,76 para clorofila total, 0,75 para clorofila *a* e de 0,57 para a clorofila *b*. Os valores dos coeficientes de determinação são congruentes com os reportados na literatura para cana-de-açúcar por Jangpromma, *et al.* (2010), com a diferença de que no trabalho dos autores anteriormente mencionados, os dados foram separados em função do tempo de estresse hídrico e para cada condição foi realizada uma regressão. No presente trabalho os dados não foram separados para fazer as regressões, pois pretende-se avaliar um método que seja abrangente numa ampla faixa de valores de teor de clorofila usando um método não destrutivo.

No trabalho de Rigon *et al.* (2016) para estimação do teor de clorofila usando análise de imagem na cultura de soja, da mesma forma que no presente trabalho, verificaram a relação entre a medição usando um medidor de clorofila portátil (Clorofilog) com o método analítico de quantificação do teor de clorofila. Demonstraram que o modelo que melhor se ajustou para a medição pelos métodos analítico e com medidor portátil foi o modelo quadrático obtendo coeficientes de determinação ajustados com valores de 0,92, 0,96 e 0,94 para Chl *a*, Chl *b* e Chl total respectivamente, considerando que são suficientes para estimar o teor de clorofila com grande precisão e eficiência. Em comparação com o atual trabalho, há uma diferença significativa na relação entre os métodos, que é grandemente influenciada pela diferença de cultura na qual está se trabalhando, pois como tem sido apresentado, os medidores portáteis têm comportamento diferente para cada cultura.

Embora o SPAD tenha sido projetado para a detecção do teor de clorofila em folhas e apresente boas correlações com os métodos analíticos, em concordância com o exposto por Ali *et al.* (2012) o teor de clorofila nas folhas é afetado por grande variedade de fatores como genótipo da planta, concentração de nutrientes, espessura de folha ou estresse biótico. Ali *et al.* (2012) expõe que devido a influencia da diversidade de fatores, para atingir maior

precisão, o SPAD deve ser calibrado para cada variedade e espécie de planta em certas condições ambientais.

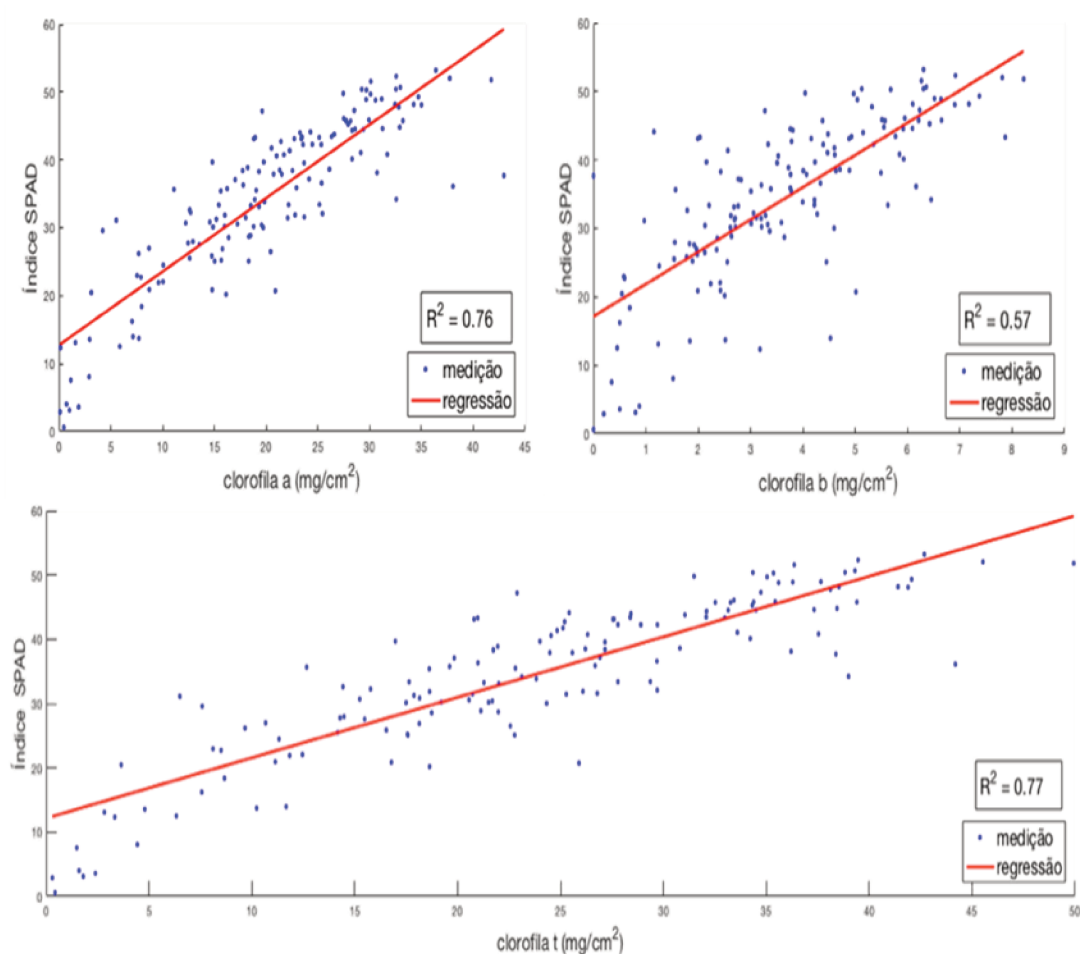


Figura 15. Relação entre o teor de clorofila e a medição com o sensor de clorofila SPAD para as 144 amostras do experimento.

$$\text{SPAD} = 1,08 \times \text{Chl}_a + 12,74 \quad (14)$$

$$\text{SPAD} = 4,71 \times \text{Chl}_b + 17,15 \quad (15)$$

$$\text{SPAD} = 0,94 \times \text{Chl}_T + 12,17 \quad (16)$$

Onde:

Chl_a: Teor de clorofila *a* (mg cm⁻²)

Chl_b: Teor de clorofila *b* (mg cm⁻²)

Chl_T: Teor de clorofila total (mg cm⁻²)

SPAD: Leitura do índice SPAD.

6.2 Caraterização espectral

A etapa de caraterização espectral teve como intuito identificar o comportamento espectral das mudas das três variedades de cana-de-açúcar (IAC 1099, IAC 5000 e IAC 5094) com doses de fertirrigação diferenciadas (Dose completa e metade da dose) e diferentes tempos de desenvolvimento (três semanas de permanência na casa de vegetação e uma semana em estresse fisiológico), para posteriormente analisar a possibilidade de discriminação em função dessas classes, através do uso de imagens espectrais de refletância e fluorescência no espectro visível e através de imagens digitais coloridas.

6.2.1 Processamento e Análise das imagens tricromáticas RGB

Através da aquisição das imagens no espaço de cor RGB foi possível identificar o comportamento tricromático das três variedades de cana-de-açúcar. O Programa desenvolvido para realizar o processamento das imagens seguindo o algoritmo descrito na metodologia (seção 5.3.1.3), apresentado na Figura 16, e dar como resultado os valores médios de cada componente R, G e B para cada amostra e também calcular os valores normalizados r , g e b (Figura 17). Desta forma, o primeiro passo depois do processamento das imagens foi avaliar a correlação uni-variada para cada uma das fontes de excitação (Tabela 1, Tabela 2 e Tabela 3).

Na ultima versão do programa de processamento de imagens coloridas (ilustrado na Figura 16) primeiro se realiza a seleção da amostra a ser avaliada, posteriormente o programa automaticamente realiza a segmentação e no passo seguinte pede para o usuário selecionar três regiões de interesse (de forma coerente com a medição em triplicata realizada com o SPAD). Seguidamente as imagens são recortadas diminuindo suas dimensões até um valor preestabelecido para manter a relação com a área de medição do SPAD e finalmente são calculados os histogramas para cada uma das componentes de cor, com e sem normalização, para a partir dos anteriores calcular o valor médio para cada uma das componentes, sendo a informação a ser usada nas análises posteriores (Figura 17).



Figura 16. Interface da ferramenta computacional para o processamento das imagens digitais RGB.

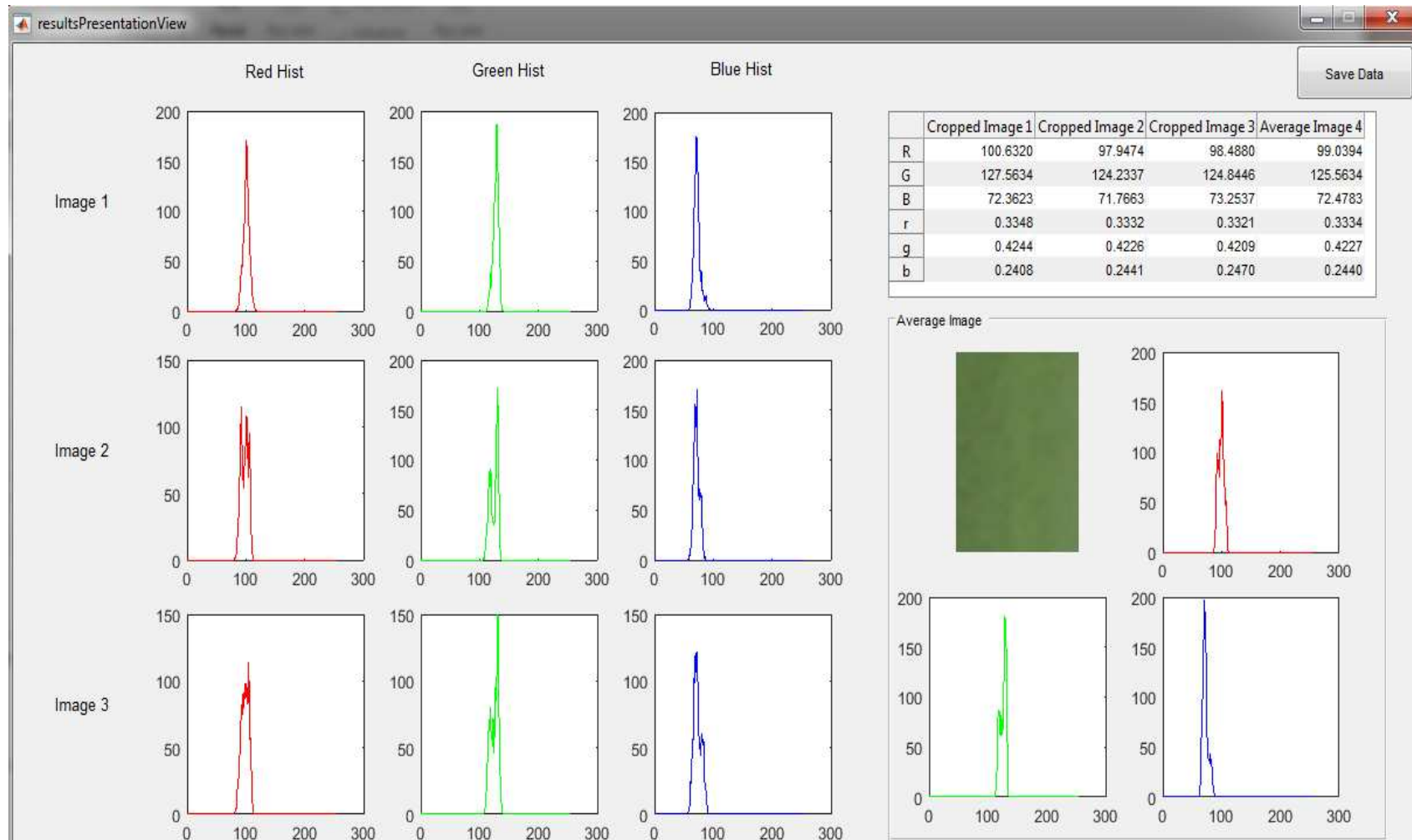


Figura 17. Interface da ferramenta gráfica na apresentação dos resultados da análise tricromática RGB.

A possibilidade de usar os índices RGB de imagens, para estimar os teores de clorofila foi demonstrada no trabalho de Kawashima e Nakatani (1998) no qual verificaram a estimação do teor de clorofila usando processamento de imagens. Tempo depois a análise tricromática foi validada no trabalho de Su *et al.* (2008) para avaliar o teor de clorofila. Esses trabalhos sentaram as bases do método de avaliação da clorofila a partir de imagens coloridas de forma não destrutiva, embora demonstraram o potencial para a medição, não pode se confiar em que pode ser extrapolado para diferentes culturas em diferentes condições como é o caso do presente estudo, dessa forma a análise usando a vertente das imagens tricromáticas é só uma das que foram avaliadas nesta pesquisa, permitindo também a comparação com os resultados da vertente das imagens espectrais.

Consequentemente, métodos de regressão multivariada têm sido implementados e validados para a estimação do teor de clorofila usando imagens, para plantas de batatas micro-propagadas (YADAV, IBARAKI e GUPTA, 2010), para alface brócolis e tomate (ALI, AL-ANI, *et al.*, 2012) em milho (SALA, BOLDEA e GERGEN, 2013), em arroz (WANG, WANG, *et al.*, 2014), em quinoa e amaranto (RICCARDI, MELE, *et al.*, 2014), em soja (RIGON, CAPUANI, *et al.*, 2016) e finalmente em cana-de-açúcar (PATIL e PATIL, 2014). Da mesma forma, para a criação dos modelos, neste estudo também foram implementados métodos de regressão multivariados, partido desde a análise de correlação para cada fonte de excitação e avaliação da regressão para cada uma dessas fontes de excitação, onde radica uma grande diferença com os trabalhos aqui citados.

Como apresentado na Tabela 1, existe uma alta correlação entre todas as componentes de cor quando não normalizadas (RGB). Já para os valores normalizados das componentes (rgb), observa-se uma diminuição da alta correlação entre elas. Quanto a correlação com as clorofilas, observa-se que para excitação induzida pela luz branca o maior coeficiente de correlação é observado para o caso da *chl a* com a componente do vermelho sendo de -0,71, da mesma forma observa-se uma correlação de -0,69 para a clorofila total.

A análise de correlação evidencia uma relação inversamente proporcional, devido ao signo dos coeficientes de correlação, entre a componente de cor vermelha, que apresenta os maiores coeficientes de correlação, com os teores de clorofila, demonstrando que existe uma relação inversa entre os teores de clorofila e a intensidade na imagem na componente de cor

do vermelho, o qual na pratica se reflete em que quando maior seja o teor de clorofila menor será a intensidade na imagem na componente de cor vermelha, demonstrando uma diminuição da pigmentação da folha.

Tabela 1. Análise de correlação para a fonte de iluminação branca, os coeficientes de correlação indicados com ** não foram significativamente diferentes de zero.

	R	G	B	r	g	b	Chl a	Chl b	Chl t
R	1,00								
G	0,90	1,00							
B	0,89	0,84	1,00						
r	0,71	0,45	0,38	1,00					
g	-0,67	-0,35	-0,72	-0,59	1,00				
b	0,03**	-0,06**	0,44	-0,36	-0,54	1,00			
Chl a	-0,71	-0,59	-0,51	-0,73	0,49	0,20	1,00		
Chl b	-0,58	-0,51	-0,39	-0,60	0,36	0,22	0,85	1,00	
Chl t	-0,69	-0,58	-0,50	-0,72	0,48	0,19	0,99	0,90	1,00

As componentes de cor RGB estiveram negativamente correlacionados ao teor de clorofila total e cada uma das componentes da clorofila. Esse comportamento nas correlações dos índices de cor é similar ao reportado por Yadav *et al.* (2010), Gupta *et al.* (2013), Riccardi *et al.* (2014), Wang *et al.* (2014) e Rigon *et al.* (2016). Em relação aos valores dos coeficientes de correlação obtidos, observa-se proximidade dos coeficientes de correlação dos índices R e B com os apresentados no trabalho de Wang *et al.* (2014), para estimar clorofila total em arroz, reportados como -0,68 e -0,48 respectivamente. Para os índices normalizados observa-se similaridade no índice r, uma ampla diferença no g, o qual teve um coeficiente baixíssimo, e no caso do b reportaram mais do dobro de correlação, também em relação ao trabalho de Wang *et al.* (2014) com coeficientes de correlação dos índices normalizados com a clorofila total de -0,76, 0,01 e 0,41 respectivamente para rgb.

Analisando os coeficientes de correlação dos pigmentos chl *a* e chl *b*, dos autores anteriores, só Rigon *et al.* (2016) exploraram a correlação com os índices RGB (em soja). Os

coeficientes da chl *a* foram similares para o caso de R e B com a diferença de que eles obtiveram maior correlação para o G, reportando valores de 0,67, -0,82 e 0,59. No entanto, para chl *b* observa-se um comportamento diferente, pois eles reportam coeficientes de correlação de -0,79; -0,79 e 0,54 para R,G e B, diferindo dos apresentados no presente trabalho, mas demonstrando uma equivalência respeito ao presente trabalho da correlação inversa dos índices R e G com a chl *b*.

Para o caso da condição de excitação com a luz fluorescente no comprimento de onda de 405 nm (Tabela 2), demonstram-se correlações baixas entre as componentes de cor RGB, sendo a maior entre o vermelho e o verde com coeficiente de correlação de -0,92. Para esta condição de iluminação os coeficientes de correlação com a clorofila são os menores das condições de iluminação testados, porém, o mesmo comportamento foi identificado, sendo os maiores coeficientes de correlação da componente do vermelho normalizado com a chl *a* de -0,36 e para a clorofila total de -0,35. Mantendo assim, o comportamento evidenciado com a luz de excitação branca.

Tabela 2. Análise de correlação para a fonte de iluminação de 405 nm. Os coeficientes de correlação indicados com ** não foram significativamente diferentes de zero.

	R	G	B	r	g	b	Chl a	Chl b	Chl t
R	1,00								
G	0,92	1,00							
B	0,80	0,92	1,00						
r	0,98	0,85	0,76	1,00					
g	0,91	0,98	0,86	0,85	1,00				
b	-0,97	-0,97	-0,85	-0,94	-0,98	1,00			
Chl a	0,36	0,12**	0,11**	0,47	0,14**	-0,28	1,00		
Chl b	0,23	-0,01**	0,06**	0,35	-0,01**	-0,13**	0,85	1,00	
Chl t	0,35	0,10**	0,10**	0,46	0,11**	-0,26	0,99	0,90	1,00

Para a condição de iluminação com excitação com luz fluorescente no comprimento de onda de 470 nm (Tabela 3), é possível observar que se manteve a alta correlação entre as

componentes de cor, ainda após a normalização. Quanto ao comportamento da clorofila, se manteve a característica de ter maior coeficiente de correlação e negativo, para a banda vermelha com a *chl a* e a clorofila total. Partindo da informação apresentada nas matrizes de correlação, de que embora os coeficientes de correlação sejam significativos estatisticamente, ou seja afirmando que existe certo grau de relação entre as clorofilas e as componentes de cor, pela magnitude dos coeficientes de correlação já é possível afirmar que prever os teores de clorofila em função de só uma das componentes de cor não resultará em um modelo suficientemente preciso, sustentando assim a necessidade da modelagem multivariada.

Tabela 3. Análise de correlação para a fonte de iluminação de 470 nm. Os coeficientes de correlação indicados com ** não foram significativamente diferentes de zero.

	R	G	B	r	g	b	Chl a	Chl b	Chl t
R	1,00								
G	-0,61	1,00							
B	0,49	-0,33	1,00						
r	0,98	-0,73	0,48	1,00					
g	-0,65	0,98	-0,41	-0,77	1,00				
b	-0,90	0,22	-0,36	-0,82	0,26	1,00			
Chl a	-0,52	0,49	-0,18	-0,56	0,50	0,39	1,00		
Chl b	-0,39	0,37	-0,16**	-0,42	0,38	0,30	0,85	1,00	
Chl t	-0,51	0,48	-0,18	-0,55	0,49	0,38	0,99	0,90	1,00

Comparando as análises de regressão dos componentes de cor submetidas a luz branca e as fontes de excitação fluorescentes observa-se que os maiores coeficientes de correlação com a clorofila foram obtidos na fonte de excitação branca, embora com a fonte fluorescente no comprimento de onda de 470 nm se obtiveram os melhores coeficientes de correlação na componente normalizada b. Na literatura não existem trabalhos que testem a indução de fluorescência combinada com métodos de processamento de imagem para predição do teor de clorofila.

Após a análise de correlação os dados foram divididos nos *data sets* de calibração e validação com o objetivo de levar a cabo a criação de um modelo multivariado de predição da clorofila em função dos parâmetros de cor. Para separar os conjuntos de dados, aproveitando que se trabalhou com três amostras para cada variedade em cada tratamento, tomou-se cada terceira amostra para ser levada para o conjunto de validação de forma que no final foi trabalhada uma relação calibração-validação de (2:1) respetivamente.

Foram realizadas as respetivas regressões multivariadas nos conjuntos de calibração, para cada uma das condições de iluminação. Feita a regressão multivariada obtendo os coeficientes de regressão do modelo, coeficientes que posteriormente serão aplicados no conjunto de dados de validação. Dessa forma, foram testados o erro médio quadrático RMSE e o coeficiente de determinação R^2 , avaliando a precisão e o ajuste dos modelos.

Para o caso da fonte de excitação branca, na calibração obteve-se um RMSEC de 4,49 mg l⁻¹ e um R^2 de calibração de 0,59 para a clorofila total trabalhando com os parâmetros de cor sem normalização. Para o caso da normalização dos parâmetros de cor obtiveram-se RMSEC de 4,76 mg l⁻¹ e um R^2 de calibração de 0,54. Nas equações 17 e 18 são apresentados os parâmetros da regressão dos modelos obtidos na calibração e que posteriormente foram aplicados no conjunto de dados de validação.

$$Chl\ T = 2,99 \times 10^{-4}R + 1,93 \times 10^{-5}G + 1,75 \times 10^{-4}B + 0,028 \quad (17)$$

$$Chl\ T = 13,81R + 14,05G + 14,01B - 13,94 \quad (18)$$

Com o intuito de avaliar a precisão do modelo de regressão do teor de clorofila total a partir de componentes de cor RGB e as componentes normalizadas rgb, as figuras 18 e 19 respetivamente, comparam os valores de teor de clorofila total medida (método analítico) com os valores de teor de clorofila total calculados usando o modelo obtido na calibração multivariada, com a fonte de excitação de luz branca. Também são apresentados os limites de predição com um nível de confiança de 95%, que indicam a incerteza da predição de cada valor.

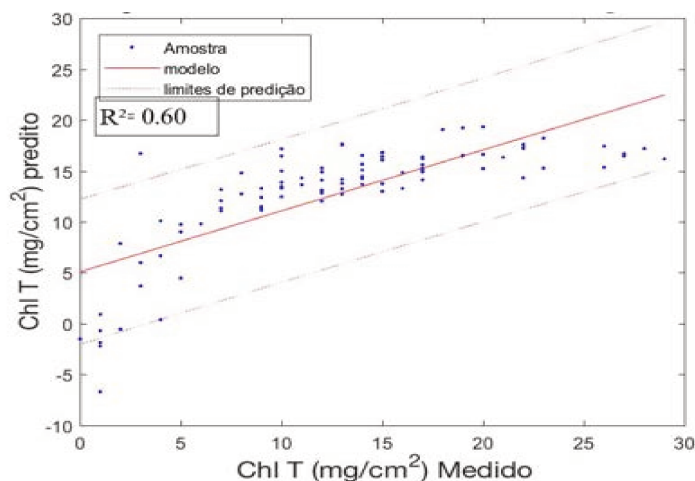


Figura 18. Modelo de calibração relacionando o valor medido de clorofila para cada amostra e o valor predito usando o modelo respectivo para o caso de RGB.

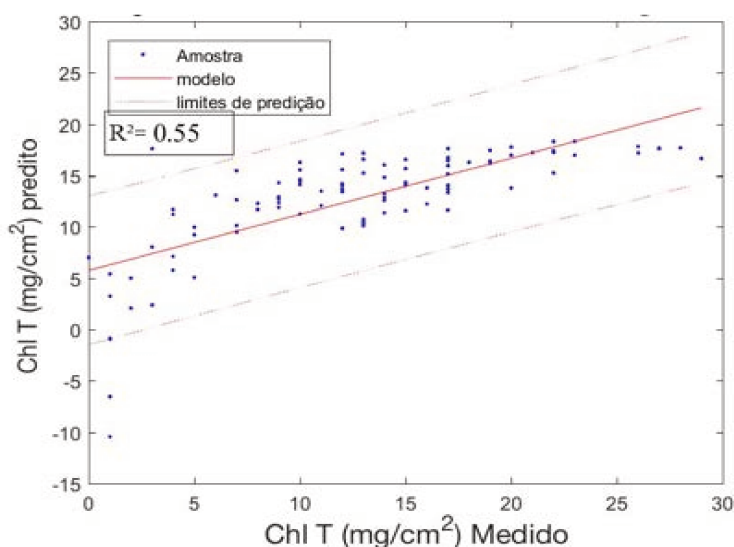


Figura 19. Modelo de calibração relacionando o valor medido de clorofila para cada amostra e o valor predito usando o modelo respectivo para o caso de rgb (normalizados).

Posteriormente, o modelo obtido no conjunto de dados da calibração foi aplicado ao conjunto de dados de validação e foi avaliada a precisão dos modelos RGB (Figura 20) e rgb (Figura 21) e o ajuste do modelo no conjunto de dados de validação. Obtiveram-se valores de erro médio quadrático de validação RMSEV, para RGB e rgb de 4,81 mg l⁻¹ e 4,7 mg l⁻¹ respectivamente. Quanto ao ajuste foram obtidos valores de 0,51 e 0,46 de R² para RGB e rgb respectivamente.

Tomando em conta os resultados obtidos, é evidente que o modelo usando os parâmetros de cor normalizados rgb apresentou um melhor desempenho pois apresenta um maior

coeficiente de determinação na validação, ou seja, tem um melhor ajuste. Também esse modelo apresenta menor valor de RMSEV o que significa que há menos erro na predição, quando comparado com o modelo RGB sem a normalização dos parâmetros de cor. Porém o valor do coeficiente de determinação do melhor modelo obtido indica que não suficientemente bom para prever a clorofila.

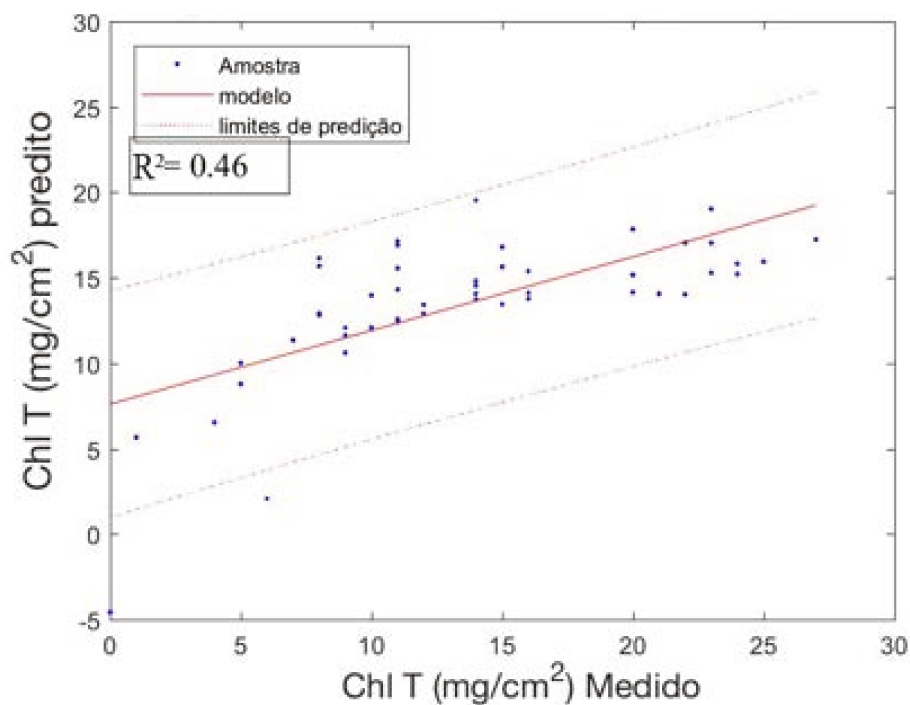


Figura 20. Validação do modelo de predição RGB do teor de clorofila total usando a fonte de excitação branca.

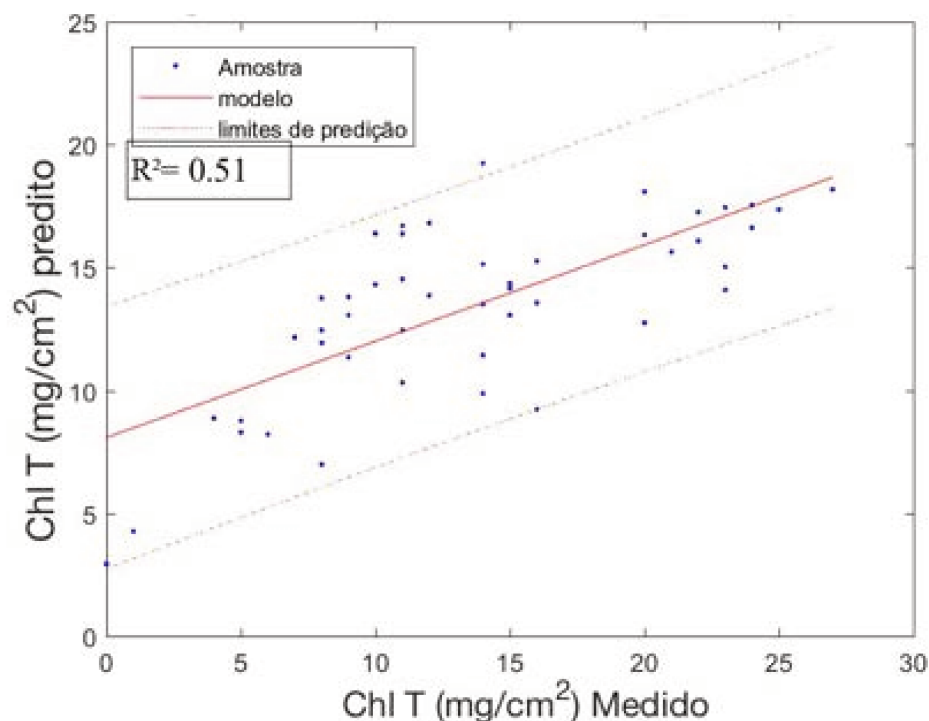


Figura 21. Validação do modelo de predição rgb do teor de clorofila total usando a fonte de excitação branca.

Atualmente não existem trabalhos de avaliação do teor de clorofila usando imagens digitais e processamento de imagens no espaço de cor RGB em plantas de cana-de-açúcar. Embora não tenham sido encontrados estudos deste tipo para cana-de-açúcar, é possível realizar a comparação com outras culturas nas quais foi avaliada a estimação do teor de clorofila a partir de processamento de imagens, pois a variável de interesse que está sendo avaliada, ou seja a clorofila, não muda as suas propriedades óticas nem as interações com a radiação incidente em função da variedade.

O único trabalho na literatura que tem esse objetivo com a diferença de trabalhar no espaço de cor HSV é o desenvolvido por Patil e Patil (2014), que apresenta grandes diferenças no método em comparação com o atual trabalho pois está mais focado a segmentação da imagem do que a criação dos modelos multivariados, dificultando a replicação do método. Nesse trabalho só é reportado o RMSE da modelagem, sem fazer validação do modelo, valor reportado (sem unidades) de 1,93 dificultando a comparação com o atual trabalho.

No presente trabalho foi utilizada uma metodologia similar à realizada por Su *et al.* (2008), na qual empregaram métodos de regressão multivariada a partir da análise tricromática de imagens e fazendo validação externa do modelo. Quando comparando os

coeficientes de determinação, observa-se que os obtidos no presente trabalho são significativamente inferiores aos reportados por Su *et al.* (2008) de 0,99 na validação externa.

A principal diferença com o trabalho desses autores é o fato de que, por eles estarem trabalhando com microalgas cultivadas dentro de um reator, houve uma menor variância da clorofila, de 0,07 a qual é significativamente inferior à do presente trabalho nas diferentes condições avaliadas (Figura 14) por apresentar-se maior homogeneidade no material vegetal, o modelo conseguiu acompanhar melhor a variação sistemática da clorofila.

Comparando os RMSE com os reportados no trabalho de Yadav *et al.* (2010) com valores de 8,8 para modelagem de RGB e 6,6 na modelagem com rgb pode se afirmar que no presente trabalho houve um melhor desempenho do modelo por ter menores valores de RMSEC. O anterior demonstra que embora Yadav e colaboradores tenham usado um scanner digital para a aquisição da imagem, a metodologia e o algoritmo proposto foram adequados para a aquisição da informação e a criação dos modelos. Não é possível comparar a predição com o trabalho de Yadav *et al.* (2010) pois eles só realizaram a etapa de modelagem sem fazer validação do modelo, etapas fundamentais na construção de modelos preditivos.

No trabalho de Wang *et al.* (2014) com o intuito de estimar o teor de clorofila em arroz usando uma câmera digital, reportaram a melhor correlação com o índice de cor b (brilho) do espaço de cor Lab, entanto que os índices RGB e rgb reportaram coeficientes de correlações similares às apresentadas no presente trabalho. Devido a ter obtido a melhor correlação com o índice b, eles realizaram um modelo uni-variado de regressão para predizer a clorofila para diferentes etapas fisiológicas do arroz.

Essa separação demonstrou ser uma estratégia para reduzir a variância dos valores e consequentemente a dispersão, mas mesmo com essa separação, os coeficientes de determinação da regressão (entre 0,31 e 0,65 para as diferentes etapas) não foram em grande medida superiores aos apresentados no presente trabalho na calibração (0,60), não sendo possível comparar com a validação pois Wang *et al.* (2014) não realizaram a mesma.

Riccardi *et al.* (2014) utilizaram como base o trabalho de Ali *et al.* (2012) para predizer o teor de clorofila nas folhas de amaranto e quinoa e plantearam um método de avaliação não destrutiva do teor de clorofila nas folhas por regressão múltipla testando diferentes funções. Diferente aos estudos discutidos anteriormente eles seguiram as etapas de calibração e validação cruzada, obtendo valores médios do coeficiente de determinação

de 0,82 e valores médios de RMSEP de 1,24 e 1,78 ng cm^{-2} para amaranço e quinoa, demonstrando melhor desempenho quando comparados com os modelos criados no presente trabalho. É importante salientar que nesse trabalho os autores afirmam que, a técnica de imagens digitais combinada com regressão múltipla dos componentes de cor demonstrou um resultado muito melhor do que o SPAD, com valores de coeficiente de determinação significativamente superior e RMSEP consideravelmente melhor pois apresentou uma redução do 32% para ambos, amaranço e quinoa.

O procedimento anterior foi seguido para as condições de excitação de fluorescência nos comprimentos de onda de 405 e 470 nm. Para a fluorescência de 405 nm obtiveram-se valores de RMSEC de 5,64 mg l^{-1} e 5,66 mg l^{-1} para RGB e rgb respectivamente. Quanto ao ajuste dos modelos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) obtiveram-se valores de R^2 de 0,36 para os dois casos (Figura 22, Figura 23). Já para o conjunto de dados de validação se obtiveram valores de RMSEV de 5,96 e 5,91 mg l^{-1} para RGB e rgb respectivamente. O ajuste R^2 dos modelos na validação foi de 0,20 e 0,21 para RGB (Figura 24) e rgb respectivamente (Figura 25).

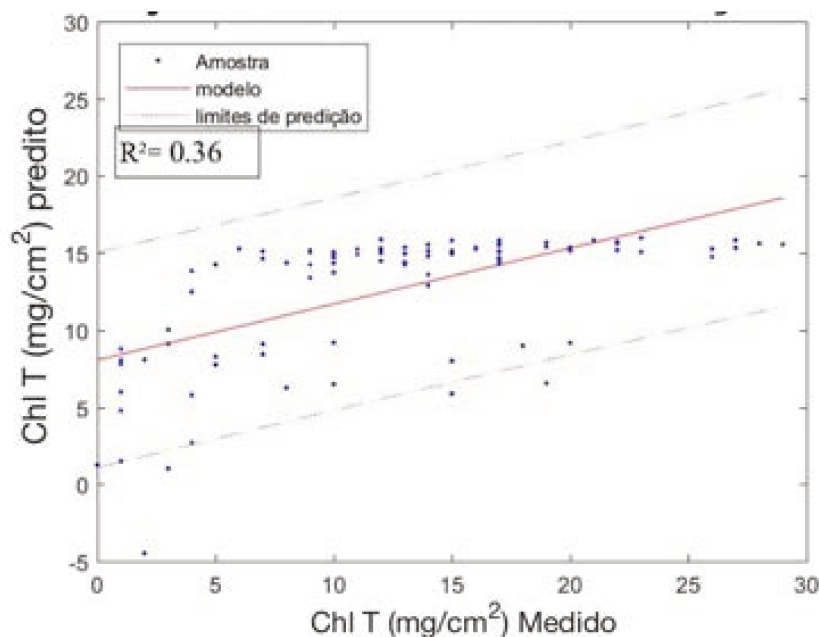


Figura 22. Calibração do modelo de predição RGB na condição de fluorescência 405 nm.

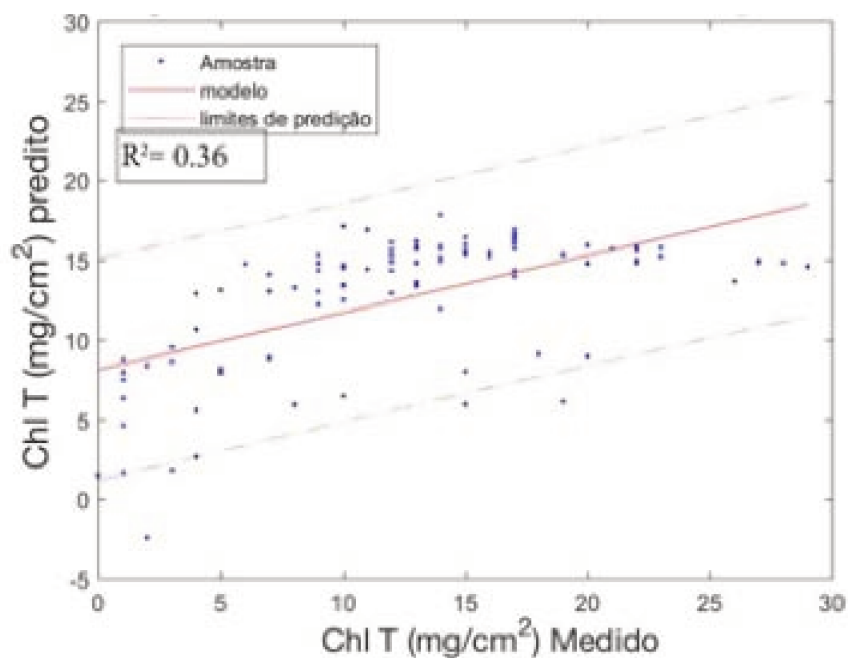


Figura 23. Calibração do modelo de predição rgb na condição de fluorescência de 405 nm.

$$Chl T = -1,10 \times 10^{-4}R + 2,50 \times 10^{-3}G + 1,20 \times 10^{-4}B - 0,013 \quad (16)$$

$$Chl T = 5,16R + 5,27G + 5,21B - 5,19 \quad (17)$$

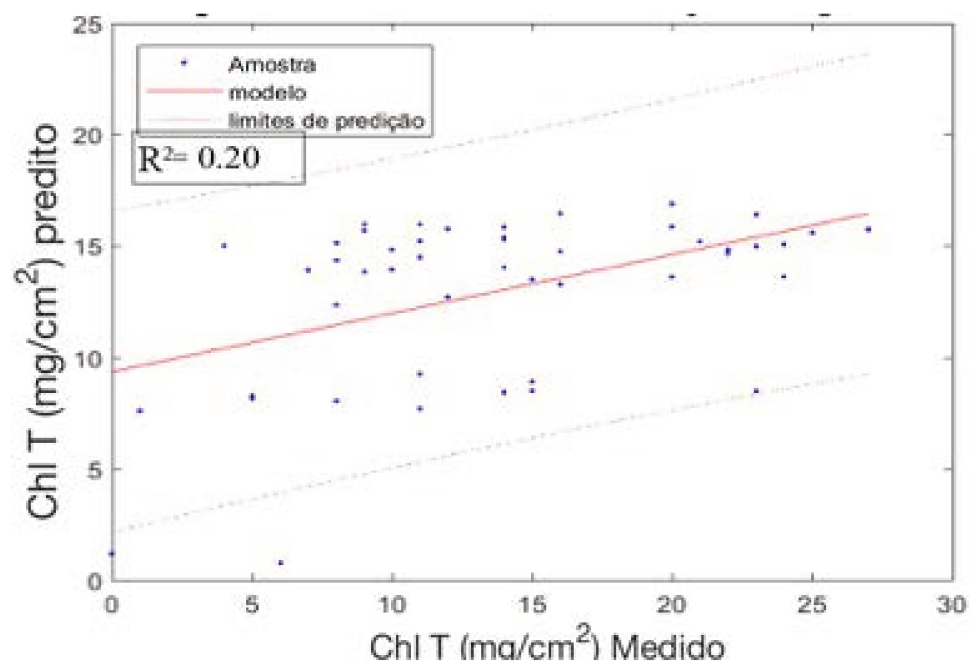


Figura 24. Validação do modelo RGB na condição fluorescência de 405 nm.

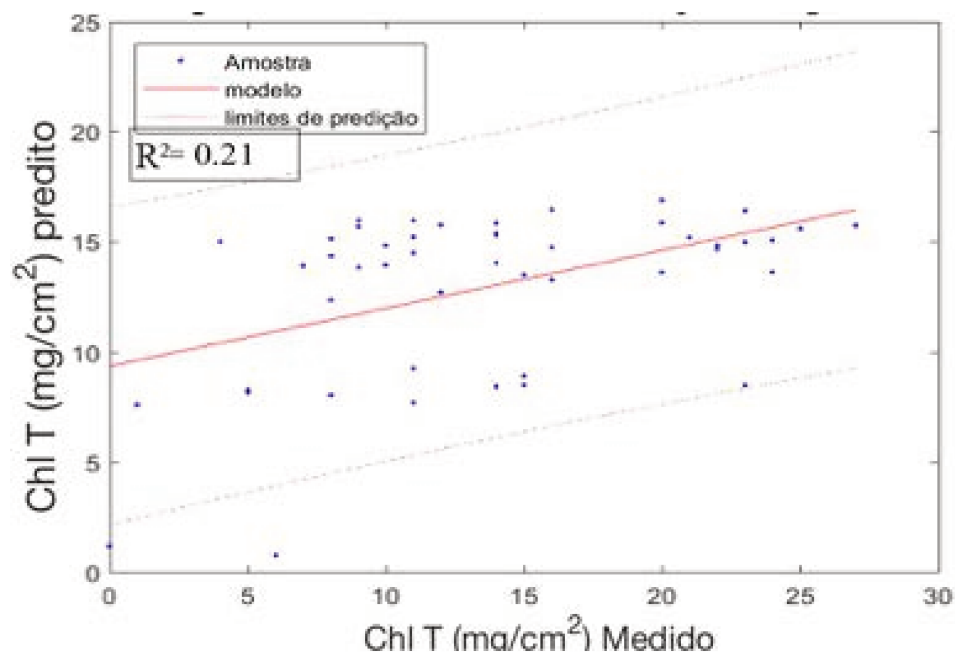


Figura 25. Validação do modelo rgb na condição fluorescência de 405 nm.

Foi seguido o mesmo procedimento para a condição de fluorescência de 470 nm obtendo valores de RMSEC de 5,41 e 5,23 mg l⁻¹ para RGB e rgb respectivamente. Quanto ao ajuste R² dos modelos (Equações 17 e 18) na calibração foram obtidos valores de 0,41 e 0,45 para RGB (Figura 26) e rgb (Figura 27) respectivamente. Aplicando os modelos aos conjuntos de dados de validação foram obtidos RMSEV de 4,4 e 4,29 mg l⁻¹ para RGB e rgb respectivamente. O ajuste R² obtido na validação (Figura 28 e Figura 29) foi de 0,64 e 0,63 para RGB e rgb respectivamente.

$$Chl T = 1,17 \times 10^{-3}R - 4,5 \times 10^{-3}G + 1,12 \times 10^{-4}B + 7,32 \quad (17)$$

$$\times 10^{-3}$$

$$Chl T = -1,17R - 1,70G - 1,53B + 1,57 \quad (18)$$

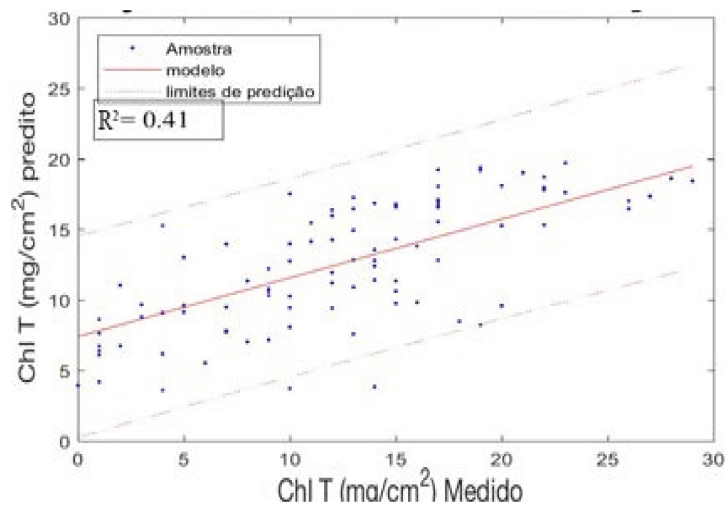


Figura 26. Calibração do modelo de predição RGB na condição de fluorescência de 470 nm.

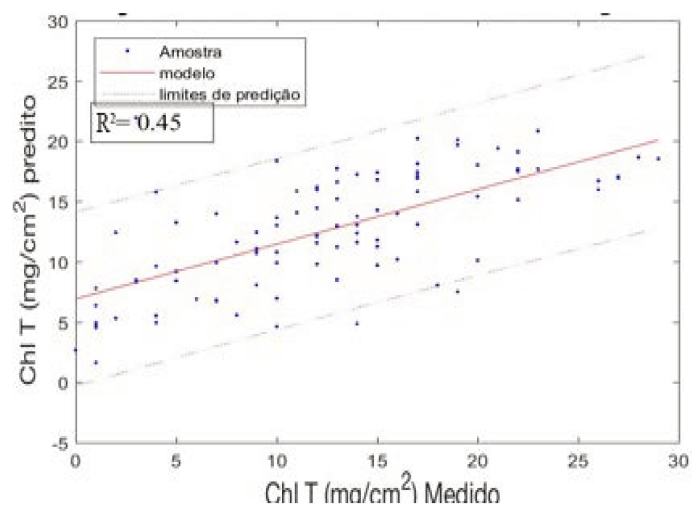


Figura 27. Calibração do modelo de predição rgb na condição de fluorescência de 470 nm.

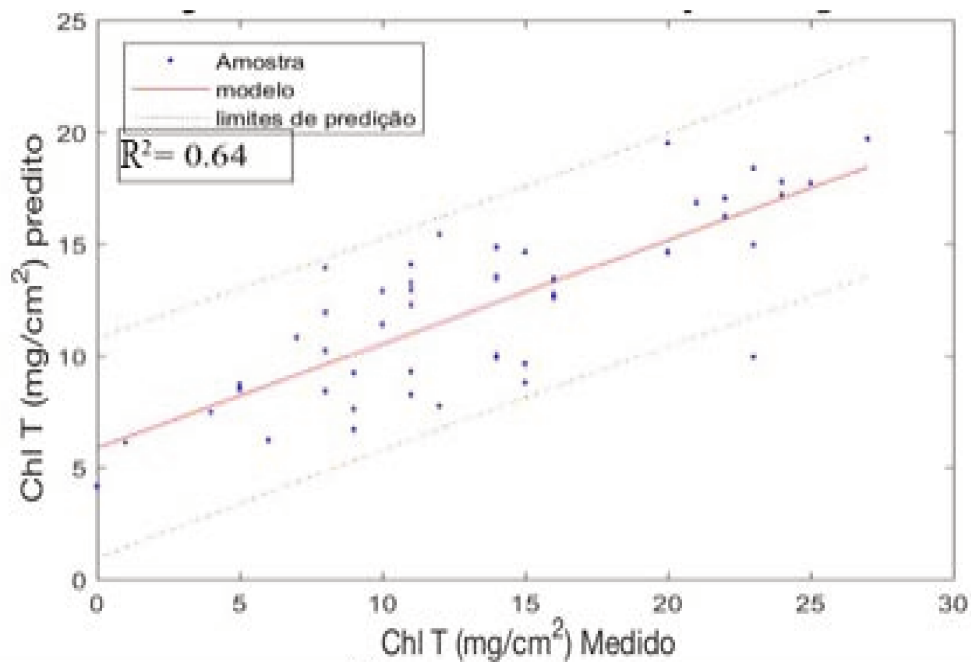


Figura 28. Validação do modelo RGB na condição fluorescência de 470 nm.

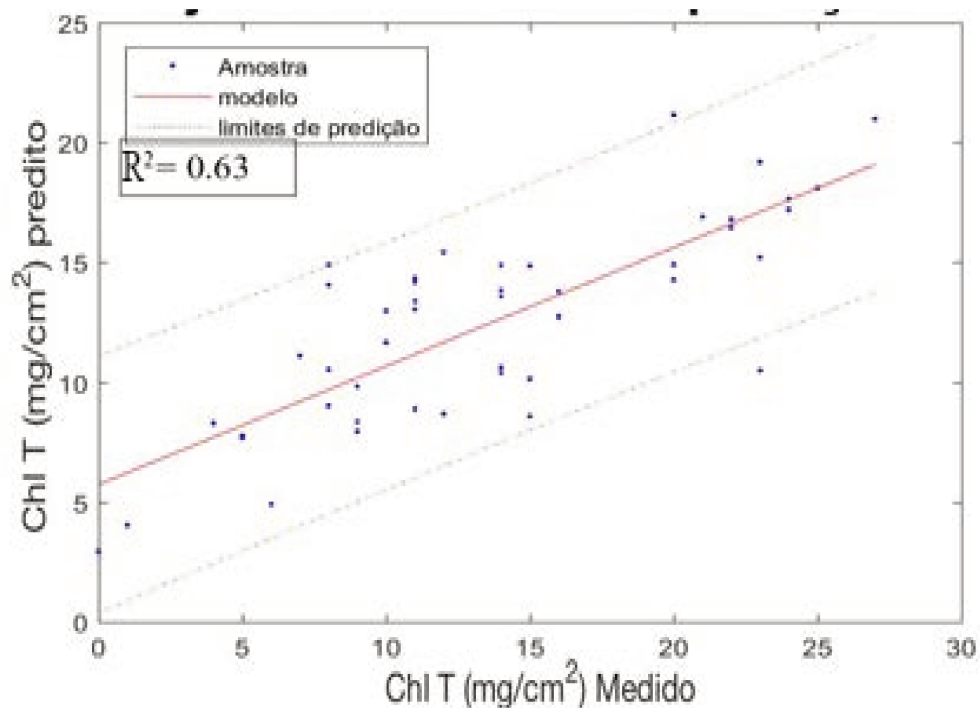


Figura 29. Validação do modelo rgb na condição fluorescência de 470 nm.

6.2.2 Processamento das imagens e análise exploratória dos dados espectrais

Através da aquisição das imagens de refletância e o processamento das imagens, foi possível identificar o comportamento espectral das três variedades de cana-de-açúcar (IAC 1099, IAC5000 e IAC5094), submetidas a duas doses diferentes de fertirrigação (dose completa recomendada e metade da dose), e quatro tempos de desenvolvimento fisiológico na casa de vegetação (três semanas e fase de estresse).

Para o processamento das imagens foi realizada uma ferramenta computacional com o intuito de executar o algoritmo de processamento valendo-se de uma interface homem-máquina. Com a ferramenta computacional apresentada na Figura 30, foi realizada a segmentação das imagens sem filtro ótico, sob as quais foram realizadas as máscaras binárias para posteriormente realizar a segmentação de cada amostra nas imagens espectrais.

A interface gráfica desenvolvida para a criação das máscaras binárias primeiro informa para o usuário qual amostra deve ser selecionada realizando uma primeira aproximação a região de interesse, posteriormente o programa pede para realizar uma seleção, com a ferramenta de poli-linha, da região de interesse da amostra, contornando o material vegetal e finalmente, após ter realizado os passos anteriores em todas as amostras da cena, o programa realiza apresenta a imagem em falsa-cor para a verificação do usuário de cada uma das regiões de interesse (Figura 30).

Após a segmentação o programa contínuo com os passos do algoritmo para a extração de informação da resposta a excitação nas imagens, organização dos dados, cálculo do valor de resposta para cada uma das amostras, e finalmente, construção dos respectivos espectros de refletância, absorbância e fluorescência. Dessa forma, a partir das imagens que são consideradas como o sinal inicial, foi possível obter as curvas espectrais consideradas que são a base das análises quimiométricas multivariadas que foram realizadas.



Figura 30. Passos do processo de criação da máscara binária para segmentação usando a interface da ferramenta computacional criada.

A análise exploratória dos dados foi iniciada calculando os espectros médios para cada uma das respostas (refletância, absorbância e fluorescência) e fazendo uma primeira inspeção do comportamento espectral para os agrupamentos dados pelas fontes de variação do experimento (variedades, doses de fertirrigação e tempo de desenvolvimento).

Analisando a possibilidade de diferenciação entre variedades, tratamentos e tempos de desenvolvimento, a partir das imagens de refletância no espectro visível, só foi possível identificar diferenças entre os tempos de desenvolvimento (Figura 31), contrário à expectativa da possibilidade de identificar diferenças entre as variedades nos espectros.

Observa-se que todas as amostras apresentaram uma região de alta emissão no comprimento de onda de 550 nm, pois este comprimento de onda está altamente correlacionado com o teor de clorofila, fato que tem sido amplamente demonstrado e discutido na literatura (ANATOLY, GITELSON e MERZLYAK, 1995; MACCIONI, AGATI e MAZZINGHI, 2001). O comprimento de onda de 620 nm é a segunda maior região de emissão de refletância para as amostras, está também amplamente comprovado que, o comprimento de onda de 620 nm apresenta um alto coeficiente de correlação com o teor de clorofila (YODER e PETTIGREW-CROSBY, 1995). Chama a atenção que no comprimento de onda correspondente a 580 nm há uma clara diferenciação entre os tempos de desenvolvimento fisiológico e o estresse, tendo menor refletância as amostras em estresse, embora esse comprimento de onda não tenha sido reportado como um correlacionado com o teor de clorofila.

Após análise dos espectros de refletância, realizou-se uma análise estatística exploratória multivariada, através da análise de componentes principais PCA, a fim de identificar diferenças entre as variedades de cana-de-açúcar estudadas, doses de fertirrigação e tempos de desenvolvimento fisiológico. Realizando a PCA para os espectros de refletância, para os fatores de variação das variedades e das doses de fertirrigação, não foi possível evidenciar nenhuma das variedades pois não houve nenhuma tendência de separação das amostras em nenhuma combinação de componentes principais, correspondendo com o evidenciado nos espectros.

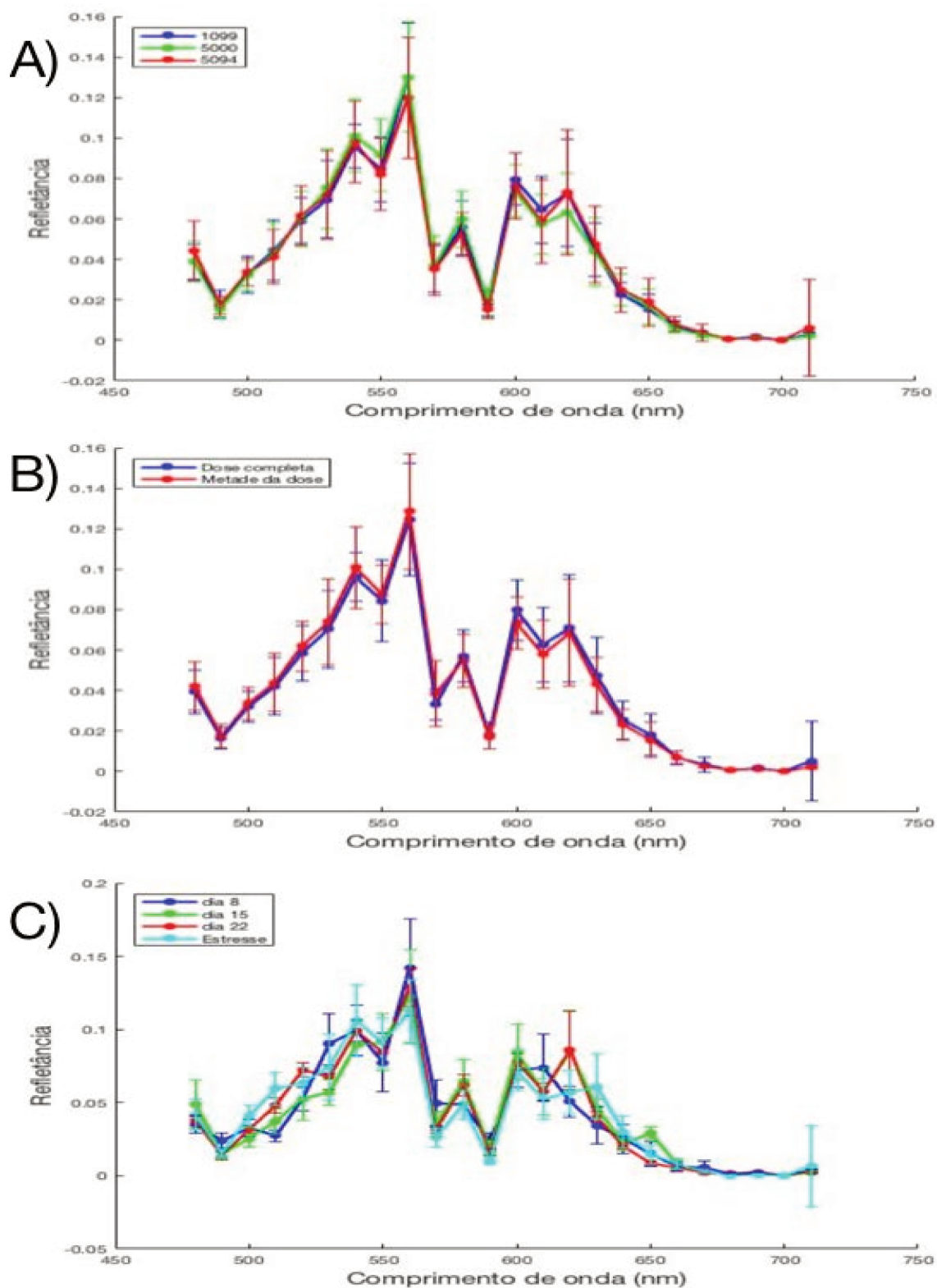


Figura 31. Espectros de refletância para cada uma das classes, sendo a variedade (A), doses (B) e tempo de desenvolvimento fisiológico (C).

Realizando a análise de componentes principais PCA para os tempos de desenvolvimento fisiológico e estresse, obtiveram-se tendências de agrupamentos, dos diferentes tempos, em vários dos componentes principais (Figura 32), embora nenhum deles tenha a capacidade de diferenciar totalmente os três tempos e a condição de estresse. Conforme a tendência de agrupamentos apresentada pela análise PCA é fundamentada a viabilidade de testar métodos de classificação para discriminar os tempos de desenvolvimento fisiológico e a condição de estresse fisiológico.

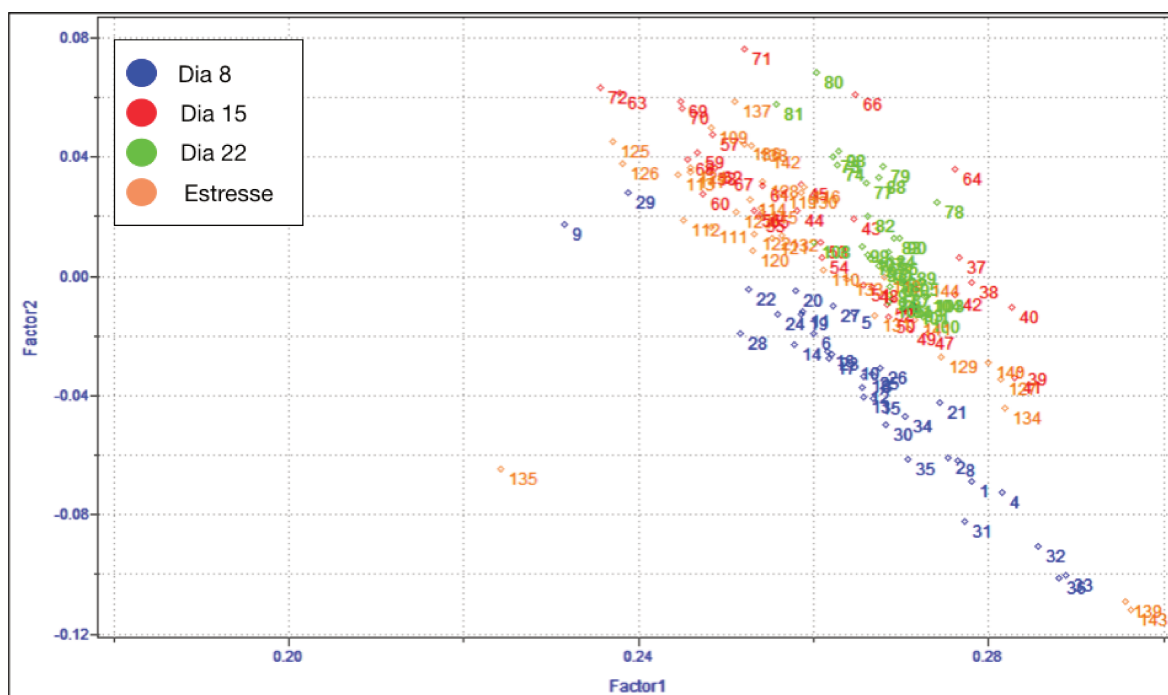


Figura 32. Resultado da PCA dos dados de refletância, para os tempos de desenvolvimento fisiológico e a condição de estresse fisiológico, para todas as amostras.

Os dados de refletância foram convertidos para absorvância usando a equação 11, e realizando a transformação para cada pixel e posteriormente fazendo a coleta dos dados, foi possível reconstruir os espectros de resposta. Analisando a possibilidade de diferenciação entre variedades, tratamentos e tempos de desenvolvimento, a partir das imagens de absorvância no espectro visível, só foi possível identificar diferenças entre os tempos de desenvolvimento (Figura 34), contrário à expectativa da possibilidade de identificar diferenças entre as variedades nos espectros.

Observam-se regiões de emissão de resposta claramente reconhecíveis nos comprimentos de onda de 490, 570, 580, 590 e 600 nm. Visualizando os dados para cada classe, do mesmo modo que na refletância, só se evidencia uma clara separação nos espectros quando trabalhando com o tempo de desenvolvimento. Após análise dos espectros de absorbância, realizou-se uma análise estatística exploratória multivariada, através da análise PCA, a fim de identificar diferenças e possibilidades de discriminação, onde só foi possível verificar visualmente agrupamentos para a classe de tempos de desenvolvimento (Figura 33). Em base à tendência de agrupamentos apresentada fundamenta-se a possibilidade de empregar métodos de classificação para complementar os modelos preditivos.

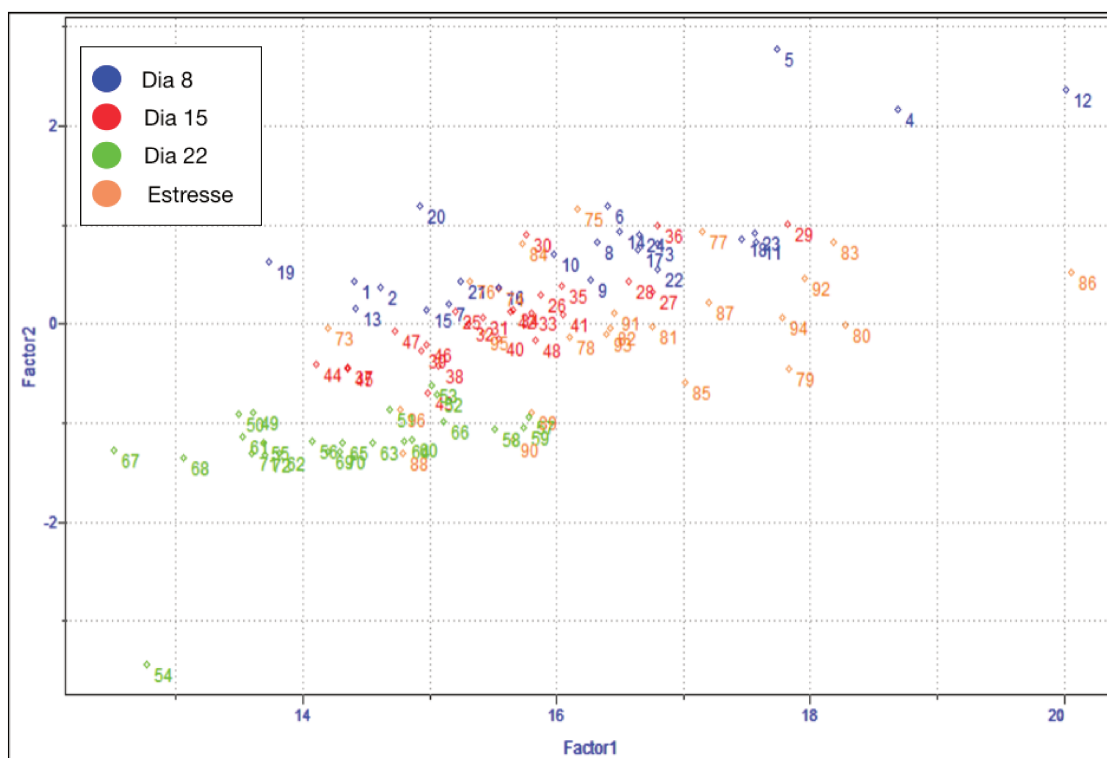


Figura 33. Resultado da PCA dos dados de absorbância, para os tempos de desenvolvimento fisiológico e a condição de estresse fisiológico, para todas as amostras.

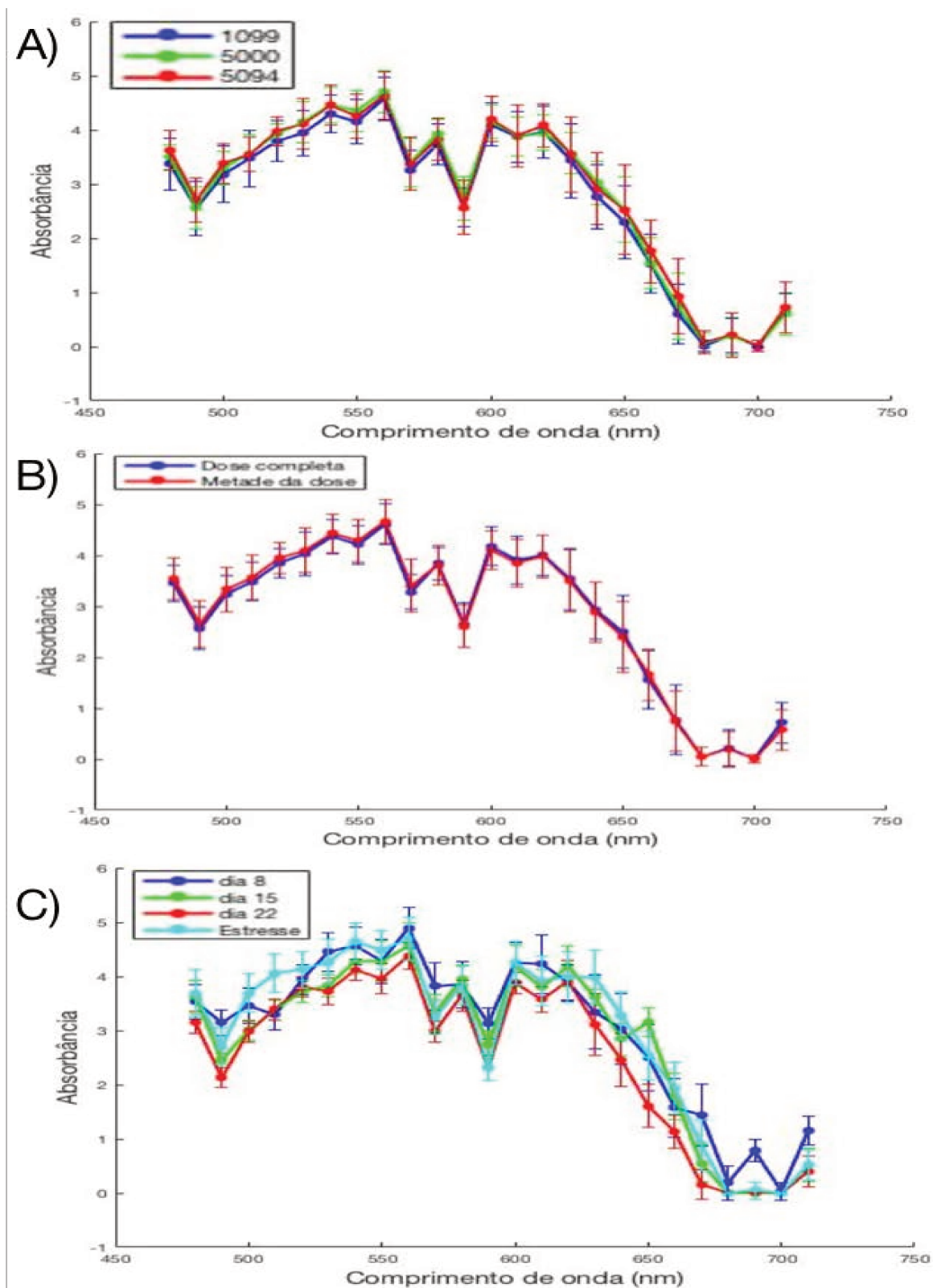


Figura 34. Espectros de absorbância para cada classe, sendo variedade (A), a doses (B) e tempo de desenvolvimento fisiológico (C).

As imagens de fluorescência nos comprimentos de onda de 405 e 470 nm seguiram o mesmo procedimento para obter os espectros de resposta. Foram ativadas cada uma das classes para visualizar tendências de agrupamento nas classes e verificar o comportamento espectral das mesmas (Figura 35). Nos espectros de resposta de fluorescência visualmente foi mais difícil identificar agrupamentos entre as classes e o comportamento espectral apresenta mais variação entre amostras da mesma classe. É importante salientar que o espectro de fluorescência de 470 nm só teve resposta nos comprimentos de onda entre 480 e 580 nm e no comprimento de onda de 710 nm, apresentando o mesmo comportamento que no trabalho de Tinini (2015), onde é importante salientar que na região do espectro inferior a 580 só se está dando o fenômeno de reflexão da fonte de excitação, de forma que, a emissão de fluorescência das amostras associada a esta condição de excitação é muito baixa.

Quanta a avaliação de tendências de agrupamentos usando a análise exploratória PCA obteve-se o mesmo resultado que nas análises de refletância e absorbância, onde só foi possível observar tendências de agrupamentos para a classe de tempos de desenvolvimento fisiológico em determinados componentes principais, mesmo que os agrupamentos não são suficientes para criar um modelo de classificação a partir do método PCA.

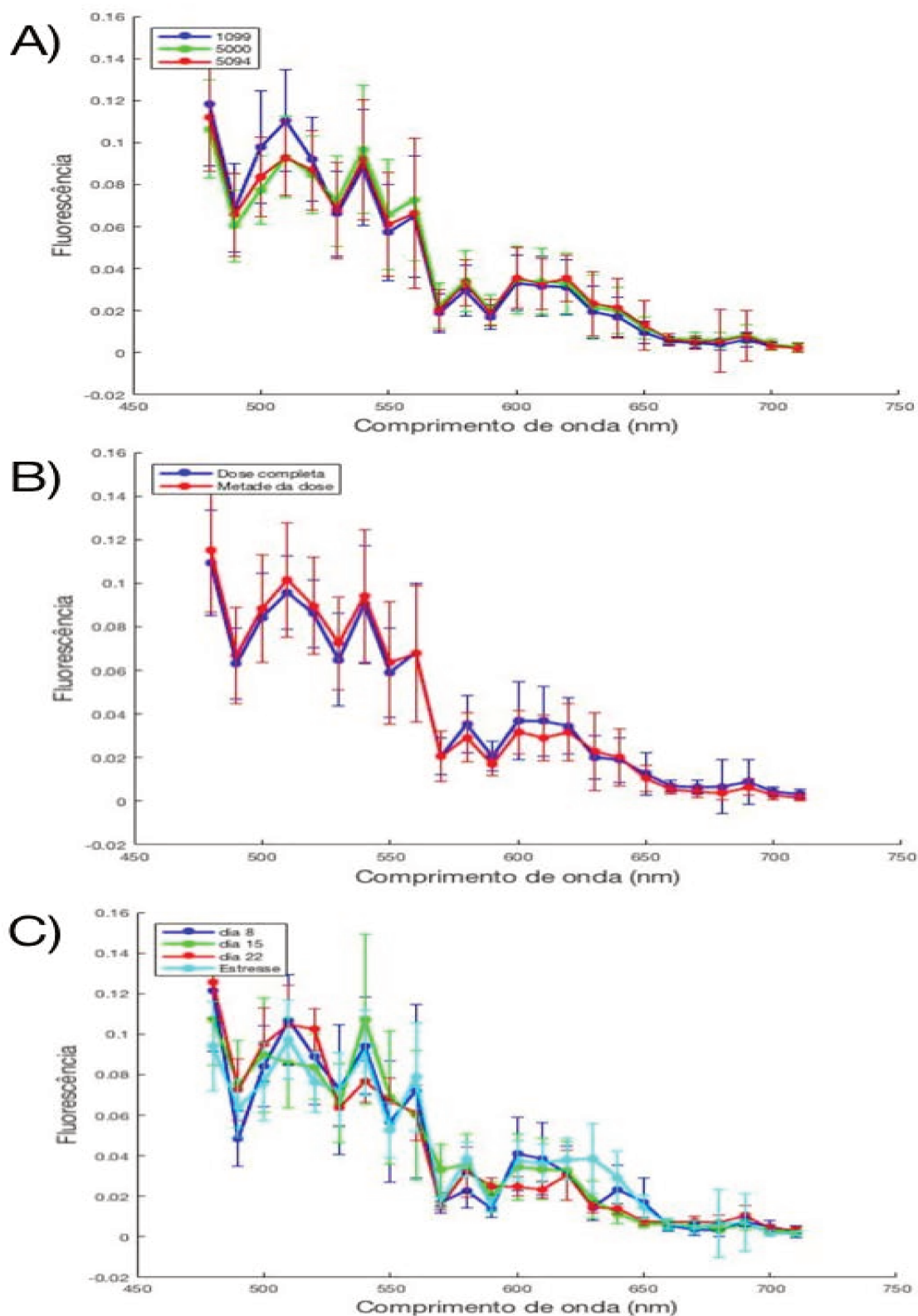


Figura 35. Espectros de fluorescência para 405 nm visualizando cada uma das classes, sendo variedade (A), doses (B) e tempo de desenvolvimento fisiológico (C).

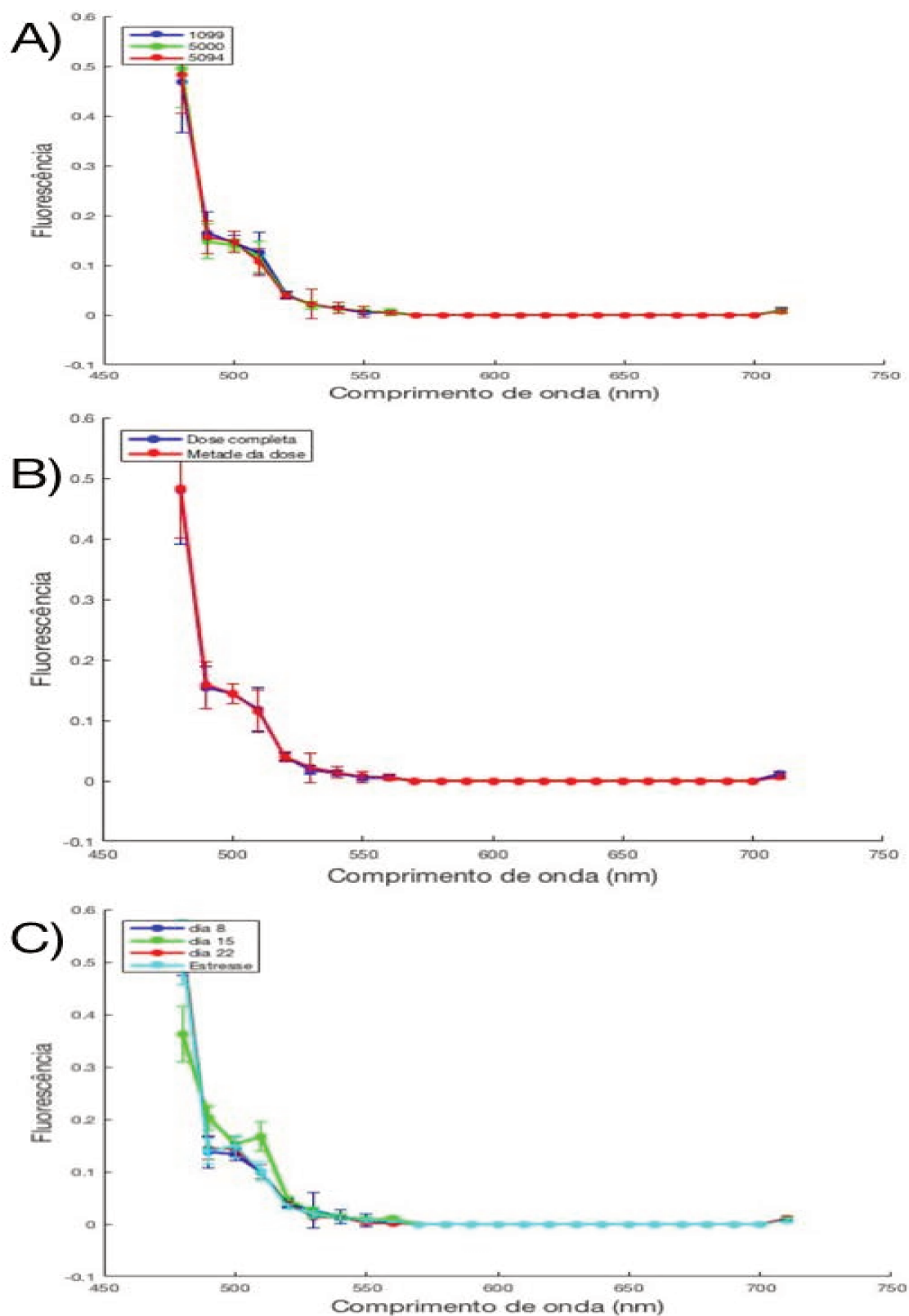


Figura 36. Espectros de fluorescência para 470 nm visualizando cada uma das classes, sendo variedade (A), doses (B) e tempo de desenvolvimento fisiológico (C).

6.3 Modelagem espectral

A fase de modelagem espectral teve o intuito de correlacionar as imagens espectrais no espectro visível para três excitações aplicadas as três variedades de cana-de-açúcar e submetidas a duas doses de fertirrigação diferentes durante três semanas de permanência na casa de vegetação e em uma condição de estresse fisiológico, procurando melhor desempenho na predição da clorofila do que o apresentado pelo modelo multivariado das componentes de cor RGB.

A partir das curvas de calibração e validação quimiométrica entre diferentes teores de clorofila e imagens espectrais foi possível construir modelos multivariados para predição do teor de clorofila foliar da cana-de-açúcar. Logo a aplicação de imagens espectrais, com diferentes fontes de excitação, demonstra potencial para o uso em amostragens não destrutivas de cana-de-açúcar para a partir da quantificação da clorofila, levar a cabo diagnósticos do estado da cultura.

6.3.1 Refletância

A seguir, foram analisados os dados espectrais para amostras foliares de mudas de cana-de-açúcar para a resposta em refletância, dados que foram submetidos a análise multivariada para correlação e regressão entre o espectro de resposta e o teor de clorofila. A análise de refletância é baseada na fonte de excitação com LEDs brancos ao produto. Foi calculado o espectro médio para todas as amostras avaliadas para representar o comportamento da refletância no espectro visível (Figura 37). Para realizar as fases de calibração, validação e predição, o conjunto de dados foi separado em dois conjuntos, de calibração e de predição com relação (2:1) respectivamente.

No espectro médio evidenciam-se níveis satisfatórios da porcentagem de refletância, indicando a possibilidade de atingir boas correlações e um modelo de regressão da clorofila a partir dos valores de refletância no espectro visível. Além disso, no espectro médio é possível identificar o comportamento das amostras produto da excitação e é possível verificar os comprimentos de onda nos quais se apresentam as regiões de emissão de refletância.

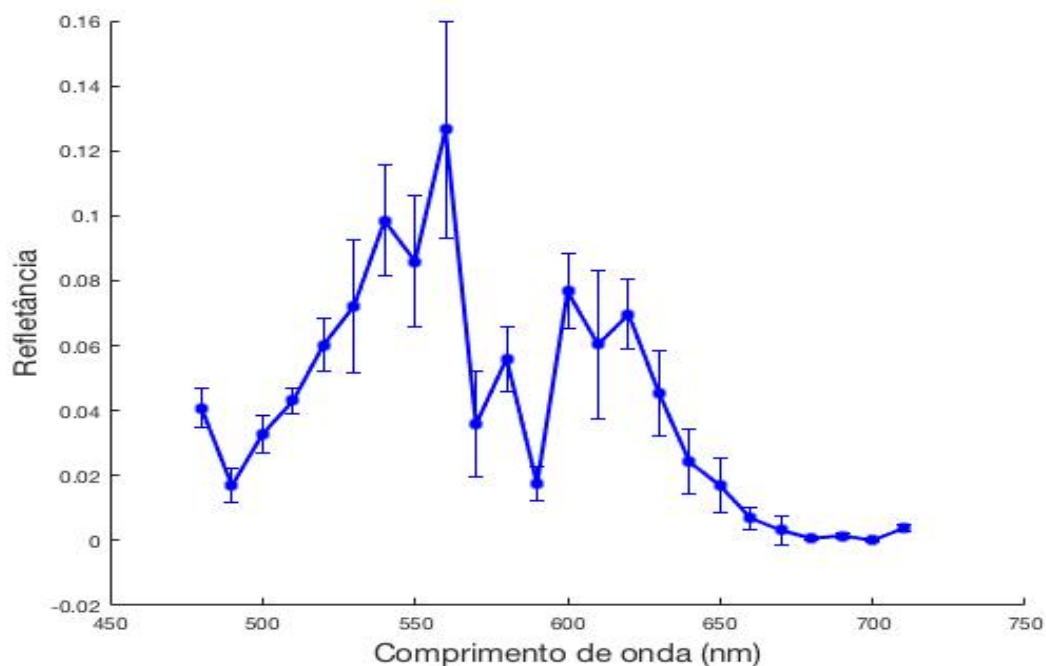


Figura 37. Espectro médio de refletância.

Após análise dos dados espectrais médios, realizaram-se as regressões pelos métodos PLS e PCR no conjunto de dados de calibração utilizando validação cruzada pelo método de *leave-one-out*. O primeiro passo foi selecionar o número de fatores (Figura 38), fatores que representam uma redução do espaço (cada fator é dado por uma composição de várias variáveis) com os quais foi construído o modelo, o qual foi feito seguindo os critérios delineados por Ferreira (2015), selecionando o número de fatores com os quais o modelo ficava com o menor valor de RMSECV, implicando em um modelo que não está sub-ajustado nem super-ajustado aos valores com os quais foi construído, garantindo o melhor desempenho na etapa de predição.

Com o intuito de obter um bom modelo de regressão deve-se garantir que o conjunto de dados de calibração, deve-se assegurar que as amostras formem um conjunto homogêneo, pois uma amostra com perfil diferente das restantes pode ter uma influência inadequada no modelo, sendo uma amostra anômala (atípica ou *outlier*) em potência. A inclusão das amostras inadequadas no modelo pode prejudicar a qualidade e o desempenho do modelo de regressão.

Para a identificação das amostras anômalas, neste trabalho foram usados os parâmetros estatísticos de alavancagem e o resíduo de Student (Figura 39). A influência de uma amostra indica a capacidade de influenciar na estimativa dos coeficientes de regressão. Os resíduos de Student servem para detectar quando uma amostra apresenta um problema baseando-se na probabilidade da amostra tendo em conta que cada modelo de regressão dá origem a um conjunto de dados de resíduos que seguem uma distribuição de probabilidade normal. Nessa linha de raciocínio, as amostras que tenham altos valores de influencia (ou alavancagem) e altos valores absolutos de resíduos de Student, superando simultaneamente os limites em ambos eixos, deverão ser excluídas da modelagem.

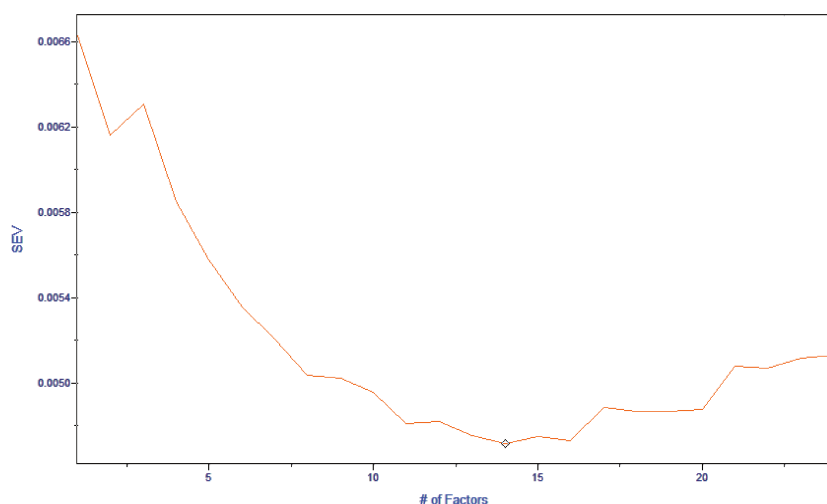


Figura 38. Seleção de número de fatores (14) a serem trabalhados no modelo de refletância para clorofila total pelo método PLS.

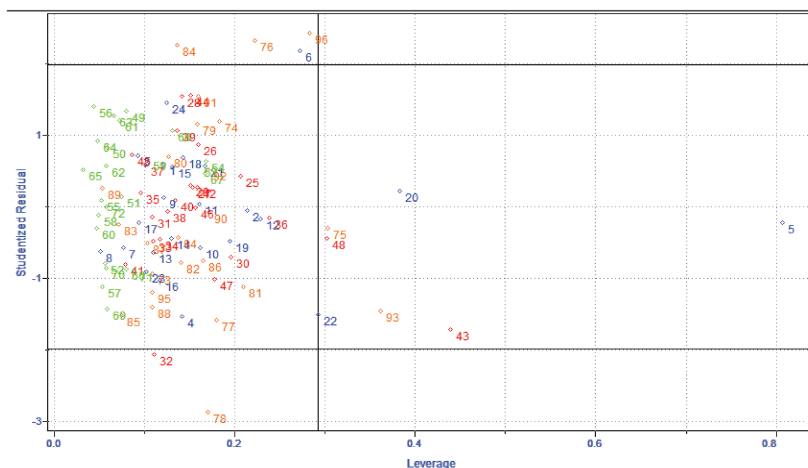


Figura 39. Identificação de outliers para conjunto de calibração de refletância pelo método PLS.

Havendo verificado a presença de *outliers* no conjunto de calibração, procedeu-se a avaliar os parâmetros do modelo de regressão sendo a variância acumulada pelo número de fatores selecionados, os erros médios quadráticos de calibração e validação cruzada RMSEC e RMSECV, o os ajustes de calibração e validação cruzada sendo R^2C e R^2CV respetivamente.

Como foi sinalado anteriormente, neste trabalho foram utilizados os métodos de regressão PLS e PCR para obter o melhor modelo de regressão para as clorofilas. Posterior ao passo de calibração, aplicaram-se os modelos criados na calibração no conjunto de predição, avaliando finalmente a capacidade preditiva dos modelos criados, sendo RMSEP e R^2P , e assim, selecionar o melhor modelo.

Para o caso da refletância, na Tabela 4 são apresentados todos os parâmetros das regressões a predição. Evidencia-se um melhor desempenho do modelo PLS, o qual trabalha com menos fatores (11 em PLS e 16 em PCR) na predição de todas as variáveis, e mesmo assim tem menores valores de RMSEP implicando em menor erro de predição e também apresenta melhores valores de ajuste R^2P . Na Figura 40 se mostram os gráficos de calibração e predição do modelo PLS para a clorofila total.

Tabela 4. Parâmetros dos modelos de regressão PLS e PCR na predição usando refletância.

	PLS			PCR		
	ChlT (mg/cm ²)	Chla (mg/cm ²)	Chlb (mg/cm ²)	ChlT (mg/cm ²)	Chla (mg/cm ²)	Chlb (mg/cm ²)
RMSEP	8,525	7,197	1,455	8,584	7,312	1,432
PRESS	3416,165	2434,224	99,497	3463,341	2513,063	96,422
R²	0,630	0,628	0,659	0,638	0,631	0,662
FACTORS	11	11	13	16	16	16
SLOPE	0,556	0,556	0,587	0,583	0,583	0,562
INTERCEPT	10,171	8,608	1,364	9,026	7,654	1,451
MODELESS	0,024	0,024	0,014	0,001	0,001	0,001

Na estimativa do teor de clorofila, Endo, Yasuoka e Tamura, (2001), usaram imagens hiperespectrais na região de 400 – 10000 nm de folhas separadas da planta, para as espécies de *Ginko bilboa* e *Zalkova serrata* obtendo coeficientes de determinação de 0,85 e 0,79 para

a clorofila *a* quando trabalharam unicamente com a região de vizinhança do *red edge* na primeira derivada da refletância e erros RMSEP de $8,80 \mu\text{g cm}^{-2}$ e $3,05 \mu\text{g cm}^{-2}$. O anterior demonstra resultados superiores aos reportados no presente trabalho na análise de refletância e apresentam um grande avanço por terem conseguido o mapeamento da distribuição de clorofila nas folhas, mapeamento que espera-se possa ser realizado como continuidade do presente trabalho, pois como será apresentado mais adiante, obtiveram-se coeficientes de determinação suficientes com baixos erros de predição associados, tendo a vantagem de estar modelando a clorofila em função do método mais exato como é o método analítico de laboratório.

No trabalho de Xiaobo, Jiyong, *et al.* (2011) para a detecção não invasiva da distribuição de clorofila nas folhas de pepino com índices baseados em imagens hiperespectrais, foi realizada a análise usando o enfoque da regressão univariada usando como variável independente cada um dos índices calculados para predizer o teor de clorofila. A avaliação do desempenho dos índices calculados foi realizada por meio dos erros RMSEC e RMSEP.

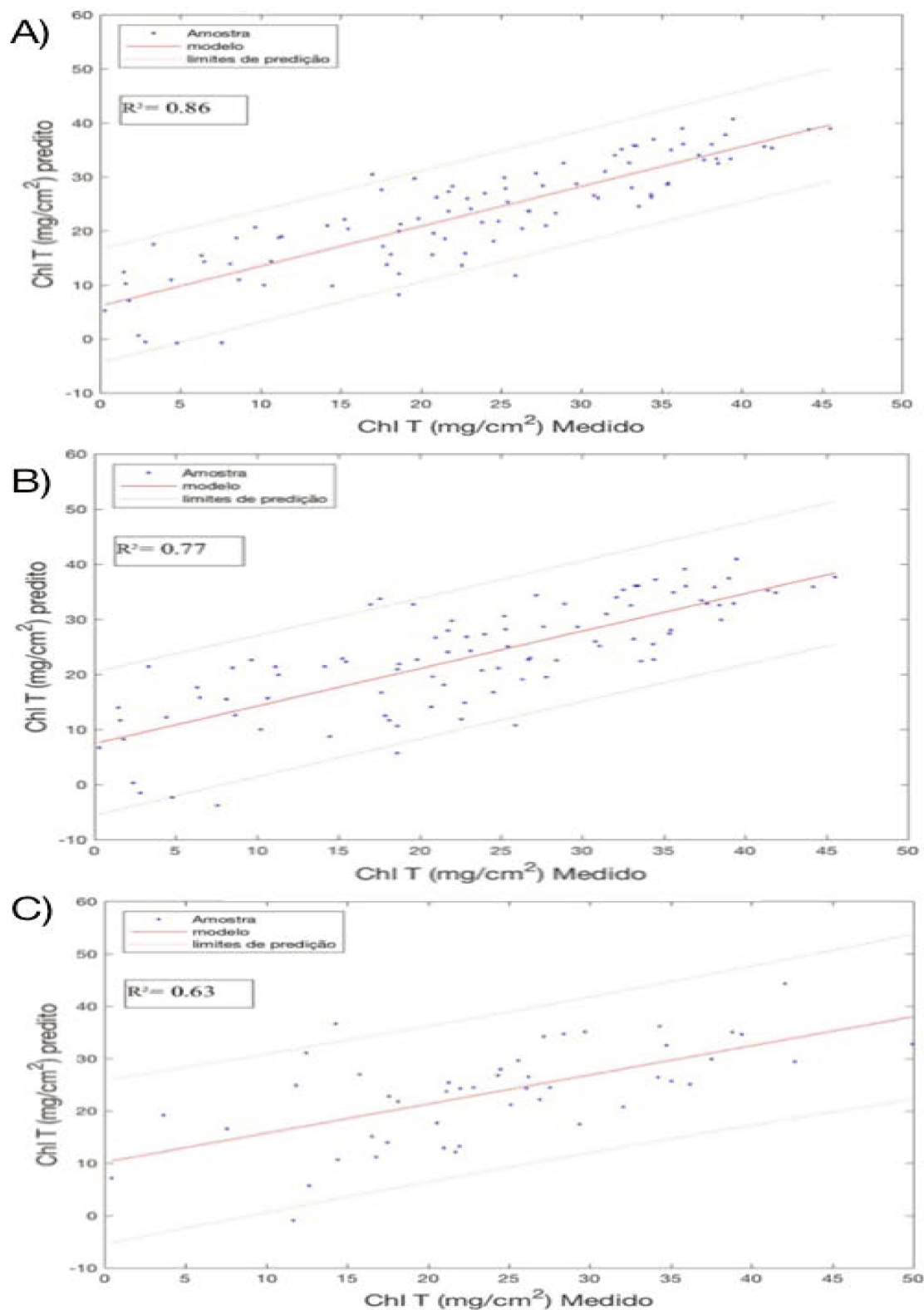


Figura 40. Melhor modelo de regressão (PLS) para a predição de clorofilas usando reflectância, apresentando o desempenho na calibração (A), validação cruzada (B) e predição (C).

Os índices calculados usando a refletância unicamente de um único comprimento de onda foram os de R_{550} e R_{675} , nos quais reportaram um melhor desempenho do índice R_{550} devido a que obteve maiores valores de R^2C (0,6339) e R^2P (0,6466); e menores valores de RMSEC (0,2760) e RMSEP (0,3006), e adicionalmente o valor médio de teor de clorofila foi correspondente a um teor alto de clorofila, de acordo a (XUE e YANG, 2009). Comparando o desempenho do R_{550} com o modelo obtido a partir de PLS baseado na refletância, observa-se que no presente trabalho houve melhor ajuste na calibração e na predição os valores de ajuste foram muito próximos, mas quanto aos erros RMSEC e RMSEP os resultados do presente trabalho tem valores menores, refletindo assim em melhor precisão do modelo.

Quanto à correlação dos índices com o teor de clorofila os autores Xiaobo, Jiyong, *et al.* (2011) obtiveram a região de maior correlação entre os comprimentos de onda de 700 e 750 nm, junto com outra região de alta correlação nos 550 nm. Em comparação com o presente trabalho, como observa-se na Figura 41, embora não houve uma região bem definida de alta correlação, na região de 550 nm a correlação é próxima de 0, ao igual que em 710 nm. Salienta-se que a maior correlação obtida em refletância é no comprimento de onda de 700 nm correspondendo ao reportado no trabalho de Xiaobo, Jiyong, *et al.* (2011) e é uma correlação inversa equivalente à reportada no trabalho de Endo, Yasuoka e Tamura, (2001) devida a resposta da clorofila na região do *red edge*.

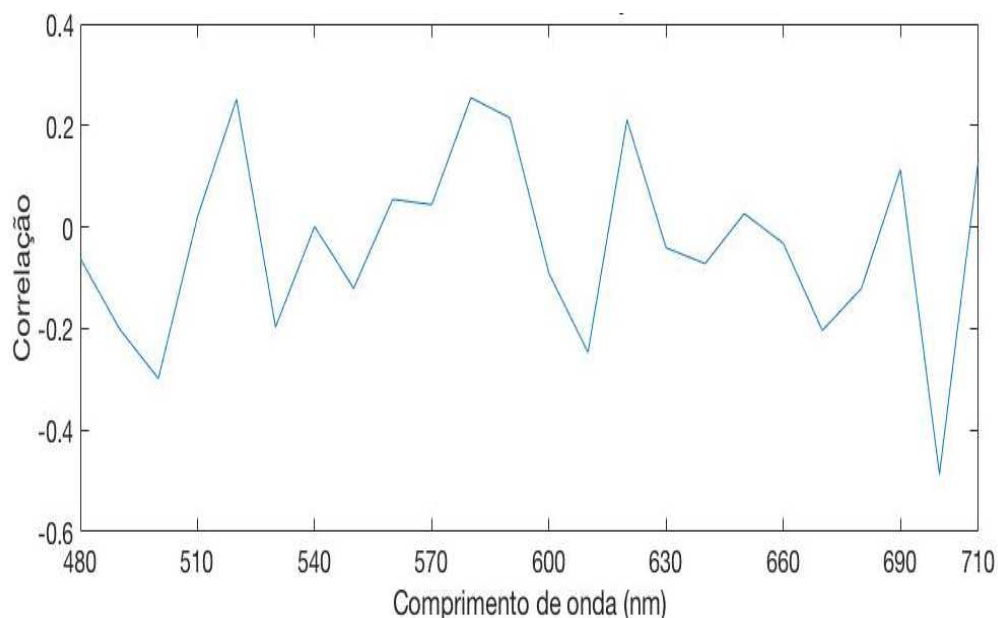


Figura 41. Espectro de correlação de refletância.

Xiaobo, Jiyong, *et al.* (2011) também verificaram o desempenho de índices baseados em dois ou três comprimentos de onda determinados, dos quais o melhor índice dos apresentados foi o de $R_{860}/(R_{550} \times R_{708})$ reportado por Datt (1999) apresentando valores de RMSEC = 0,2657; R^2C = 0,6674; RMSEP = 0,2274 e R^2P = 0,8101. Chama a atenção que o índice anterior esta dado em função do NIR, contando com mais informação quando comparada com o presente trabalho que esta focado só no espectro visível. Consequentemente, em procura de uma comparação acorde, o melhor índice obtido usando unicamente o espectro visível é o de $(R_{680}-R_{430}) / (R_{680}+R_{430})$ reportado no trabalho de Fiella e Penuelas, (1994). Os valores de desempenho do modelo foram reportados: RMSEC= 0,2813; R^2C = 0,6152; RMSEP = 0,3081 e R^2P = 0,6494. Comparando-os com os obtidos no presente trabalho, evidencia-se um melhor desempenho do modelo obtido a partir de PLS usando regressão lineal múltipla, no entanto, o método de modelagem PLS é mais complexo e requer de maior informação espectral.

Também usando imagens hiperespectrais, neste caso em milho, Wu, Wang, *et al.* (2016) procuraram obter um modelo preditivo do teor de clorofila (predizendo o índice SPAD) no qual chegaram ao valor máximo de coeficiente de correlação de 0,78 usando a região de 699 - 713 nm com a implementação de algoritmo genético e análise multivariada PLS. O máximo valor do coeficiente de correlação obtido nessa região é congruente com o apresentado na Figura 41 e os autores Xiaobo, Jiyong, *et al.* (2011) e Endo, Yasuoka e Tamura, (2001) explicado pela resposta na região do *red edge*. No entanto, Wu e colaboradores só reportaram os coeficientes de correlação e não os coeficientes de determinação dos modelos obtidos, dessa forma, o máximo coeficiente de correlação reportado (r) corresponde a um coeficiente de determinação (R^2) de 0,6123 o qual é próximo, mas ainda inferior, ao reportado no presente trabalho. Da mesma forma comparando obtiveram maiores valores de RMSEC e RMSEP embora tenham implementado métodos de modelagem mais complexos (Algoritmos genéticos) combinados com PLS.

Realizando uma combinação da informação espacial e espectral para a estimação do teor de clorofila na cultura de soja, Liu, Shen, *et al.* (2016), obtiveram um modelo usando 7 comprimentos de onda com coeficiente de determinação de 0,8 e RMSE de 0,348 usando MLR para a criação do modelo. O anterior trabalho, além de ter apresentado um melhor desempenho preditivo na clorofila, embora seja em outra cultura, demonstra que há uma serie

de possíveis tratamentos nas imagens para extrair maior informação da imagem, como é o caso da entropia e desvio padrão da refletância, a partir dos quais conseguiram prever o teor de clorofila com boa precisão e bom ajuste dos modelos. No trabalho de Liu, Shen, *et al.* (2016) as regiões de refletância indicados como indicadores sensíveis da clorofila foram as de 530 – 670 nm e 695 – 715 nm devido às altas correlações, regiões que estão dentro do espectro que foi selecionada para o presente trabalho, ainda os valores de não podem ser comparados (sendo culturas e métodos diferentes) mas indicam uma correspondência e validade do enfoque que foi escolhido no presente trabalho.

Para a cultura da cana-de-açúcar, Rao, Garg, *et al.* (2008) usaram imagens hiperespectrais de satélite, para estimar o teor de clorofila total e a concentração de nitrogênio na folha, obtendo o melhor coeficiente de determinação para clorofila ($R^2=0,93$) no modelo baseado no índice R_{860}/R_{560} . Nesse trabalho afirmam que o teor de clorofila total demonstrou melhores coeficientes de correlação na região do espectro visível, particularmente nas regiões de refletância de 547, 540, 550, 560, 671, 681 e 691 nm. As correlações observadas em 457, 671, 681 e 695 são indicativos da forte absorbância das clorofilas nas regiões azul e vermelha do espectro e também reportaram uma correlação moderada e consistente com a região do *rededge* (680 -730 nm), reforçando a importância desta região espectral. No presente trabalho os resultados reportados não foram similares aos obtidos por Rao, Garg, *et al.* (2008) pois os espectros de correlação não estão apresentando as mesmas regiões de sensibilidade da clorofila.

Trabalhando também com cana-de-açúcar, Abdel-Rahman, Ahmed e Berg, (2010), trabalhando com um espectrorradiômetro *in situ*, estudaram a modelagem do nitrogênio folhar a partir da espectroscopia, obtendo coeficiente de determinação de 0,71 e RMSEP de 0,089 no melhor modelo, demonstrando melhor capacidade preditiva do que o melhor modelo obtido no presente trabalho (Tabela 4), com a diferença que eles trabalharam com o espectro de 400 a 2500 nm e o índice que gerou o melhor modelo foi baseado em regiões fora do espectro visível. O único índice reportado pelos autores que pode ser comparado com os resultados do presente trabalho é R_{725}/R_{723} obtendo coeficiente determinação de 0,71 e RMSEP de 0,122, demonstrando melhor capacidade preditiva do que o modelo obtido no presente trabalho, mas dependendo de uma alta resolução Radiométrica. O trabalho realizado pelos autores citados anteriormente é relacionado com o teor de clorofila, pois o teor de clorofila e

o teor de nitrogênio tendem a ser correlacionados (Costa, Dwyer, *et al.*, 2001; Oppelt e Mauser, 2004; Jain, Ray, *et al.*, 2007), possibilitando a associação direta entre as duas variáveis.

6.3.2 Absorbância

A seguir, foram analisados os dados espectrais para amostras foliares de mudas de cana-de-açúcar para a resposta em absorbância, dados que foram submetidos a análise multivariada para correlação e regressão entre o espectro de resposta e o teor de clorofila. A análise de absorbância é baseada na fonte de excitação com LEDs brancos ao produto, obtendo a resposta de refletância das amostras e posteriormente feita uma transformação para absorbância.

No espectro médio de absorbância apresentado na Figura 42 é possível observar que houve níveis satisfatórios da porcentagem de absorbância, sendo maiores do que os apresentados na refletância, indicando o potencial para apresentar correlações satisfatórias e consequentemente, suficientes para a criação de um modelo de regressão para predição da clorofila no espectro visível.

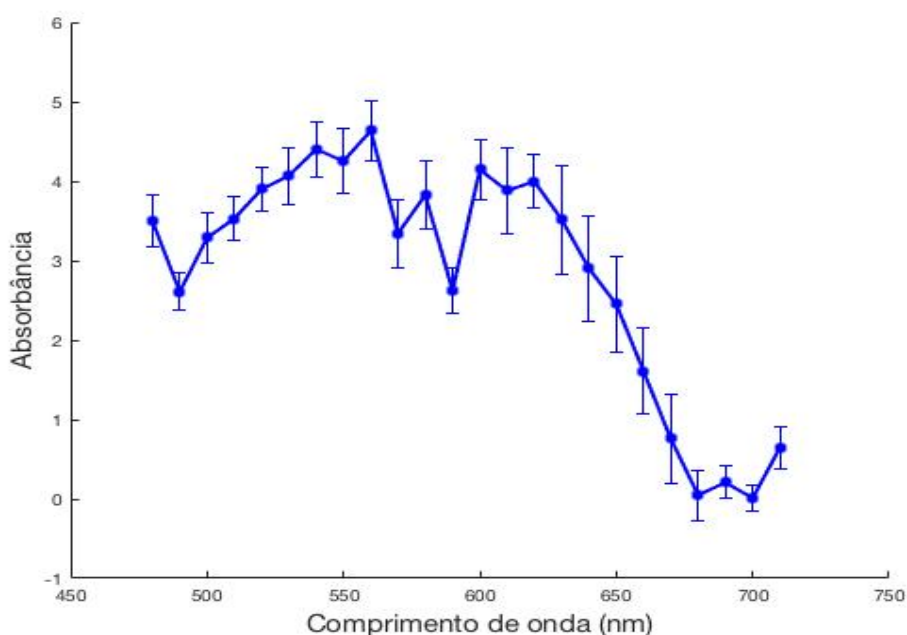


Figura 42. Espectro médio de absorbância.

Realizaram-se as regressões pelos métodos PLS e PCR no conjunto de dados de calibração utilizando validação cruzada pelo método de *leave-one-out*. O primeiro passo foi selecionar o número de fatores, seguindo o procedimento descrito anteriormente selecionando o número de fatores com os quais o modelo ficava com o menor valor de RMSECV.

Para o caso da análise de absorbância, depois da avaliação de presença de *outliers*, foi feita uma verificação do espectro de correlação visando num processo de seleção de variáveis para garantir a construção do melhor modelo possível de regressão. Com a seleção de variáveis busca-se excluir variáveis que não estão acrescentando informação valiosa ao modelo ou representam interferência. A seleção de variáveis foi realizada tomando como base o correlograma (Figura 43), o qual cria um “espectro” de correlação de todas as variáveis preditoras.

Em função do correlograma, para cada método de regressão foi realizada uma série de seleção de variáveis, definindo um valor de correlação mínimo e a partir do qual foram excluídas todas as variáveis com correlação inferior. Desta forma foram testados 5 modelos de regressão diferentes para cada método, sendo a regressão com todas as variáveis, removendo as variáveis com correlação dentro do intervalo de $\pm 0,3$; removendo as variáveis com correlação dentro do intervalo de $\pm 0,4$; removendo as variáveis com correlação dentro do intervalo de $\pm 0,5$; removendo as variáveis com correlação dentro do intervalo de $\pm 0,6$.

Em função dos parâmetros de RMSEP e R^2P (Tabela 5), verificou-se que o melhor modelo de regressão, para todas as clorofilas, é a seleção de variáveis removendo as variáveis com correlação dentro do intervalo de $\pm 0,4$. Observa-se que também neste caso o melhor método de regressão foi o de PLS pois utiliza para todas as variáveis resposta menos número de fatores, apresentando valores pequenos e próximos aos de PCR de RMSEP e valores muito próximos de R^2P . Dessa forma, na Figura 44 é apresentado o comportamento do modelo PLS com seleção de variáveis para resposta em absorbância.

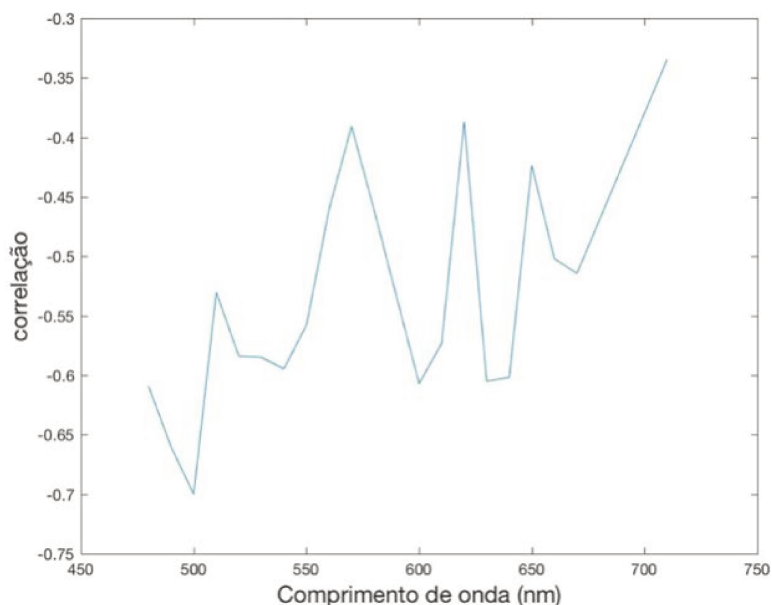


Figura 43. Correlograma para o método PLS em absorbância.

Demonstra-se claramente que no espectro de absorbância existe uma relação inversamente proporcional com o teor de clorofila, pois o espectro de correlação da região trabalhada apresenta correlação negativa com o teor de clorofila, de forma que, as regiões que demonstraram maior correlação foram respectivamente: 480, 490, 500, 600, 630 e 640 nm. Lichtenthaler e Buschmann (2001), reportaram que os pigmentos *Chl a* e *Chl b* apresentam a região de maior absorção nas regiões azul (428 até 453) e vermelho (ao redor de 661 e 641 nm), consequentemente no presente trabalho, a região perto do azul (480 a 500 nm) e a região do vermelho (600 a 640 nm) demonstraram as maiores correlações. As regiões de absorbância de 670 nm em diante, apresentam baixas correlações indicando menor poder preditivo do teor de clorofila em comparação com as regiões do azul e vermelho, o qual explica-se devido a que teores de clorofilas relativamente baixos são suficientes para saturar a absorção na região do vermelho (RAO, GARG, *et al.*, 2008).

Atualmente existe grande quantidade de índices de vegetação que relacionam o teor de clorofila da folha, do dossel e o índice de área folhar a partir de medições espectrais. Estes índices consistem em razões simples e razões de diferença normalizadas, amplamente empregados para estimativas com espectroscopia, e consistem na combinação de bandas sensíveis à absorção da clorofila e ao espalhamento da folha, com uma banda de normalização que só é sensível ao espalhamento (JAY, MAUPAS, *et al.*, 2017). Tomando em conta a lógica para a seleção de regiões espectrais para a criação dos índices de vegetação,

as regiões espectrais do visível empregadas nos índices de vegetação mais usados são: 550, 670, 681, 705 e 710 nm (JAY, MAUPAS, *et al.*, 2017), embora estes índices sejam calculados no domínio da refletância, a decisão da seleção está baseada na absorbância por parte dos pigmentos da clorofila, reforçando a discussão que vem sendo desenvolvida quanto as regiões aptas para a estimativa de clorofila.

Tabela 5. Parâmetros após a seleção de variáveis para os dos métodos de regressão em absorbância.

	PLS			PCR		
	ChlT (mg/cm ²)	Chla (mg/cm ²)	Chlb (mg/cm ²)	ChlT (mg/cm ²)	Chla (mg/cm ²)	Chlb (mg/cm ²)
RMSEP	7,665	6,562	1,293	7,858	6,718	1,309
PRESS	2664,569	1937,964	75,252	2778,784	2031,204	77,156
R²	0,718	0,711	0,723	0,703	0,697	0,710
FACTORS	11	11	8	18	18	15
SLOPE	0,661	0,663	0,601	0,629	0,633	0,564
INTERCEPT	9,081	7,707	1,623	10,367	8,732	1,731
MODELESS	17,568	16,984	38,831	0,577	0,577	2,894

Com o objetivo de estimar o teor de clorofila em milho usando espectros de refletância, Sidko, Botvich, *et al.* (2017), usaram o potencia de clorofila, que consiste na diferença entre a integral do fator de refletância com e sem a absorção de clorofila, na região entre 550 e 730 nm, para a estimativa do teor de clorofila e a produtividade da cultura. Os autores argumentam que as mudanças no fator de refletância nessa região (550 – 730 nm) é essencialmente determinada pelo teor de clorofila nas plantas, reportando a região de maior absorbância em 680 nm.

No presente trabalho, na região de 680 nm apresentou-se uma baixa absorção e o máximo de absorbância foi encontrado na região entre 550 e 560 nm de acordo ao reportado previamente nos trabalhos de Lichtenthaler e Buschmann (2001), Rao, Garg, *et al.* (2008) e Jay, Maupas, *et al.* (2017). Embora Sidko, Botvich, *et al.* (2017) trabalharam em milho e existam diferenças quando a região de maior absorbância com o presente trabalho, existe um ponto de convergência devido a que suportam que existem grandes valores de informação na região do vermelho na banda de absorção da clorofila, a qual pode ser usada para a decodificação de imagens multiespectrais de satélite.

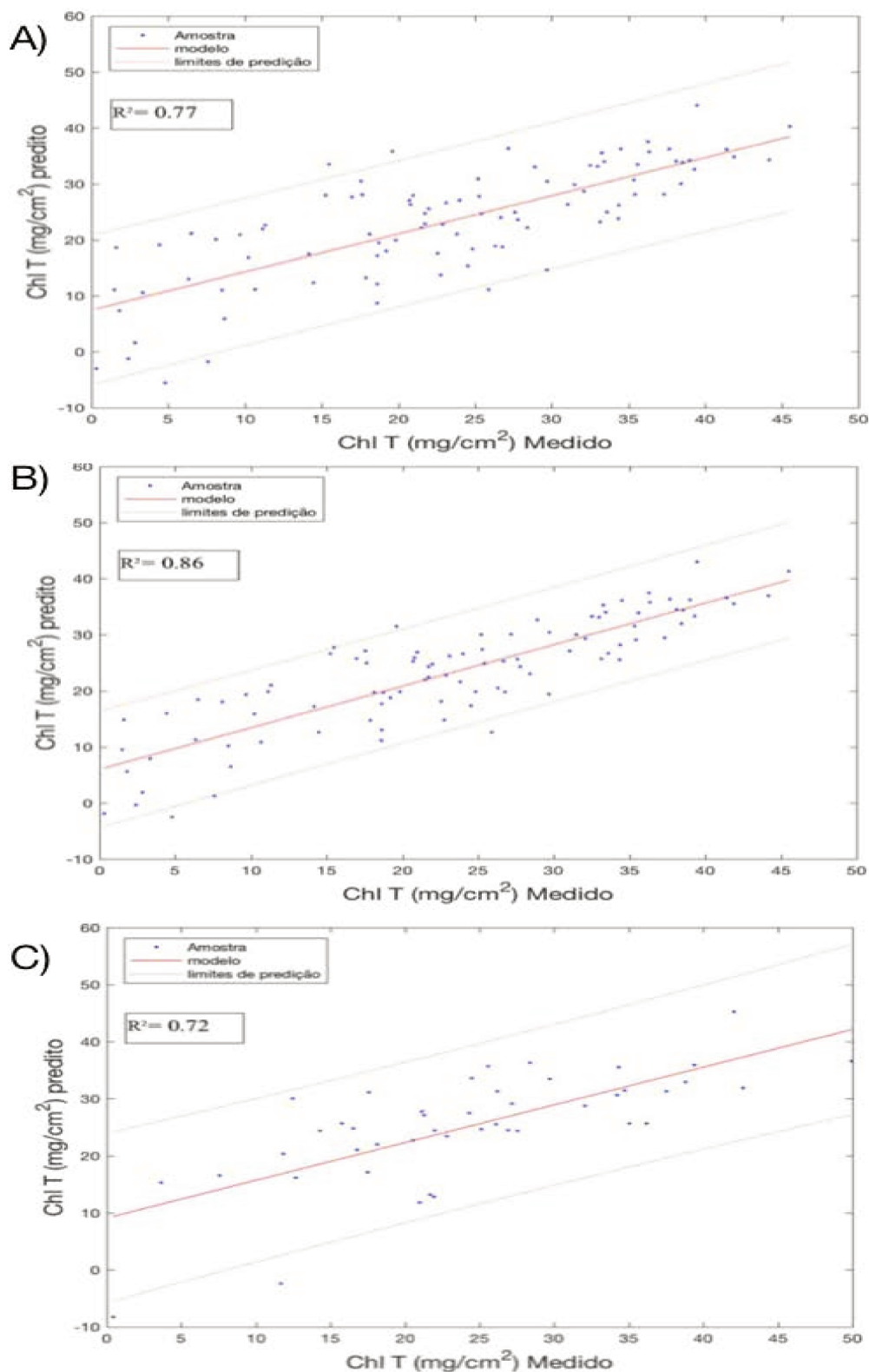


Figura 44. Melhor modelo de predição de clorofilas (método PLS usando seleção de variáveis) usando absorvância, apresentando o desempenho na calibração (A), validação cruzada (B) e predição (C).

Realizando as respectivas comparações entre os modelos obtidos em refletância e absorvância, verificam-se melhores modelos obtidos a partir da absorvância com a seleção de variáveis, devido a que demonstraram melhor ajuste na predição dos valores ($R^2 = 0,72$) e menor erro na predição demonstrando maior precisão na estimativa do teor de clorofila ($RMSEP = 7,665$). Consequentemente o modelo selecionado para absorvância, apresenta um coeficiente de determinação (na predição) próximo ao ajuste do medidor SPAD em relação ao método de analítico ($R^2 = 0,77$), o que significa que a partir do modelo obtido em absorvância é possível trabalhar com uma precisão ligeiramente inferior à do SPAD mas ganhando em abrangência espacial e potencial para automação e controle.

O modelo obtido a partir do espectro de absorvância e a seleção de variáveis para a modelagem multivariada, é considerado melhor em função do ajuste e da precisão, aos apresentados em trabalhos similares para a estimativa do teor de clorofila por meio de imagens espectrais e espectroscopia combinadas com modelagem multivariada (FIELLA e PENUELAS, 1994; WU, WANG, *et al.*, 2016; ABDEL-RAHMAN, AHMED e BERG, 2010), embora alguns deles tenham empregado métodos mais sofisticados na modelagem multivariada e tenham trabalhado com mais regiões do espectro. O trabalho de Rao *et al.* (2008) para estimativa do teor de clorofila em cana-de-açúcar usando imagens hiperespectrais apresentou melhor coeficiente de determinação ($R^2 = 0,93$) e consequentemente melhor capacidade preditiva, mas é importante salientar que o melhor modelo que reportaram foi R_{860}/R_{560} , demonstrando coerência com os resultados do presente trabalho onde de 560 nm é a região de maior absorvância de clorofila (Figura 42) na cana-de-açúcar.

6.3.3 Fluorescência 405 nm

Foram analisados os dados espectrais para as amostras foliares de cana-de-açúcar, desta vez submetida a uma fonte de excitação de fluorescência com comprimento de onda de 405 nm; assim, obteve-se a resposta de fluorescência das amostras. Os dados de resposta de fluorescência posteriormente foram submetidos a análise multivariada para correlação e regressão entre o espectro de resposta e o teor de clorofila.

Foi calculado o espectro médio para todas as amostras avaliadas para representar o comportamento de fluorescência resposta a uma excitação no comprimento de onda de 405 nm (Figura 45). No espectro médio evidenciam-se níveis satisfatórios de fluorescência na resposta das amostras e é demonstrada uma maior resposta de fluorescência nos comprimentos de onda compreendidos entre 480 e 560 nm.

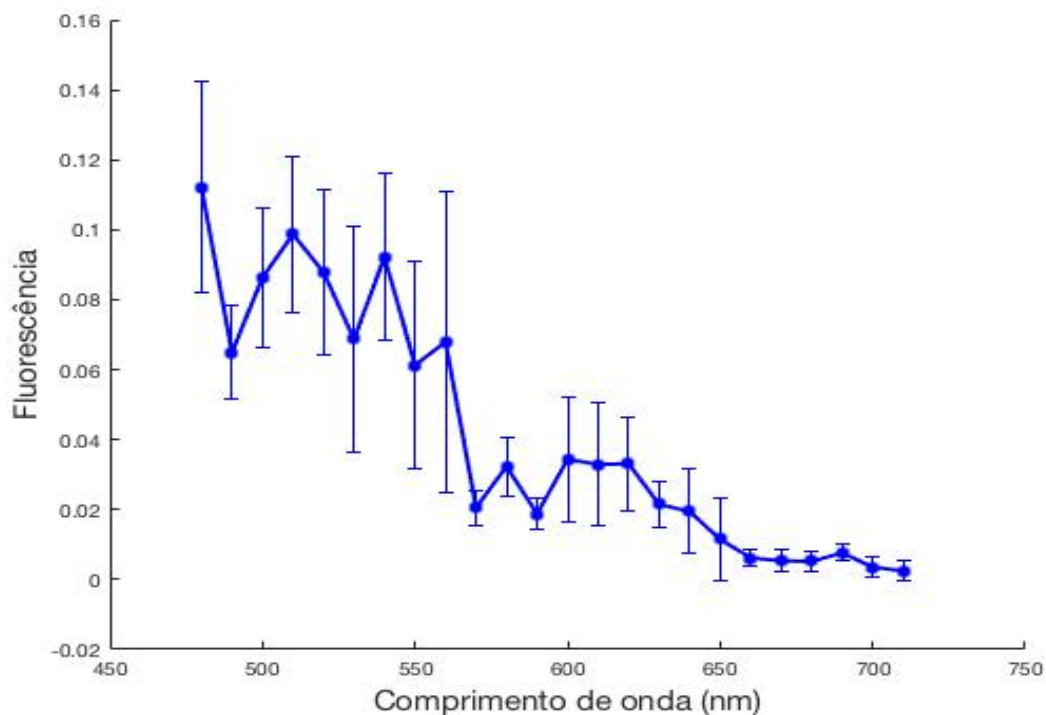


Figura 45. Espectro de fluorescência correspondente a uma excitação de 405 nm.

Como citado anteriormente, a região de absorbância das clorofilas encontra-se entre 400 e 500 nm (região azul – verde) e entre 600 e 700 nm (vermelho) e adicionalmente as clorofilas reabsorvem a sua fluorescência emitida na região espectral do vermelho (CEROVIC, SAMSON, *et al.*, 1999). Consequentemente, observa-se (Figura 45) que a maior região de fluorescência para as amostras de cana-de-açúcar foi obtida na região entre 480 e 510 nm e na região entre 600 e 710 nm observaram-se os menores valores de fluorescência, o qual é devido à reabsorção da própria fluorescência por parte das clorofilas.

As regiões de fluorescência 480, 490 e 500 nm pertencem a fluorescência do azul (BF) sendo a região de 480 nm onde obteve-se a maior emissão de fluorescência, onde os

principais pigmentos fluorescentes são o ácido ferúlico, a NADP⁺ e NADPH (LICHTENTHALER e SCHWEIGER, 1998; MORALES, CEROVIC e MOYA, 1996; BUSCHMANN, LANGSDORFH e LICHTENTHALER, 2000). A região compreendida entre 500 e 600 nm, que é conhecida como a região de fluorescência do verde (GF) também apresentou altas emissões de fluorescência, com máximos em 510 e 540 nm, região na qual os pigmentos responsáveis pela fluorescência são as clorofilas e os carotenoides (CEROVIC *et al.*, 1999; LICHTENTHALER e SCHWEIGER, 1998; MORALES, CEROVIC e MOYA, 1996; C. BUSCHMANN, LANGSDORFH.K e LICHTENTHALER, 2000).

Seguindo a análise do espectro médio de fluorescência, foram realizadas as regressões pelos métodos PLS e PCR no conjunto de dados de calibração utilizando o método de validação cruzada para a seleção do melhor modelo, seguindo o procedimento descrito anteriormente para a seleção do número de fatores do modelo em função do RMSECV.

Foi realizada uma verificação da presença de *outliers* no modelo e posteriormente, como no caso da absorbância, foi realizada a verificação do espectro de correlação (Figura 46) para avaliar a possibilidade de seleção de variáveis para garantir a construção do melhor modelo de regressão para fluorescência. Observa-se no espectro de correlação (Figura 46) que as regiões de fluorescência que mais se relacionam com teor de clorofila são 590, 640 e 680 nm. Foram testados os modelos sem fazer seleção de variáveis, fazendo remoção das variáveis com correlação dentro do intervalo $\pm 0,2$ e remoção das variáveis dentro do intervalo de correlação de $\pm 0,3$.

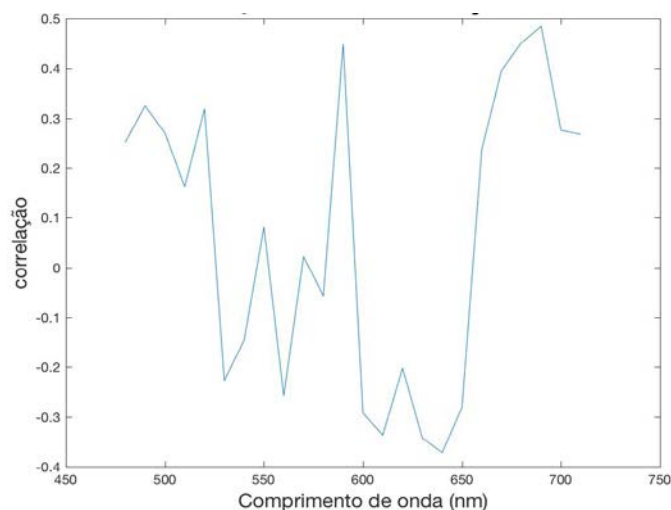


Figura 46. Espectro de correlação para a resposta em fluorescência 405 nm.

Em função dos parâmetros de RMSEP e R^2P foi escolhido o melhor modelo para cada método de interpolação. Diferente do caso da absorbância, para os métodos de interpolação PLS e PCR o melhor modelo foi obtido usando todas as variáveis preditoras, pois em todos os casos de seleção verem-se com prejuízo os parâmetros de erro e ajuste dos modelos. Na Tabela 6 são apresentados os parâmetros para o melhor modelo usando os dois métodos de regressão testados. Observa-se que neste caso o melhor método de regressão foi o de PLS (Figura 47), pois os modelos apresentam desempenhos muito similares, com a diferença que com PLS precisam ser inclusos um menor número de fatores.

Comparando os resultados obtidos com indução de fluorescência de 405 nm com os obtidos em refletância e absorbância, o modelo PLS obtido com fluorescência foi ligeiramente superior ao obtido em refletância, mas sem superar o desempenho do modelo obtido na análise de absorbância. No trabalho de Zarco-Tejada, *et al.* (2002) desenvolveram um modelo combinado de fluorescência-refletância-transmitância para estimar o teor de clorofila, a partir do qual reportaram resultados ($R^2=0,7$) com desempenho similar aos aqui apresentados (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros para os modelos selecionados para fluorescência 405.

	PLS			PCR		
	ChlT (mg/cm ²)	Chla (mg/cm ²)	Chlb (mg/cm ²)	ChlT (mg/cm ²)	Chla (mg/cm ²)	Chlb (mg/cm ²)
RMSEP	8,142	6,900	1,465	9,584	8,119	1,656
PRESS	3182,77	2285,839	103,102	4409,109	3164,734	131,586
R²	0,626	0,629	0,622	0,442	0,424	0,486
FACTORS	4	4	4	4	4	4
SLOPE	0,488	0,489	0,437	0,254	0,239	0,274
INTERCEPT	11,449	9,716	1,898	16,118	13,935	2,391
MODELESS	0,108	0,108	0,109	0,088	0,088	0,088

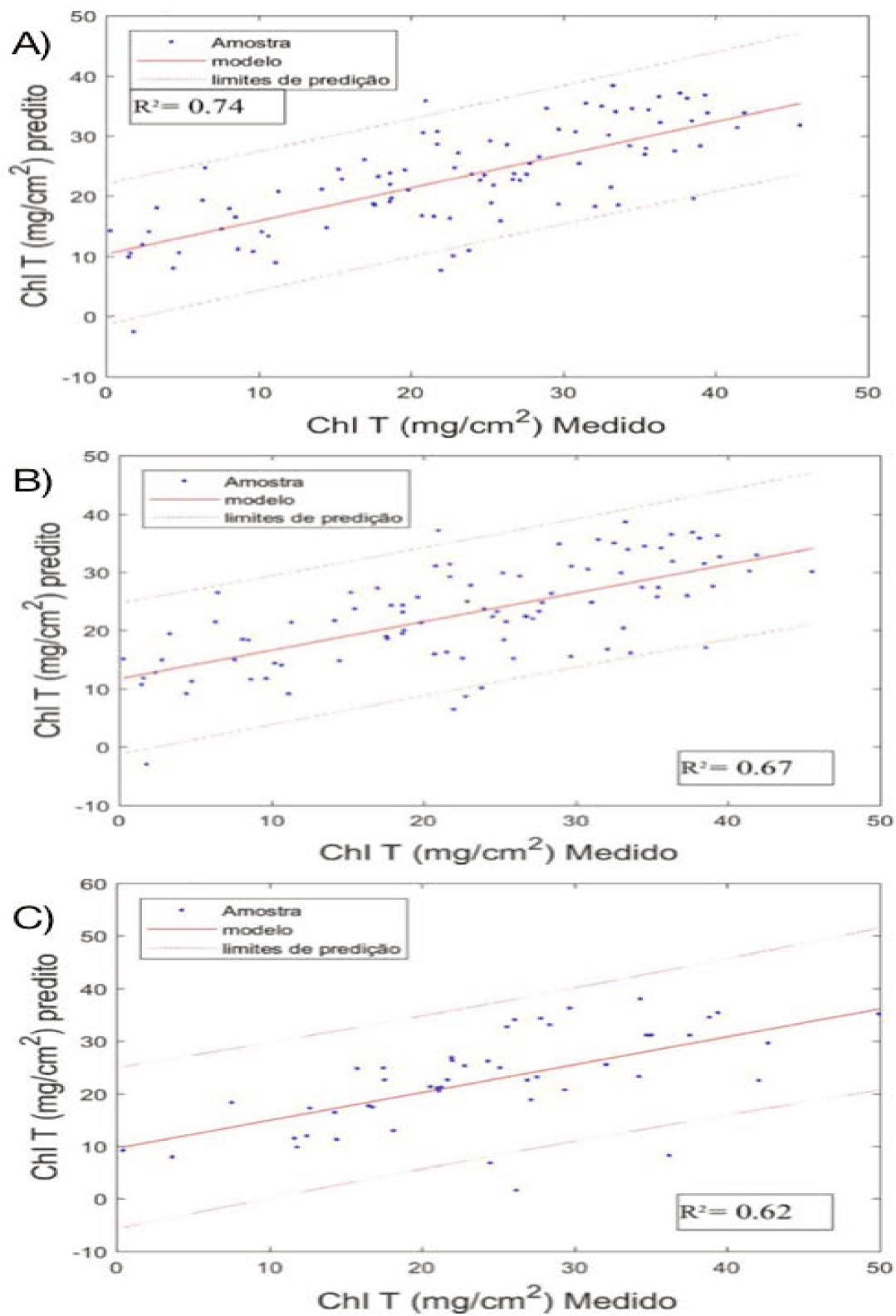


Figura 47. Melhor modelo de predição de clorofilas (método PLS) com fluorescência 405 nm, apresentando o desempenho na calibração (A), validação cruzada (B) e predição (C).

6.3.4 Fluorescência 470 nm

Foram analisados os dados espectrais para as amostras foliares de cana-de-açúcar, desta vez submetida a uma fonte de excitação de fluorescência com comprimento de onda de 470 nm provenientes do processamento das imagens espectrais. Os dados da resposta de fluorescência foram posteriormente submetidos a análise multivariada para correlação e regressão entre o espectro de resposta e o teor de clorofila.

Foi calculado o espectro médio para todas as amostras avaliadas para representar o comportamento de fluorescência resposta a uma excitação no comprimento de onda de 470 nm (Figura 48). No espectro médio evidenciam-se níveis não satisfatórios de fluorescência na resposta das amostras e é demonstrada uma maior resposta de fluorescência nos comprimentos de onda compreendidos entre 480 e 530 nm, demonstrando que há predominância da reflexão da fonte de excitação e baixa emissão de fluorescência fora dessa região do espectro, diminuindo o potencial de coleta de informação. Essa região de fluorescência difere do argumentado por Chappelle, Wood, *et al.* (1984) os quais apresentam que a região esperada para fluorescência em tecidos vegetais é por volta de 680 nm.

Desta forma, vendo o comportamento espectral produto da fluorescência induzida com excitação de 470 nm, observa-se que as amostras só estão refletindo a energia da fonte de excitação na região do espectro próxima à da luz emitida pelo sistema (470 nm), o que leva a questionar se a maior região de fluorescência pode ter ocorrido numa região inferior a 480 nm ou se a excitação neste comprimento de onda não gera fluorescência suficiente das folhas de cana-de-açúcar para obter informação, fazendo-se necessário um estudo que seja abrangente da região final do ultravioleta.

O espectro de emissão de fluorescência aqui apresentado demonstra grande similitude como o apresentado por Terencio (2006), onde evidencia-se um decaimento da emissão de fluorescência pelo tecido vegetal após o comprimento de onda da excitação e no qual apresenta que quando existe esse decaimento da fluorescência, deve-se a que a região de maior emissão se encontra em uma região espectral inferior à estudada.

Seguindo a análise do espectro médio de fluorescência, foram realizadas as regressões pelos métodos PLS e PCR no conjunto de dados de calibração, utilizando o método de validação cruzada para a seleção do melhor modelo. O anterior, conforme o procedimento descrito

anteriormente para a seleção do número de fatores do modelo em função do erro na validação cruzada RMSECV.

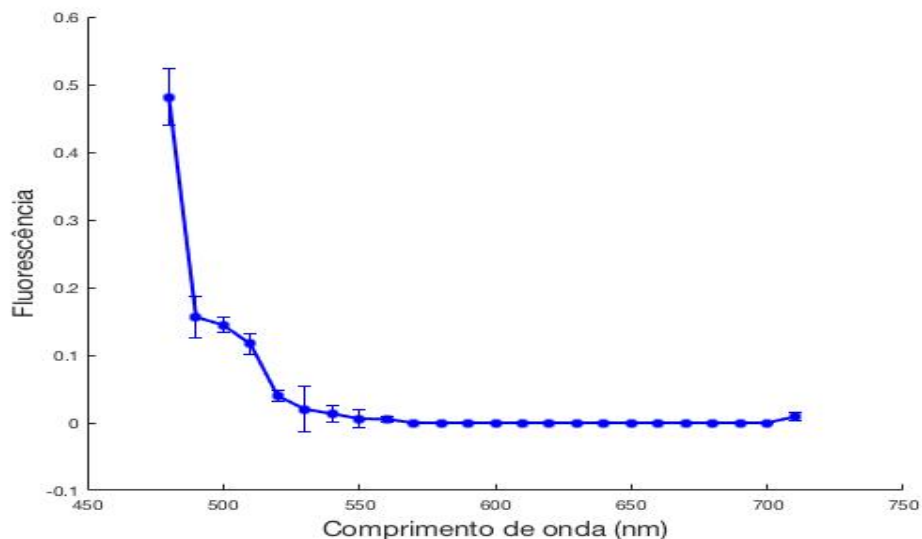


Figura 48. Espectro de fluorescência correspondente à excitação de 470 nm.

Neste caso, como se evidencia no espectro médio, a partir dos 560 nm a resposta de fluorescência é muito baixa, de forma que essas variáveis de 560 até 700 foram removidas na criação do modelo, trabalhando dessa forma com as variáveis de 480 – 560 nm e 710 nm. Foi realizada a verificação de presença de *outliers* no modelo de calibração e posteriormente, aplicaram-se os modelos criados na calibração no conjunto de predição, avaliando finalmente a capacidade preditiva dos modelos criados (Tabela 7), sendo RMSEP e R^2 P, e assim, selecionar o melhor modelo.

Tabela 7. Parâmetros dos modelos de predição para fluorescência 470 nm.

	PLS			PCR		
	ChlT (mg/cm ²)	Chla (mg/cm ²)	Chlb (mg/cm ²)	ChlT (mg/cm ²)	Chla (mg/cm ²)	Chlb (mg/cm ²)
RMSEP	11,180	9,475	1,951	11,010	9,271	1,953
PRESS	6000,032	4309,641	182,758	5818,792	4126,962	183,257
R²	0,241	0,234	0,247	0,245	0,242	0,242
FACTORS	7	7	7	8	8	8
SLOPE	0,173	0,171	0,167	0,168	0,166	0,164
INTERCEPT	19,519	16,579	3,008	19,001	16,615	3,027
MODELESS	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000

Para a modelagem a partir da fluorescência de 470 nm, evidenciaram-se os maiores erros de predição RMSEP e os menores valores de ajuste R^2P , demonstrando numa grande dispersão dos dados e consequentemente, um desempenho muito pobre dos modelos criados, mesmo que teve melhor desempenho o método PCR, o modelo não tem suficiente capacidade preditiva para ser aplicada na clorofila. Para a comparação com os modelos criados de refletância apresentam-se na Figura 49 os gráficos de cada uma das etapas, calibração, validação cruzada e predição, do modelo PCR para clorofila total em resposta a fluorescência no comprimento de onda de 470 nm. Evidencia-se que o modelo obtido com a fluorescência induzida a 470 nm teve um desempenho na modelagem inferior às análises de refletância, absorvância e fluorescência a 405 nm, pois como apresentado na Tabela 7 teve o menor ajuste ($R^2=0,31$) e o maior erro na predição (RMSEP= 0,0067).

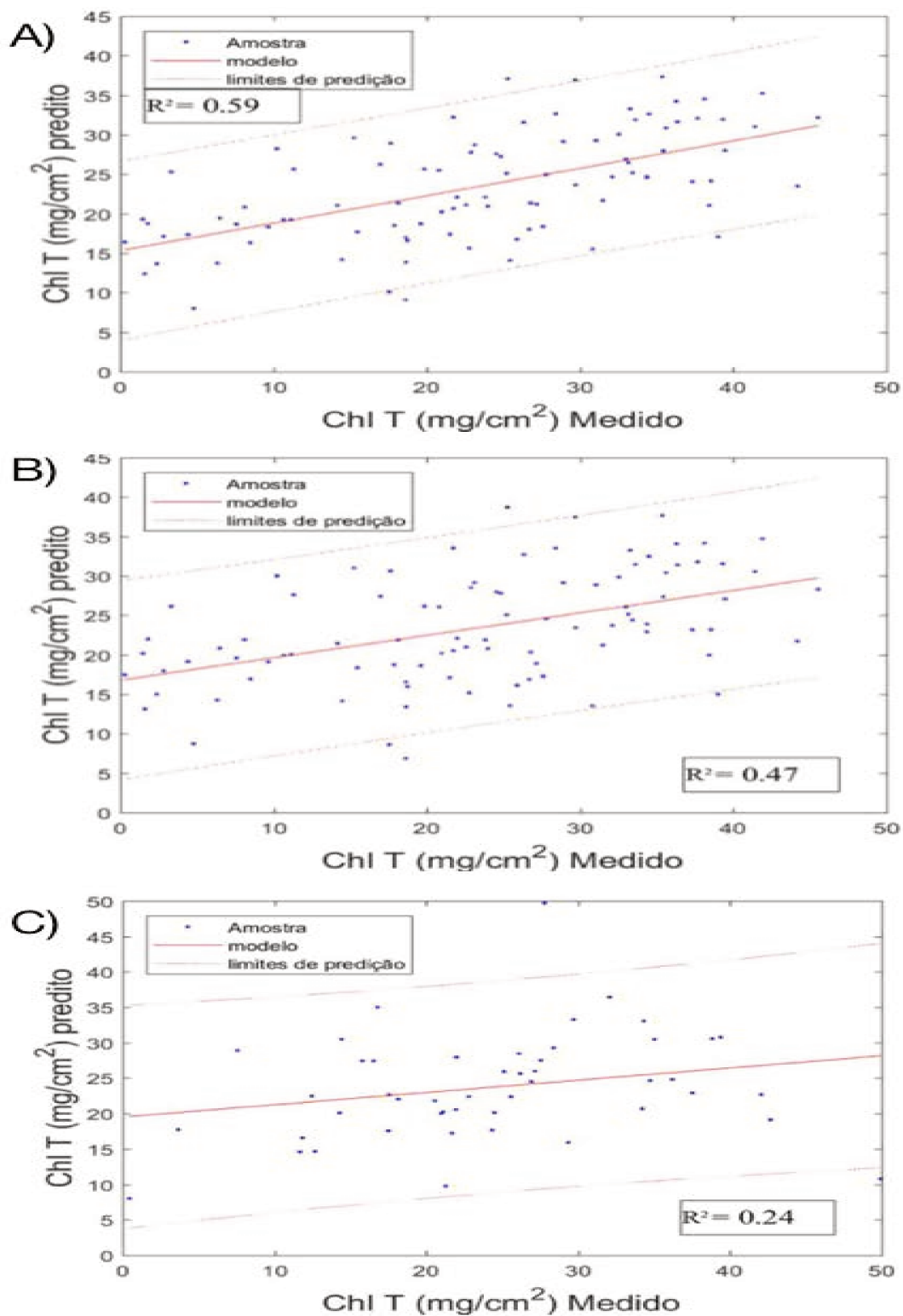


Figura 49. Melhor modelo para predição de clorofilas (PLS) usando fluorescência 470 nm, apresentando o desempenho na calibração (A), validação cruzada (B) e predição (C).

6.4 Classificação usando características espectrais

Conforme foram sendo desenvolvidas as análises multivariadas, foi percebido o padrão de que realmente usando a tecnologia e a metodologia apresentada no presente trabalho não é possível discriminar as variedades de cana-de-açúcar IAC 1099, IAC 5000 e IAC 5094, verificação que tinha sido planteada dentro dos objetivos do trabalho. Da mesma forma e conforme o planejamento experimental, não foi possível discriminar as duas doses de fertirrigação às quais foram submetidas as mudas. Porém, ao incluir na análise a variável temporal do desenvolvimento e o tempo de estresse fisiológico, observaram-se diferenças nas curvas espectrais (

Figura 50) e na análise de componentes principais, de forma que se demonstrou a possibilidade da classificação usando a variável temporal.

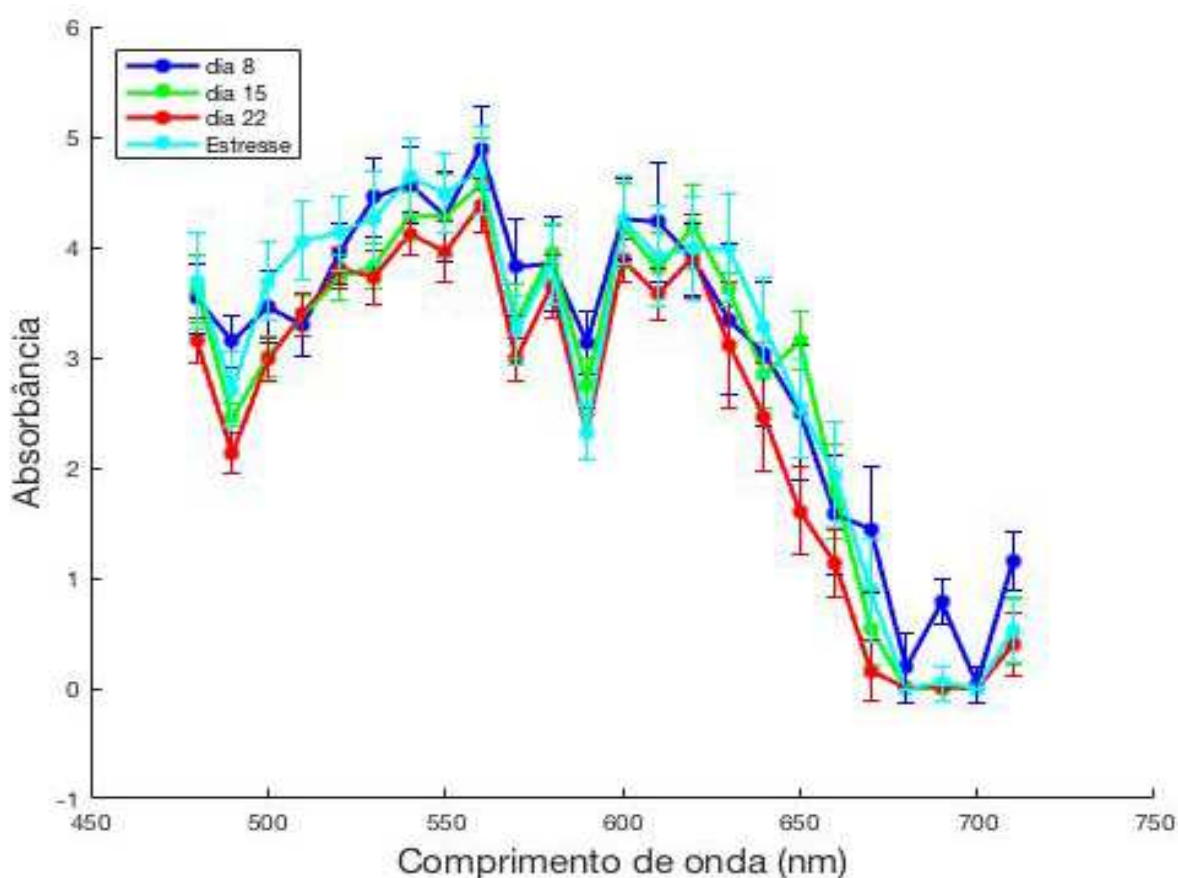


Figura 50. Espectro médio de absorvância classificado por tempo de desenvolvimento.

Para a classificação em tempos de desenvolvimento testaram-se os métodos de classificação supervisionada pelo k-ésimo vizinho mais próximo KNN (pela sigla em inglês correspondente a *k – Nearest Neighborhood*) e o método SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogies*). Como apresentado na seção anterior, melhor modelo de regressão para prever a clorofila foi obtido usando a resposta em absorbância, de forma que os dados de absorbância foram os trabalhados para levar a cabo a classificação.

Trabalhou-se com um conjunto de dados de um experimento preliminar que foi realizado no qual foram coletadas 240 amostras foliares de cana de açúcar, sendo que se coletaram 60 amostras por semana. Nas imagens obtidas foi realizado o mesmo processamento de imagens espectrais para obter assim a curva espectral para cada uma das amostras. O conjunto de dados foi dividido em 60% dos valores para calibração e 40 % para a predição.

Para a aplicação da classificação pelo método KNN foi realizada em primeira instância uma análise PCA para avaliar os agrupamentos gerados e em função do anterior e o poder de modelagem das variáveis, para realizar uma seleção de variáveis. Na seleção de variáveis foram excluídos os comprimentos de onda com poder de modelagem inferior a 0,75; dessa forma os comprimentos de onda removidos foram 510, 520, 530, 560, 570 580 e 610 nm. Para a seleção de número de vizinhos mais próximos usou-se o critério de selecionar o número de vizinhos mais próximos, maior que três conforme (FERREIRA, 2015) que apresenta menor número de erros.

Na Tabela 8 e na Tabela 9 apresentam-se as matrizes de confusão dos resultados da classificação, para calibração e predição respectivamente, usando o método KNN, com K=3 e trabalhando com todas as variáveis. Observa-se que na modelagem, usando todos os comprimentos de onda, acertou para todas as amostras do primeiro e do terceiro tempo de desenvolvimento, apresentando o maior número de erros nas amostras da segunda semana que foram classificadas erroneamente no terceiro tempo e no tempo de estresse fisiológico.

Tabela 8. Matriz de confusão da calibração do método kNN ($k = 3$) usando todas as variáveis.

		CLASSE REAL			
		1	2	3	4
CLASSE PREDITA	1	36	0	0	0
	2	0	31	0	4
	3	0	1	36	0
	4	0	4	0	32

Na predição (Tabela 9) é apresentada a matriz de confusão para a predição. Observa-se que houve acerto total para o primeiro tempo, 1 erro de classificação para o segundo tempo a qual foi classificada erroneamente no tempo de estresse fisiológico, 3 erros de classificação do terceiro tempo classificando-os como do tempo de estresse fisiológico e finalmente 4 erros no tempo de estresse fisiológico os quais foram classificados como pertencentes ao segundo tempo de desenvolvimento.

Tabela 9. Matriz de confusão da predição do método kNN ($k = 3$) usando todas as variáveis.

		CLASSE REAL			
		1	2	3	4
CLASSE PREDITA	1	24	0	0	0
	2	0	23	0	4
	3	0	0	21	0
	4	0	1	3	20

Quanto à classificação usando seleção de variáveis, na Tabela 10 e na Tabela 11 são apresentadas as matrizes de confusão ($k = 4$) para classificação e predição respectivamente. Observa-se que na calibração, como na classificação sem seleção de variáveis, houve acerto total no primeiro e terceiro tempo de desenvolvimento. No segundo tempo houve 2 erros de

classificação sendo 1 para o terceiro e 1 para o quarto tempo; e no quarto tempo houve 3 erros de classificação sendo classificados como do segundo tempo.

Tabela 10. Matriz de confusão da calibração do método kNN ($k = 4$) com seleção de variáveis.

		CLASSE REAL			
		1	2	3	4
CLASSE PREDITA	1	36	0	0	0
	2	0	34	0	3
	3	0	1	36	0
	4	0	1	0	33

Na predição do método kNN ($k = 4$) usando seleção de variáveis (Tabela 11), observa-se na matriz de confusão da predição que não houve nenhum erro de classificação para o primeiro tempo, para o segundo tempo houve 1 erro de classificação sendo alocado no 4 tempo, no terceiro tempo apresentaram-se 3 erros todos alocados no quarto tempo, e finalmente, no quarto tempo houve 4 erros onde todos foram alocados no segundo tempo.

Tabela 11. Matriz de confusão na predição do método kNN ($k = 4$) usando seleção de variáveis.

		CLASSE REAL			
		1	2	3	4
CLASSE PREDITA	1	24	0	0	0
	2	0	23	0	4
	3	0	0	21	0
	4	0	1	3	20

Chama a atenção que as matrizes de confusão dos dois modelos kNN, com e sem seleção de variáveis, tiveram exatamente os mesmos erros e de fato são matrizes de confusão idênticas. Para avaliar o método classificador foram calculadas as figuras de mérito da predição, que são entendidas como: Precisão (PRE), Sensibilidade (SEN), Taxa de Falsos Positivos (TFP) e Seletividade (SEL) (Tabela 12). Como as matrizes de confusão na predição dos dois modelos foram iguais, todas as figuras de mérito serão iguais para os dois modelos.

Tabela 12. Figuras de mérito (%) correspondentes a predição dos modelos kNN.

	PRE	SEN	TFP	SEL
1	100,00	100,00	0,00	100,00
2	94,79	95,83	5,56	94,44
3	96,88	87,50	0,00	100,00
4	91,67	83,33	5,56	94,44

Agora, realizando a classificação pelo método SIMCA, usando os mesmos conjuntos de calibração e predição mencionados anteriormente, obtiveram-se resultados da classificação muito satisfatórios. O modelo foi criado com 3 – 2 – 2 – 2 fatores para cada uma das classes correspondentes, obtendo na calibração a matriz de confusão apresentada na tabela 20. Chama a atenção que não houve nenhum erro de classificação na fase de calibração.

Aplicando o modelo anterior no conjunto de dados de predição, obteve-se a matriz de confusão apresentada na Tabela 13, na qual se evidenciam os erros de classificação. Acorde ao exposto anteriormente no método kNN, não houve nenhum erro de classificação para o primeiro tempo, no segundo tempo houve 2 amostras que não foram classificadas, no terceiro tempo houve 1 amostra que foi classificada erroneamente no quarto tempo e 3 não foram classificadas, e finalmente no quarto tempo houve 1 amostra que foi classificada erroneamente no segundo tempo e 2 amostras não foram classificadas.

Tabela 13. Matriz de confusão na predição do método SIMCA.

		CLASSE REAL			
CLASSE PREDITA		1	2	3	4
	1	24	0	0	0
	2	0	22	0	1
	3	0	0	20	0
	4	0	0	1	21
	NM	0	2	3	2

Partindo da matriz de confusão da predição foram calculadas as respectivas figuras de mérito para avaliar o modelo de classificação (Tabela 14). Comparando as figuras de mérito obtidas nos métodos de classificação supervisionada KNN e SIMCA, é possível afirmar que o melhor método de classificação de tempos de desenvolvimento fisiológico usando imagens espectrais é o método kNN pois ele apresenta melhores valores das figuras de mérito, sendo só superado pelo método SIMCA na seletividade e na taxa de falsos positivos (é de esperar-se pois no SIMCA ficaram amostras sem serem classificadas), sendo superior o modelo kNN em precisão, sensibilidade.

Tabela 14. Figuras de mérito da predição usando o método SIMCA.

	PRE	SEM	TFP	SEL
1	100,00	100,00	0,00	100,00
2	91,58	91,67	1,41	98,59
3	91,58	83,33	0,00	100,00
4	90,63	87,50	1,39	98,61

Para a classificação de variedades de cana-de-açúcar usando imagens de satélite (EO-1), têm se demonstrado o potencial usando análise de discriminante múltiplo (MDA), devido a sensibilidade de certos índices espectrais a mudanças no teor de clorofila, teor de água e lignocelulose (GALVAO, FORMAGGIO e TISOT, 2005). No trabalho de Galvão e colaboradores conseguiram discriminar cinco variedades de cana-de-açúcar brasileiras

usando principalmente as regiões espectrais de 983, 1205, 2103 e 2304 nm usando um limiar na região do NIR, obtendo 87,5% de precisão na classificação, e conforme o apresentado neste trabalho, explica-se que não tenha sido possível classificar as variedades aqui trabalhadas pois a região de discriminação está fora do espectro visível.

A influência da resolução espectral para a classificação de variedades brasileiras de cana-de-açúcar foi investigada no trabalho de Galvao, Formaggio e Tisot, (2007) onde reportaram que as bandas de refletância apropriadas para a discriminação de variedades são 651, 722, 813, 1084, 1124, 1649 e 2002 nm, onde se evidencia que no presente trabalho só duas dessas regiões foram abrangidas e as restantes não foram avaliadas, além disso no trabalho presente trabalhou-se com uma resolução espectral consideravelmente inferior à usada para a classificação das variedades, o qual demonstra uma clara influência no resultado da classificação, dessa forma se conclui que na região visível do espectro eletromagnético, com a resolução espectral trabalhada nas imagens, não é possível classificar as variedades de cana-de-açúcar aqui estudadas.

As técnicas de sensoriamento remoto têm sido amplamente usadas no campo agrícola devido a sua capacidade de monitorar o crescimento da cultura e estimar produtividades com certo grau de precisão (LIN, CHEN, *et al.*, 2009). Dados de sensoriamento remoto (Landsat-7, ETM+, ASTER e MODIS) têm sido implementados para discriminar variedades de cana-de-açúcar e estimar produtividades (ALMEIDA e ROSSETTO, 2006; FORTES e DEMATTE, 2006; XAVIER e RUDOREF, 2006). Embora todos os trabalhos encontrados na literatura trabalhem o enfoque do sensoriamento remoto para monitorar ou classificar o crescimento da cana-de-açúcar, os resultados promissórios de classificação para o tempo de desenvolvimento da cana-de-açúcar podem ser investigados para avaliar a correlação com variáveis biométricas do crescimento da cultura que a sua vez estão relacionadas aos métodos de estimação de produtividade.

Foi demonstrado que existe uma forte relação linear entre o Índice de Área Folhar (LAI pela sigla em inglês) e a altura da cana-de-açúcar, especificamente com valores de desvio padrão de 0,22 e $R^2 = 0,97$, implicando a possibilidade de predição do crescimento da cultura usando o índice de área folhar (LIN, CHEN, *et al.*, 2009). Baseados na relação linear encontrada, Lins e colaboradores propuseram um método para mapeamento do crescimento do cultivo usando a relação de polarização da imagem do ASAR para modelar o LAI e

mapear o crescimento com baixo erro (0, 15) e altos coeficientes de determinação (0,93). Esse método proposto depende totalmente do ENVISAT ASAR, o qual, quando trabalhando em casa de vegetação não vai ser aplicável pelo que se justifica um método alternativo para monitoramento do crescimento das mudas em casa de vegetação, como o apresentado no presente trabalho, o qual é baseado na resposta espectral da planta nas primeiras semanas de desenvolvimento fisiológico.

Quanto a classificação de plantas sob uma condição de estresse, Carter e Knapp, (2001) reportaram que a maior diferença em refletância se apresenta dentro da região espectral de 400 – 850 nm entre plantas sem e com estresse, com as maiores diferenças observadas ao redor dos 700 nm (695 – 725 nm). O anterior explica a possibilidade de classificação das plantas submetidas a condição de estresse hídrico na região espectral do espectro visível, além disso o reportado no presente trabalho é consequente com o trabalho de Carter e Knapp pois as respectivas mudanças na resposta espectral da planta no espectro verde – amarelo são explicadas pela tendência geral da condição de estresse em reduzir o teor de clorofila.

No estudo de Veysi, Naseri, *et al.* (2017), desenvolveram um novo índice de estresse hídrico do cultivo baseado em imagens de satélite (Landsat 8). Os autores usaram os dados térmicos infravermelhos para medir a temperatura do dossel e o teor de água na vegetação, obtendo coeficientes de determinação de 0,45 – 0,85 do índice da capacidade de estresse hídrico do cultivo e criaram uma classificação em função do estresse hídrico em função do índice.

Os valores anteriores de coeficiente de determinação, demonstraram uma grande dispersão e variação em função das características da imagem. Embora usam uma metodologia diferente a aqui apresentada, sendo baseada no infravermelho, os resultados da classificação apresentadas no presente trabalho apresentam uma melhor precisão do que os obtidos usando índices vegetativos, além de avaliar as figuras de mérito que acrescentam mais informação da classificação quanto ao custo do erro na classificação, sem ter que trabalhar em regiões fora da região visível do espectro eletromagnético e possibilitando a aplicação em casa de vegetação com sensoriamento proximal.

7. CONCLUSÕES

- O objetivo geral do trabalho foi alcançado e a hipótese comprovada, de forma que foi possível gerar um modelo preditivo dos teores das clorofilas em mudas de cana-de-açúcar com uma precisão (R^2) de 0,72 próxima à apresentada pelo método validador SPAD que apresentou precisão (R^2) de 0,77 e apresentando potencial de implementação com maior abrangência espacial, maior velocidade de medição e sentando bases para a automação da medição para dar sustento a tomada de decisão.
- Na região do espectro visível, em base à propriedade de absorbância, se obtém o melhor espectro de correlação com o teor de clorofila e consequentemente o melhor modelo preditivo dos pigmentos.
- Trabalhando com a resposta espectral na região do visível não é possível classificar as mudas de cana-de-açúcar das variedades IAC1099, IAC5000 e IAC 5094, nem as doses de fertirrigação.
- Com a implementação de métodos de classificação supervisionada em função da resposta espectral em absorbância na região do visível, é possível classificar as mudas de cana-de-açúcar nos tempos de desenvolvimento e na condição de estresse fisiológico, com precisão de 95,83%.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de aquisição das imagens espectrais é a base do estudo e dessa forma, a imagem consiste na matéria prima para o processamento e posterior análise multivariado para a predição, pelo que deve ser ressaltado que a qualidade das imagens deve ser a melhor pois a informação nela contida é determinante. Tomando em conta o anterior, deve ser encontrada uma forma de reduzir ao máximo a possibilidade de erro humano, o qual pode ser realizado apoiando-se em interfases de comunicação entre os componentes do sistema (Câmera, roda de filtros, sistema de iluminação) com o computador e implementando métodos de controle e automação no processo.

Testaram-se as técnicas de imageamento de refletância (usando também a transformação para análise de absorbância) e de fluorescência para, em base ao processamento digital das imagens, obter um modelo preditivo do teor de clorofila em mudas de cana-de-açúcar. As imagens de fluorescência, nas regiões de excitação aqui definidas (F405 e F470 nm), não se mostraram eficientes para este fim, embora existam vários métodos de mapeamento da clorofila a partir da propriedade de emissão de fluorescência (FLEXAS, ESCALONA, *et al.*, 2002; BARBAGALLO, KEVIN OXBOROUGH e BAKER, 2003; MOYA, CAMENEN, *et al.*, 2004; SOUKUPOVA, CSEFALVAY, *et al.*, 2008; ZARCO-TEJADA, BERNI, *et al.*, 2009; LYSENKO, VARDUNI, *et al.*, 2013).

Com o intuito de obter um modelo com maior capacidade preditiva, deve ser realizada a aquisição das imagens no menor tempo possível, pois na experimentação aqui apresentada, foi necessário de ao redor de 2 horas para completar a aquisição de todas as imagens, tempo no qual as clorofilas se irão degradando com a influência da luz de excitação à qual estarão sendo submetidas as amostras de folhas.

Para aprimorar a fase de processamento será necessário atingir melhores níveis de homogeneidade na iluminação do sistema, com uma iluminação homogênea na cena será possível parametrizar adequadamente a segmentação das imagens, otimizando assim o processamento das imagens e consequentemente o tratamento dos dados, além de obter melhores espectros de resposta.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, E. M.; AHMED, F. B.; BERG, M. V. Estimation of sugarcane leaf nitrogen concentration using in situ spectroscopy. **International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation**, 12S, 2010. S52-S57.

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2008. 244-248 p.

ALI, M. M. et al. A New Image Processing Based Technique to Determine Chlorophyll in Plants. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, p. 1323-1328, 10 dez. 2012.

ALMEIDA, T. I.; ROSSETTO, R. ASTER and Landsat ETM+ images applied to sugarcane yield forecast. **Int. J. Remote Sens**, 27, n. 19, 2006. 4057-4069.

ANATOLY, A.; GITELSON; MERZLYAK, M. N. Signature Analysis of Leaf Reflectance Spectra: Algorithm Development for Remote Sensing of Chlorophyll. **Journal of Plant Physiology**, 148, 1995. 494-500.

ARAÚJO, R. M. M. D. Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamentos – Aplicação em Variáveis de Educação e Renda no Estado de Pernambuco Principal Component Analysis and Cluster Analysis applied to Educational and Income Variables for the state of Pernambuco (BRAZIL). **exata**, v. 3, n. 1, 2010.

BARBAGALLO, R. P.; KEVIN OXBOROUGH, K. E. P.; BAKER, N. R. Rapid, Noninvasive Screening for Perturbations of Metabolism and Plant Growth Using Chlorophyll Fluorescence Imaging. **Plant physiology**, v. 132, n. 2, p. 485-493, Janeiro 2003.

BARRUETO CID, P. A propagação in vitro de plantas. O que é isso? **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 25, p. 1-6, 2000.

BASTIAANSEN, W. G. M.; MOLDEN, D. J.; MAKIM, I. W. Remote sensing for irrigated agriculture: examples from research and possible applications. **Agricultural Water Management**, v. 46, p. 137-155, 2000.

BEHMANN, J.; STEINRÜCKEN, J.; PLÜMER, L. Detection of early plant stress responses in hyperspectral images. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, Amsterdam, v. 93, p. 98-111, 2014.

BELASQUE, J.; GASPAROTO, M. G.; MARCASSA, L. G. Detection of mechanical and disease stresses in citrus plants by fluorescence spectroscopy. **Applied optics**, v. 47, n. 11, p. 1922-1926, 2008.

BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, 58, n. 15-16, 01 Dec 2007. 4019-4026.

BERNARDES, M. S. Fotossíntese no dossel das plantas cultivadas. In: CASTRO, P. R. C. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: POTAFOS, 1987. p. 13-48.

BLACKMER, T. M.; SCHEPERS, J. S. Techniques for monitoring crop nitrogen status in corn. **Plant Anal**, 25, 1994. 1791-1800.

BOARETTO, L. F. et al. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes, 74, 21 November 2014. 165-175.

BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R. et al. Chlorophyll Fluorescence as a Probe of the Photosynthetic Competence of Leaves in the Field: A Review of Current Instrumentation. **Functional Ecology**, v. 3, n. 4, p. 497-514, 1989.

BUSCHMANN, C.; LANGSDORF, H. K.; LICHTENTHALER, R. Imaging of the Blue, Green, and Red Fluorescence Emission of Plants: An Overview. **Photosynthetica**, v. 38, n. 4, p. 483–491, 2000.

CARTER, G. A.; KNAPP, A. K. Leaf optical properties in higher plants: Linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 677-684, 2001.

CASAGRANDE, A. A. **Tópicos de morfologia e fisiologia de cana-de-açúcar**. Jaboticabal: [s.n.], 1991. 157 p.

CASAS, A. et al. Estimation of water- related biochemical and biophysical vegetation properties using multitemporal airborne hyperspectral data and its comparison to MODIS spectral response. **Remote Sensing of Environment**, New York, v. 148, p. 28-41, 2014.

CASTRO, P. R. C.; CHRISTOFOLETTI, P. J. Fisiologia da cana- de-açúcar. In: MENDONÇA, A. F. **Cigarrinhas da cana-de- açúcar: controle biológico**. Maccio: Insecta, 2005. p. 3-48.

CECHIN, I. Photosynthesis and Chlorophyll Fluorescence in Two Hybrids of Sorghum under Different Nitrogen and Water Regimes. **Photosynthetica**, v. 35, n. 2, p. 233-240, 1998.

CEN, H.; HE, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 2, p. 7-83, 2007.

CEROVIC, Z. G. et al. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. **Agronomie**, Paris, 19, 1999. 543-558.

CHAERLE, L. et al. Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. **Journal of Experimental Botany**, 58, n. 4, 2006. 773-784.

CHAERLE, L.; VAN DER STRAETEN, D. Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. **Biochim Biophys Acta**, p. 153-166, 2001.

CHAPPELLE, E. W. et al. Laser-induced fluorescence of green plants. for the remote detection of plant stress and species differentiation. **Applied Optics**, v. 23, n. 1, p. 1-5, 1984.

CHAPPELLE, E. W.; KIM, M. S.; MCMURTREY, J. E. Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): An algorithm for the remote estimation of the concentrations of chlorophyll A, chlorophyll B, and the carotenoids in soybean leaves. **Remote Sensing of Environment**, v. 39, p. 239-247, 1992.

CHAVES, M.; MAROCO, J.; PEREIRA, J. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 239-264, 2003.

CHEN, Y. R.; CHAO, K.; KIM, M. S. Machine vision technology for agricultural applications. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 36, n. 2-3, p. 173-191, 2002.

CHENG, T. et al. Predicting leaf gravimetric water content from foliar reflectance across a range of plant species using continuous wavelet analysis. **Journal of Plant Physiology**, p. 1134-1142, 2012.

CHENG, T.; RIVARD, B.; SÁNCHEZ-AZOFEIFA, A. Spectroscopic determination of leaf water content using continuous wavelet analysis. **Remote Sensing of Environment**, New York, v. 115, n. 2, p. 659-670, Feb 2011.

CLEMENTS, H. F. **ugarcane crop logging and control: principles and practices**. Londres: Pitman Publishing, 1980. 520 p.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar. **Observatório Agrícola**, Brasília, v. 3, n. 4, p. 1-77, Abril 2017. ISSN 2318-7921.

COSTA, C. et al. Interrelationships of applied nitrogen, spad and yield of leafy and non-leafy maize genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, 8, 2001. 1173-1194.

DATT, B. A new reflectance index for remote sensing of chlorophyll content in higher plants: tests using Eucalyptus leaves. **Journal of Plant Physiology**, n. 154, 1999. 30-36.

DATT, B. Visible/near infrared reflectance and chlorophyll content in eucalyptus leaves. **Journal of Remote Sensing**, 20, 1999. 2741-2759.

DE OLIVEIRA, E. C. **Introdução à biologia vegetal**. 2. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

DHOPE, A. M.; MANUEL, L. M. **Principles and techniques for plants scientists**. 1. ed. Opdhpur: Updesh Purohit for Agribios (India), 2002. 373 p.

EATON-RYE, J. J.; TRIPATHY, B. C.; SHARKEY, T. D. **Advances in photosynthesis and respiration**. New York: Springer, v. 34, 2012. ISBN 978-94-007-1579-0.

ECARNOT, M.; COMPAN, F.; ROUMET, P. Assessing leaf nitrogen content and leaf mass per unit area of wheat in the field throughout plant cycle with a portable spectrometer. **Field Crops Research**, v. 140, p. 44-50, 2013.

ELMARSY, G. et al. Principles and applications of hyperspectral imaging in quality evaluation of agro-food products: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 52, n. 11, p. 999-1023, 2012. ISSN 10.1080/10408398.2010.543495.

EMBRAPA. **Fertirrigação em fruteiras tropicais**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura tropical, 2009. 180 p.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos, 1999. 412 p.

ENDO, T.; YASUOKA, Y.; TAMURA, M. **Spatial estimation of biochemical parameters of leaves with hyperspectral imager**. 22nd Asian Conference on Remote Sensing. Singapore: Centre of Remote Imaging, Sensing and Processing. 2001.

FAO. FAO Stats. **FAO**, maio 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 03 set. 2017.

FARIAS, C. et al. Índices de crescimento da cana-de-açúcar irrigada e de sequeiro no Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 4, p. 356-362, 2008.

FARIAS, C. H. D. A. et al. Índices de crescimento da cana-de-açúcar irrigada e de sequeiro no Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 12, n. 4, p. 356-362, 2008.

FENECH-LARIOS, L. et al. Relación entre un método no destructivo y uno de extracción destructivo, para medir el contenido de clorofila en hojas de plántula de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). **Universidad y Ciencia, topico humedo**, 25, n. 1, 2009. 99-102.

FERREIRA, M. C. **Quimiometria, Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas: Editora UNICAMP, 2015. 493 p.

FIELD, I.; PENUELAS, J. The Red Edge Position and Shape as Indicators of Plant Chlorophyll Content, Biomass and Hydric Status. **International Journal of Remote Sensing**, 15, 1994. 1459-1470.

FILHO, A. F. et al. **Simulação do desempenho de sistemas de irrigação por capilaridade na produção de porta-enxertos cítricos**. XL Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. Cuiabá: CONBEA. 2011. p. 5.

FLEXAS, J. et al. Steady- state chlorophyll fluorescence (Fs) measurements as a tool to follow variations of net CO₂ assimilation and stomatal conductance during water-stress in C-3 plants. **Physiologia Plantarum**, v. 114, n. 2, p. 231-240, 2002.

FORTES, C.; DEMATTE, J. A. Discrimination of sugarcane varieties using Landsat 7 ETM+ spectral data. **Int. J. Remote Sens**, 27, n. 7, 10 Apr 2006. 1395-1412.

FRAGA, E. F. **Considerações sobre o manejo de irrigação na produtividade e qualidade de gemas de cana-de-açúcar para viveiros de mudas-pré-brotadas (MPB)**. Piracicaba: Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2015. 111 p.

GADDANAKERI, S. A. .; D.P. BIRADAR, N. S. K.; NYAMGOUDA, V. B. Productivity and Economics of Sugarcane as Influenced by Leaf Colour Chart Based Nitrogen Management. **Agric. Sci**, Karnataka, v. 20, n. 3, p. 466-8, 2007.

GAIN. **Brazil Sugar Annual**. USDA Foreign Agricultural Service. [S.l.], p. 11. 2017. (BR17001).

GALVAO, L. S.; FORMAGGIO, A. R.; TISOT, D. A. Discrimination of sugarcane varieties in Southeastern Brazil with EO-1 Hyperion data. **Remote Sensing of Environment**, v. 94, p. 523-534, 2005.

GALVÃO, L. S.; FORMAGGIO, A. R.; TISOT, D. A. Discrimination of sugarcane varieties in Southeastern Brazil with EO-1 Hyperion data. **Remote Sensing of Environment**, v. 94, n. 4, p. 523-534, 28 fevereiro 2005.

GALVAO, L. S.; FORMAGGIO, A. R.; TISOT, D. A. The influence of spectral resolution on discriminating Brazilian sugarcane varieties. **International Journal of Remote Sensing**, 27, n. 4, 2007. 769-777.

GERALD, L. T. S.; LEE, L. L. Biofábrica e sua influência na produtividade de cana-de-açúcar. In: GERALD, L. T. S.; LEE, L. L. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas in vitro**. São Paulo: Antiqua, 2011. p. 118-130.

GEST, H. History of the word photosynthesis and evolution of its definition. **Photosynthesis Research**, v. 73, p. 7-10, 2002.

GODESBERG, B.-B. **Potential of fluorescence techniques with special reference to fluorescence lifetime determination for sensing and differentiating biotic and abiotic stresses in Triticum aestivum L.** [S.l.]: Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES) Fachbereich Pflanzen- und Gartenbauwissenschaften, 2010. 113 p.

GOMES, C. Cana-de-açúcar, Sistema Muda Conceito de Plantio. **Revista A LAVOURA**, n. 696, p. 38-39, 2013.

GOVINDJEE. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. **Australian Journal of Plant Physiology Botany**, 22, n. 2, 1995. 131-160.

GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y.; PATTANAYAK, A. K. Development of a digital image analysis method for real-time estimation of chlorophyll content in micropropagated potato plants. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 1, p. 91-97, 2013.

HANSEN, P.; SCHJOERRING, J. Reflectance measurement of canopy biomass and nitrogen status in wheat crops using normalized difference vegetation indices and partial least squares regression. **Remote Sensing of Environment**, New York, v. 86, p. 542-553, 2003.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **National Research Council of Canada**, Ontario, 1979.

INMAN-BAMBER, N. G. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. **Field Crops Research**, v. 89, p. 107-122, 2004.

INMAN-BAMBER, N.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Fields Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 185-202, 2005.

INTERNATIONAL ENERGY STATISTICS. **Fuel Ethanol Production 2014**. Renewable Fuels Association. [S.l.]. 2014.

ISLAM, Z. . B. B.; HOSSAIN, M. adoption of leaf color chart for nitrogen use efficiency in rice: Impact assesment of a farmer-participatory experiment in West Bengal. **Field Crops Research**, v. 103, p. 70-5, 2007.

JAIN, N. et al. Use of hyperspectral data to assess the effects of different nitrogen applications on a potato crop. **Precision Agriculture**, v. 8, p. 225-239, 2007.

JANGPROMMA, N. et al. Rapid Assesment of Chlorophyll Content in Sugarcane using a SPAD Chlorophyll Meter across Different Water Stress Conditions. **Asian Journal of Plant Sciences**, 2010.

JAY, S. et al. Retrieving LAI, chlorophyll and nitrogen contents in sugar beet crops from multi-angular optical remote sensing: Comparison of vegetation indices and PROSAIL inversion for field phenotyping. **Field Crops Research**, v. 210, p. 33-46, 2017.

JOHNSON, R. M. et al. Discrimination of sugarcane varieties with pigment profiles and high resolution, hyperspectral leaf reflectance data. **Journal Association Sugar Cane Technologists**, v. 28, p. 63-75, 2008.

KACIRA, M.; LING, P. P.; SHORT, T. H. Machine vision extracted plant movement for early detection of plant water stress. **Transactions of the ASAB**, v. 45, n. 4, p. 1147-1153, 2002.

KAWASHIMA, S.; NAKATANI, M. An Algorithm for Estimating Chlorophyll Content in Leaves Using a Video Camera. **Annals of Botany**, v. 81, p. 49-54, 1998.

KENDRICK, R. E.; KRONENBERG, G. H. **Photomorphogenesis in plants**. 2. ed. Wageningen: Kluwer academic publishers, 1994. ISBN 978-0-7923-2551-2.

KIM, Y. et al. Hyperspectral image analysis for water stress detection of apple trees. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 77, p. 155-160, 2011.

KIM, Y. et al. Hyperspectral image analysis for water stress detection of apple trees. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 77, p. 155-160, 2011.

KJAERGAARD, J. H. et al. Crop coefficients for winter wheat in a sub-humid climate regime. **Agricultural water management**, p. 918-924, 2008.

KURATA, K.; YAN, J. Water stress estimation of tomato canopy based on machine vision. **Acta Horticulturae**, v. 440, p. 389-394, 1996.

LANDELL, M. A. **Melhor manejo das variedades IAC e novos híbridos de alta performance**. 8º Grande encontro sobre variedades de cana. [S.l.]: Programa Cana IAC. 2014.

LANDELL, M. G. A. et al. **Variedades de cana-de-açúcar para o Centro-Sul do Brasil: 16a liberação do programa cana IAC (1959-2007)**. Campinas: Série Tecnologia APTA, Boletim técnico IAC, 201, 2007. 37 p.

LANDELL, M. G. et al. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Campinas: IAC, v. 109, 2012. 17 p.

LARCHER, W. Photosynthesis as a tool for indicating temperature stress events. In: E. D. SCHULZE, & M. M. C. **Ecophysiology of photosynthesis**. Berlin: Springer, 1994. p. 261-277.

LARCHER, W. **Plants Under Stress. Physiological Plant Ecology (4th ed.)**. New York: Berlin: Springer Verlag, 2003. 345-415 p.

LICHTENTHALER, H. K. The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics. **Photosynthetica**, v. 27, p. 45-55, 1992.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E., et al. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. [S.l.]: John Wiley and Sons, Inc., 2001.

LICHTENTHALER, H. K.; GITELSON, A. A.; LANG, M. M. Non-destructive determination of chlorophyll content of leaves of a green and an aurea mutant of tobacco by reflectance measurements. **Journal of Plant Physiology**, n. 148, 1996. 483-493.

LICHTENTHALER, H. K.; SCHWEIGER, J. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 152, n. 2, p. 272-282, 1998.

LIN, H. et al. Monitoring Sugarcane Growth Using ENVISAT ASAR Data. **IEEE TRANSACTIONS ON GEOSCIENCE AND REMOTE SENSING**, v. 47, n. 8, p. 2572-2580, 2009.

LINS, E. C. **Espectroscopia da fluorescência na citricultura**. São Carlos: Instituto de física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009. 116 p.

LINS, E. **Técnicas ópticas para a análise da manifestação do estresse hídrico em laranjeiras**. Pernambuco: Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, 2005.

LIU, B. et al. Combining spatial and spectral information to estimate chlorophyll contents of crop leaves with a field imaging spectroscopy system. **Precision Agriculture**, v. 18, n. 4, p. 491-506, 2016. ISSN DOI 10.1007/s11119-016-9466-5.

LUCCHESI, A. **Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar, seringueira, coqueiro, dendezeiro e oliveira**. Piracicaba: STAB, 2001. 138 p.

LYSENKO, V. S. et al. Plant chlorophyll fluorescence as an environmental stress characteristic: a theoretical basis of the method application. **Fundamental research**, v. 4, n. 1, p. 112-119, 2013.

MACCIONI, A.; AGATI, G.; MAZZINGHI, P. New vegetation indices for remote measurement of chlorophylls based on leaf directional reflectance spectra, 61, n. 1-2, 15 August 2001. 52-61.

MACHADO, R. S. et al. Respostas biométricas e fisiológicas ao deficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesq. agropec. bras**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1575-1582, 2009.

MAGRO, F. J. et al. **Biometria em cana-de-açúcar**. Piracicaba: Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

MAKI, M.; ISHIAHRA, M.; TAMURA, M. Estimation of leaf water status to monitor the risk of forest fires by using remotely sensed data. **emote Sensing of Environment**, v. 90, p. 441-450, 2004.

MALVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. **Agronômica Ceres**, São Paulo, p. 16-42, 130-140, 1980.

MARQUES, F. Vias para avançar como líder do etanol. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo, p. 20-25, julho 2008.

MASELLI, F. Monitoring forest conditions in a protected Mediterranean coastal area by the analysis of multiyear NDVI data. **Remote Sensing of Environment**, New York, v. 89, p. 423-433, 2004.

MERONI, M. et al. Assessing Steady-state Fluorescence and PRI from Hyperspectral Proximal Sensing as Early Indicators of Plant Stress: The Case of Ozone Exposure. **Sensors**, v. 8, p. 1740-1754, 2008.

MERONI, M. et al. Remote sensing of solar-induced chlorophyll fluorescence: Review of methods and applications. **Remote Sensing of Environment**, v. 113, n. 10, p. 2037-2051, 2009.

MILNER, L. **Water and fertilizers management in substrates**. INTERNATIONAL CONGRESS OF CITRUS NURSEYMEN. Ribeirão Preto: [s.n.]. 2001. p. 108-111.

MIRZAIE, M. et al. Comparative analysis of different uni- and multi-variate methods for estimation of vegetation water content using hyper-spectral measurements. **International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation**, v. 26, p. 1-11, 2014.

MIZUSHIMA, A.; LU, R. An Image Segmentation Method for Apple Sorting and Grading Using Support Vector Machine and Otsu's Method. **Comput. Electron. Agric.**, v. 94, p. 29-37, 2013.

MORALES, F.; ABADIA, A.; ABADIA, J. Photosynthesis, quenching of chlorophyll fluorescence and thermal energy dissipation in iron-deficient sugar beet leaves. **Plant Physiology**, v. 25, p. 403-412, 1998.

MORALES, F.; CEROVIC, Z. G.; MOYA, I. Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore of the epidermis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1273, n. 3, p. 251-262, 1996.

MOREIRA, M. **Fundamentos do sensoriamento remoto e metodologias de aplicação**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2011. 422 p.

MOYA, I. et al. A new instrument for passive remote sensing 1. Measurements of sunlight-induced chlorophyll fluorescence. **Remote Sensing of Environment**, v. 91, p. 186-197, 2004.

NYACHIRO, J. M. et al. Chlorophyll Content, Chlorophyll Fluorescence and water deficit in spring wheat. **Cereal Research Communications**, v. 29, n. 1-2, p. 135-142, 2001.

OPPELT, N.; MAUSER, W. Hyperspectral monitoring of physiological parameters of wheat during a vegetation period using AVIS data. **International Journal of Remote Sensing**, 25, 2004. 145-159.

PAPAGEORGIOU, G. C. . G. Govindjee Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. In: _____ **Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis**. Advances in Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Springer, v. 19, 2004. p. 1-42.

PATIL, S. B.; PATIL, S. S. Measurement of Sugarcane Leaf Chlorophyll. **International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management (IJAIEEM)**, 3, n. 2, Fevereiro 2014. 97-102.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropédica: EDUR, 2004. 191 p.

POLETTI TOLEDO, C. **Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de micropropagação de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011. 21 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola).

PONZONI, F.; SHIMABUKURO, Y.; KUPLICH, T. **Sensoriamento remoto da vegetação**. 2. ed. São Paulo: Parêntese, 2012. 176 p.

PROENÇA, E. R. **Caracterização da produção de Cana-de-açúcar e de inovações tecnológicas adotadas por usinas da regional de Andradina (SP)**. Ilha Solteira: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2008.

PU, R. et al. Spectral absorption features as indicators of water status in coast live oak (*Quercus agrifolia*) leaves. **International Journal of Remote Sensing**, v. 24, p. 1799-1810, 2003.

RAO, N. R. et al. Estimation of leaf total chlorophyll and nitrogen concentrations using hyperspectral satellite imagery. **Journal of Agricultural Science**, 146, 2008. 65-75.

RESH, H. M. **Hydroponic Food Production**. Mahwah: NewConcept Press, 2001.

REZENDE, R. S.; ANDRADE JÚNIOR, A. S. Irrigação. **Agencia embrapa**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_56_711200516718.html>. Acesso em: 01 abr. 2016.

RFA. Industry Statistics. **World Fuel Ethanol Production**, 2018. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099103927-61e598f7-7643>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

RICCARDI, M. et al. Non-destructive evaluation of chlorophyll content in quinoa and amaranth leaves by simple and multiple regression analysis of RGB image components. **Photosynthesis Research**, v. 120, p. 263–272, Janeiro 2014.

RIGON, J. P. G. et al. A novel method for the estimation of soybean chlorophyll content using a smartphone and image analysis. **PHOTOSYNTHETICA**, v. 54, n. 4, p. 559-566, 2016.

RODRIGUES, F. H. L. **Manejo de uma mesa de subirrigação na produção de Mudanças Pré-Brotadas de cana-de-açúcar**. Campinas: UNICAMP, 2016.

ROQUE, M. W. et al. Correlação linear e espacial entre a resistência do solo ao penetrômetro e a produtividade do feijoeiro irrigado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1827-1835, 2008.

ROQUE, M. W. et al. Correlação Linear e Espacial entre a Resistência do Solo ao Penetrômetro e a Produtividade do Feijoeiro Irrigado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1827-1835, 2008.

SALA, F.; BOLDEA, M.; GERGEN. SPECTRAL IMAGING IN THE EVALUATION OF THE CHLOROPHYLL CONTENT IN WHEAT. **Research Journal of Agricultural Science**, v. 45, n. 2, p. 259-267, 2013.

SANKARAN, S. et al. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 72, n. 1, p. 1-13, 2010.

SAWHNEY, V.; SINGH, D. Effect of chemical desiccation at the post-anthesis stage on some physiological and biochemical changes on the flag leaf of contrasting wheat genotypes. **Field Crops Research**, v. 77, n. 1, p. 1-6, 2002.

SCANAVINI, J. G. V. **Estratégias de irrigação para viveiros de cana-de-açúcar com mudas provenientes de micropropagação (Biofábrica)**. Piracicaba: Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2014. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências.

SCHAEFER, S. Fotossíntese, 2011. Disponível em: <http://www.biologiados.com.br/botanica/fisiologia_vegetal/fotossintese.htm>. Acesso em: 18 fev. 2017.

SCHAEPMAN, M. E. Spectrodirectional remote sensing: From pixels to processes. **International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation**, v. 9, n. 2, p. 204-223, 2007.

SCHEPERS, J. S. et al. Transmittance and reflectance measurements of corn leaves from plants with different nitrogen and water supply. **Journal of Plant Physiology**, n. 148, 1996. 523-529.

SCHLEMMER, M. R. et al. Remotely Measuring Chlorophyll Content in Corn Leaves with Differing Nitrogen Levels and Relative Water Content. **American Society of Agronomy**, v. 97, n. 1, p. 106-112, 2005.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: E. D. SCHULZE, & M. M. C. **Ecophysiology of photosynthesis Ecological Studies**. Berlin: Springer, 1994. p. 49-70.

SEGINER, I. . E. R. T. . G. J. W. . R. M. W. Plant wilt detection by computer-vision tracking of leaf tips. **Transactions of the ASABE**, v. 35, n. 5, p. 1563-1567, 1992.

SIDKO, A. F. et al. Estimation of chlorophyll content and yield of wheat crops from reflectance spectra obtained by ground-based remote measurements. **Field Crops Research**, 207, 2017. 24-29.

SILVA, A. L. C. D.; COSTA, W. A. J. M. Varietal variation in growth, physiology and yield of sugarcane under two contrasting water regimes. **Tropical Agricultural Research**, v. 16, p. 1-12, 2004.

SILVA, M. D. A. et al. Pigmentos fotossintéticos e índice spad como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Boisience Journal**, Uberlandia, 30, n. 1, Jan-Feb 2014. 173-181.

SILVA, M. D. A. et al. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane, 05 December 2007. ISSN 1677-9452.

SILVA, T. G. et al. Requerimento hídrico e coeficiente de cultura da cana-de-açúcar irrigada no semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 1, p. 64-71, 20 nov. 2012.

SIMS, D. A.; GAMON, J. A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v. 81, n. 2-3, p. 337-354, 2002. ISSN 10.1016/S0034-4257(02)00010-X.

SINGELS, A.; DONALDSON, R. A.; SMIT, M. A. Improving biomass production and partitioning in sugarcane: theory and practice. **Field Crops Research**, v. 92, n. 2-3, p. 291-303, June 2005. ISSN <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.01.022>.

SINGELS, A.; DONALDSON, R.; SMIT, M. Improving biomass production and partitioning in sugarcane: theory and practice. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 291-303, 2005.

SOUKUPOVA, J. et al. Annual variation of the steady-state chlorophyll fluorescence emission of evergreen plants in temperate zone. **Remote Sensing of Environment**, v. 113, p. 1262-1275, 2008.

SOUKUPOVA, J. et al. Plant response to destruxins visualized by imaging of chlorophyll fluorescence. **Physiologia Plantarum**, 118, n. 3, 17 June 2003. 399-405.

STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 784-755, 2005.

SU, C. H. et al. Simultaneous estimation of chlorophyll a and lipid contents in microalgae by three color analysis. **Biotechnol. Bioeng**, v. 99, p. 1034-1039, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 917 p.

TEIXEIRA, S. L. **Cultura de tecidos Vegetais**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2001. 53 p.

TERENCIO, J. C. C. **Deteção precoce da morte súbita dos citros usando fluorescência**. [S.l.]: Universidade de São Paulo, 2006.

TERENCIO, J. C. C. **Detecção precoce da morte súbita dos citros usando fluorescência**. São Carlos: Instituto de química de São Carlos, 2006.

TERENCIO, J. C. **Detecção precoce da morte súbita dos citros usando fluorescência**. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, 2006. 106 p.

TININI, R. **Avaliação não destrutiva de sólidos solúveis por meio de imagens espectrais de uvas submetidas à desidratação parcial**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia Agrícola, 2015. 135 p.

ULLAH, S. et al. Retrieval of leaf water content spanning the visible to thermal infrared spectra. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, Amsterdam, 93, July 2014. 56-64.

VAUGHAN, P.; CHUVIECO, E.; ZARCO-TEJADA, P. J. Estimation of fuel moisture content by inversion of radiative transfer models to simulate equivalent water thickness and dry matter content: analysis at leaf and canopy level. **IEEE Geoscience and Remote Sensing Society**, p. 819-826, 2005.

VEYSI, S. et al. A satellite based crop water stress index for irrigation scheduling insugarcane fields. **Agricultural Water Management**, v. 189, p. 70-86, 2017.

WANG, Y. et al. Estimating rice chlorophyll content and leaf nitrogen concentration with a digital still color camera under natural light. **Plant Methods**, v. 10, n. 36, p. 1-11, 2014.

WETTERICH, C. **Uso de imagens de fluorescência para monitoramento da evolução do cancro cítrico**. São Carlos: Instituto de física de São Carlos, 2012.

WU, D.; SUN, D.-W. Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review — Part II: Applications. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 15-28, 2013.

WU, Q. et al. Study on the optimal algorithm prediction of corn leaf component information based on hyperspectral imaging. **Infrared Physics and technology**, v. 78, p. 66-71, 2016. ISSN dx.doi.org/10.1016/j.infrared.2016.07.011.

XAVIER, A.; RUDOREF, B. F. Multi-temporal analysis of MODIS data to classify sugarcane crop. **Int. J. Remote Sens**, 27, n. 4, Feb 2006. 755-768.

XAVIER, M. A. et al. **Fatores de Desuniformidade e Kit de Pré-Brotação IAC para Sistema de Multiplicação de Cana-de-Açúcar – Mudanças Pré-Brotadas (MPB)**. Campinas: Documentos IAC, v. 113, 2014.

XIAOBO, Z. et al. In vivo noninvasive detection of chlorophyll distribution in cucumber (*Cucumis sativus*) leaves by indices based on hyperspectral imaging. **Analytica Chimica Acta**, n. 706, p. 105-112, 2011. ISSN 10.1016/j.aca.2011.08.026.

XUE, L.; YANG, L. Deriving leaf chlorophyll content of green-leafy vegetables from hyperspectral reflectance. **Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, n. 64, p. 97-106, 2009.

YADAV, S. P.; IBARAKI, Y.; GUPTA, S. D. Estimation of the chlorophyll content of micropropagated potato plants using RGB based image analysis. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 100, p. 183-188, 2010.

YODER, B. J.; PETTIGREW-CROSBY, R. E. Predicting Nitrogen and Chlorophyll Content and Concentrations from Reflectance Spectra (400-2500 nm) at Leaf Canopy Scales, v. 53, p. 199-211, 1995. ISSN 0034-4257.

ZARCO-TEJADA, P. J. et al. Imaging chlorophyll fluorescence with an airborne narrow-band multispectral camera for vegetation stress detection. **Remote Sensing of Environment**, v. 113, p. 1262-1275, 2009.

ZARCO-TEJADA, P. J. et al. Vegetation Stress Detection through Chlorophyll a b Estimation and Fluorescence Effects on Hyperspectral Imagery. **J. Environ. Qua**, 31, 2002. 1433-1441.

ZHANG, B. et al. Principles, developments and applications of computer vision for external quality inspection of fruits and vegetables: A review. **Food Research International**, v. 62, p. 326-343, 2014.

ZHAO, D.; GLAZ, B.; COMSTOCK, J. C. Sugarcane Response to Water-Deficit Stress during Early Growth on Organic and Sand Soils. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 403-414, 2010.

ZINGARETTI, S. M. et al. Sugarcane responses at water deficit conditions. In: ISMAIL, M.; MOFIZUR, R. **Waterr Stress**. [S.l.]: InTech, 2012. p. 255-277. available from: <http://www.intechopen.com/books/water-stress/sugarcane-responses-at-water-deficit-conditions->.

ZULETA BONILLA, M. M. **Dados hiperespectrais na determinação do conteúdo relativo de água na folha em cana-de-açúcar**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2015. 87 p.

ZYNGIELBAUM, A. I. et al. Non-destructive detection of water stress and estimation of relative water content in maize. **Geophysical Research Letters**, New Jersey, v. 36, n. 12, p. 1-4, 2009.