



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0819792-0 B1



(22) Data do Depósito: 08/10/2008

(45) Data de Concessão: 01/10/2019

(54) Título: MÉTODO PARA CERTIFICAÇÃO DE MUDAS DE CITROS

(51) Int.Cl.: G06Q 50/02.

(73) Titular(es): EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA.

(72) Inventor(es): DÉBORA MARCONDES BASTOS PEREIRA MILORI; LADISLAU MARTIN NETO; EDNALDO JOSÉ FERREIRA.

(57) Resumo: EQUIPAMENTO, MÉTODO E SISTEMA PARA CERTIFICAÇÃO DE MUDAS DE CITROS - A presente invenção compreende um equipamento para identificar variedades de copas e porta-enxertos ser diretamente utilizado em campo. A identificação é realizada por meio da análise do espectro de fluorescência de pigmentos fotossintéticos principais (clorofila-a e clorofila-b) e acessórios das folhas das árvores de maneira rápida, de baixo custo e, principalmente, não-invasiva. Outra concretização da presente invenção é um método para identificação de variedades de citros, bem como um método para certificar mudas de citros no que se refere à variedade da copa e do porta-enxerto. A invenção compreende, ainda, um sistema para identificação e certificação de mudas de citros utilizando espectroscopia de emissão de fluorescência e inteligência artificial através da associação do equipamento e do método da presente invenção.

“MÉTODO PARA CERTIFICAÇÃO DE MUDAS DE CITROS”

CAMPO DA INVENÇÃO

[01] A presente invenção refere-se a um método para identificação das diversas variedades de árvores cítricas, tanto das copas quanto dos porta-enxertos, por meio da análise dos espectros de fluorescência obtidos a partir de suas folhas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

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

[03] Os citros são as frutas mais produzidas no mundo, representando 24% da produção total, índice que supera as culturas de uva, banana e maçã. Em nível mundial, oito em cada dez copos de suco de laranja produzidos são de procedência brasileira. Somente o Estado de São Paulo é responsável por 98% do montante de suco concentrado para exportação. Esse mercado possui também elevada importância sócio-econômica, pois as atividades relacionadas à cadeia produtiva dos citros empregam cerca de 400 mil pessoas só no Estado de São Paulo, direta ou indiretamente.

[04] O Brasil é também o maior exportador mundial de suco de laranja concentrado congelado, com 74,6% das vendas no comércio internacional, sendo 95% produzido pelo Estado de São Paulo. Esses índices garantem o 1º lugar na produção mundial com 49,3% do total de suco de laranja produzido, seguido pelos Estados Unidos da América com 37,6%. Entretanto, os EUA consomem praticamente toda a sua produção, tendo uma participação de apenas 3,1% nas transações internacionais.

[05] A projeção realizada para a produção de laranja até 2009 no Estado de São Paulo permeia os 346 milhões de caixas que não é significativamente diferente do recorde de 368 milhões de caixas atingido em 2002. Isso demonstra uma estagnação do crescimento da produção de laranja, que está associada principalmente com os problemas de sanidade e do manejo adequado dos pomares citrícolas. O controle de doenças antigas, como o cancro, CVC, Pinta Preta e a Gomose e de doenças recentes, como a Morte Súbita dos Citros (MSC) e o Greening, é um desafio enorme para os produtores e cooperativas justamente pela carência de sistemas rápidos e precisos de diagnóstico. De maneira similar, o problema se estende para a certificação de produção de mudas.

[06] A muda cítrica é o insumo mais importante na implantação do pomar, sendo constituída por duas partes: o porta-enxerto e a copa. O procedimento correto é a produção de mudas com borbulhas para copa e sementes para o porta-enxerto provenientes de matrizes comprovadamente sadias, todavia não há condições para um controle completo. Excetuando o Estado de São Paulo, em nenhum outro estado brasileiro há uma busca por normas técnicas visando proteger as mudas eficientemente quanto à contaminação por doenças e prover a certificação para produção. Tipicamente, cabe ao viveiro uma parcela de responsabilidade na produção das mudas e na certificação das mesmas. Trata-se, portanto, de um mecanismo unidirecional no qual viveiristas provêm a certificação com base na procedência da muda (semente e borbulha) e citricultores acatam-a sem uma prévia comprovação. Agrega-se a esse mecanismo erros de certificação de várias naturezas e, geralmente, o citricultor é o maior prejudicado de toda cadeia produtiva.

[07] A certificação da variedade dos citros em viveiros é especialmente importante, assim como o porta-enxerto, pois induz a variedade da copa alterações no seu crescimento, tamanho, precocidade de produção, produtividade, época de maturação e massa dos frutos, permanência dos frutos nas plantas, conservação da fruta após a

colheita, transpiração das folhas, fertilidade do pólen, composição química das folhas, capacidade de absorção, síntese e utilização de nutrientes, tolerância e salinidade, resistência à seca e ao frio, resistência e tolerância a pragas e doenças e resposta à produção de abscisão. Usualmente, a fim de ampliar a faixa de colheita e promover a adequação às variações climáticas, pratica-se o plantio de diferentes variedades de plantas com diferentes épocas de maturação (precoces, de meia-estação e tardias). O parque citrícola brasileiro utiliza principalmente as variedades: Pêra-Rio, Valência, Natal, Hamlin, Bahia ou Baianinha. No entanto, essa prática tem impacto direto nos custos de produção devido ao aumento da mão-de-obra, à necessidade de tratamentos diferenciados, intervenção constante para controle de pragas, manejo do solo, diversidade de defensivos agrícolas, irrigação e outros.

[08] Atualmente não existem métodos ou equipamentos para certificação das variedades das mudas de citros ou da saúde das mesmas. O produtor ao adquirir mudas enxertadas confia na informação de seu fornecedor quanto à natureza das plantas que está adquirindo. Tendo em vista que a escolha das copas e porta-enxertos apropriados é um fator decisivo para a obtenção de uma boa safra, pelas razões expostas anteriormente, a garantia de aquisição das plantas corretas torna-se um requisito fundamental.

[09] A Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo instituiu normas, estabelecidas no Programa de Matrizes do Estado de São Paulo, para a produção de mudas de citros certificadas. Segundo as normas, o controle de qualidade genética e sanitária das mudas é rigoroso, feito sobre o material de propagação, plantas matrizes fornecedoras das sementes dos porta-enxertos e borbulheiras. Uma vez seguidas as normas, o viveirista ou produtor pode ter suas próprias matrizes e borbulheiras. As normas não se restringem ao controle de origem e proteção dos viveiros com tela para evitar infestações, deve haver também acompanhamento contínuo, vistorias e amostragens para análise em laboratório, para garantia da qualidade genética e

sanitária das mudas (CARVALHO et al., Produção de borbulha básica para formação de mudas de citros sadias em São Paulo, http://revistalaranja.centrodecitricultura.br/2001/v22_n1/v22_n1_p185.pdf; Chat técnico sobre certificação de mudas de citros, http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=8985). No entanto, e na prática, a consolidação deste método de certificação baseia-se principalmente na qualidade sanitária das mudas, cabendo ao produtor de mudas a confiabilidade pela qualidade genética. Isto se deve ao fato da dificuldade de distinção laboratorial dos cultivares, como exemplificado pela técnica de polimorfismo enzimático, que não consegue distinguir entre laranjas doces (*Citrus cinensis*) quanto as variedades Hamlin, Natal, Valência, Pineapple, Rubi e Moro (Sawasaki et al., **Bragantia**, Campinas, 51(2), 121-128, 1992).

[010] A busca por novas técnicas capazes de realizar a certificação de mudas de forma rápida, precisa e economicamente viável tem sido intensa, e passa por métodos físicos, como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, e vai até a genotipagem (PRESTES, R. A. ; COLNAGO, L. A. ; CARRILHO, E. ; WULFF, N. A. . Diagnóstico da Morte Súbita dos Citros através da ressonância magnética nuclear de baixo campo e quimiometria. In: IX Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, 2006. Resumo da IX Jornada Brasileira de Ressonancia Magnética).

[011] A espectroscopia de fluorescência é uma técnica de grande potencial para ser aplicada em estudos de tecidos biológicos e, nesta patente, utilizada como uma ferramenta para a certificação de mudas.

[012] Atualmente, a espectroscopia de fluorescência vem sendo amplamente aplicada na medicina para diagnóstico de doenças, como é o caso da biópsia óptica (R. A Zângaro, L. Silveira Jr., R. Manoharan, G. Zonios, I. Itzkan, R. Dasari, J. Van Dam, M; Feld, "Rapid multi-excitation fluorescence spectroscopy system for in vivo tissue diagnosis", *Applied Optics*, Vol. 35 (25), 1996).

[013] O documento US20030023386 refere-se a uma metodologia que inclui uso de cromatografia ou espectroscopia e processamento dos dados por redes neurais para estudo de resposta a agentes estressantes, como pesticidas, inseticidas e fungicidas, ou por modificações genéticas, com aplicação para plantas, animais e microrganismos. Esta tecnologia visa mapear alterações nas concentrações metabólicas induzidas uma vez estabelecido o agente estressante, contudo sua aplicação é limitada a condições de laboratório altamente controladas, e preferencialmente, emprega a espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

[014] O método e equipamento descrito no documento WO2004026022 clama identificar a qualidade de material vegetal, no que se refere a saúde de plantas, condições de crescimento ou grau de estresse, assim como distinguir as diferentes partes de um mesmo material vegetal, via a análise de fluorescência dos pigmentos fotossintéticos clorofila-*a* e clorofila-*b* e obtenção da razão de eficiência fotossintética pela transferência de fótons entre estes pigmentos. De maneira similar, o documento US20060102851 apresenta método e equipamento para avaliar a eficiência quântica da fotossíntese, remetendo à “saúde” do material vegetal, bem como classifica e auxilia na separação de diferentes partes componentes de um mesmo vegetal. No entanto, estas tecnologias não têm emprego ampliado à distinção entre materiais vegetais de espécies ou variedades diferentes. Além disso, estas são exclusivamente voltadas para a leitura de emissão de clorofilas *a* e *b*, e, portanto, não analisam a emissão de fluorescência de outros pigmentos acessórios ao processo fotossintético, importantes ferramentas à distinção sutil deste tipo de propriedade óptica.

[015] Para aplicação na citricultura, o documento PI05059757-7 demonstra um método óptico para detecção da Morte Súbita dos Citros (“Método e equipamento para detecção de morte súbita dos citros (MSC)” - Inventores: Débora M. B. P. Milori, Ladislau Martin Neto, Jean C. C. Terêncio, Lúcio A. de C. Jorge, André Torre

Neto). O preceito básico deste documento é que a MSC acarreta alterações em diversos compostos orgânicos fluorescentes das folhas, como por exemplo, as concentrações de clorofila *a*, clorofila *b*, e β -caroteno (Figura 1). Como a espectroscopia de fluorescência é uma técnica extremamente sensível, as pequenas alterações químicas podem ser detectadas diretamente nas folhas de plantas. A metodologia referente a este documento é feita em duas etapas distintas, sendo a primeira em campo e a segunda em laboratório. A etapa de campo consiste na triagem inicial de plantas com suspeita de MSC ou Declínio, por meio da captação da fluorescência de folhas em câmera do tipo CCD (Charged Coupled Device) após excitação por fonte de luz e análise do resultado em programa de computador, que classifica os pixels das imagens com uso de rede neural na composição de cores RGB (vermelho, verde, azul), distinguindo plantas sadias (fluorescem no vermelho) de plantas doentes (fluorescem no amarelo). Posteriormente, a segunda etapa é realizada, em laboratório, para a confirmação de MSC. A confirmação é feita com análise do espectro de fluorescência, por avaliação de razão de picos de intensidade de fluorescência, compondo índices baseados em comprimentos de onda específicos, desenvolvidos para detecção desta doença. No entanto, os índices e programas de computador desenvolvidos para a aplicação desta metodologia limitam-se à distinção de folhas sadias e doentes, assim como detecção/confirmação de MSC via índices em porta-enxertos e folhas.

[016] Diferentes variedades de citros podem possuir sutis diferenças nas propriedades ópticas das folhas. O método proposto na presente invenção consiste em adquirir o espectro de fluorescência de folhas de mudas de citros e detectar estas diferenças entre as variedades (codificadas no espectro) e por meio de análise de componentes principais aplicada ao espectro de emissão de fluorescência, aliada a um comitê de redes neurais artificiais, estabelecer um classificador para as diferentes variedades.

[017] Sendo assim, o método proposto na presente invenção consiste em um sistema compacto e portátil, que possibilita uma avaliação direta, no campo, de forma rápida e eficiente da qualidade de mudas de citros. O presente sistema incorpora um miniespectrômetro de fluorescência, cabos ópticos para leitura direta na folha dos citros, um programa de computador e um banco de dados que implementa um classificador baseado em um comitê de redes neurais para identificação da variedade.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[018] A presente invenção vem mostrar que laranjeiras e outras plantas cítricas podem ser identificadas e distinguidas umas das outras quanto às variedades de sua copa e do porta-enxerto por meio de metodologia que utiliza espectroscopia de fluorescência e algoritmos de aprendizado de máquina. A identificação é realizada por meio da análise do espectro de fluorescência de pigmentos fotossintéticos principais (clorofila-*a* e clorofila-*b*) e acessórios das folhas das árvores de maneira rápida, de baixo custo e, principalmente, não-invasiva.

[019] A presente invenção faz uso de um equipamento portátil para identificar variedades de copas e porta-enxertos, podendo ser diretamente utilizado em campo. Todos os componentes do equipamento estão abaixo descritos e são comercialmente disponíveis, o que permite a montagem e reprodução do mesmo para um especialista. O referido equipamento compreende um cabo óptico de excitação, um filtro óptico ajustável, um acoplador de fibra óptica, um cabo óptico misto, uma sonda, um cabo óptico de emissão, um miniespectrômetro, um computador portátil acoplado e nele um programa processador de dados. O referido equipamento é caracterizado por apresentar uma fonte laser com comprimento de onda de excitação variando de 200 a 800 nm, preferencialmente em 561nm. O equipamento apresenta ainda uma capacidade de coleta de espectro de emissão entre 545-1100 nm, sendo utilizada preferencialmente a faixa de leitura entre 660 a 800 nm para a composição da matriz de dados.

[020] Uma concretização da presente invenção é um método para identificação de variedades de citros caracterizado por compreender os seguintes estágios:

- a) Extrair da planta algumas folhas;
- b) Obter o espectro de fluorescência a partir dessas folhas;
- c) Calcular as seis primeiras componentes principais do espectro, usando para cada uma delas uma fórmula previamente determinada segundo as mudanças de coordenadas requeridas pelo método estatístico Principal Component Analysis (PCA);
- d) Aplicar às componentes principais encontradas o programa classificador, baseado em comparações feitas por redes neurais, que determinam a variedade de copa e porta-enxerto da planta em questão com uso de mudas já identificadas; e
- e) Gerar um laudo e inserir a informação no banco de dados.

[021] Uma concretização adicional da presente invenção refere-se a um método de certificação de mudas de citros (copa e porta-enxerto) usando um equipamento portátil dedicado caracterizado por compreender os seguintes estágios:

- a) Analisar de forma não invasiva as folhas ou porta-enxerto de mudas de citros;
- b) Obter o espectro de fluorescência a partir das mudas;
- c) Calcular as seis primeiras componentes principais do espectro, usando para cada uma delas uma fórmula previamente determinada segundo as mudanças de coordenadas requeridas pelo método estatístico Principal Component Analysis (PCA);
- d) Aplicar às componentes principais encontradas o programa classificador, baseado em comparações feitas por redes neurais, que determinam a variedade de copa e porta-enxerto da planta em questão, mediante calibração prévia do método com mudas já identificadas; e

- e) Gerar um laudo e inserir a informação no banco de dados, retroalimentando a base de dados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[022] A citricultura paulista é pioneira na adoção de normas técnicas e/ou procedimentos para controle de doenças e certificação de mudas. No entanto, essas normas e procedimentos são dotados de mecanismos limitados para certificação da qualidade da produção no que tange às variedades comercializadas, sejam de copas ou de porta-enxertos. É esse o problema que esta invenção se propõe a resolver. A presente invenção se baseia na espectroscopia de fluorescência, que vem sendo amplamente utilizada pelo comprovado potencial para análise de substâncias orgânicas, em muitos casos sem prévio tratamento químico, pelo custo reduzido e pela rapidez com que os resultados são obtidos. Exemplos de substâncias químicas fluorescentes presentes nas folhas são: clorofila a; clorofila b; β -caroteno.

[023] Estudos experimentais preliminares demonstraram que é possível distinguir as variedades a partir dos espectros de fluorescência das folhas, cujas características estão associadas às propriedades químicas das mesmas. A superfície da folha é iluminada por um laser de comprimento de onda de 561nm e o espectro de fluorescência é obtido por meio de um espectrômetro que opera na faixa de 545 a 1100nm. A classificação de cada espectro é feita utilizando-se a faixa de comprimento de onda entre 660 nm e 800 nm, e segue critérios matemáticos e estatísticos bem definidos, os quais são efetivamente determinados por meios computacionais, construídos segundo medições experimentais já realizadas.

[024] O procedimento de aquisição e classificação do espectro obtido, como parte da calibração da metodologia frente às distintas espécies de porta-enxertos e copas de citros, é realizado em três etapas por um programa de computador desenvolvido

especialmente para esse fim. As etapas são: aquisição, cálculo das componentes principais e a classificação do espectro.

[025] De forma semelhante à metodologia descrita em PI05059757-7, a presente metodologia envolve a emissão de fluorescência de pigmentos fotossintéticos principais e acessórios para compor a análise de dados. No entanto, a primeira usa de passo inicial de triagem por análise de imagem da fluorescência em câmara do tipo CCD e distinção de plantas sadias e doentes por rede neural aplicada aos pixels da imagem; a confirmação da presença de MSC em plantas doentes é então feita com equipamento espectrômetro de fluorescência, usando-se comprimento de onda de excitação entre 572 a 578 nm, preferencialmente, 576 nm, e análise de índices a partir da razão de picos de intensidade de emissão em comprimentos de onda específicos (I1, 629 nm e 823 nm; I2, 735 nm e 688 nm) para a detecção da doença MSC.

[026] A presente invenção apresenta um novo método para certificação de mudas, que compreende o uso de um equipamento portátil para ser levado a campo para realização de medidas espectroscópicas características do método. O equipamento portátil utilizado para realização de medidas espectroscópicas compreende os seguintes componentes: 1 – laser ou led; 2- cabo óptico de excitação; 3 – filtro óptico ajustável; 4 – acoplador de fibra óptica; 5 – cabo óptico misto; 6 – sonda; 7 – folha a ser analisada; 8 – cabo óptico de emissão; 9 – miniespectrômetro; 10 – computador portátil para aquisição de dados com programa de computador classificador; 11 – corte transversal do cabo óptico misto; 12 – fibras ópticas de excitação; 13 – fibra óptica para coletar emissão.

[027] A fonte de excitação de fluorescência utilizada pelo equipamento pode ser lâmpada, led ou laser.

[028] A presente invenção é distinta e suplanta os inconvenientes da BR PI05059757-7, pois a excitação ocorre entre 200 a 800 nm, preferencialmente em 561 nm, todo o espectro de emissão entre 545-1100 nm é coletado, e selecionada a faixa

de leitura de intensidade de fluorescência entre 660 nm a 800 nm para compor a matriz de dados. A presente invenção também difere no uso de redes neurais como classificador de resultados, usada após o tratamento estatístico por análise dos componentes principais a partir do espectro de emissão para certificar as espécies de citros, ao contrário da PI05059757-7, onde a rede neural é aplicada como classificador para distinguir imagens captadas por CCD na fase de triagem de plantas saudáveis ou doentes.

[029] A tabela 1, mostrada logo abaixo, apresenta uma comparação de metodologia e equipamentos usados no pedido PI05059757-7 e a presente invenção.

Tabela 1. Comparação entre PI 05059757-7 e a presente invenção.

PI05059757-7 (i). O equipamento portátil descrito na PI05059757-7 descreve um miniespectrômetro com comprimentos de onda de excitação entre 572-578nm	Esta invenção (i). No equipamento portátil descrito no presente pedido, o miniespectrômetro utilizado atua no comprimento de onda de excitação de 561nm, ou seja, é um componente diferente do pedido anterior que torna esta capaz de diferenciar as espécies de citros.
(ii). A metodologia da PI 05059797-7 consiste em duas etapas: primeiro faz-se necessário a aquisição das imagens, e após diagnosticar as plantas doentes é feito uma segunda etapa que consiste na análise espectroscópica.	(ii). A metodologia do presente pedido consiste em apenas uma etapa, onde a espectroscopia é utilizada.
(iii). O resultado espectroscópico da metodologia da PI mencionada acima é obtido por razão entre máximos de picos e depois por inteligência artificial.	(iii). O resultado do presente pedido analisa o espectro como um todo por PCA e depois por inteligência artificial.

[030] A redução da dimensionalidade do espaço de cada espectro é outro fator fundamental para a análise e para o algoritmo que gera o classificador baseado em comitês de redes neurais. Por isso, a análise de componentes principais (PCA, do inglês Principal Component Analysis) é utilizada. A PCA gera um novo espaço, fundamentado nos espectros previamente obtidos para um conjunto de amostras estatisticamente significativo. Em essência, esse método toma as variáveis que

caracterizam uma amostra qualquer e efetua uma mudança para um sistema de coordenadas que atende certos requisitos matemáticos que o torna mais propício a evidenciar a distinção entre os diversos tipos de amostras. No domínio em questão, as amostras são os espectros obtidos de uma ampla variedade de folhas de diversas espécies.

[031] O novo sistema de coordenadas é uma base de dimensão reduzida, na qual os dados espectrais podem ser projetados. Trata-se de um sistema ortonormal, e sua base é composta pelos autovetores da matriz de covariância do conjunto de dados analisado. Um sistema de coordenadas com essas propriedades usualmente concentra quase toda a variância dos dados em umas poucas coordenadas, e isso torna possível reduzir drasticamente a quantidade de variáveis analisadas sem qualquer prejuízo significativo à validade dos resultados. As coordenadas são denominadas “componentes principais” e apresentam-se ordenadas segundo a proporção da variância abrangida por cada uma.

[032] A transformação para o espaço reduzido das componentes principais é realizada com base em um conjunto de dados das variedades estatisticamente representativo. Essa transformação guarda as relações matemáticas entre o espaço espectral e o espaço das componentes principais. Assim, novos espectros são simplesmente projetados no espaço das componentes principais, por meio da aplicação da transformação.

[033] O espaço abrangendo cerca de 95% da variabilidade total dos dados foi adotado como ideal na presente invenção. Assim, o subespaço das componentes principais é composto por apenas 6 componentes, utilizadas como atributos para o classificador.

[034] O classificador é constituído por um comitê de 30 redes neurais artificiais do tipo Perceptron de múltiplas camadas (MLP, do inglês MultiLayer Perceptron) treinadas pelo algoritmo de retropropagação de erros (back-propagation). A

integração das redes é realizada por meio do voto majoritário, ou seja, a classe mais predita entre as MLPs é definida como a predição do comitê. O algoritmo para construção do comitê utilizado é o Bagging (Breiman L. Bagging predictors. Machine Learning. 24(2):123-140. 1996). Esse algoritmo é um método de “bootstrap” que treina cada classificador base (MLP) com uma partição diferente do conjunto de dados usado para treinamento. Cada MLP é então treinada por um conjunto de instâncias aleatoriamente amostradas do conjunto de dados de treinamento, que consiste em um banco de dados. Essas amostras provocam diversidade de predição entre os classificadores, um requisito fundamental para a construção de comitês acurados. Bagging é aplicado sobre os dados transformados para o subespaço definido pelas 6 componentes principais. Assim, o classificador final baseado em comitê de MLPs está pronto para ser utilizado na classificação das variedades.

[035] As medições espectroscópicas com o uso do equipamento portátil se dá da seguinte forma: um laser, led ou outra fonte de luz excita a amostra no comprimento de onda de 561 nm, no caso a folha da laranjeira, que vai emitir fluorescência devido aos seus pigmentos; a luz é conduzida da fonte até a amostra por um conjunto de seis fibras ópticas dispostas simetricamente em relação à sétima; esta cumpre a função de captar a luz fluorescente emitida pela amostra excitada e enviá-la a um miniespectrômetro, o qual mede a intensidade em cada região do espectro; antes de chegar ao miniespectrômetro, porém, a luz atravessa um filtro óptico ajustável (ao qual a fibra é ligada por um acoplador apropriado), que retém a luz meramente refletida, deixando passar apenas a fluorescência da amostra; os dados do miniespectrômetro são, por sua vez, coletados e convertidos numa tabela por um computador portátil no qual se encontra instalado o programa acima descrito, procedendo então ao tratamento dos dados obtidos.

[036] Esse equipamento foi previamente usado no laboratório para aquisição dos dados, possibilitando assim o estudo das propriedades ópticas das diversas variedades

de citros e o estabelecimento de critérios de diferenciação entre elas. Desta forma, foi feita a calibração do sistema, construindo-se uma consistente base de dados incremental, que confere suporte e confiabilidade para análise comparativa e avaliação da qualidade de variedades de citros, permitindo a certificação de mudas de citros. O mesmo equipamento é usado para a realização de medidas em campo, fornecendo os resultados poucos segundos após a medição, o que constitui a concretização final desta invenção.

EXEMPLO

[037] Foi realizado um minucioso estudo utilizando espectroscopia de fluorescência em folhas saudáveis para calibração do sistema. Foram utilizados dois conjuntos de amostras. O primeiro com folhas de seis variedades de copa em porta-enxerto Cleópatra e o segundo com quatro variedades de copa em porta-enxerto Cravo. As medições do espectro de fluorescência foram efetuadas rigorosamente de acordo com o procedimento descrito na seção anterior. Utilizou-se uma fonte de luz monocromática de comprimento de onda de 561nm.

[038] Embora exista, para cada conjunto de amostras, uma variabilidade considerável na forma dos espectros, o que dificulta a análise comparativa precisa baseada meramente no exame visual dos mesmos, é possível perceber a existência de importantes tendências à diferenciação entre quatro conjuntos.

[039] Observou-se que o método é altamente eficiente na distinção e classificação das variedades, tanto para as copas quanto para os porta-enxertos. Treinando o comitê de redes neurais artificiais como classificador de variedades, o sistema foi capaz de reconhecer as variedades e os porta-enxertos com acerto superior a 90%.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para identificação de variedades de citros caracterizado por compreender os seguintes estágios:

- a) extrair da planta algumas folhas;
- b) obter o espectro de fluorescência a partir dessas folhas;
- c) calcular as seis primeiras componentes principais do espectro, usando para cada uma delas uma fórmula previamente determinada segundo as mudanças de coordenadas requeridas pelo método estatístico Principal Component Analysis (PCA);
- d) aplicar o programa classificador às componentes principais encontradas, baseado em comparações feitas por redes neurais, determinando a variedade de copa e porta-enxerto da planta em questão com uso de mudas já identificadas; e
- e) gerar um laudo e inserir a informação no banco de dados.

2. Método de certificação de mudas de citros caracterizado por compreender os seguintes estágios:

- a) utilizar um equipamento portátil compreendendo um cabo óptico de excitação, uma fonte de excitação de fluorescência, um filtro óptico, um acoplador de fibra óptica, um cabo óptico misto, uma sonda, um cabo óptico de emissão, um miniespectrômetro e um computador acoplado;
- b) analisar de forma não invasiva as folhas ou porta-enxerto de mudas de citros;
- c) obter o espectro de fluorescência a partir das mudas;
- d) calcular as seis primeiras componentes principais do espectro, usando para cada uma delas uma fórmula previamente determinada segundo as mudanças de coordenadas requeridas pelo método estatístico Principal Component Analysis (PCA);
- e) aplicar às componentes principais encontradas o programa classificador, baseado em comparações feitas por redes neurais, determinando a variedade de copa e porta-enxerto da planta em

questão, mediante calibração prévia do método com mudas já identificadas;

f) gerar um laudo e inserir a informação no banco de dados, retroalimentando a base.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que a fonte de excitação de fluorescência pode ser lâmpada, led ou laser.
4. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que a fonte de excitação de fluorescência emite radiação em comprimento de onda variando de 200 a 800 nm, preferencialmente de 561 nm.
5. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que a luz de excitação é conduzida até a folha através de fibra óptica.
6. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que a coleta do sinal é feita através de fibra óptica.
7. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que o sinal difratado é detectado por miniespectrômetro.
8. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que o sinal é difratado por grade de difração.
9. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que o sinal é detectado por arranjo de fotodiodos calibrados.
10. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que a calibração prévia é feita utilizando análise de componentes principais e algoritmos de aprendizado de máquina (redes neurais) nas leituras do espectro de emissão entre 660 e 800 nm.
11. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que a calibração é realizada sobre intensidades ou descritores (índices) espectrais.
12. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que as variações nos espectros de fluorescência são alterações na composição química de constituintes das plantas.

13. Método de acordo com a reivindicação 12 caracterizado pelo fato de que os referidos constituintes são fluorescentes.
14. Método de acordo com a reivindicação 13 caracterizado pelo fato de que os referidos constituintes fluorescentes são pigmentos fotossintéticos da planta.
15. Método de acordo com a reivindicação 14 caracterizado pelo fato de que os referidos constituintes fluorescentes são, principalmente, as clorofilas *a* e *b*, e alguns pigmentos acessórios, tais como carotenos e xantofilas.
16. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que as folhas fluorescem em comprimentos de onda entre 660 e 800 nm.
17. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que o comprimento de onda preferencial para certificação de mudas é de 561 nm.
18. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado por certificar mudas de citros no que se refere à variedade da copa e do porta-enxerto.
19. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que utiliza um programa de computador classificador dedicado ao sistema.