

---

# ÁREA DO LIMBO FOLIAR DE DIFERENTES PLANTAS ESTIMADA POR MEDIDAS LINEARES E MATÉRIA SECA, CALIBRADAS COM O SOFTWARE IMAGEJ

---

Fabricio Tomaz Ramos, Lucas de Souza Ferreira, Fernando Pivetta e João Carlos de Souza Maia

## RESUMO

Grande parte da matéria seca acumulada pelas plantas advém da fotossíntese nas folhas. Por isso, a análise do crescimento foliar é útil para o estudo vegetal sob diferentes condições edafoclimáticas. A área foliar pode ser estimada por diferentes métodos e equipamentos, alguns onerosos e demorados, inviáveis para as condições comuns de pesquisas. Entretanto, podem existir alternativas econômicas e rápidas por meio do uso de softwares processadores de imagens, gratuitos ou não. Diante disso, objetivou-se estimar a área do limbo foliar de diferentes plantas baseando-se em medidas lineares e de massa seca, calibradas com o software gratuito 'ImageJ'. As folhas das plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L) cultivar IMACD 6001, cajueiro (*Anacardium occidentale* L) cultivar FAGA 10, soja (*Glycine max* L) cultivar

M-SOY 7639RR, e milho (*Zea mays* L) cultivar Penta TL foram coletadas no terço inferior, médio e superior em diferentes fases fenológicas. Verificou-se que se pode usar imagens com resolução de no mínimo 7,2 megapixels para estimar a área real do limbo foliar, e processadas no software ImageJ com até 324cm<sup>2</sup> de área. Para superfícies maiores, recomendam-se testes com câmera de resolução superior ou que a folha, de dimensões maiores, seja recortada em pedaços de até 324cm<sup>2</sup>. Observou-se elevada explicação na estimativa da área do limbo foliar baseando-se em medidas lineares e de massa seca, logo recomenda-se estimar a área foliar de folhas com limbos danificados ou de várias amostras de folhas coletadas à campo com base na massa seca das folhas, por ser operacionalmente viável.

## Introdução

O termo 'crescimento' de plantas distingue acréscimo de tamanho e, ou massa, registrado ao longo do ciclo fenológico, e tem caráter quantitativo. Já o termo 'desenvolvimento' é mais abrangente e envolve todas as mudanças qualitativas (diferenciação) e quantitativas (crescimento) experimentadas pela planta (Cairo *et al.*, 2008). Por isso, é mais fácil analisar dados de crescimento, sobretudo de folhas. Uma folha completa apresenta as seguintes estruturas: limbo, pecíolo ou bainha, e um par de apêndices foliares chamados estípulas na base do pecíolo (Vidal e Vidal, 2007). Em maior proporção, tem-se que o acúmulo de biomassa vegetal acumulada pelas plantas, resulta da

atividade fotossintética, principalmente no limbo foliar e o restante advém da absorção de nutrientes minerais do solo, sendo este um fator incentivador para se estimar a área foliar de uma planta (Kerbauy, 2012).

Diante disso, a estimativa da área foliar pode ser realizada por meio de diferentes métodos, divididos em destrutivos e não destrutivos, os quais na maioria dos estudos são utilizados para estimar o crescimento da planta ou do órgão de interesse, seja causa de variações de plantas geneticamente diferentes ou de plantas que crescem em ambientes diferentes (Martin *et al.*, 2013). Entretanto, a escolha do método dependerá do objetivo e cronograma do pesquisador, da disponibilidade de plantas, mão-de-obra e

equipamentos, pois quando se planeja uma maior frequência de coleta de material vegetal é inviável, por exemplo, analisar a área foliar de cada folha de um volume grande de amostras. Assim, estimar a área foliar baseando-se em medições rápidas pode ser muito eficaz em agilizar o processamento das amostras (Cairo *et al.*, 2008).

Medições rápidas podem ser realizadas precisamente por equipamentos denominados 'integradores de área foliar', tidos como método padrão, mas por serem de custo elevado ainda são inviáveis para as condições comuns de pesquisas (Martin *et al.*, 2013). Em substituição, tem-se utilizado diferentes softwares, licenciados e gratuitos, para estimar a área foliar por meio do processamento da imagem digital da

folha da planta (Adami *et al.*, 2008; Embrapa, 2014; SigmaScan, 2014). Dentre os softwares gratuitos, o *Image Processing and Analysis In Java* (ImageJ, 2014), é usado em várias áreas do conhecimento e em análises muito complexas (Laurecen e Chromy, 2010). Embora pouco utilizado no Brasil tem-se encontrado resultados satisfatórios para ser usado em substituição ao método do integrador de área foliar (LI3100 LICOR) (Martin *et al.*, 2013).

Diante disso, objetivou-se neste trabalho estimar a área do limbo foliar de plantas de algodão, caju, soja e milho, baseando-se em medidas lineares e de massa seca, por meio da calibração prévia das imagens digitais dos limbos de diferentes tamanhos no software 'Image J'.

---

## PALAVRAS CHAVE / Algodão / Área Foliar / Caju / Milho / Software Image J / Soja /

Recebido: 12/09/2014. Modificado: 16/07/2015. Aceito: 17/07/2015.

**Fabricio Tomaz Ramos.** Agrônomo, Mestre e Doutorando em Agricultura Tropical, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Brasil. e-mail: fabriciotomazramos@gmail.com

**Lucas de Souza Ferreira.** Engenheiro Agrônomo e Mestre em Ambientes e Sistemas de Produção Agrícolas, Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil. e-mail: lucas-jna@hotmail.com

**Fernando Pivetta.** Engenheiro Agrônomo e Mestre em Agricultura Tropical, UFMT, Brasil. e-mail: nand\_ao@hotmail.com

**João Carlos de Souza Maia.** Engenheiro Agrônomo e Doutor

em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Brasil. Professor, Faculdade de Agronomia, UFMT, Brasil. e-mail: jotace@terra.com.br

## LEAF BLADE AREA OF DIFFERENT PLANTS ESTIMATED BY LINEAR AND DRY MATTER MEASURES, CALIBRATED WITH THE IMAGEJ SOFTWARE

Fabricio Tomaz Ramos, Lucas de Souza Ferreira, Fernando Pivetta and João Carlos de Souza Maia

### SUMMARY

Much of dry matter accumulation by plants comes from photosynthesis in the leaves. Therefore, analysis of leaf growth is useful for plant study under different climatic and soil conditions. Leaf area can be estimated with different methods and equipments, some of which are costly and time consuming, ineffective for common research conditions. However, there can be alternatives, economic and fast, through the use of imaging software, free or licensed. Thus, we aimed to estimate the area of the leaf blade of different plants based on linear and dry weight measures, calibrated with the free software ImageJ. The leaves of cotton plants (*Gossypium hirsutum* L) var. IMACD 6001, cashew (*Anacardium occidentale* L) var. FAGA 10, soybean (*Glycine max* L) var. M-SOY

7639RR, and corn (*Zea mays* L) var. Penta TL were collected from the lower third, middle and top in different phenological phases. It was found that images with a resolution of at least 7.2 megapixels can be used to estimate the actual leaf blade area, processed with the ImageJ software till 324cm<sup>2</sup>. For larger surfaces, we recommend testing with higher resolution camera, or cut a large sheet into pieces up to 324cm<sup>2</sup>. We observed a good agreement in the estimation of the leaf blade area based on linear and dry mass measures and, therefore, it is recommended to estimate leaf area leaves with damaged pieces or measures from several samples of leaves collected at the field based on the dry weight of the leaves, as it is operationally viable.

## ÁREA DE LA LÁMINA FOLIAR DE DIFERENTES PLANTAS POR ESTIMACIÓN LINEAL Y MATERIA SECA, AJUSTADAS POR EL SOFTWARE IMAGEJ

Fabricio Tomaz Ramos, Lucas de Souza Ferreira, Fernando Pivetta y João Carlos de Souza Maia

### RESUMEN

Gran parte de la acumulación de materia seca en plantas proviene de la fotosíntesis foliar. El análisis del crecimiento de las hojas es útil para el estudio de los vegetales bajo diferentes condiciones edafoclimáticas. El área de la hoja puede estimarse por diferentes métodos y aparatos, algunos costosos y cuyo funcionamiento requiere tiempo, lo cual los hacen ineficientes para las condiciones comunes de investigación. Sin embargo, el uso de algunos softwares procesadores de imágenes, libres o no, puede ser una alternativa más económica y rápida para una adecuada determinación del área foliar. El objetivo del presente trabajo fue estimar la superficie de la lámina foliar de diferentes plantas por medidas lineales y materia seca, ajustadas por el software libre 'ImageJ'. Para eso fueron recolectadas hojas

del tercio superior, medio y inferior, en distintas fases fenológicas, de plantas de algodón (*Gossypium hirsutum* L) cultivar IMACD 6001, marañón (*Anacardium occidentale* L), variedad FAGA 10, de soja (*Glycine max* L) cultivar M-SOY 7639RR, y maíz (*Zea mays* L) cultivar Penta TL. El software ImageJ puede ser utilizado para estimar área foliar con superficie inferior a 324cm<sup>2</sup> e imágenes con resolución mínima de 7,2 megapíxeles. Para mayores superficies se recomienda usar imágenes de mejor resolución, o el fraccionamiento de las hojas en trozos de hasta 324cm<sup>2</sup>. La estimación del área de la lámina foliar por medición lineal y materia seca fue eficiente, por lo tanto para determinaciones de láminas dañadas o un gran número de muestras se recomienda el empleo de la materia seca.

### Material e Métodos

As folhas de diferentes espécies de plantas foram coletadas no terço inferior, médio e superior em diferentes tamanhos, idades fenológicas e fases fenológicas das plantas. Elas foram amostradas no período de 05/11/2013 a 10/06/2014.

As espécies de plantas e seus respectivos históricos foram:

i- Algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L) cultivar IMACD 6001, retiradas de uma unidade experimental de 0,16ha, cultivado em espaçamento 0,90m entre linhas e 12 plantas por metro linear, em latitude de 15°48'10''S, longitude de 54°26'47''O e altitude de

435m, em NEOSSOLO QUARTZARÊNICO Distrófico, relevo plano (Embrapa, 2006). Descontou-se 3,6m de bordadura e, a amostragem consistiu na retirada ao acaso de 32 folhas.

ii- Cajueiro (*Anacardium occidentale* L) cultivar FAGA 10, apanhadas de uma unidade experimental de 0,324ha com cajueiros adultos. Os cajueiros foram plantados em 2003, quando ainda eram mudas, no espaçamento de 7,5x8,0m, a 15°47'11''S e 56°04'47''O, altitude de 140m, em um NEOSSOLO QUARTZARÊNICO Órtico éutrico, A moderado, fase cerrado, relevo plano (Embrapa, 2006). Selecionaram-se três plantas

centrais e a amostragem consistiu na retirada ao acaso de 35 folhas.

iii- Soja (*Glycine max* L) cultivar M-SOY 7639RR, apanhadas de uma unidade experimental de 10ha, cultivado em espaçamento de 0,45m entre linhas e média de 10 plantas por metro linear, a 14°07'40,7''S e 56°58'39,59''O e altitude de 539m, em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, relevo suave ondulado (Embrapa, 2006). Descontou-se 10m de bordadura e, a amostragem consistiu na retirada, ao acaso de 25 folhas.

iv- Milho (*Zea Mays* L) cultivar Penta TL, apanhadas de

uma unidade experimental de 10ha, cultivado em espaçamento de 0,45m entre linhas e média de três plantas por metro linear, a 14°07'40,7''S, 56°58'39,59''O e altitude de 539m, em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, relevo suave ondulado (Embrapa, 2006). Descontou-se 10m de bordadura e, a amostragem consistiu na retirada, ao acaso de 28 folhas.

Em função do murchamento, as folhas eram arrancadas na ordem de uma por vez, fotografadas imediatamente, para posteriormente obter as medidas lineares (comprimento e largura) e de área foliar, utilizando o software (Figura 1). Os detalhes da

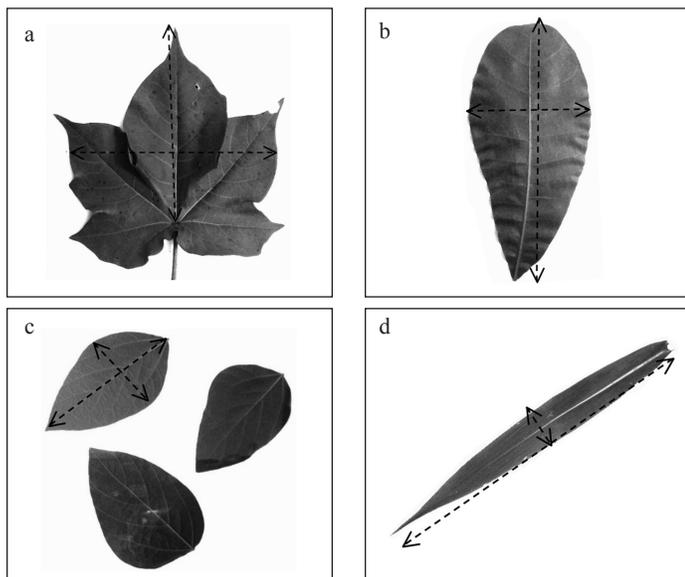


Figura 1. Imagens digitais de limbos foliares em cor cinza de plantas de: algodão (a), caju (b), soja (c) e milho (d). Obs. A medida de comprimento foi realizada paralelo ao sentido da nervura principal.

obtenção das fotografias à campo são descritos as seguir.

Para determinar a área real do limbo foliar das diferentes plantas, inicialmente as imagens foram obtidas via máquina fotográfica digital (Sony DSC-W110) utilizando resolução de 7,2 megapixels, sem o uso do *flash* para evitar reflexos, a uma distância perpendicular de ~0,30m. Para isso, fez-se o uso de uma prancheta, uma folha A4 branca com escala desenhada de 2cm, além de um plástico rígido de acrílico transparente para prensar a folha com a face superior sobre o papel. As imagens foram obtidas sob iluminação solar, e em seguida transferidas para o computador. Posteriormente, as imagens foram processadas utilizando-se o software de domínio público, denominado 'ImageJ' (ImageJ, 2014; Figura 2). A seguir tem-se a ordem sequencial das análises.

i- Abriu-se a imagem pelo programa: *File > Open* e definiu-se o que medir (*Analyze > Set Measurements > Area > Ok*).

ii- Definiu-se a escala, clicando no ícone *Magnifying glass* para aproximar da escala desenhada (botão esquerdo do *mouse*) na folha A4 e, em seguida a sublinhou, selecionando o ícone *Straight*. Depois,

clicando no ícone *Magnifying glass* para reduzir o *zoom* (botão direito do *mouse*) registrou-se a escala em: *Analyze > Set scale > Know distance = 2 > Unit of length = cm*, que foi a unidade de medida adotada.

iii- Eliminou-se o que não era folha, selecionando o ícone *Freehand selections* para contorná-la e, depois em *Edit > Clear outside* retirou-se a bordadura.

iv- Converteu-se a imagem em tons de cinza: *Image > Type > 8 bit*. Depois a segmentou em cor preto e branco em: *Image > Adjust > Threshold > Apply*. Nesse processo de segmentação é importante haver contraste entre o fundo (papel A4) e a folha, pois pode acontecer de regiões da folha não serem contabilizadas. Isso acontece geralmente por causa de reflexos, pouco contraste e, ou nervuras foliares claras. Se isso acontecer é necessário contornar as regiões com *Paintbrush Tool* e depois preencher com *Flood Fill Tool*. Além disso, pode haver pontuações brancas no interior das imagens, mas desde que não seja devido à ação de doenças e insetos, pode-se eliminá-las em: *Process > Binary > Fill holes*. Caso essas correções sejam necessárias é necessário realizar novamente a segmentação (*Image > Adjust > Threshold > Apply*).

v- Por fim, obtiveram-se os resultados de área foliar em: *Analyze > Analyze particles > Summarize > OK*. Na obtenção de imagem com várias folhas, é possível realizar uma única análise e conhecer a medida de área de cada folha selecionando: *Show > Outlines* em: *Analyze > Analyze particles* e *OK*.

Posteriormente, obteve-se a imagens segmentadas (preto e branco) dos limbos foliares das plantas, com exceção da soja, que devido à ondulosidade no interior e nas bordas dos limbos, observou-se que foi necessário recortá-los para evitar sobreposição, e consequentemente, erros de medidas, durante a prensagem para a obtenção das fotografias no campo (Figura 3).

Em substituição aos 'aparelhos integradores de área foliar', para calibrar e validar o programa 'ImageJ', que estimou a área de limbo foliar das folhas, inseriu-se no Microsoft Word em: inserir > formas, quadrados preenchidos de cor verde padrão, simulando a cor natural das folhas, com lados conhecidos (1, 2, 3, ..., 18cm), ou seja, com área de 1, 4, 9, 16, 25, 36,

49, 64, 100, 121, 144, 169, 196, 225, 256, 289 e 324cm<sup>2</sup>, respectivamente. Assim como no campo, a uma distância de ~0,30m, fotografou-se cada quadrado impresso, um por vez, mantendo o plástico rígido transparente para prensar o papel na prancheta. Posteriormente, as imagens foram processadas no ImageJ para comparar com a área real dos quadrados do Microsoft Word e, assim, validar o método para as folhas.

Todos os dados apresentaram homoscedasticidade pelo teste de Levene e normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ao nível de 5% de probabilidade (SigmaPlot, 2014). Em seguida, fez-se o ajuste dos pares de dados obtidos pela área estimada com o ImageJ por meio da foto digital dos quadrados vs área real dos quadrados (Microsoft Word-MW). Como o ajuste anterior foi validado, isto é, de que a área estimada pelo ImageJ é a mesma dos quadrados do Microsoft Word, a área real das folhas foi determinada a partir de então por este software. Diante disso, comparou-se a área 'real' dos limbos foliares das plantas

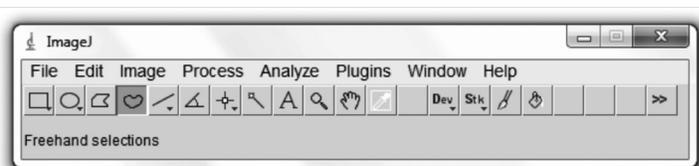


Figura 2. Menu do programa computacional *Image Processing and Analyze In Java* (Image J, 2014).

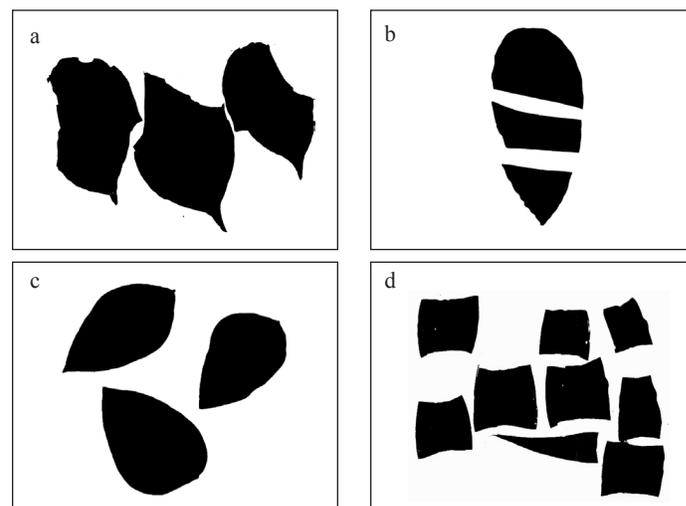


Figura 3. Imagens de limbos foliares recortadas e segmentadas em preto e branco no 'ImageJ' de plantas de: algodão (a), caju (b), soja (c) e milho (d).

estimada via ImageJ com: i) a área estimada por medidas lineares (comprimento vezes largura); e ii) com a massa seca do limbo foliar das plantas, na tentativa de estimar a área do limbo foliar.

Todas as comparações foram ajustadas por meio de regressão, conforme o modelo polinomial linear crescente ( $y_i = y_0 + bx + e_i$ ), em que  $y_0$  e  $b$  foram os coeficientes estimados, sendo  $e_i$  o erro de estimativa. A acurácia do ajuste foi avaliada pela significância dos coeficientes  $a$  e  $b$ ; pelos coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) e determinístico ( $R^2$ ), além do erro padrão da estimativa do ajuste, em que valores próximos de 1 e 0 são os desejados, respectivamente (Larson e Farber, 2010). Para avaliar se o erro padrão da estimativa do modelo estatístico poderia comprometer o uso dos valores oriundos da estimativa da área do limbo foliar pela massa seca, considerando as culturas de soja e milho avaliadas e no mesmo talhão de cultivo, coletou-se mais de 50 plantas em diferentes estádios e distribuídas no espaço para comparar o desvio padrão do ajuste com o intervalo de confiança da média ( $\alpha = 0,05$ ) da área foliar por estádios. Além disso, como o coeficiente de correlação ' $r$ ', na maioria dos casos, não avaliam concordância e sim associação, a equivalência entre a área estimada com o ImageJ por meio da foto digital dos quadrados vs área real dos quadrados (Microsoft Word-MW) foi avaliada pelo índice de concordância de Willmott e pelo índice de desempenho de Carmargo e Sentelhas (1997); e o limite de concordância proposto por Bland e Altman (1986).

## Resultados e Discussão

Na Tabela I são apresentados os resultados, e na Figura 4a, o gráfico que confronta os pares de dados ajustados entre área estimada usando o ImageJ versus área real dos quadrados do Microsoft Word, de modo a averiguar se as duas medidas são equivalentes e se o primeiro poderia substituir o segundo, ou

TABELA I  
RESULTADOS OBTIDOS NO AJUSTE DOS PARES DE DADOS  
ENTRE ÁREA ESTIMADA VIA IMAGEJ vs ÁREA REAL DOS QUADRADOS

Intercepto	Coefficiente	N	r	R <sup>2</sup>	d	c	Prob. Fc>Ft <sup>1</sup>	EPE
$y_0$	$a$							
0,009 ±0,299***	1,023 ±0,002***	25	0,999	0,998	0,999	0,999	<0,0001	0,832

Utilizou-se o modelo linear (AIJ=  $y_0+b.AMW$ ), em que: AIJ: área estimada via ImageJ, AMW: área real dos quadrados (Microsoft Word) e  $y_0$  e  $a$ : coeficientes estimados; N: número de pares de dados usados para ajustar o modelo; r: coeficiente de correlação de Pearson ( $p < 0,0001$ ); R<sup>2</sup>: coeficiente determinístico; d: índice de concordância de Willmott; c: índice de desempenho de Carmargo-Sentelhas; EPE: erro padrão da estimativa ( $\alpha = 0,05$ ).

<sup>1</sup> Probabilidade pelo teste de Tukey.  
\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) significativo pelo teste t.

seja, se existe ou não concordância. Observa-se com base no coeficiente determinístico (R<sup>2</sup>) que a imagem obtida via câmera fotográfica digital e posteriormente processada no ImageJ explicou 99,99% da variação da área real dos quadrados, no intervalo de 1 a 324cm<sup>2</sup>, com um erro padrão médio de estimativa de apenas 0,8320cm<sup>2</sup>.

Além disso, embora o grau de correlação não avalie concordância e sim associação de casos bem distintos, no presente trabalho, esse índice foi confiável, pois o coeficiente angular foi próximo a 1 e o intercepto igual à 0, condizente com a reta da igualdade (1:1) (Figura 4a). De modo a corroborar, averiguou-se a concordância pelo método de Willmott ( $d$ ), no qual quanto mais próximo de 1, mais forte (ou perfeita) é a concordância entre os métodos, e obteve-se o valor  $d = 0,999$  que reflete uma perfeita concordância e, quando multiplicado pelo coeficiente de correlação para encontrar o índice de desempenho de Carmargo-Sentelhas ( $c = r \cdot d$ ), o mesmo foi classificado como 'ótimo' ( $c \geq 0,85$ ) (Tabela I). Esse resultado da comparação do ImageJ com quadrados do Microsoft Word foi melhor até mesmo que as comparações obtidas pelo integrador de área foliar obtidas por Martin *et al.* (2013), o que descarta a necessidade do uso desse equipamento para realizar a calibração de um software.

No entanto, verificou-se certa tendência da diferença entre os dois métodos em aumentar o erro de estimativa, à medida que aumentava a área dos quadrados (Figura 4b), e isso auxilia no entendimento da superestimação dos valores a partir

de 200cm<sup>2</sup> (Figura 4a), porque o comportamento esperado é uma distribuição aleatória das diferenças em torno da média dos métodos. A vantagem do método de Bland-Altman em complementar os resultado dos índices de Willmott e Camargo-Sentelhas é que inclui os limites de concordância e seus intervalos de confiança e, assim, pode-se inferir se os limites encontrados são aceitáveis do ponto de vista técnico, pois nesse método a concordância dos métodos é avaliada, levando em consideração o viés (o quanto as diferenças se afastam do valor 0), o erro (a dispersão dos pontos das diferenças ao redor da média), além de *outliers* e tendências.

Diante disso, como os limites de concordância representam a região em que se encontram no mínimo 95% das diferenças das medidas estudadas (Figura 4b), ao considerar a área estimada do maior quadrado (324cm<sup>2</sup>) verificou-se uma variação de -2,2972 e +7,8147cm<sup>2</sup>, que representa uma subestimativa de 0,70% e superestimava de 2,41%, valores abaixo dos 5%

de erro comum usado em experimentos agrônômicos, além disso, conforme Hair *et al.* (2005) 'valores maiores depois de serem previstos' naturalmente tem resíduos maiores. Portanto, do ponto de vista agrônômico pode-se usar imagem de folhas fotografadas por câmera digital de resolução no mínimo de 7,2 megapixels para estimar a área foliar real, e processadas no software ImageJ até 324cm<sup>2</sup> de área. Portanto, ao utilizar valores maiores que este, recomenda-se uma máquina fotográfica digital com resolução superior ou que se recorte as folhas com dimensões maiores em pedaços menores e/ou iguais a 324cm<sup>2</sup>.

Do pressuposto, tendo validado o método de estimativa da área real de imagens digitais processadas no software ImageJ, em seguida fizeram-se regressões polinomiais do 1º grau com o objetivo de comparar a área real dos limbos foliares com a possibilidade do uso de medidas lineares e de massa seca dos mesmos em estimar essa área real (Tabela II). No geral, independente das plantas estudadas,

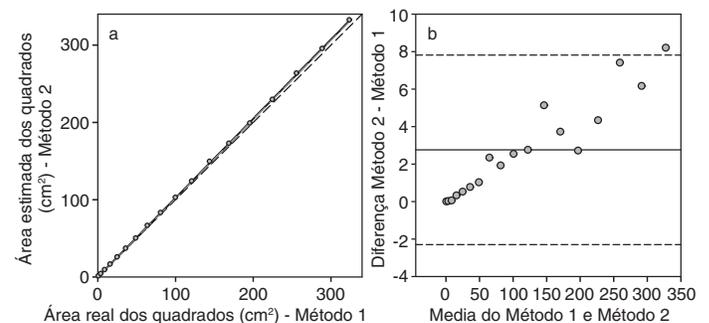


Figura 4. Regressão entre os pares de dados entre área estimada via ImageJ versus área real dos quadrados (a); Análise de concordância de Bland-Altman, em que a média (linha contínua) foi de 2,7588cm<sup>2</sup>, e os limites de concordância, linhas pontilhadas, foram de -2,2972 e 7,8147cm<sup>2</sup>, inferior e superior, respectivamente (b).

observou-se elevada associação entre os ajustes, demonstrado pelo coeficiente de Person, maior que 0,90, que segundo Martin *et al.* (2013), está em conformidade com a literatura. Ainda, com base no coeficiente determinístico ( $R^2$ ) observa-se que tanto o método de medida linear quanto o uso da massa seca explicaram, na maioria, mais de 90% da variável dependente (área real dos limbos foliares) e isso foi garantido pela distribuição equilibrada e pelo pouco desvio verificado entre os pares de valores de cada observação e a função estatística linear ajustada (Figura 5).

Além disso, conforme Hair *et al.* (2005), quando uma análise de regressão é baseada em uma amostra da população é apropriado realizar testes de significância dos coeficientes da regressão, de modo que, quando o tamanho da amostra é representativa da população, o erro padrão dos coeficientes estimados deve ser diferente de 0. Assim, com base nos resultados da Tabela II, observa-se que para o presente trabalho, o número de amostras foi representativo da população para as ambas as culturas avaliadas, pois o erro do coeficiente foi significativamente diferente de 0. Isso significa que um aumento de uma unidade de 'x' é associado com um aumento de 'y' e que ao longo de todas as possíveis amostras que possam ser consideradas, o coeficiente de regressão será diferente de 0, de forma que os resultados podem ser considerados generalizáveis para qualquer amostra da população, no intervalo de medida calibrado

(Tabela II). Ao contrário do coeficiente, segundo Hair *et al.* (2005), o valor do intercepto apropriado para representar a população é zero, e no presente trabalho observa-se que apenas a estimativa da área real via massa seca dos limbos de caju e soja não diferiram do valor 0 (Tabela II). Se o intercepto não for diferente de 0 é devido a erro amostral e, conforme Hair *et al.* (2005), é melhor removê-lo para fins preditivos.

Conforme Larson e Farber (2010), quando se trabalha com um modelo estatístico é importante que se calcule o intervalo de confiança da previsão para conhecer a amplitude média esperada dos valores da variável dependente. Portanto, é importante que se avalie se os resultados têm ou não um erro considerável que

justifique ou não uma ação corretiva ou complementativa. Diante disso, embora os ajustes sejam altamente significativos ( $p < 0,0001$ ), observa-se que o erro padrão da estimativa na previsão da variável dependente foi maior quando se tentou estimar a área do limbo foliar pela massa seca dos limbos, independente da planta estudada, em vez da área estimada por medidas lineares (comprimento x largura) (Tabela II).

Observa-se que o maior erro encontrado foi na estimativa da área do limbo foliar do milho pela massa seca, a qual variou  $\pm 39,643 \text{ cm}^2$ , mas essa amplitude apresentou níveis aceitáveis para o uso do método de estimativa da área do limbo foliar via massa seca. Segundo Hair *et al.* (2005), o pesquisador deve julgar a luz da significância

teórica e prática perante o problema da pesquisa investigando se o erro é aceitável para justificar o uso. Diante disso, deve-se usar os erros na previsão não como uma falha ou algo que simplesmente deve ser eliminado, mas como um ponto de partida para diagnosticar a validade dos resultados obtidos e uma indicação das relações restantes sem explicação.

O erro padrão da estimativa (EPE) mede o desvio médio entre os valores reais de Y e os valores estimados de  $Y'$ , de modo que o EPE seria igual a zero se todos os pares de dados utilizados na estimativa do modelo de regressão linear simples estivessem sobre a reta ajustada (Figura 5). Nesse caso, a reta da regressão explicaria perfeitamente a relação entre X e Y, entretanto, a ocorrência de um

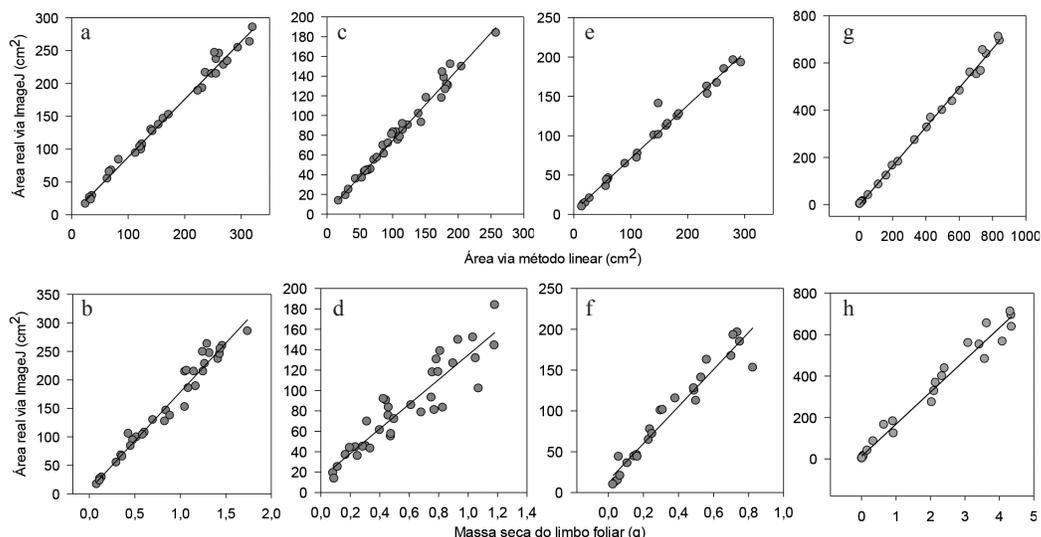


Figura 5. Regressão entre os pares de dados de área estimada via imagem digital processada no ImageJ vs valores de medidas lineares dos limbos foliares das plantas de algodão (a), caju (c), soja (e) e milho (g); e vs valores de medidas de matéria seca de plantas de algodão (e), caju (d), soja (f) e milho (h).

TABELA II  
REGRESSÃO ENTRE A ÁREA REAL DE LIMBO FOLIAR COM MEDIDAS LINEARES E DE MASSA SECA

Planta	Medida	Intercepto		Coeficiente		N	r	$R^2$	Prob. Fc>Ft	EPE (cm <sup>2</sup> )	Calibração (cm <sup>2</sup> )	
		$y_0$	ns	a	**						Mín	Máx
Algodoeiro	L	-0,185	$\pm 3,283$	0,881	$\pm 0,017^{**}$	30	0,995	0,989	<0,0001	8,689	21,585	281,920
	MS	6,748	$\pm 5,755$	171,905	$\pm 5,907^{**}$	32	0,982	0,965	<0,0001	15,812	13,924	299,063
Cajueiro	L	1,760	$\pm 2,284$	0,729	$\pm 0,018^{**}$	34	0,990	0,980	<0,0001	6,137	12,685	187,790
	MS	14,049	$\pm 5,923^*$	120,822	$\pm 8,988^{**}$	35	0,920	0,846	<0,0001	17,056	9,555	142,727
Soja	L	3,714	$\pm 3,182$	0,675	$\pm 0,020^{**}$	25	0,990	0,980	<0,0001	8,609	9,455	198,130
	MS	14,633	$\pm 5,252^*$	226,934	$\pm 12,106^{**}$	25	0,969	0,939	<0,0001	15,276	5,945	187,152
Milho	L	-2,945	$\pm 4,178$	0,828	$\pm 0,009^{***}$	28	0,998	0,997	<0,0001	15,326	2,340	697,838
	MS	12,219	$\pm 10,542$	155,118	$\pm 4,600^{***}$	28	0,989	0,978	<0,0001	39,643	1,349	675,476

Utilizou-se o modelo linear ( $y = y_0 + bx$ ), em que y: área real estimada via imagem digital (ImageJ), x: área estimada via medida linear e via massa seca, em que  $y_0$  e a: coeficientes estimados; N: número de pares de dados usados para ajustar o modelo; r: coeficiente de correlação de Pearson ( $p < 0,0001$ );  $R^2$ : coeficiente determinístico; EPE: erro padrão da estimativa.

\*\*\* ( $p < 0,0001$ ), ns: não significativo ( $p > 0,05$ ) pelo teste t.

modelo perfeito dificilmente será observado (Naghetini e Pinto, 2007). Portanto, o erro padrão existirá sempre que o poder de explicação modelo ajustado não coincidir com os valores observados.

O valor do EPE significa então que existem outros fatores que interferem no comportamento da variável estimada Y' além da variável X e, assim, será uma estimativa aproximada de um valor de Y' para um dado valor de X. De qualquer forma, é uma medida importante da variabilidade dos pontos amostrais acima e abaixo da reta de regressão. No presente trabalho os erros podem ser explicados tanto para as medidas lineares quanto para as medidas de massa seca dos limbos foliares. Conforme Cairo *et al.* (2008), a estimativa da área de uma folha por meio da relação entre o maior comprimento e largura da folha resultará em uma figura geométrica do tipo retângulo. Entretanto, esse método expressará valores superestimados, já que a área da folha não abrange os cantos de um retângulo. Além disso, segundo Adami *et al.* (2008), se a folha não estiver íntegra, ou seja, danificada, essa superestimação pode ser ainda maior, entretanto, quando o método leva em consideração esse dano a medida da área foliar é muito confiável.

Já no caso de medidas de massa seca de folhas a fim de estimar a área real, existem fatores naturais implícitos que interferem nos resultados, como

a espessura foliar em função da localização na planta, já que conforme Kerbauy (2012) somente as folhas adultas, completamente expandidas e efetivamente expostas à radiação solar, podem ser consideradas como área foliar fotossinteticamente útil. Assim, folhas situadas em posições inferiores e internas nas plantas estão sujeitas ao sombreamento, o que torna sua atividade fotossintética limitada. Mesmo entre as folhas mais expostas à radiação plena, é necessário considerar que nas folhas jovens, ou em fase inicial de crescimento, o aparelho fotossintético ainda está sendo estruturado (Cairo *et al.*, 2008). Portanto, duas folhas podem apresentar mesma área, mas massa seca diferente. Esta discussão ajuda a esclarecer porque os valores do intercepto não foram diferentes de zero na estimativa da área real via massa seca dos limbos de caju e soja (Tabela II), pois coletou-se folhas pequenas, que provavelmente não estariam completamente desenvolvidas o que, conforme Hair *et al.* (2005), seria o erro amostral.

Para avaliar se o erro padrão da estimativa do modelo estatístico poderia comprometer o uso dos valores oriundos da estimativa da área do limbo foliar pela massa seca tomou-se como exemplo os dados de massa seca do limbo foliar de diferentes estádios fenológicos da cultura da soja e do milho por meio da coleta de várias

amostras de plantas à campo, calibrados com a equação respectiva (Tabela II), e estimou-se a área do limbo foliar durante os estádios fenológicos da cultura (Figuras 6a, b). Quando pretende-se estimar a média de uma população com variância desconhecida através de amostras simples, pode-se utilizar do parâmetro 'intervalo de confiança da média' (IC) para assegurar valores prováveis a um determinado nível de confiabilidade (1- $\alpha$ ), de tal forma que quanto menor o IC mais confiável será a estimativa da média da população. Dessa forma, observou-se um grande incremento da área foliar ao longo do ciclo da soja (Figura 6a) e do milho (Figura 6b); além disso, observou-se que os IC aumentam com a idade da planta.

Com isso, ao fazermos comparação do erro padrão da estimativa (EPE) do ajuste da soja e do milho pela massa seca (Tabela II), verificou-se que esta variação foi muito menor do que naturalmente ocorreu à campo, o que é esperado quando consideramos no espaço as inter-relações solo-planta-atmosfera em uma área agrícola com plantas cultivadas e, isso, portanto, representa níveis aceitáveis para o uso do método de estimativa da área do limbo foliar via massa seca, pois ao nível de 5% de probabilidade o verdadeiro valor da média populacional da área do limbo foliar ( $\text{cm}^2 \cdot \text{m}^{-1}$ ) da soja (Figura 6a) e do milho (Figura 6b) poderia variar bem mais que o próprio EPE de  $\pm 15,276 \text{cm}^2$  e  $\pm 39,643 \text{cm}^2$ , respectivamente, verificado no ajuste da calibração (Tabela II). Portanto, pode-se usar seguramente a massa seca do limbo foliar das plantas avaliadas para estimar a respectiva área foliar de maneira simples e rápida.

## Conclusões

A estimativa da área do limbo foliar de plantas de algodão, caju, soja e milho pode ser obtida baseando-se em medidas lineares e de massa seca das folhas, utilizando o software ImageJ para a calibrar essas medidas.

## REFERÊNCIAS

- Adami M, Hastenreiter FA, Flumignan DL, Faria RT de (2008) Estimativa de área de folíolos de soja usando imagens digitais e dimensões foliares. *Bragantia* 67: 1053-1058.
- Bland JM, Altman DG (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 8: 307-310.
- Cairo PAR, Oliveira LEM, Mesquita AC (2008) *Análise de Crescimento de Plantas*. Edições UESB: Vitória da Conquista, Brasil. 72 pp.
- Camargo AP de, Sentelhas PC (1997) Avaliação do desempenho de diferentes métodos de estimativa da evapotranspiração potencial no estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Agrometeorol.* 5: 89-97.
- Embrapa (2006) *Sistema Brasileiro de Classificação de Solo*. 2ª ed. Embrapa Solos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Rio de Janeiro, Brasil. 306 pp.
- Embrapa (2014) *Laboratório de Imagens*. Embrapa Instrumentação Agropecuária. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária São Paulo, Brasil. <http://labimagem.cnpdia.embrapa.br>
- Hair JF Jr., Anderson RE, Tatham RL, Black WC (2005) *Análise Multivariada de Dados*. 5ª ed. Bookman. Porto Alegre, Brasil. 593 pp.
- ImageJ (2014) *Image Processing and Analyse in Java*. <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- Kerbauy GB (2012) *Fisiologia Vegetal*. 2ª ed. Koogman. Guanabara, Brasil. 446 pp.
- Larson R, Farber B (2010) *Estatística Aplicada*. 4ª ed. Pearson. São Paulo, Brasil. 656 pp.
- Laurecen TA, Chromy BA (2010) QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ. *Nature Meth.* 7: 339-340.
- Martin TN, Marchese JA, Souza ANF, Curti GL, Fogolari H, Cunha VS (2013) Uso do software ImageJ na estimativa de área foliar para a cultura do feijão. *Interciência* 38: 843-848.
- Naghetini M, Pinto EJA (2007) *Hidrologia Estatística*. Serviço Ecológico do Brasil. Secretaria de Geologia, Mineração e Transformação Mineral. Belo Horizonte, Brasil. 552 pp.
- SigmaPlot (2014) *Exact Graphs And Data Analysis*. Vers. 12.5. [www.sigmaplot.com/](http://www.sigmaplot.com/)
- Vidal WN, Vidal MRR (2007) *Botânica Organografia: Quadros Sinóticos Ilustrados de Fanerógamos*. 4ª ed. Editora UFV. Viçosa, Brasil. 124 pp.

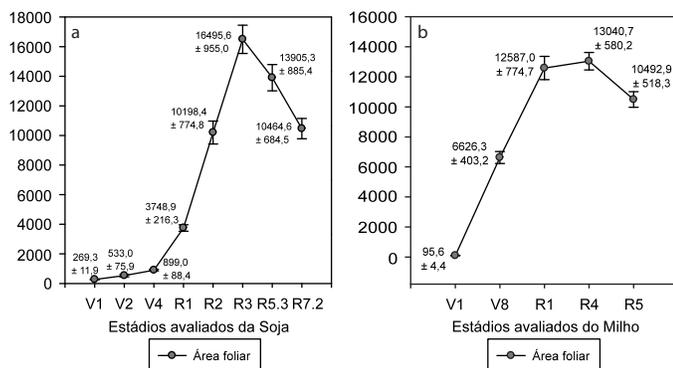


Figura 6. Estimativa da área do limbo foliar ( $\text{cm}^2 \cdot \text{m}^{-1}$ ) em diferentes estádios fenológicos da cultura da soja (a) e do milho (b). A imprecisão associada à estimativa da média de cada estádio foi calculado pelo intervalo de confiança (IC) ( $\alpha = 0,05$ ), conforme Larson e Farber (2010), com os seguintes números de amostras simples. Soja, n= 80 (V1), n= 101 (V2), n= 101 (V4), n= 101 (R1), n= 80 (R2), n= 96 (R3), n= 64 (R5.3), e n= 98 (R7.2). Milho, n= 59 (V1), n= 59 (V8), n= 59 (R1), n= 59 (R4), e n= 59 (R5).