

**MODELAGEM AGRONÔMICA NÃO-DESTRUTIVA DE PIGMENTOS
CLOROPLASTÍDICOS EM *MORINGA OLEIFERA* LAMARCK**

Priscylla Marques de Oliveira Viana¹, Semako Ibrahim Bonou², Patrícia da Silva Costa³,
Renner Luciano de Souza Ferraz⁴, Mario Sergio de Araujo⁵, Rayanne da Silva Alencar⁶

RESUMO: O consumo crescente de alimentos impulsiona a degradação de recursos naturais nos sistemas de produção e isso torna evidente a necessidade de cultivo de espécies com múltiplos usos, como a *Moringa oleifera*. Apesar da importância desta cultura, ainda não foram desenvolvidos ou não estão disponíveis na literatura modelos de regressão para estimativa dos teores de pigmentos cloroplastídicos a partir de leituras do índice SPAD. Assim, objetivou-se com a execução desta proposta ajustar e validar modelos de regressão para estimativa não destrutiva dos teores de pigmentos cloroplastídicos de *M. oleifera* a partir de leituras do índice SPAD e teores de pigmentos reais determinados por método analítico a partir de leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 470, 646 e 663 nm. Com base nos resultados, conclui-se que o SPAD (Modelo: SPAD-502; Konica-502; Konica Minolta Sensing, Osaka, Japão), pode ser utilizado para estimativa não-destrutiva da concentração dos pigmentos cloroplastídicos em folha de *M. oleifera* com forte precisão, além de proporcionar economia de recursos e tempo.

PALAVRAS-CHAVE: Moringaceae, SPAD; regressão

**NON-DESTRUCTIVE AGRONOMIC MODELING OF CHLOROPLASTID
PIGMENTS IN *MORINGA OLEIFERA* LAMARCK**

ABSTRACT: The growing consumption of food drives the degradation of natural resources in production systems and this makes evident the need to grow species with multiple uses, such as *Moringa oleifera*. Despite the importance of this culture, regression models for estimating

¹ Bacharelanda em Agroecologia, Depto de Agroecologia e Agropecuária, UEPB, CEP 58117-000, Lagoa Seca, PB. Fone (83) 3366-1244, e-mail: pri.marques.o@hotmail.com

² Mestrando em Engenharia Agrícola, Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola, UFCG, Campina Grande, PB

³ Doutoranda em Engenharia Agrícola, Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola, UFCG, Campina Grande, PB

⁴ Prof. Doutor em Engenharia Agrícola, Unidade Acadêmica de Tecnologia do Desenvolvimento, UFCG, Sumé, PB

⁵ Prof. Doutor em Engenharia Agrícola, Depto de Agroecologia e Agropecuária, UEPB, Lagoa Seca, PB

⁶ Graduanda em Ciências Biológicas, Depto de Biologia, UEPB, Campina Grande, PB

chloroplast pigment levels based on SPAD index readings have not yet been developed or are not available in the literature. Thus, the objective was to adjust and validate regression models for non-destructive estimation of chloroplast pigments in *Moringa oleifera* Lamarck. 196 measurements of the SPAD index were performed in leaflets, subsequently absorbance readings were performed in a spectrophotometer, at wavelengths of 663, 646 and 470 nm, to determine the pigment contents. Based on the results, it is concluded that the SPAD can be used for non-destructive estimation of the concentration of chloroplast pigments in *M. oleifera* leaf with strong precision, in addition to saving resources and time.

KEYWORDS: Moringaceae, SPAD, regression

INTRODUÇÃO

A *Moringa oleifera* pertence à família Moringaceae, é uma espécie de planta bem conhecida e amplamente distribuída e assim renomada como “árvore milagrosa”, o que se deve ao fato de todas as suas partes serem aproveitadas para diversas finalidades e importância econômica, social e ambiental. É uma planta rica em nutrientes, carotenóides, alcalóides, flavonóides, glicosídeos, antocianina, antraquinona, saponinas, esteróides, taninos e terpenóides que contribuem na prevenção de vários distúrbios de saúde, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, distúrbios funcionais, artrite e inflamação (ZAINAB et al., 2020).

Neste sentido, é importante destacar que o Brasil é um dos principais produtores e exportadores de alimentos do mundo intensificando a agricultura e isso acaba acarretando um aumento nas mudanças climáticas, evidenciando assim a necessidade de cultura para usos eficientes da água e produção de alimentos (PIEDRA-BONILLA et al., 2020). Assim como destacou Macário et al. (2020), neste cenário supracitado destaca-se a *Moringa oleifera* devido aos seus múltiplos usos e benefícios.

Devido às propriedades desta espécie, a comunidade científica e os produtores têm despertado o interesse em otimizar os sistemas de produção de *M. oleifera*, destacando-se práticas de manejo como adubação, irrigação e colheita (BANCESSI et al., 2020; MASHAMAITE et al., 2020). Neste contexto, a determinação dos teores de pigmentos cloroplastídicos é de fundamental importância, uma vez que pode auxiliar no monitoramento do status nutricional das plantas devido à alta relação entre pigmentos e nutrientes. Além disso, a clorofila é fundamental para as trocas gasosas, uso de água e energia da planta (SONG et al., 2021).

Os teores de pigmentos podem ser determinados a partir de sua extração por métodos que utilizam reagentes químicos e leitura de absorbância em espectrofômetro. No entanto, este método pode ser laborioso e demorado, além do elevado custo do equipamento para as leituras (BARMAN & CHOUDHURY, 2020), no entanto, estes pigmentos podem ser determinados por leituras indiretas a partir do índice de verde das folhas utilizando-se de um equipamento tipo SPAD com maior praticidade e eficiência (CAHYO et al., 2020). Os teores de pigmentos são variáveis entre as espécies vegetais, havendo necessidade de ajuste de modelos de regressão entre as leituras do SPAD e os valores reais de clorofila determinados pelo método analítico de laboratório para cada espécie (DONNELLY et al., 2020).

Ressalta-se que estes modelos ainda não foram ajustados para a cultura da *M. oleifera*, cenário que justifica o desenvolvimento destes, haja vista a já relatada importância da cultura. Assim, a execução desta proposta contribui de forma significativa para avanços científicos sobre a cultura no mundo.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi montada no Campo experimental no Centro de Ciências Agrárias e Ambientais (CCAA) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), localizado no município de Lagoa Seca-PB. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia de Plantas Cultivadas (ECOLAB), localizado no Campus I da UEPB em Campina Grande-PB. As mudas foram formadas entre os meses de dezembro de 2019 e fevereiro de 2020, a partir de sementes obtidas de um produtor rural do município de Catolé do Rocha, semeadas em sacos de polietileno com substrato composto de areia lavada e esterco bovino nas proporções de 3:1. O solo da área experimental foi coletado para análises químicas e físicas e determinação de fertilidade e granulometria.

Transcorrido um ano após o plantio das mudas no campo, foram realizadas medições dos índices SPAD (Modelo: SPAD-502; Konica-502; Konica Minolta Sensing, Osaka, Japão) em 196 folíolos (150 utilizados para ajuste dos modelos e 46 para validação dos modelos ajustados) selecionados aleatoriamente no terço mediano da planta. Imediatamente após a leitura SPAD, o folíolo foi destacado e no mesmo ponto de inserção do leitor cortado um disco foliar de 21,24 mm² o qual foi envolvido em papel alumínio para evitar a foto oxidação dos pigmentos, estas amostras foram acondicionadas em recipiente térmico e transportadas ao ECOLAB/UEPB. Com os discos colocados em frascos envolvidos com papel alumínio, foram realizadas as pesagens dos mesmos, seguindo-se de maceração e posteriormente, a cada amostra foram

acrescentados 4 mL de acetona a 80% (v/v) e armazenados em tubos Eppendorf protegidos da luz. Em seguida, uma alíquota de 3 mL foi pipetada para uma cubeta de quartzo para posterior realização das leituras de absorvância no espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 663, 646 e 470 nm, correspondentes às bandas de maior absorção de luz para os pigmentos: Chla, Chlb, Chlt e Cart.

Os teores dos pigmentos foram obtidos utilizando-se das equações de Lichtenthaler & Buschmann (2001). Para converter os valores encontrados em $\mu\text{g mL}^{-1}$ para $\mu\text{g g}^{-1}$, os resultados obtidos foram multiplicados por 4,0 mL (volume do recipiente de digestão) dividindo-se pela massa do disco. Atendido o pressuposto de normalidade dos dados, foi modelada a relação entre os índices SPAD e os teores de Chla, Chlb, Chlt e Cart, por meio dos modelos de regressão linear ($y = a + b * x$), onde: y - variável dependente representado pelo teor do pigmento que se deseja estimar (Chla, Chlb, Chlt e Cart); a e b - parâmetros da equação a serem estimados; e x - variável independente representada pelos índices SPAD. Para ajuste dos modelos foi utilizado o *software* Microsoft Office Excel v. 2016 (WINSTON, 2016).

A avaliação do desempenho estatístico dos modelos ajustados foi realizada tomando-se como base a qualidade, mensurada pelo coeficiente de determinação ajustado " R^2_{ajustado} "; a precisão, medida pelo coeficiente de correlação de Pearson "r"; a exatidão, medida pelo índice de concordância de Willmott "d" e de confiança "c"; e a performance geral do modelo medida pelo erro médio quadrático "RMSE", (TOEBE et al., 2012; TOEBE et al., 2019; WANG et al., 2019).

Os valores de índice SPAD obtidos das 46 amostras reservadas para validação foram utilizados nos modelos ajustados para estimativas dos teores de pigmentos cloroplásticos (Chla, Chlb, Chlt e Cart) simulados pelos modelos. Posteriormente, os valores de pigmentos quantificados nos discos dos folíolos de *Moringa oleifera* das 46 amostras de validação foram submetidos às análises de regressão e de resíduos, sendo os teores de pigmentos estimados pelos modelos considerados variáveis independentes e aqueles quantificados nos discos dos folíolos considerados variáveis dependentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas análises realizadas, foi possível verificar que houve ajuste significativo ($P_{\text{valor}} < 0,01$) de modelos de regressão para todos os pigmentos estudados em função dos índices SPAD. Os parâmetros e coeficientes dos modelos estão descritos na Tabela 1. Ainda, pode-se observar que os modelos ajustados possuem boa qualidade (R^2_{ajustado}), precisão (r),

exatidão (d), confiança (c) e performance geral (RMSE) para estimativa dos teores de Chla, Chlb e Chlt. No entanto, o modelo ajustado para estimativa dos teores de Cart teve baixo desempenho (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo das estatísticas de ajuste e avaliação de desempenho dos modelos para estimativa dos pigmentos cloroplastídicos de folhas de *Moringa oleifera*.

	Quadrado Médio			
	Chla	Chlb	Chlt	Cart
Regressão	202693344,76	81109423,92	540242550,51	1360124,91
Resíduo	338734,70	303230,04	1162092,03	26506,36
Teste F				
F _{calculado}	598,38	267,48	464,89	51,31
P-valor	7,30E-54	5,45E-35	1,62E-47	3,44E-11
Parâmetros	Coeficientes			
β_0	-214,28	321,25	106,97	209,64
β_1	74,24	46,96	121,20	6,08
R ² _{ajustado}	0,80	0,64	0,76	0,25
Erro Padrão	582,01	550,66	1078,00	162,81
Desempenho dos Modelos				
R ² _{ajustado}	0,89	0,89	0,92	0,43
r	0,94	0,94	0,96	0,66
d	0,89	0,88	0,90	0,47
c	0,84	0,83	0,87	0,31
RMSE	693,65	451,61	1078,24	205,98

Chla: clorofila a, Chlb: clorofila b, Chlt: clorofila total, Cart: carotenoides totais, β_0 : intercepto da curva no eixo das ordenadas (y), β_1 : coeficiente angular da curva, R²_{ajustado}: coeficiente de determinação ajustado, r: coeficiente de correlação de Pearson, d: índice de concordância de Willmott, c: índice de confiança e RMSE: erro médio quadrático.

Ao correlacionar os resultados do SPAD nas folhas de *Moringa oleifera* ao teor de clorofila ‘a’ ($\mu\text{g g}^{-1}$), obtido em laboratório, observou-se que houve alta relação entre as leituras, com coeficiente de determinação de 0,89, conforme a Figura 1A. Evidencia-se que as leituras com o equipamento portátil estimam com forte precisão os valores desse pigmento fotossintético na cultura de *M. oleifera*, conforme classificação de Dancey & Reidy (2019), em que valores de R² variando entre 0,10-0,30 representa fraca correlação, valores entre 0,40-0,60 correlação moderada e 0,70-1,00 correlação forte. Dessa forma, o modelo matemático gerado na Figura 1A pode ser utilizado para estimar o teor de clorofila a em folhas de *Moringa oleifera*. Zotarelli et al. (2003) verificaram alta relação entre as leituras com o SPAD e a clorofila extraída em laboratório para milho (*Zea mays*), assim como Coelho et al. (2010) também constataram semelhanças das leituras do clorofilômetro SPAD com as determinações analíticas de clorofila para folha de batata (*Solanum tuberosum*).

A estimativa do conteúdo de clorofila ‘b’ por meio dos equipamentos portáteis é mais difícil quando confrontada à leitura da clorofila ‘a’, assim como atribuiu Rigon et al. (2012). Isto é possível ocorrer devido ao fato do comprimento de onda emitido pelo aparelho aproxima-se mais ao pico de absorção da clorofila ‘a’, do que do pigmento ‘b’. Observou-se, no entanto, alta eficiência nas leituras do SPAD em relação às análises laboratoriais para esse pigmento, com coeficientes de determinação de 0,89, demonstrando que o equipamento proporcionou bom ajuste com o modelo linear, conforme Figura 1B.

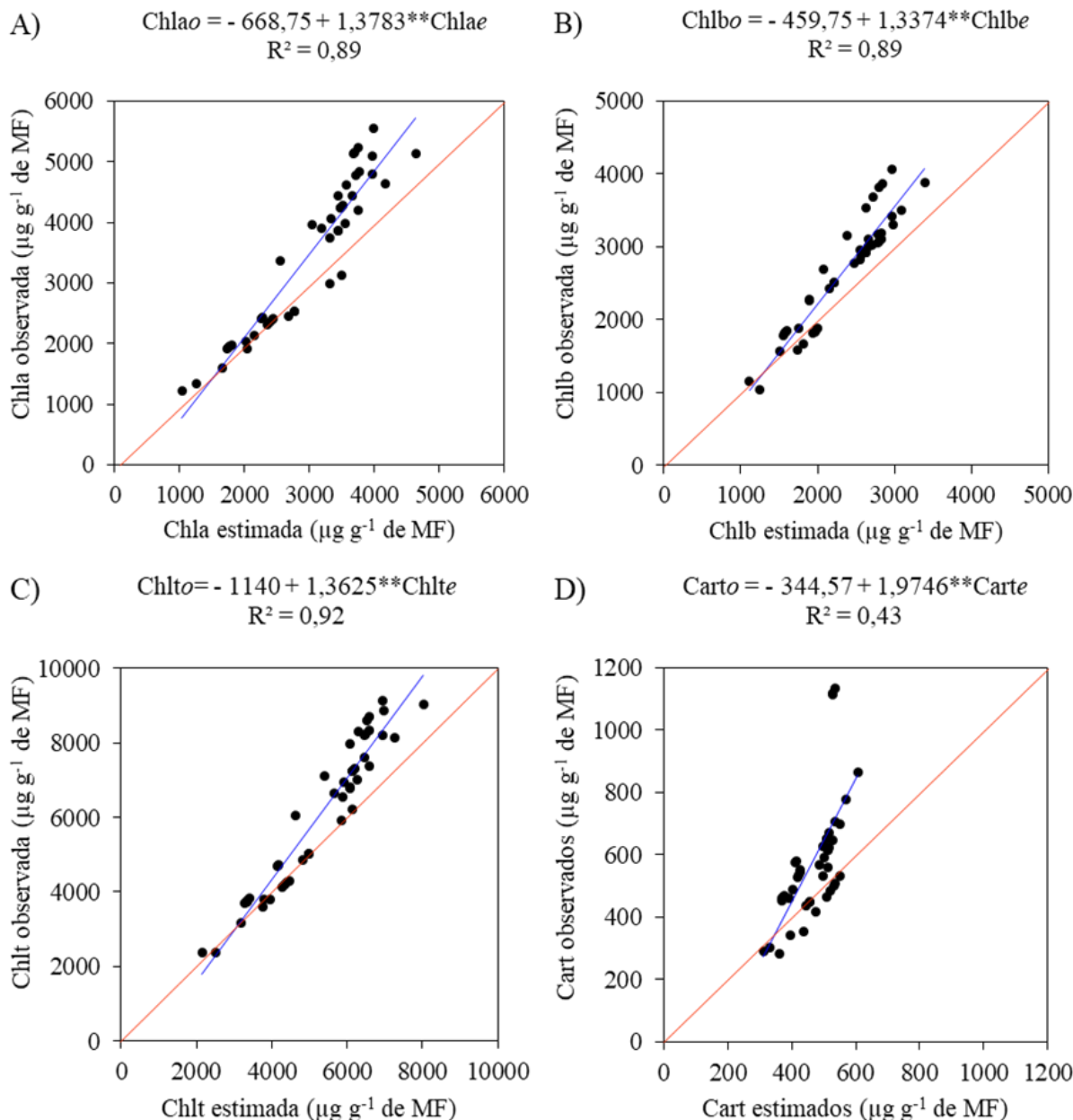


Figura 1. Relação entre clorofila a (Chla) observada e a estimada (A), clorofila b (Chlb) observada e estimada (B), clorofila total (Chlt) observada e estimada (C) e carotenoides totais (Cart) observados e estimados (D) pelos modelos de regressão ajustados para estimativa dos pigmentos em folhas de *Moringa oleifera*. MF: matéria fresca, **: inclinação significativa da linha de tendência ($p < 0,01$). A linha diagonal vermelha representa a linha 1:1.

Os valores referentes a clorofila total permitiram identificar uma alta relação entre as leituras com medidor portátil de clorofila e teor de clorofila extraível, evidenciando que as leituras efetuadas com clorofilômetro estimam adequadamente o grau de esverdeamento da folha, tornando possível ajustá-los a um modelo matemático linear, com coeficiente de 0,92, conforme Figura 1C. Argenta et al. (2001) também observaram alto coeficiente de correlação de 0,72 a 0,98, para clorofila total na cultura de milho. Assim como através das análises não destrutivas realizadas com os clorofilômetros portáteis, obteve-se diferenças estatísticas significativas para os índices de pigmentos fotossintéticos, com exceção dos carotenoides, que

não apresentou diferença significativa com coeficiente de determinação de 0,43. Bem como Silva (2020) que não encontrou resultado significativo para os carotenoides na seleção dos genótipos cafeeiro (*Coffea canéfora*). O que pode justificar essa proporção entre clorofilas e carotenoides é alterada de acordo com que os vegetais sejam submetidos a algum estresse abiótico, e.g., estresse hídrico (YOUNG & BRITTON, 1990).

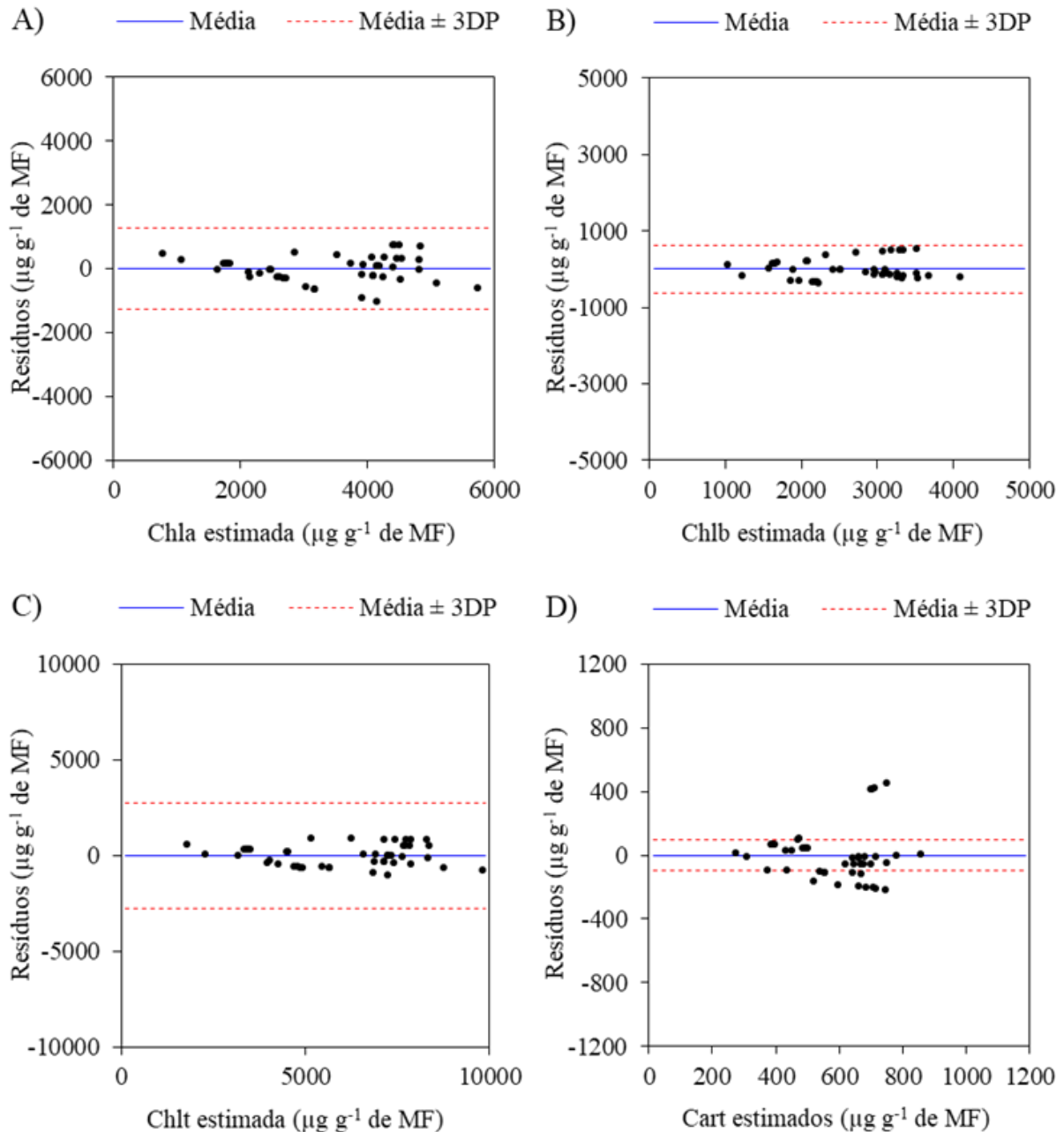


Figura 2. Dispersão residual da relação entre os teores de Chla (A), Chlb (B), Chlt (C) e Cart (D) estimados e observados em folhas de Moringa oleifera. MF: matéria fresca.

Baseado na análise de resíduos, foi avaliada a possibilidade dos modelos de regressão ajustados para estimativa não destrutiva dos teores de pigmentos cloroplastídicos a partir de leituras do índice SPAD e teores de pigmentos reais determinados por método analítico. Constatou-se que os resíduos estão bem distribuídos em torno da média e localizados nos limites

superiores e inferiores (média \pm 3DP), como pode ser observado na dispersão residual dos teores de clorofila 'a', 'b' e total, conforme ilustrado nas Figura 2A, B e C, respectivamente. Para o teor de carotenoides totais, verificou-se que a distribuição dos resíduos em torno da média foi insatisfatória, ficando fora dos limites superiores e inferiores (média \pm 3DP), o que justifica o baixo desempenho do modelo ajustado para a estimativa deste pigmento (Figura 2D).

CONCLUSÕES

O clorofilômetro portátil SPAD (*Soil Plant Analyzer Develop*) pode ser utilizado para estimativa não-destrutiva da concentração dos pigmentos cloroplastídicos em folha de *M. oleifera* a partir dos modelos ajustados e validos com forte precisão, além de proporcionar economia de recursos e tempo.

REFERÊNCIAS

- ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F.; BORTOLINI, C. G; FORSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 158-167,2001.
- BANCESSI, A.; BANCESSI, Q.; CATARINO, A. B. L. Present and potential uses of *Moringa oleifera* as a multipurpose plant in Guinea-Bissau. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 206-208. 2020.
- BARMAN, U.; CHOUDHURY, R. D. Smartphone image based digital chlorophyll meter to estimate the value of citrus leaves chlorophyll using Linear Regression, LMBP-ANN and SCGBP-ANN. **Journal of King Saud University - Computer and Information Sciences**, 2020. In Press.
- CAHYO, A. N.; MURTI, R. H.; PUTRA, E. T. S.; NURINGTYAS, T. R.; FABRE, D.; MONTORO, P. SPAD-502 and atLEAF CHL PLUS values provide good estimation of the chlorophyll content for *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. Leaves. **Menara Perkebunan**, v. 88, p. 1-8, 2020.
- COELHO, F. S.; FONTES, P. C. R.; PUIATTI, M.; NEVES, J. C. L.; SILVA, M. C. C. Dose de nitrogênio associada à produtividade de batata e índices do estado de nitrogênio na folha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1175-1183, 2010.

DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística sem matemática para psicologia**. 7. ed. Porto Alegre: Penso, 2019, 596p.

DONNELLY, A.; YU, R.; REHBERG, C.; MEYER, G.; YOUNG, E. B. Leaf chlorophyll estimates of temperate deciduous shrubs during autumn senescence using a SPAD-502 meter and calibration with extracted chlorophyll. **Annals of Forest Science**, v. 77, 2020.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. F4.3.1-F4.3.8, 2001.

MACÁRIO, A. P. S.; FERRAZ, R. L. S.; COSTA, P. S.; BRITO NETO, J. F.; MELO, A. S.; DANTAS NETO, J. Allometric models for estimating *Moringa oleifera* leaflets area. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 44, p. e005220, 2020.

MASHAMAITE, C. V.; DUBE, Z. P.; PHIRI, E. E.; Chemical root-pruning of *Moringa oleifera* for improved seedling growth. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 155-160, 2020.

PIEDRA-BONILLA, E. B.; CUNHA, D. A.; BRAGA, M. J. Climate variability and crop diversification in Brazil: An ordered probit analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 253, p. e120252, 2020.

RIGON, J. P. G.; BELTRÃO, N. E. M.; CAPUANI, S.; BRITO NETO, J. F.; SILVA, F. V. F. Análise não destrutiva de pigmentos fotossintéticos em folhas de gergelim. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, p. 258-261, 2012.

SILVA, A. T. **Intensidade da Coloração Verde Foliar em Genótipos de *Coffea Canephora*: Divergência Genética e Relação Com o Desempenho Fotossintético**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2020, 76 f.

SONG, Y.; TENG, G.; YUAN, Y.; LIU, T.; SUN, Z. Assessment of wheat chlorophyll content by the multiple linear regression of leaf image features. **Information Processing in Agriculture**, v. 8, p. 232-243, 2021.

TOEBE, M.; FILHO, A. C.; LOOSE, L. H.; HELDWEIN, A. B.; ZANON, A. J. Área foliar de feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) de acordo com as dimensões foliares. **Semina Ciências Agrárias**, v. 33, p. 2491-2500, 2012.

TOEBE, M.; SOUZA, R. R.; MELLO, A. C.; MELO, P. J.; SEGATTO, A.; CASTANHA, A. C. Leaf area estimation of squash 'Brasileirinha' by leaf dimensions. **Ciência Rural**, v. 49, 2019.

WANG, Y.; JIN, G.; SHI, B.; LIU, Z. Empirical models for measuring the leaf area and leaf mass across growing periods in broadleaf species with two life histories. **Ecological Indicators**, v. 102, p. 289-301, 2019.

WINSTON, W. **Microsoft Excel data analysis and business modeling**. Microsoft press, 2016.

YOUNG, A.; BRITTON, G. Carotenoids and stress. In: ALSCHER, R. G.; CUMMINGS, J. R. (Eds.). **Stress responses in plants: Adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, p. 87-112, 1990.

ZAINAB, B.; AYAZ, Z.; ALWAHIBI, M. S.; KHAN, S.; RIZWANA, H.; SOLIMAN, D. W.; ALAWAAD, A.; ABBASI, A. M. In-silico elucidation of Moringa oleifera phytochemicals against diabetes mellitus. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, p. 2299-2307, 2020.

ZOTARELLI, L.; CARDOSO, G. E.; PICCININ, L. J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, M. R.; TORRES, E.; ALVES, B. J. R. Calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1117-1122, 2003.