

UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO NO AUXÍLIO À IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE CUPINS

Renato Almeida de AZEVEDO¹
Cristian de Sales DAMBROS²
José Wellington de MORAIS³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Co-orientador University of Vermont-USA; ³Orientador CBIO/INPA

INTRODUÇÃO

Os cupins são insetos eussociais, possuindo castas estéreis (soldado e operário) e uma casta reprodutiva (rei e rainha), mas em algumas espécies a casta soldado pode estar ausente e, em outros casos, existem somente pseudo-operários (Constantino 1999). A proporção de soldados em uma colônia é influenciada por feromônios produzidos pelos soldados (Constantino 2012) e, geralmente, a proporção vai de zero a 25% dos indivíduos.

Apesar do grande número de indivíduos em uma colônia, tanto operários quanto soldados, as descrições de espécies, revisões de gêneros e chave de famílias utilizam primariamente a morfologia do soldado para a caracterização dos grupos, pois esses possuem características mais claramente distinguíveis do que as demais castas. Diferentemente, a casta de operários possui a morfologia externa similar entre diferentes espécies e, no caso de espécies de mesmo gênero, é praticamente impossível a distinção entre espécies utilizando somente essa casta. Na subfamília Apicotermatinae, a dificuldade na identificação é ainda maior, pois este grupo não possui soldados e as principais características utilizadas para a caracterização das espécies estão na morfologia interna (Grassé e Noirot 1954).

A técnica de espectroscopia no infravermelho próximo para a identificação taxonômica se baseia na identificação de espécies a partir da leitura espectral de amostras. Esta técnica capta a luz refletida pela superfície de uma amostra, incluindo comprimentos de onda não visíveis a olho nu, sendo capaz de revelar e quantificar diferenças entre espécies. A espectroscopia tem sido utilizada na identificação de diferentes táxons, como fungos (Timmins *et al.* 1998), algas (Chopin *et al.* 1999), insetos (Perez-Mendoza *et al.* 2002 e 2004; Aldrich *et al.* 2007; Fernández 2008) e plantas (Durgante *et al.* 2013). Este é um método muito rápido, não gera resíduos sólidos, líquidos ou gasosos, sendo uma tecnologia limpa, requer pouca quantidade de amostras, pode ser implementada *in situ*, geralmente dispensa o tratamento prévio da amostra e, principalmente, não é invasivo e nem destrutivo (Pasquini 2003; Munck 2007), sendo ideal para material de coleções biológicas.

O objetivo deste estudo foi testar a capacidade da técnica de espectroscopia no infravermelho próximo para discriminar espécies de cupins. Além disso, verificou-se o potencial da utilização da casta operário para separar espécies com uso dessa técnica.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS

Foram utilizadas para as análises sete espécies de cupins: *Cyllindrotermes parvignathus*, *Cyllindrotermes flangiathus*, *Cornitermes pugnax* e *Cornitermes ovatus* da família Termitidae e *Heterotermes tenuis*, *Heterotermes crinitus* e *Coptotermes testaceus* da família Rhinotermitidae. Essas espécies foram selecionadas devido à sua alta abundância em várias localidades na Reserva Ducke, que permitiu a comparação tanto entre espécies quanto entre colônias da mesma espécie provenientes de diferentes áreas dentro da reserva. Apesar de serem espécies comuns, as espécies congêneras em *Cyllindrotermes* e *Heterotermes* possuem características muito similares, principalmente na casta dos operários, o que torna a separação de espécies quase impossível utilizando apenas a morfologia externa dos operários. Além destes gêneros, foram selecionadas outras espécies a fim de contemplar diferentes grupos e avaliar (1) a precisão do método na identificação de grupos maiores, (2) se existem diferenças na precisão do método para diferentes grupos e (3) se o método é capaz de inferir relações filogenéticas.

DESENHO AMOSTRAL

Para cada espécie de cupim foram selecionadas até 10 colônias por localidade no interior da reserva. De cada colônia, foram retirados três soldados e três operários que foram utilizados para a leitura do espectro. Como as amostras estão conservadas em álcool, para que a concentração do álcool e outras propriedades não interferissem na leitura da amostra, os espécimes foram retirados dos frascos e postos em uma placa de petri seca com papel toalha, para acelerar a evaporação do álcool e foi aguardado, de um a dois minutos para cupins pequenos e de três a quatro para cupins grandes, até que o álcool todo fosse evaporado. Em seguida foram feitas as leituras do espectro de cada indivíduo.

Para padronizar a leitura dos espectros dos indivíduos, todas as amostras sempre foram colocadas numa mesma posição. Além disso, para não haver contaminação com indivíduos de amostras diferentes, a retirada dos indivíduos sempre foi realizada, uma a uma, com todas sendo enumeradas e separadas. Esse procedimento teve por objetivo minimizar qualquer interpretação errônea das análises e facilitou a replicação dos espectros que não se enquadraram ao padrão da maioria.

Análise de dados

Primeiramente, foi feita uma análise de componentes principais (PCA) para verificar a capacidade do método em separar famílias, gêneros e espécies. Também, usando a PCA, foram plotados gráficos para tentar separar, usando as castas, as espécies.

Também, utilizando a leitura dos espectros e cada comprimento de onda como uma variável, foi criado um modelo discriminante no programa R (R Development Core Team 2013) através da função 'lda' do pacote MASS (Venables e Ripley 2002). Uma parte das amostras foi reservada e não incluída nas análises iniciais para posterior validação do modelo.

Foi utilizada a análise discriminante para prever a identidade das demais amostras somente com base nos espectros. Por fim, foi comparada a predição do modelo com a identificação já conhecida para estas amostras e verificamos a porcentagem de acertos e erros na análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PCA não obteve grande poder discriminatório em nível de família (Figura 1), havendo sempre muita sobreposição dos pontos e, na maioria dos casos, as figuras usando o primeiro e terceiro eixo de ordenação foram os que mais conseguiram separar os grupos. Apesar das figuras sempre apresentarem grande variação dos pontos, a família Rhinotermitidae sempre aparece com os pontos mais agrupados em relação à Termitidae.

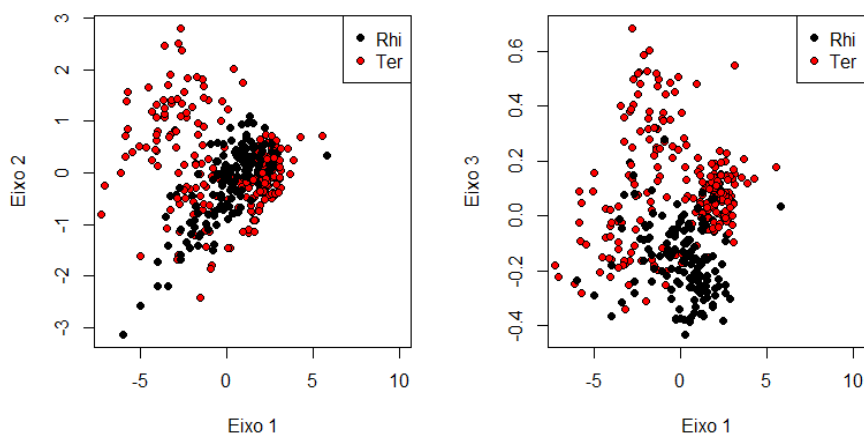


Figura 1. Plote de todos os espectros em Família (A) utilizando o primeiro e o segundo e (B) o primeiro e o terceiro eixo de ordenação. Rhinotermitidae (Rhi) e Termitidae (Ter).

Para gêneros, o resultado da PCA conseguiu separar melhor do que para família (Figura 2). Utilizando todos os espectros foi possível observar que a maioria dos gêneros ficou agrupada em pontos diferentes dos gráficos. Esse agrupamento também foi observado quando separamos as castas, sendo que, utilizando somente a casta soldado, os gêneros foram muito bem separados.

Usando os espectros somente da casta operário, o gráfico plotado com o primeiro e terceiro eixos de ordenação conseguiu separar melhor os gêneros. Apesar de a PCA conseguir separar melhor gêneros do que famílias, o gênero *Coptotermes* sempre apresentou grande variação dos pontos e, em alguns gráficos, ficou mais próximo de *Cornitermes* que *Heterotermes*, mesmo sendo da mesma família.

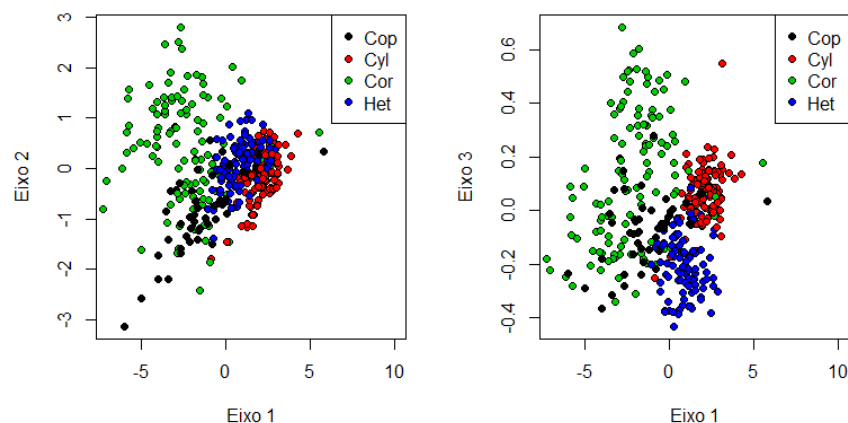


Figura 2. Plotes de todos os espectros em gêneros (A) utilizando o primeiro e o segundo e (B) o primeiro e o terceiro eixo de ordenação. *Coptotermes* (Cop), *Cylindrotermes* (Cyl), *Cornitermes* (Cor) e *Heterotermes* (Het).

A figura 3, plotada usando todos os espectros, não conseguiu separar a maioria das espécies, havendo muita sobreposição de pontos. No entanto, foi possível observar que a maioria das espécies ficou unida, sendo que, *Heterotermes tenuis*, em ambos os gráficos, aparece sempre muito agrupada e mais isolada do restante das espécies (Figura 3 b). Esse mesmo resultado é observado nas figuras 11 e 12, em que são usados os espectros das castas soldado e operário separadamente. O modelo foi capaz de distinguir com clareza esta mesma espécie utilizando ambas as castas.

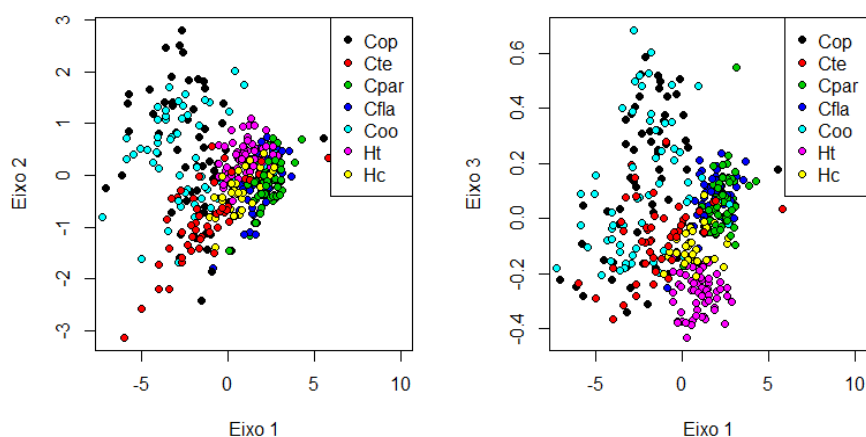


Figura 3. Plotes de todos os espectros das espécies (A) utilizando o primeiro e segundo e (B) o primeiro e terceiro eixo de ordenação. *Cornitermes pugnax* (Cop), *Coptotermes testaceus* (Cte), *Cylindrotermes parvignathus* (Cpar), *Cylindrotermes flangiatus* (Cfla), *Cornitermes ovatus* (Coo), *Heterotermes tenuis* (Ht) e *Heterotermes crinitus* (Hc).

A segunda análise testada no estudo foi o modelo discriminante. Este modelo foi criado a fim de verificar o número de acertos e erros do método na identificação das espécies. Primeiramente, foi observada a eficácia do método em separar famílias. Com 377 acertos, correspondendo a quase 99% de acerto, o método não foi capaz de separar apenas um dos espectros analisados. Os gêneros foram o segundo aspecto a ser observado na análise discriminante. Esta análise obteve 374 acertos, correspondendo a 98% do total. Por fim, o modelo discriminante foi utilizado na separação de espécies utilizando somente os espectros refletidos por cada indivíduo. O modelo foi capaz de identificar corretamente 334 amostras, correspondendo a quase 88% de acerto em nível específico.

O resultado da análise ficou próximo do resultado obtido por Durgante *et al.* (2013), que utilizou o mesmo método para identificar espécies de árvores na Amazônia. No estudo, o método foi capaz de identificar corretamente 96% das amostras testadas. Fernandes (2008) também usou o método para identificar espécies de um gênero de Diptera. No entanto, diferente do nosso estudo, o autor conseguiu extrair dos espectros apenas a parte correspondente aos hidrocarbonetos e conseguiu obter 100% de acerto quando comparando até três espécies. Na comparação incluindo nove espécies, o percentual de acertos baixou para 81%.

CONSIDERAÇÕES

A técnica do Infra Vermelho Próximo como método de discriminação de espécies para as amostras de cupim obteve um resultado muito satisfatório para família e para gênero. Em nível específico, o método foi menos eficiente, mas ainda satisfatório quando comparado a outros estudos que testaram a eficácia do método para outros grupos. Avaliamos essa técnica como uma boa ferramenta para auxiliar as descrições e identificação de espécies, nas quais as características morfológicas são as mais utilizadas. Esta poderá se tornar uma importante ferramenta para auxiliar os trabalhos taxonômicos, principalmente para a subfamília Apicotermatinae, que não possui soldados. Entretanto esta eficácia em Apicotermatinae ainda precisará ser testada.

REFERÊNCIAS

- Aldrich, B.T.; Maghirang, E.B.; Dowell, F.E.; Kambhampati, S. 2007. Identification of termite species and subspecies of the genus *Zootermopsis* using near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Insect Science*, 7: 18.
- Chopin, T.; Kerin, B.F.; Mazerolle, R. 1999. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycological Research*, 47: 167-188.
- Constantino, R. 1999. Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins (Insecta: Isoptera) que ocorrem no Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 40: 387-448.
- Constantino, R. 2012. Catálogo on-line. Disponível em: <<http://www.unb.br/ib/zoo/catalog.html>>. Acessado em 20 de julho de 2012.
- Durgante, F.M.; Higuchi, N.; Almeida, A.; Vicentini, A. 2013. Species spectral signature: Discriminating closely related plant species in the Amazon with Near-Infrared Leaf-Spectroscopy. *Forest Ecology and Management*, 291: 240-248.
- Fernández, J.I.R. 2008. *Coenosiini neotropicais (Muscidae: Diptera): taxonomia, filogenia e contribuição da espectroscopia no infravermelho próximo*. Tese. Universidade Federal do Paraná, Paraná. 154 pp.
- Grassé, P.P.; Noirot, C.H. 1954. *Apicotermes arquieri* (Isoptera): ses constructions, sa biologie: considérations générales sur la sous-famille des Apicotermatinae. *Ann. Se. Nat. Zoo I. Biol. Anim.*, 16: 345-388.
- Munck, L. 2007. A new holistic exploratory approach to Systems Biology by Near Infrared Spectroscopy evaluated by chemometrics and data inspection. *Journal of Chemometrics*, 21: 406-426.
- Pasquini, C. 2003. Near infrared spectroscopy: fundamentals practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14: 138-219.
- Perez-Mendoza, J.; Dowell, F.E.; Broce, A.B.; Throne, J.E.; Wirtz, R.A.; Feng, X.; Fabrick, J. A.; Baker, J.E. 2002. Chronological age-grading of house flies by using near-infrared spectroscopy. *Journal of Medical Entomology*, 39: 499-508.
- Perez-Mendoza, J.; Throne, J.E.; Dowell, F.E.; Baker, J.E. 2004. Chronological agegrading of three species of stored-product beetles by using near-infrared spectroscopy. *Journal of Economic Entomology*, 97: 1159-1167.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Timmins, E.M.; Howell, S.A.; Alsberg, B.K.; Noble, W.C.; Goodacre, R. 1998. Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and fourier transform-infrared spectroscopy. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 367-374.
- Venables, W.N.; Ripley, B.D. 2002. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. 495 pp.