

Software para Avaliação do Comportamento de Insetos

Introdução

A demanda social pelo meio ambiente e alimentos livres de pesticidas, herbicidas e reguladores do crescimento têm imposto à ciência um novo paradigma de exploração dos recursos naturais à disposição da agricultura. A descoberta das substâncias que intermediam as relações entre organismos, denominadas semioquímicos, associada a estudos biológicos das espécies envolvidas, pode permitir o desenvolvimento de novos produtos para uso no manejo integrado de pragas. Pesquisas com semioquímicos para o controle biológico exigem não só a identificação e isolamento dos semioquímicos, mas também o estudo do comportamento dos insetos em relação a esses semioquímicos (CASTRO et al., 2005).

Testes demonstrando a atividade comportamental dos componentes químicos são essenciais para a compreensão completa da sua função e dos mecanismos comportamentais do inseto diante ao estímulo químico, permitindo avaliar a viabilidade do uso destes semioquímicos no controle biológico (LAUMANN et al., 2005). Para isto, é necessário monitorar o comportamento do inseto, o que, tradicionalmente, é feito através da observação visual e registro manual pelo pesquisador.

A implementação de bioensaios manuais tem baixo custo e muitas vezes é a única forma de documentar alguns experimentos. No entanto, um estudo detalhado do comportamento dos insetos é um processo laborioso e sujeito a erros devido a grande subjetividade em que estão envolvidas as conclusões obtidas. O registro preciso e a análise do movimento do inseto realizado em resposta ao estímulo oferecido são difíceis, particularmente se taxas de movimento e mudanças na direção forem importantes no estudo.

Há alguns softwares que permitem o monitoramento em tempo real do inseto e medem uma série de parâmetros importantes para a análise das respostas comportamentais. Entre eles o Ethovision da Noldus (NOLDUS et al, 2002a; 2002b) e o X-bug (COLAZZA et al, 1999), são especialmente desenvolvidos para pesquisas na área de entomologia. O primeiro é um software comercial, de custo elevado, com ferramentas que permite o estudo de até 16 animais ao mesmo tempo. O segundo é um software desenvolvido pela equipe do Dr.

Steffano Colazza, para ambiente Linux, mas com código fonte não liberado e que apresenta algumas limitações como: somente insetos com comportamento e tamanho próximo ao de vespas parasitas (0,1 a 15 mm) são monitorados com precisão e eficiência, insetos maiores e com movimentos muito rápidos não são registrados.

Um sistema de alta eficiência para monitoramento do comportamento de insetos deve seguir os movimentos do inseto em tempo real e armazenar todas as informações possíveis, tais como: tempo de residência em cada área da região monitorada,

velocidade, tortuosidade e linearidade com que o inseto caminha quando estimulado. Este tipo de monitoramento é praticamente impossível de ser realizado por observação direta e registro simultâneo, sem a utilização de outro aparelho específico.

A análise por computador por meio de imagens de vídeo de animais em movimento foi

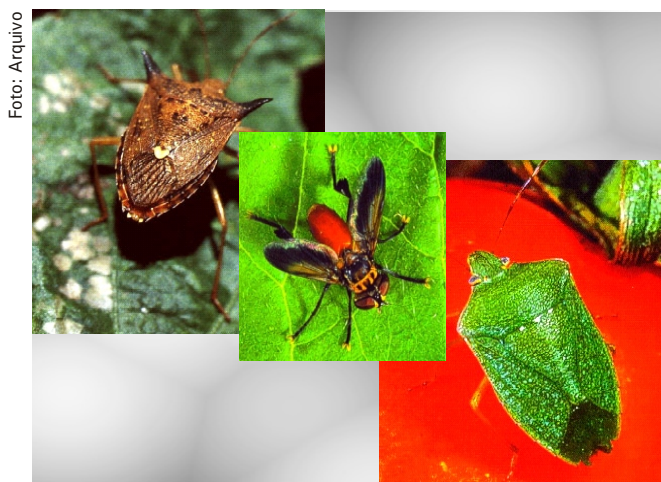


Foto: Arquivo

Autores

Lúcio André de Castro Jorge
Engenheiro Eletrônico, MSc.
Embrapa Instrumentação
Agropecuária, C.P. 741,
CEP 13560-970,
São Carlos, SP
lucio@cnpdia.embrapa.br

Raul Laumann
Biólogo, PhD,
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia,
PqEb Av. W5 Norte,
Brasília, DF - CEP:70770-900
laumann@cenargen.embrapa.br;

Miguel Borges
Biólogo, PhD,
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia,
mborges@cenargen.embrapa.br

Maria Carolina Blassioli Moraes
Química, PhD,
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia,
mcbmoraes@cenargen.embrapa.br

Rogério Alan Cruz
Bolsista FINEP, Graduando
Engenharia de Computação
UFSCar,
São Carlos, SP
alan@cnpdia.embrapa.br

Bruna Naira Milare
Bolsista Embrapa, Graduando
Engenharia de Computação
UFSCar, São Carlos, SP
brunaira@hotmail.com

Luis Palhares
Bacharel em Computação, MSc.,
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia,
palhares@cenargen.embrapa.br

estudada inicialmente por Miller et al. (1982). Desde então, muitas ferramentas vêm sendo desenvolvidas para diferentes animais. Vigneault et al. (1990) descreveram um sistema para medir bolhas em tempo real, que foi adaptado para o monitoramento de insetos. No entanto, este sistema requer um sistema de iluminação relativamente caro e praticamente não é usado pelos pesquisadores. Hoy et al. (1996) desenvolveram um software cujo algoritmo faz a comparação entre as imagens da arena sem e com o inseto, identificando o inseto pela diferença. Este é o mesmo processo usado pelo software X-bug, desenvolvido por Colazza et al. (1999) e um dos processos disponíveis no Etheovision (NOLDUS et al., 2002b).

No projeto "Desenvolvimento de um software para análise comportamental de animais em movimento", aprovado junto à chamada de software livre da FINEP e em desenvolvimento pela Embrapa Recursos Genéticos e Embrapa Instrumentação Agropecuária, está sendo desenvolvido um sistema para o monitoramento do comportamento de insetos baseado em processamento de vídeo digital. Nesta circular, está sendo apresentada apenas a versão Windows do software. No projeto, está prevista também a geração de uma versão para Linux.

O objetivo desta circular foi de apresentar a primeira versão do software desenvolvido para análise e monitoramento do comportamento de insetos por meio de imagens, quando os mesmos estão expostos a estímulos de diferentes naturezas (olfativos, visuais ou vibracionais), apresentando as diferentes etapas para uso do sistema e os diferentes cálculos efetuados.

Foram implementadas ferramentas para monitorar diferentes tamanhos de insetos em diversas situações que permitem analisar parâmetros comportamentais como velocidade, tortuosidade, velocidade linear, entre outros.

Requisitos do Sistema

Para operar o sistema é necessária uma câmera de vídeo CCD ou uma WEBCAM para registrar a área na qual o inseto está ou será inserido. A resolução do vídeo depende da qualidade da placa de captura utilizada. Para alguns casos, por exemplo, insetos maiores como os perceijos, pode ser utilizada uma WEBCAM conectada diretamente à interface USB do computador.

Além das câmeras, recomenda-se um computador pessoal Pentium 4 ou equivalente com 1GB de memória RAM e um HD de 80GB. São necessários 46.8 MB para instalação do programa.

O rastreamento dos insetos é realizado por algoritmos de detecção automática com diferentes sensibilidades, possibilitando operar com diferentes tamanhos de insetos.

Para evitar erros relacionados com as condições de iluminação, recomenda-se fortemente uma fonte de infravermelho iluminando na parte inferior do olfatómetro (Fig. 1) ou arena, que pode ser de acrílico transparente, e um filtro infravermelho na lente da câmera, de tal forma a se obter imagens menos ruidosas. Além disso, com esta fonte de luz infravermelho pode-se acompanhar experimentos durante o período noturno. Caso não seja possível este arranjo, o sistema pode operar em condições de iluminação padronizada.

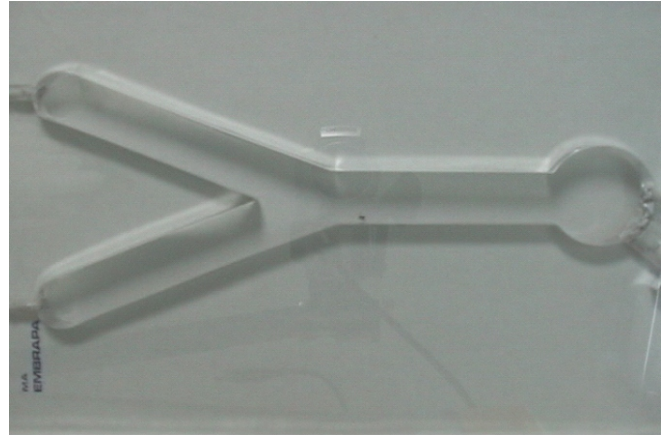


Fig. 1: Olfatómetro em Y utilizado nos experimentos de monitoramento do comportamento de insetos. Neste caso, é um olfatómetro de acrílico com três passagens de fluxo de ar através dos quais se aplica os semioquímicos em estudo.

Preparando para uso do software

Para instalar o programa, denominado de BigBrother, deve-se seguir os passos de instalação que aparecem na tela do computador assim que executado o comando *instalar*. A primeira janela, conforme apresenta a Fig. 2, é a janela para selecionar o idioma de instalação.

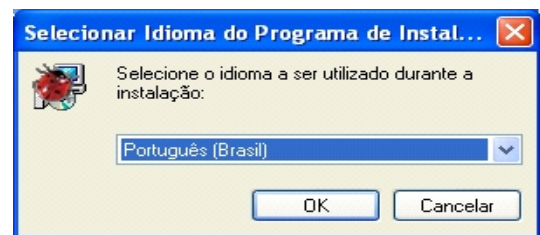


Fig. 2: Janela de seleção de idioma para instalação

Após a seleção do idioma, será exibida a tela da Fig. 3, com um texto informando o nome do programa e as instruções para continuar a instalação.



Fig. 3: Janela de informações para instalação

O programa foi elaborado de tal forma a permitir o controle de distribuição do mesmo com uma senha para instalação. No caso desta primeira versão a senha de instalação é *inseto*. Aparecerá então uma janela onde se informa a senha de instalação do software, conforme Fig. 4.

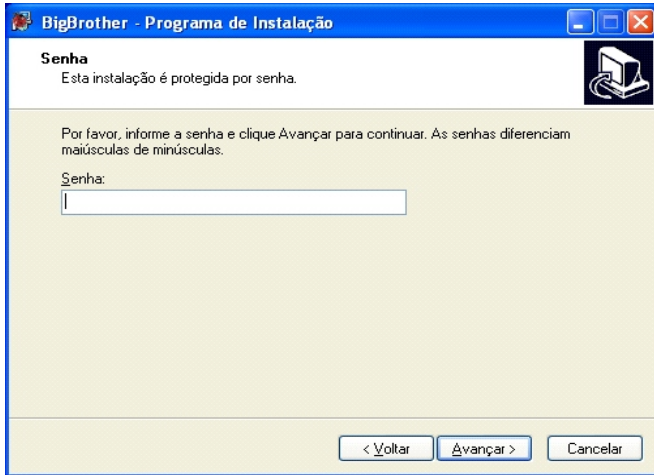


Fig. 4: Tela para entrada da senha de instalação do software

Após informar a senha do software, seleciona-se a pasta de destino para instalar o programa, conforme tela apresentada na Fig. 5. A pasta padrão é VideoMonitoramento.

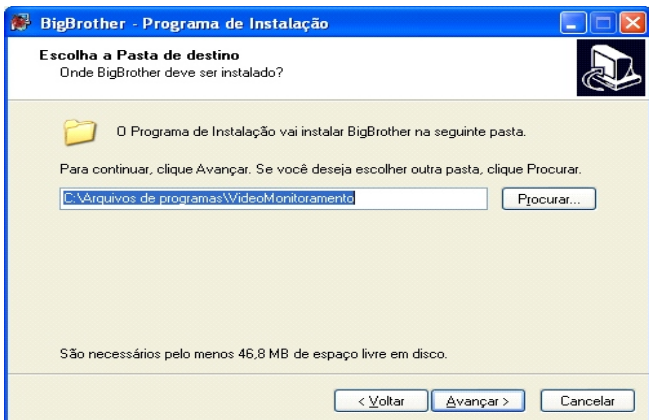


Fig. 5: Janela de escolha da pasta de instalação do software

Em seguida, são apresentadas algumas janelas típicas de instalação, finalizando com a janela da Fig. 6, onde se decide iniciar a execução do software ou não.



Fig. 6: Janela de finalização de instalação

Se a opção for por iniciar a execução do software, será exibida a tela principal do software, apresentada na fig. 7

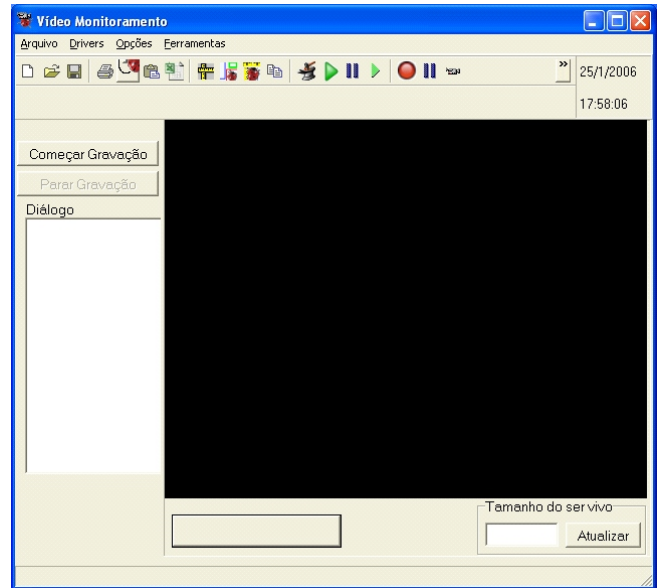


Fig. 7: Tela principal do software de monitoramento de insetos

Para iniciar uma aplicação deve ser conectada a câmera na interface USB ou na placa digitalizadora, preparada a arena ou olfatómetro e todo o experimento.

Como operar o software

Para iniciar a análise, é necessário criar uma pasta para o projeto. O conceito de pasta para o projeto foi criado para permitir que os dados de cada experimento fiquem separados e organizados. A criação de pasta é a primeira ação quando se inicia um novo projeto.

Uma vez criado o projeto, entra-se com os dados do experimento: nome, tipo de inseto a ser observado, semioquímico utilizado e temperatura do ambiente. Para exemplificar, na fig. 8 é apresentada a tela de entrada de dados com o nome do experimento teste; o inseto, mosca; o feromônio, x e a temperatura 29 graus Celsius.

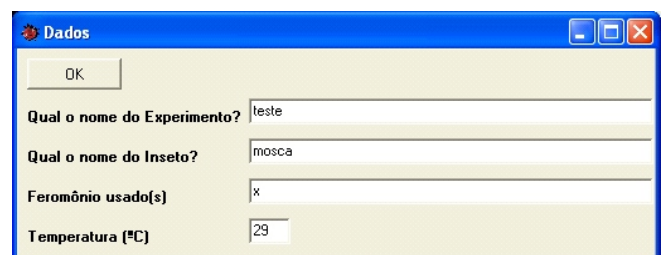


Fig. 8: Tela de entrada de dados do experimento

Outro parâmetro de entrada requerido para iniciar o experimento é a seleção da câmera de vídeo. Assim, uma vez confirmados os dados do experimento, abre-se a tela de configuração de captura da imagem, conforme Fig. 9. Na janela seguinte é realizada a seleção da câmera a ser utilizada no experimento. Como se tem a opção de mais de uma entrada, ou seja, interface USB e placa digitalizadora, deve-se selecioná-la conforme indicado a seguir.

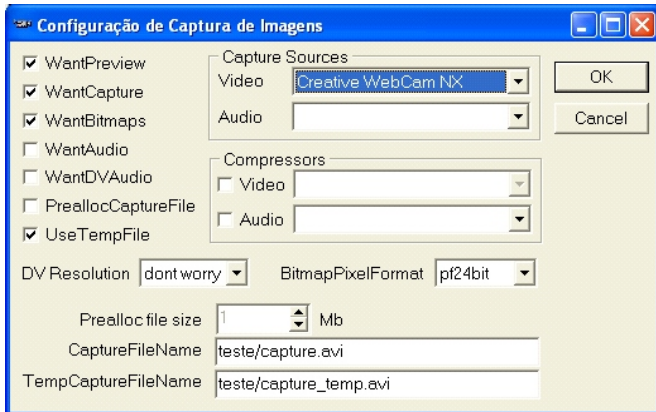


Fig. 9: Tela de configuração da câmera

A tela da Fig. 9 é uma forma padrão para utilização de vídeo e som. As opções de som ainda não estão incorporadas, mas existe previsão para inclusão de som nas versões futuras. Neste caso, deve-se apenas selecionar a fonte de captura de vídeo. Posteriormente, a resolução de cores da imagem, a resolução espacial e a taxa de captura de quadros.

Na Fig. 10 é mostrada a seleção padrão utilizada, com profundidade de cores de 24 bits, 640x480 de resolução espacial e 30 quadros por segundo. Estes valores são dependentes da placa de captura utilizada.

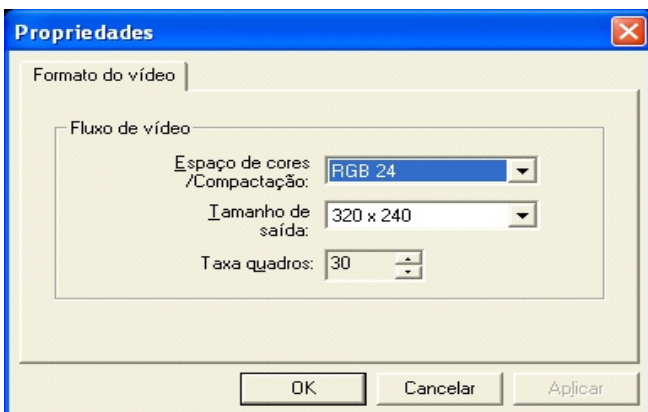


Fig. 10: Tela de definição de formato de vídeo

Uma vez definidos os parâmetros de vídeo, a câmera já inicia a captura da imagem e o próprio software indica os próximos passos. Um destes passos é a definição da escala, que é necessária pois os ajustes de posição e zoom da câmera de vídeo nem sempre são os mesmos. Com uma referência no olfatometro pode-se calibrar o sistema para os cálculos em dimensões reais.

A Fig. 11 apresenta a tela para determinação de escala. Nesta, a referência para determinação de escala pode ser visualizada com maior definição. Fazendo-se a seleção com o mouse no início e fim da referência se calcula o valor em unidades reais.

Quando se estuda o comportamento de insetos, é necessário delimitar as regiões de interesse no experimento, ou seja, a área de liberação do inseto, a área de teste de um semioquímico e a área de controle. Estas áreas variam de acordo com o experimento. Podem

ser utilizadas mais de 3 áreas dependendo do tipo de experimento e de arena utilizada.

O software foi projetado para possibilitar a seleção do número de áreas de análise de acordo com a necessidade. Na Fig. 12 é apresentada a tela de seleção de áreas e algumas áreas exemplo.

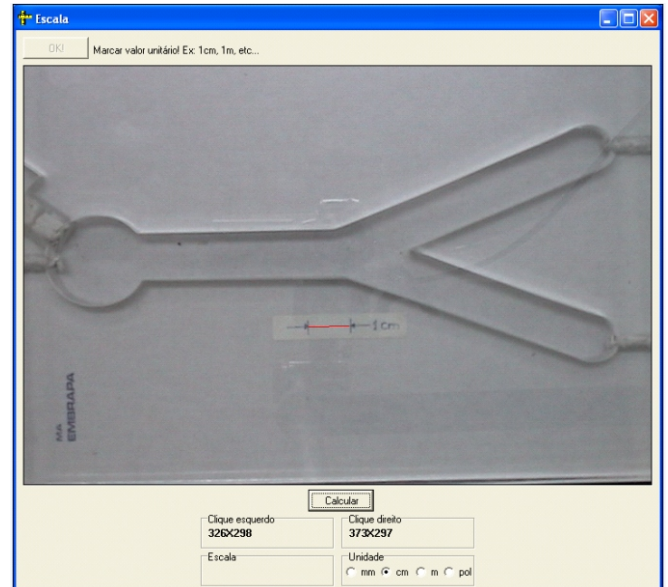


Fig. 11: Tela da interface de definição de escala

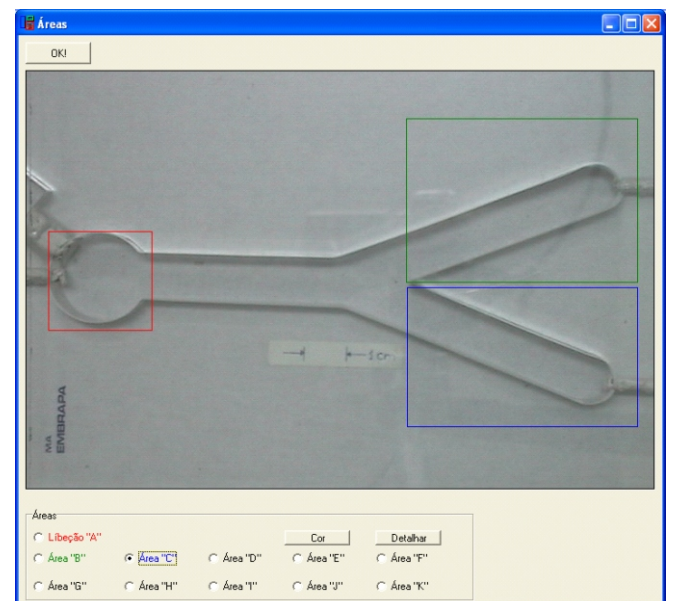


Fig. 12: Tela de definição de áreas de análise

Para delimitar a área A, basta selecionar com o mouse sobre a imagem e na opção detalhar, configura-se o nome, cor e descrição de cada área.

Depois de configurar as áreas de interesse, deve-se selecionar o tamanho de inseto a ser rastreado. Este tipo de definição é importante uma vez que o software utiliza esta informação para identificação do inseto com mais precisão. Esta informação é dada através de uma tela, como apresenta a fig. 13.

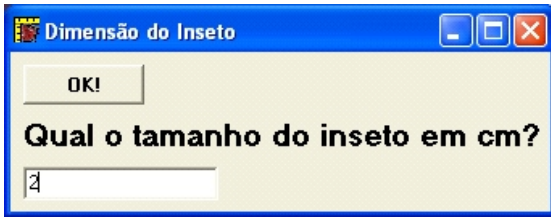


Fig. 13: Tela de definição do tamanho do inseto

Finalmente, inicia-se o monitoramento do inseto com duas telas adicionais, a primeira onde o inseto é observado circundado por um retângulo de controle (Fig. 14a) , simplesmente para facilitar a observação do mesmo, e outra janela onde é registrada a trilha percorrida por ele (fig. 14b).

O inseto começará a se mover e será obtido o seu rastro. Todas as coordenadas de deslocamento ao longo do tempo (trilha) são armazenadas.

Uma vez terminado o período de monitoramento, são efetuados os cálculos a partir dos dados armazenados. Os cálculos básicos efetuados são:

- velocidade linear de deslocamento do inseto;
- velocidade angular de deslocamento do inseto;
- tempo de permanência em cada área;
- primeira escolha de área pelo inseto;
- tortuosidade (T) é calculada por $T = 1 \text{ dm}/dt$ onde dm é a máxima distância, em linha reta, entre dois pontos da trilha e dt é o comprimento total da trilha.
- número de entradas e saídas das áreas de observação;

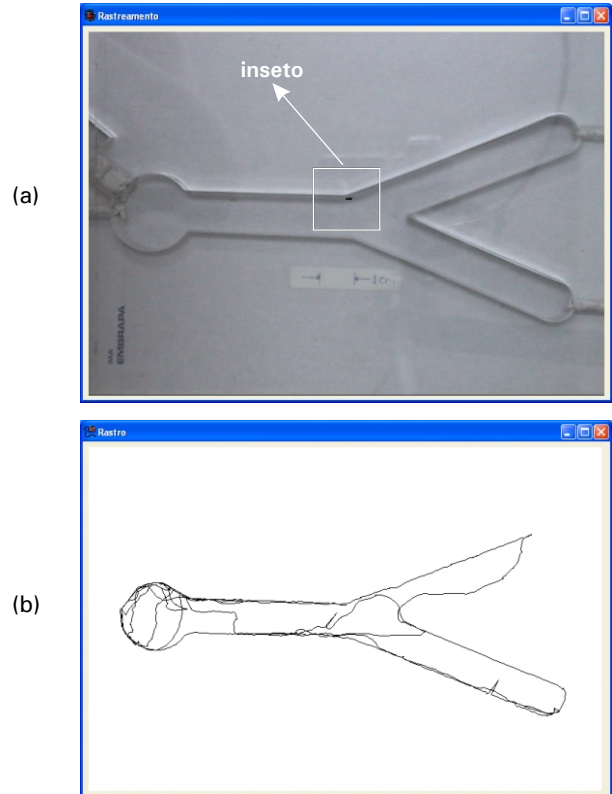


Fig. 14: (a) Tela com o inseto rastreado e (b) a trilha percorrida

Os resultados são armazenados em um relatório em formato Excel, facilitando a geração de gráficos e estatísticas adicionais. Um relatório típico é apresentado nas fig. 15 e 16.

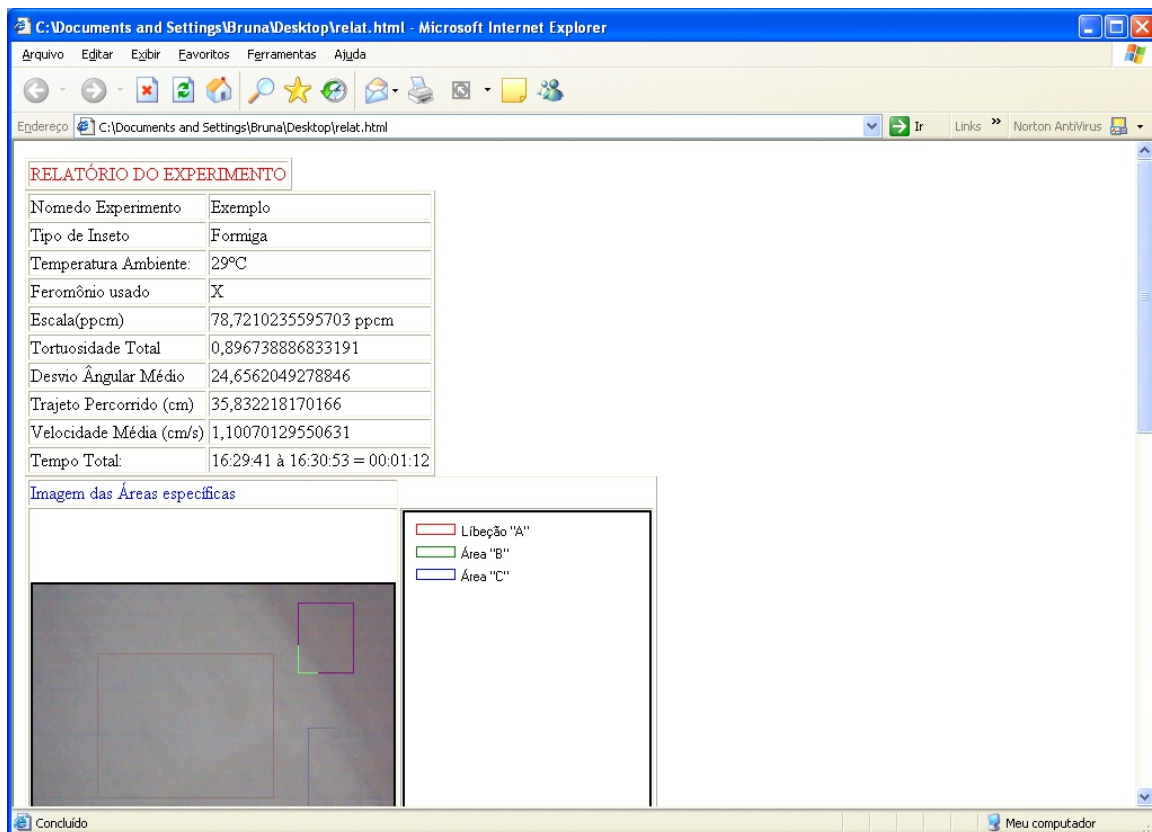
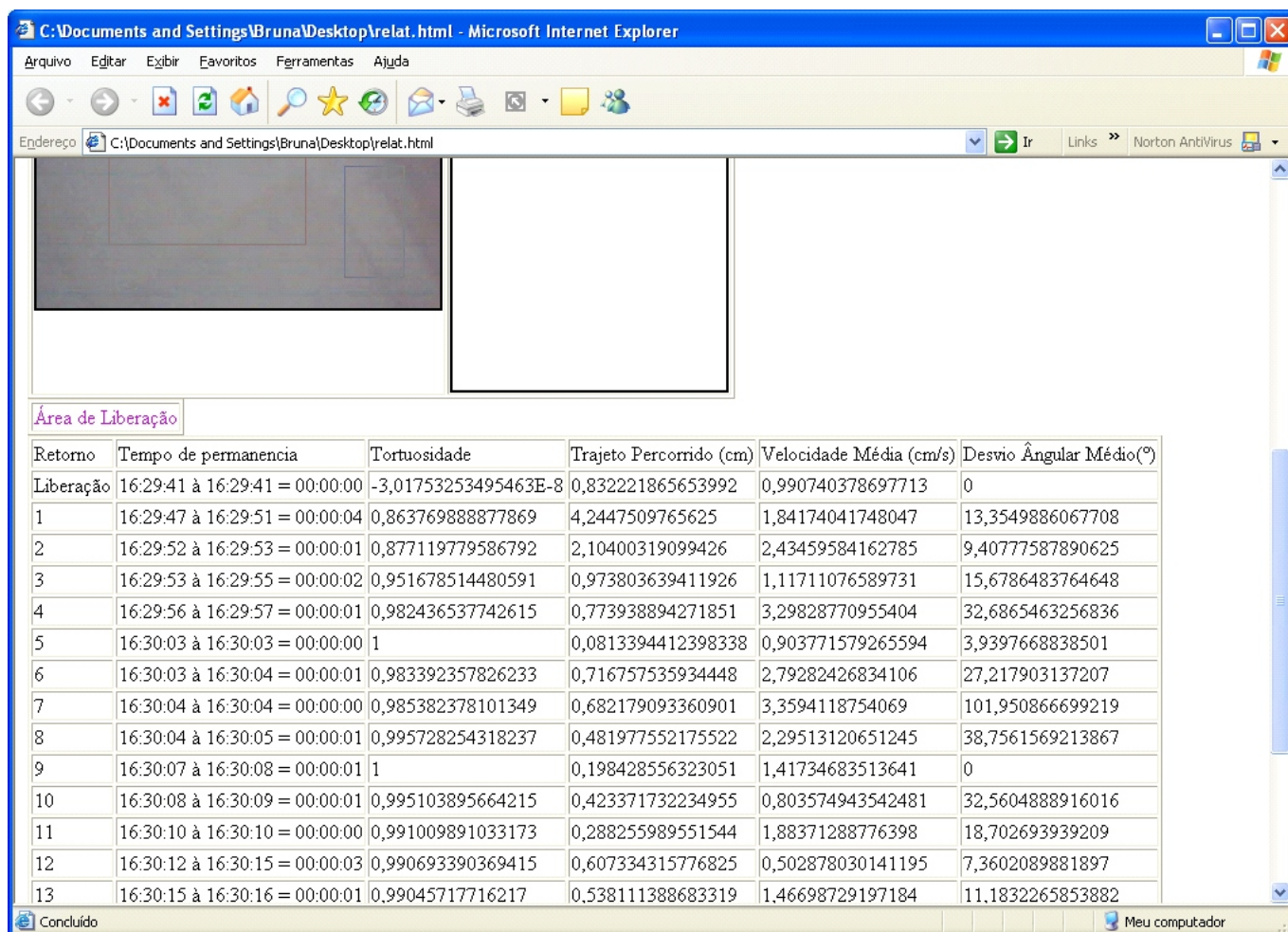


Fig. 15: Cabeçalho de um relatório típico



Retorno	Tempo de permanência	Tortuosidade	Trajeto Percorrido (cm)	Velocidade Média (cm/s)	Desvio Angular Médio(°)
Liberação	16:29:41 à 16:29:41 = 00:00:00	-3,01753253495463E-8	0,832221865653992	0,990740378697713	0
1	16:29:47 à 16:29:51 = 00:00:04	0,863769888877869	4,2447509765625	1,84174041748047	13,3549886067708
2	16:29:52 à 16:29:53 = 00:00:01	0,877119779586792	2,10400319099426	2,43459584162785	9,40777587890625
3	16:29:53 à 16:29:55 = 00:00:02	0,951678514480591	0,973803639411926	1,11711076589731	15,6786483764648
4	16:29:56 à 16:29:57 = 00:00:01	0,982436537742615	0,773938894271851	3,29828770955404	32,6865463256836
5	16:30:03 à 16:30:03 = 00:00:00	1	0,0813394412398338	0,903771579265594	3,9397668838501
6	16:30:03 à 16:30:04 = 00:00:01	0,983392357826233	0,716757535934448	2,79282426834106	27,217903137207
7	16:30:04 à 16:30:04 = 00:00:00	0,985382378101349	0,682179093360901	3,3594118754069	101,950866699219
8	16:30:04 à 16:30:05 = 00:00:01	0,995728254318237	0,481977552175522	2,29513120651245	38,7561569213867
9	16:30:07 à 16:30:08 = 00:00:01	1	0,198428556323051	1,41734683513641	0
10	16:30:08 à 16:30:09 = 00:00:01	0,995103895664215	0,423371732234955	0,803574943542481	32,5604888916016
11	16:30:10 à 16:30:10 = 00:00:00	0,991009891033173	0,288255989551544	1,88371288776398	18,7026939329209
12	16:30:12 à 16:30:15 = 00:00:03	0,990693390369415	0,607334315776825	0,502878030141195	7,3602089881897
13	16:30:15 à 16:30:16 = 00:00:01	0,99045717716217	0,538111388683319	1,46698729197184	11,1832265853882

Fig. 16: Forma de armazenamento de dados relativos às áreas de análise

Comentários finais

O desenvolvimento de um software para trabalhar com os principais insetos-praga e seus inimigos naturais presentes nas culturas brasileiras representa um grande avanço para os pesquisadores brasileiros, que atualmente fazem bioensaios visuais e manualmente.

O desenvolvimento no ambiente *Windows*, apesar de ser um sistema operacional que não é livre, se justifica uma vez que a maior parte das faculdades, escolas e institutos de pesquisa trabalham com esta plataforma. Isto não inviabiliza a liberação do código fonte e desinstalado a qualquer momento. O desenvolvimento para Linux também será conduzido, em outra fase do projeto, dada a expansão no uso deste sistema operacional nos últimos anos.

Com o desenvolvimento deste software espera-se que os pesquisadores brasileiros que trabalham na área de comportamento de insetos tenham acesso a uma ferramenta, hoje não disponível ou inacessível pelo custo, de uso geral para estudos de diferentes insetos e nas mais diversas situações, como: resposta a compostos químicos e outros estímulos, interações intra e interespecíficas, comportamento reprodutivo, comportamento de forrageamento, entre outros.

Referências Bibliográficas

- CASTRO, L. A. Imageamento com aeromodelismo para agricultura de precisão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROINFORMÁTICA, 5.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA DA INFORMAÇÃO NO AGRONEGÓCIO COMPETITIVO, 2., 2005, Londrina. [Anais...]. Londrina: SBI-Agro, 2005. 1 CD-ROM.
- COLAZZA, S.; FUCCARINO, A.; PERI, E.; SALERNO, G.; CONTI, E.; BIN, F.. A video tracking and motion analysis system for Linux. In: INTERNATIONAL ENTOMOPHAGOUS INSECT WORKSHOP, 12., 1999, Asilomar, CA, U.S.A. **Proceedings...** [S. l.: s. n.], 1999. p. 26-30.
- HOY, J. B.; KOEHLER, P. G.; PATTERSON, R. S. A microcomputer-based system for real-time analysis of animal movement. **J. of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 64, p. 157-161, 1996.
- JORGE, L. A. de C.; CRUZ, R. A.; MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R.; PALHARES, L.; BORGES, M. [Software para análise comportamental de insetos em movimento](#). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROINFORMÁTICA, 5.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA DA INFORMAÇÃO NO AGRONEGÓCIO COOPERATIVO, 2., 2005, Londrina. Anais eletrônicos... Londrina: SBI-Agro, 2005. 1 CD-ROM

LAUMANN, R. A.; MORAES, M. C. B.; JORGE, L. A. C.; CRUZ, R. A.; PALHARES, L. A.; CAETANO, L. D.; BORGES, M. Software para análises de comportamento de insetos orientados a estudos de ecologia química. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOLOGIA QUÍMICA, 4., 2005, Piracicaba, SP. 2005. **Programação e livro de resumos...** [S. l.: s. n.], 2005. p. 155.

MILLER, D. C.; LANG, W. H.; GREAVES, J. O. B.; WILSON, R. S. Investigation in aquatic behavioural toxicology using a computerized video quantification system. In: PEARSON, J. G.; FOSTER, R. B.; BISHOP, W. E. (Eds.). AQUATIC TOXICOLOGY AND HAZARD ASSESSMENT CONFERENCE, ASTM STP 766, 5TH., **Proceedings...** [Philadelphia]: American Society for Testing and Materials, 1982. p. 106-220.

NOLDUS, L. P. J. J.; SPINK, A. J.; TEGELBOSCH, R. A. J. Computerised video tracking, movement analysis and behaviour recognition in insects. **Computers and Electronics in Agriculture**, Amsterdam, v. 35, p. 201-227, 2002a.

NOLDUS, L. P. J. J.; TRIENES, R. J. H.; HENDRIKSEN, A. H. M.; JANSEN, H.; JANSEN, R. G. The Observer Video-Pro: New software for the collection, management, and presentation of time-structured data from videotapes and digital media files. **Behavior research methods instruments & computers**, Austin, v. 32, n. 1, p. 197-206, 2002b.

VIGNEAULT, C.; PANNETON, B.; RAHAVAN, G. S. V. Real-time digitizing system applied to air bubble generator characterization. **ASAE Paper**, Dt. Joseph, MI., 1990. 90-3535.

Projeto financiado pela FINEP

Circular Técnica, 30

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: 16 3374 2477
Fax: 16 3372 5958
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
www.cnpdia.embrapa.br

1a. edição
1a. impressão 2005: tiragem 300

Comitê de Publicações

Presidente: Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz
Secretária Executiva: Valéria de Fátima Cardoso
Membros: Dra. Débora Marcondes B. P. Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo

Membro Suplente: Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

Expediente

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Revisão de texto: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Editoração eletrônica: Valentim Monzane