

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELO HIDEKI WADA

DETECÇÃO DE PREDACÃO INTRAGUILDA DE *Harmonia axyridis* PALLAS
(COLEOPTERA: COCCINELLIDAE) ATRAVÉS DA
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

CURITIBA

2011

MARCELO HIDEKI WADA

DETECÇÃO DE PREDACÃO INTRAGUILDA DE *Harmonia axyridis* PALLAS
(COLEOPTERA: COCCINELLIDAE) ATRAVÉS DA
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Zoologia para a obtenção do título de mestre em
Zoologia. Departamento de Zoologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná
Orientador: Prof. Dr. Emygdio Leite de Araujo Monteiro-
Filho
Co-Orientador: Dr. Jaime Iván Rodríguez Fernández

CURITIBA

2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Wada, Marcelo Hideki

Detecção de predação intraguilda de *Harmonia axyridis pallas*
(Coleoptera: Coccinellidae) através da espectroscopia no infravermelho . /
Marcelo Hideki Wada. – Curitiba, 2011.

57 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Emygdio Leite de Araujo Monteiro-Filho

Co-orientador: Jaime Iván Rodríguez Fernández

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Joaquina (Inseto) 2. Predação (Biologia) I. Título II. Monteiro-Filho,
Emygdio Leite de Araujo III. Fernández, Jaime Iván Rodríguez IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (20. ed.) 595.769

Em memória de Armando Osamu Wada

“Se a minha teoria da relatividade estiver correta, a Alemanha dirá que sou alemão, e a França, que sou cidadão do mundo. Mas se eu estiver errado, a França sustentará que sou alemão, e a Alemanha garantirá que sou judeu”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Emygdio Leite de Araújo Monteiro-Filho por sua paciência e otimismo quase inesgotáveis, pelos conselhos valiosos nas horas mais difíceis, e por ter acreditado em mim quando tudo parecia irremediavelmente perdido. Sua visão entusiástica da natureza é inspiradora para todos que o cercam. Ela despertou em mim um lado que há muito julguei perdido e me fez compreender o que verdadeiramente está em jogo quando fazemos o que fazemos.

Ao meu co-orientador, Dr. Jaime Iván Rodríguez-Fernández por ter me apresentado todo um mundo novo de ideias e inspirações. Sua capacidade criativa e de interpretar fatos ainda está além da minha compreensão. Algumas pessoas têm a capacidade de inverter alguns conceitos já consolidados de ponta-cabeça, e fazer com que façam mais sentido a partir daí. O Jaime é uma dessas pessoas.

À minha família pelo apoio e carinho nesse longo período de estudo. Por terem sido extremamente pacientes com o solitário processo de criação, execução, análise e escrita, que essa profissão exige.

Aos grandes companheiros da salinha de alunos Pollyana Patrício-Costa, Juan Carlos Ugaz Codina e Márcia Cziulik pelo companheirismo e pela grande dedicação demonstrada às suas pesquisas. Acreditem, ao me explicarem sobre seus morcegos, copépodos e tucanos vocês me ensinaram mais sobre o meu próprio trabalho do que poderiam imaginar.

Aos colegas de curso, Diego, Sandra, Luana, Janayna, João e Flávio pela amizade, apoio e companheirismo. Aos meus amigos Vitor e Nádia pela amizade e pelas tantas vezes que me ajudaram a me salvar do “workaholismo”. Para a Nádia ainda fico em dívida com algumas dúzias de sustos inoportunos.

Aos colegas de trabalho no Biotério, professor Dr. Luís Cláudio Fernandes, Iselen Florentino Ivanoski, Luizão, Márcia, Sirlei, Diva, Ana e Douglas por terem paciência neste período em que estive dividido e me ensinarem tantas coisas novas na vida profissional.

À Simone Macedo por ter “segurado a barra” nas horas mais difíceis e ter me feito começar a diferenciar quem eu sou de quem eu gostaria de ser.

Aos professores Dr. Átila Francisco Mogor e Dr. José Henrique Pedrosa Macedo e ao sr^o João por cederem suas áreas para que eu realizasse as coletas e criação dos insetos.

À professora Dra. Silvana Nisgoski e Grazielli da Rocha pela ajuda e disponibilização dos equipamentos de infravermelho.

Ao curso de Pós-Graduação em Zoologia por me conceder a chance de realizar o trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. ESTADO DA ARTE	4
2.1 <i>Predação Intraguilda</i>	4
2.2 <i>Espectroscopia do Infravermelho Próximo (NIRS)</i>	8
2.2.1 <i>Análise de Componentes Principais</i>	11
2.2.2 <i>Análise Discriminante Linear</i>	11
2.2.3 <i>Regressão por Mínimos Quadrados Parciais</i>	11
2.3 <i>Metabolômica e aplicações</i>	12
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 <i>Coleta das espécies e criação em laboratório</i>	14
4.2 <i>Preparo das amostras</i>	15
4.2.1 <i>Preparo do macerado</i>	15
4.2.2 <i>Preparo dos intestinos e fezes</i>	15
4.3 <i>Aquisição dos espectros</i>	17
4.4 <i>Pré-tratamento</i>	17
4.5 <i>Análises multivariadas</i>	17
4.6 <i>Seleção de Outliers</i>	18
4.7 <i>Análises</i>	18
4.7.1 <i>Análise da Atividade Digestiva</i>	18
4.7.2 <i>Análise do Conteúdo Alimentar</i>	19
4.7.2.1 <i>Análise Exploratória</i>	20
4.7.2.2 <i>Teste de Homogeneidade</i>	20
4.7.2.3 <i>Testes entre Níveis</i>	21
5. RESULTADOS	22
5.1 <i>Pré-tratamento</i>	22
5.2 <i>Análises</i>	24
5.2.1 <i>Teste da Atividade Digestiva</i>	24
5.2.2 <i>Macerados</i>	25
5.2.2.1 <i>Análise Exploratória</i>	25

5.2.2.2 Teste de Homogeneidade	26
5.2.2.3 Teste entre Níveis.....	26
5.2.3 Intestinos	29
5.2.3.1 Análise Exploratória	29
5.2.3.2 Teste de Homogeneidade	30
5.2.3.3 Teste entre Níveis.....	30
5.2.4 Fezes.....	34
5.2.4.1 Análise Exploratória	34
5.2.4.2 Teste de Homogeneidade	34
5.2.4.3 Teste entre Níveis.....	34
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

Termo de aprovação

por

MARCELO HIDEKI WADA

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Programa de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Dr. Jaime Iván Rodríguez-Fernández - UFPR
Presidente e Co-Orientador



Dr. Crisleide Maria Lazzarotto – UFPR



Dr. Patricio Guillermo Peralta Zamora - UFPR

Curitiba, 27 de setembro de 2011.

RESUMO

A Espectroscopia do Infravermelho Próximo (NIRS) é uma técnica que analisa a composição molecular mediante a reflexão da luz no infravermelho (12500 cm^{-1} a 4000 cm^{-1}) do espectro eletromagnético). Na metabolômica pode ser utilizada como uma ferramenta rápida e não invasiva capaz de diferenciar organismos pelo perfil metabólico. Aqui, esta técnica detectou a predação intraguildda (IGP) pela análise de conteúdo intestinal e fecal do predador *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Exemplares de *H. axyridis* adultos de ambos os sexos foram alimentados com refeições contendo misturas de adultos de *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) e ovos de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). As refeições reproduziam níveis de IGP de 0, 25, 50, 75 e 100% dados pela concentração de ovos de *C. externa*. Foram obtidos espectros de reflectância difusa de 100 amostras de macerados das refeições, 100 de intestinos e 100 das fezes do predador utilizando um espectrofotômetro FT-IR Vertex 70. Foi analisada a faixa compreendida de 8000 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , com intervalo de 2 cm^{-1} e 32 varreduras. As análises foram feitas pelo Unscrambler v. 9.7, os espectros foram transformados de transmitância para absorvância, seguida de correção da linha base, e correção multiplicativa do sinal (log 1/R BL MSC). A Análise de Componentes Principais (PCA) dos espectros dos macerados revelou um padrão de distinção entre amostras homogêneas (0 e 100%) e heterogêneas (25, 50 e 75%) que se repetiu na análise do conteúdo intestinal e de fezes. A divisão entre amostras homogêneas e heterogêneas encontrada na análise exploratória foi utilizada como valor de referência para calibrar modelos de Partial Least Squares (PLS) e Análise Discriminante Linear (LDA). Ambos os algoritmos geraram modelos com altos valores de validação de amostras externas com macerados (100%), conteúdo intestinal (90%) e conteúdo fecal (100%). O PLS foi bem sucedido em distinguir *M. persicae* e *C. externa* com 100% de sucesso na validação de amostras externas com amostras de macerados, intestinos e fezes. Estes resultados mostram que a técnica foi capaz de prever a ocorrência de IGP em condições de laboratório. Foi inclusive possível distinguir entre alimento fresco, conteúdo intestinal e fecal. Isto sugere que mesmo após as transformações sofridas pelo alimento na passagem através do sistema digestivo, ainda é possível recuperar informações suficientes sobre a composição do alimento e da resposta metabólica do predador para reconhecer possíveis fontes alimentares.

Palavras-chave: metabolômica; conteúdo intestinal; conteúdo fecal

ABSTRACT

Near Infrared Spectroscopy (NIRS) is a technique that analyses the molecular composition by measuring infrared light reflection (electromagnetic wavelength from 12500 cm^{-1} to 4000 cm^{-1}). It may be used as a fast and non-invasive tool, capable of identify organisms by the metabolic profile in a metabolomic approach. Here, we used NIRS to access intraguild predation (IGP) levels in gut and faecal content of the predator *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Adult coccinellids of both sexes ingested *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) in different proportions. Meals reproduced IGP levels of 0, 25, 50, 75 and 100% given by the concentration of *C. externa* eggs. Spectra were obtained by diffuse reflectance of 100 samples of meal macerates, 100 of gut content and 100 from predator faeces by the spectrometer FT-IR Vertex 70. It was analyzed the range from 8000 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} , with 2 cm^{-1} gap and 32 scans. Multivariate analysis were performed with Unscrambler v. 9.7. Spectra were transformed to transmittance, followed by baseline correction and multiplicative scatter correction (log 1/R BL MSC). Principal Component Analysis (PCA) showed a remarkable pattern of distinction between homogeneous (0 and 100%) and heterogeneous (25, 50 and 75%) samples in macerates, gut and fecal analysis. The division between homogeneous and heterogeneous samples was used as reference value to calibrate Partial Least Squares (PLS) and Linear Discriminant Analysis (LDA) models. Both algorithms provided models with high rate of validation of external samples in macerates (100%), gut content (90%) and fecal content (100%). PLS was successful to distinguish *M. persicae* and *C. externa* with 100% of validation of external samples in macerate, guts and feces. These results show that the technique was able to predict IGP occurrence in lab conditions. It was possible to distinguish in fresh meals, gut content and fecal content. This may suggest that even after the food transformation in the digestive system, it was possible to recover enough information from meal composition and predator's metabolic response to recognize potential food sources.

Key-words: metabolomics; gut content; fecal analysis; predation.

1. INTRODUÇÃO

A predação intraguildd (IGP) é uma relação amplamente difundida em redes tróficas (Polis *et al.*, 1989; Polis, 2000; Lucas, 2005), capaz de afetar profundamente a ocorrência e a distribuição de presas e predadores (Meyhofer & Hindayana, 2000). Este fenômeno ocorre em sistemas nos quais dois predadores utilizam a mesma presa como recurso e ainda um deles é capaz de predar o outro (Polis *et al.*, 1989; Polis, 2000; Lucas, 2005).

A IGP é um tema de grande relevância no controle biológico, uma vez que este tem por principal objetivo controlar os níveis populacionais de pragas com a atuação de seus inimigos naturais (Hindayana, *et al.*, 2001; Parra *et al.*, 2002; Finke & Denno, 2004). Esta relação é capaz de prejudicar a coexistência dos agentes de controle biológico. Por vezes, o impacto gerado pela IGP nas comunidades resulta em níveis populacionais de insetos-praga diferentes dos esperados pela soma das ações individuais dos inimigos naturais, chegando a inviabilizar programas de controle biológico (Meyhofer & Hindayana, 2000; Lucas, 2005; Straub *et al.*, 2008). O impacto pode ser ainda maior com a introdução de espécies em programas de controle biológico clássico, podendo causar o declínio de populações nativas de parasitóides e predadores (Louda *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2009).

Apesar da relevância da IGP, existe grande dificuldade de estimar a extensão do seu impacto em comunidades de invertebrados terrestres. Os experimentos em condições controladas como arenas tendem a superestimar a frequência de ocorrência da interação em comparação a situações reais (Sato *et al.* 2008). Para estimativas mais realistas é necessário buscar evidências diretamente nos ambientes naturais (Hindayana *et al.*, 2001; Harwood & Obrycki, 2005).

A análise dos conteúdos estomacal e fecal são alternativas mais plausíveis, uma vez que extraem informações diretamente dos animais ou de seus vestígios. Desta forma, é possível conhecer as fontes alimentares dos predadores e, assim, identificar a ocorrência de IGP.

Entretanto, as ferramentas mais eficazes para análises de conteúdo estomacal ou fecal são baseadas em técnicas moleculares de custos elevados, inviáveis para serem empregadas em larga escala (Harwood & Obrycki, 2005; Lucas, 2005). Portanto, são desejáveis alternativas mais velozes, simples e de baixo custo para analisar as relações tróficas em comunidades de invertebrados terrestres.

A princípio, a tecnologia da espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS) tem potencial para ser uma alternativa promissora (Foley *et al.*, 1998). Ela se baseia na interação das moléculas com frequências de luz na faixa do infravermelho próximo (comprimentos de onda de 400 cm^{-1} a 7500 cm^{-1}) para extrair informações sobre substâncias. Esta tecnologia é veloz, possui grande

precisão, baixo custo e, por isso, é amplamente utilizada para monitorar o controle de qualidade de processos industriais (Blanco & Villaroya, 2002).

Tais características são compatíveis com as necessidades no desenvolvimento de tecnologias para a detecção de IGP em larga escala. Entretanto, ainda são necessárias evidências que comprovem sua eficiência (Foley *et al.*, 1999). Desta maneira, visando a avaliação do NIRS como uma ferramenta útil para diferenciar hábitos alimentares de predadores foram escolhidas três espécies de organismos-modelos de acordo com a facilidade de captura, criação e aceitação das presas em condições de laboratório. As espécies selecionadas foram o coccinelídeo *H. axyridis*, uma espécie invasora predadora intraguilda e também introduzida no Brasil (Martins *et al.*, 2009); o crisopídeo *C. externa* como presa intraguilda (Freitas, 2003), e como presa extraguilda o afídeo *M. persicae*, uma praga polífaga e cosmopolita (Van Emden, *et al.*, 1968).

2. ESTADO DA ARTE

2.1 Predação intraguilda

O modelo teórico ecológico utilizado no Controle Biológico foi fundamentado no conceito de níveis tróficos concebido por Hairston, Smith e Slobodkin na década de 1960 (“modelo HSS”, Rosenheim, 1998). Neste modelo, os ecossistemas terrestres estão divididos a grosso modo em três níveis tróficos discretos: produtores, herbívoros e predadores ou parasitóides. Os ocupantes de cada nível trófico só se alimentam do nível imediatamente inferior, formando uma cadeia alimentar linear. Este consumo limita as populações do nível trófico inferior, fenômeno conhecido como cascata trófica (Polis *et al.*, 2000). O Controle Biológico se baseia neste princípio ao empregar inimigos naturais (*e.g.* vespas parasitóides, joaninhas predadoras e *Bacillus thuringiensis*) na supressão de pragas. Neste caso, a abundância de inimigos naturais prevê o controle das populações de insetos-praga, em substituição ao uso de inseticidas (Parra *et al.*, 2002). Entretanto, este modelo possui inconsistências ao caracterizar os níveis tróficos de forma exageradamente reducionista (Murdoch, 1966; Ehrlich & Birch, 1967). Além disso, o modelo HSS subestima a influência da predação entre espécies pertencentes à mesma guilda, a chamada predação intraguilda (IGP) (Rosenheim, 1998).

Polis *et al.* (1989) caracterizaram a IGP e a reconheceram como um fenômeno amplamente difundido em redes alimentares. A IGP ocorre pela predação de uma espécie que utiliza um recurso alimentar semelhante, por vezes limitante. Esta relação é definida pela presença do predador

intraguilda, da presa intraguilda e da presa extraguilda (Figura 1) e, como consequência, a existência de um complexo de predadores da mesma presa não implica na supressão das populações das pragas. Ao predaar membros da mesma guilda, o predador intraguilda reduz a pressão de seleção sobre as populações da presa extraguilda, contribui para a manutenção da capacidade suporte do ambiente e aumenta sua chance de sobrevivência (Rosenheim *et al.*, 1995). Desta forma, a ocorrência da IGP depende da disponibilidade de recursos no ambiente, da especificidade e da densidade dos predadores (Polis *et al.*, 1989) e, tal como o conceito clássico predador-presa, gera grande impacto na estruturação de comunidades, capaz de moldar a distribuição, abundância e evolução dos participantes (Meyhofer & Hindayana, 2000).

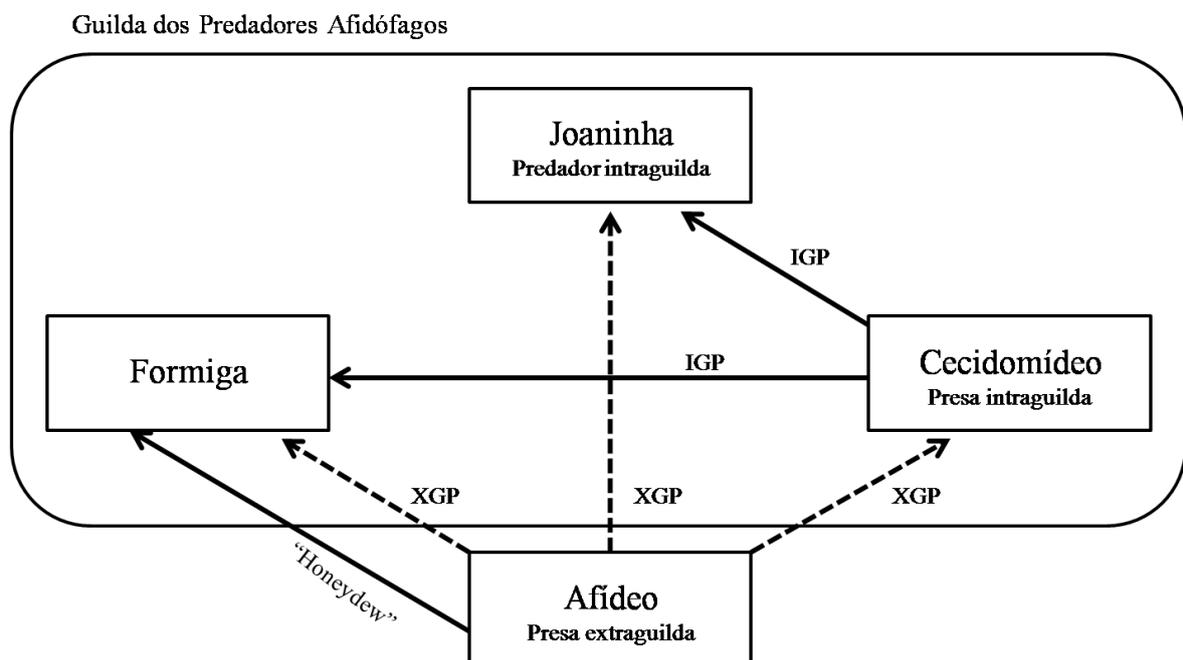


Figura 1. Exemplo de um sistema de predadores afidófagos no qual ocorre predação intraguilda (IGP) e predação extraguilda (XGP) entre formigas, afídeos, cecidomídeos e joaninhas. O consumo é indicado pela direção das flechas. Modificado de Lucas (2005).

O debate sobre as implicações da IGP é controverso quando considerado o Controle Biológico. Estudos teóricos e empíricos sugerem que a presença de múltiplos inimigos naturais no ambiente não resulta necessariamente no somatório de suas contribuições individuais no controle das pragas (Polis *et al.*, 1989; Obrycki & Kring, 1998; Hindayana *et al.*, 2001; Finke & Denno, 2004). A IGP atua na pressão de seleção da presa extraguilda e pode resultar em níveis populacionais maiores, iguais ou menores aos esperados pela soma da ação individual de cada espécie (Straub *et al.*, 2008). Esta variável pode inviabilizar programas de controle biológico e seus efeitos devem ser considerados para a supressão do nível populacional da presa extraguilda abaixo

do nível de dano econômico (Meyhofer & Hindayana, 2000; Lucas, 2005). Estratégias que utilizam inimigos naturais polífagos, como aranhas ou besouros carabídeos tendem a serem ainda mais suscetíveis à interferência da IGP (Symondson *et al.*, 2002).

Neste sentido, a guilda dos predadores afidófagos é bastante utilizada como modelo na discussão sobre os impactos causados pela IGP em comunidades de invertebrados terrestres (Obrycki & Kring, 1998; Straub *et al.*, 2008; Weber & Lundgren, 2009). Contribui a relevância econômica dos afídeos, pragas de grande relevância para cultivos em regiões temperadas (van Emden *et al.*, 1968; Ilharco, 1992) e a grande diversidade da guilda de inimigos naturais a eles associados (Frazer, 1988). Assim, a escolha do grupo como modelo de estudo de IGP também se deve às tentativas desastrosas de utilização de coccinelídeos afidófagos no controle biológico clássico (Dixon *et al.*, 1997; Louda *et al.*, 2003). O uso inicial destes predadores no controle biológico foi amplamente impulsionado pelo sucesso na importação para a Califórnia do predador neozelandês *Rodolya cardinalis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) na tentativa do controle da cochonilha *Icerya purchasi* (Hemiptera: Margarodidae) em citrus (Hodek, 1965; Obrycki & Kring, 1998). Entretanto, algumas espécies como *Harmonia axyridis* Pallas e *Coccinella septempunctata* L. mostraram-se extremamente agressivas e sua introdução causa sério risco para as espécies nativas (Koch, 2003; Hodek & Michaud, 2008).

H. axyridis, em particular, é um caso exemplar. De origem asiática, foi introduzida com sucesso em diversos países, acidentalmente ou como agente de controle em programas de controle biológico clássico para controle de hemípteros (Symondson *et al.*, 2002; Evans & Gunther, 2005; Martins *et al.*, 2009; Weber & Lundgren, 2009). Polífaga, a espécie se adaptou rapidamente a diversos ecossistemas, alimentando-se de diversas espécies de artrópodes (Koch, 2003; Evans, 2009). No entanto, em várias localidades aparentemente tornou-se uma séria ameaça às populações nativas de coccinelídeos, pois sua introdução coincide com o declínio das populações nativas de coccinelídeos (Evans, 2004). No entanto, não há consenso a respeito de qual o processo que causa a exclusão dos demais coccinelídeos (Martins *et al.*, 2009), havendo a possibilidade de que ocorra sobreposição na utilização do alimento (Evans, 2004) ou predação intraguilda (Koch, 2003).

A especificidade do predador é utilizada como um importante critério para avaliar o potencial de IGP (Kindlmann & Houdková, 2006). Experimentos de arena com ou sem chance de escolha permitem conhecer a amplitude da dieta das espécies envolvidas (Luck *et al.*, 1988; Lucas, 2005). São selecionados predadores generalistas, com maior probabilidade de atacar membros da mesma guilda como estratégia de sobrevivência (Symondson *et al.*, 2002). Aparentemente, o principal fator que define a direcionalidade da relação é o tamanho, que permite a um predador maior subjugar o outro (Polis *et al.*, 1989; Fréchette *et al.*, 2007). No entanto, observou-se que a frequência de

ocorrência da IGP em condições de laboratório tende a ser superestimada em relação às condições naturais (Sato *et al.* 2008). Tal discrepância se deve às condições artificiais criadas pelos experimentos de arena, que limitam os comportamentos de fuga e busca de refúgio da presa intraguilda (Sato *et al.* 2003). Portanto, os resultados desses testes devem ser interpretados com cautela, pois apenas informam a possibilidade de um predador subjugar o outro (Hindayana *et al.*, 2001; Harwood & Obrycki, 2005).

Evidências obtidas de amostras retiradas em condições naturais podem gerar estimativas menos tendenciosas a respeito da amplitude da dieta dos predadores. Nestes casos, a análise dos conteúdos estomacal, intestinal ou fecal do predador são alternativas úteis para estudar as interações predador-presa (Harwood & Obrycki, 2005; Calder *et al.*, 2005). Tradicionalmente, são aplicadas técnicas visuais para reconhecer os fragmentos presentes nesses conteúdos e, assim, acessar seus hábitos alimentares. Todavia, estes métodos são laboriosos e bastante imprecisos devido a variações nas taxas de digestão (Carreon-Martinez & Heath, 2010).

O desenvolvimento tecnológico tem fornecido técnicas mais sofisticadas para a identificação de material de origem biológica. Essas ferramentas são cada vez mais sensíveis e capazes de extrair informações mais precisas no estudo das dietas dos predadores (Lucas, 2005). Atualmente, as análises mais empregadas para o estudo de interações tróficas são os testes imunoenzimáticos (e.g. ELISA, Symondson *et al.*, 2002), as técnicas baseadas no DNA (Kaartinen *et al.*, 2010) e análises de isótopos estáveis (Carreon-Martinez & Heath, 2010). Elas fornecem dados quantitativos sobre as interações dos predadores com detalhamento em nível individual (Harwood & Obrycki, 2005). Desta maneira, é possível reconstruir teias alimentares e analisar a dinâmica das interações existentes entre indivíduos sem que seja necessário recorrer a generalizações de observações de espécies (Ings *et al.* 2009).

Através de abordagens quantitativas das relações tróficas é possível descrever a estruturação das comunidades e compreender o fluxo energético nas teias alimentares (Carreon-Martinez & Heath, 2010). Com estes parâmetros é possível estimar as implicações dos impactos causados pelas ações humanas e de espécies invasoras (Baiser *et al.*, 2010). Tais técnicas aplicadas ao controle biológico facilitam a compreensão das relações tróficas e detecção da frequência de IGP nas comunidades de invertebrados terrestres (Lucas, 2005). O aperfeiçoamento do controle biológico de pragas deve considerar essas informações em tentativas conciliatórias de conservação da biodiversidade com a produtividade em agroecossistemas (Symondson *et al.*, 2002; Louda *et al.*, 2003).

A despeito da grande sensibilidade, as técnicas modernas empregadas para a análise de conteúdo alimentar necessitam de equipamentos e reagentes de alto custo. Os requisitos exigidos

nem sempre são compatíveis com os recursos disponíveis para as pesquisas, o que restringe a disseminação do seu uso e limita a escala de aplicação (Foley, 2009).

2.2 Espectroscopia do Infravermelho Próximo (NIRS)

Na busca por ferramentas alternativas para acessar os recursos alimentares de predadores e evidências de IGP, nos deparamos com a espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS). Esta técnica possui a vantagem de ser rápida, de baixo custo e não-destrutiva (Perez-Mendoza *et al.*, 2002). Essas características permitiram sua ampla utilização em processos industriais, como o controle de qualidade de produtos (Landau *et al.*, 2006).

Ela se baseia em como a matéria interage com frequências de luz na faixa do infravermelho próximo (comprimentos de onda de 400 cm^{-1} a 7500 cm^{-1}). As moléculas das amostras possuem ligações químicas com momentos dipolo de acordo com a composição atômica. Quando as amostras são irradiadas por radiação infravermelha, alguns comprimentos de onda específicos excitam uma parte da molécula e altera a sua vibração, gerando um espectro característico com seus respectivos picos de absorção. A intensidade de cada pico corresponde a um comprimento de onda específico e, dessa forma, é possível reconhecer as ligações químicas (Kumirska *et al.*, 2010). A espectroscopia só é possível porque as moléculas respondem do mesmo modo quando expostas às mesmas frequências de radiação (Faber & Rajkó, 2007).

Deve ser ressaltado que o NIRS não é uma técnica nova. Os registros de uso datam dos anos 1950 (Blanco & Villaroya, 2002). Graças ao aprimoramento dos equipamentos, melhoria da capacidade computacional e das ferramentas de análise, houve um grande avanço nas possibilidades de aplicação. Em especial, o processo matemático conhecido como Transformada de Fourier contribuiu favoravelmente, permitindo que o espectro inteiro fosse analisado de uma vez. Espectroscopia do infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) significou um grande avanço e aprimorou consideravelmente a qualidade do espectro de infravermelho e reduziu o tempo necessário para obtê-lo (Kumirska *et al.*, 2010).

As equações matemáticas formuladas são denominadas modelos e o processo de desenvolvimento dos modelos é conhecido como calibração (Faber & Rajkó, 2007). Os modelos gerados permitem fazer inferências qualitativas e quantitativas sobre a composição e as propriedades de amostras de conteúdo desconhecido (Blanco & Villarroya, 2002). O número de opções é bastante grande, e sua adequação depende do objetivo proposto (Figura 2).

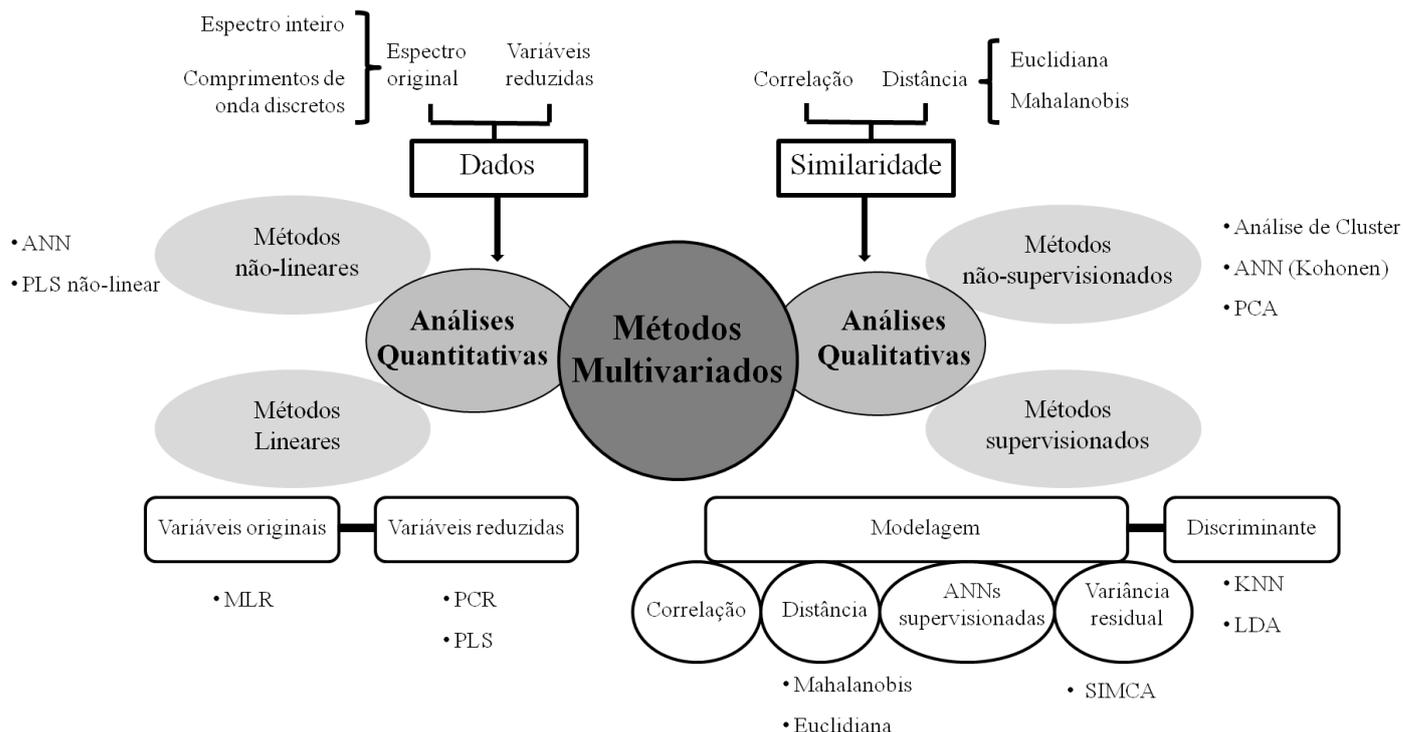


Figura 2. Classificação dos principais métodos qualitativos e quantitativos de análise multivariada usados na Espectroscopia do Infravermelho Próximo. ANN: Redes Neurais Artificiais; PCA: Análise de Componentes Principais; PLS: Mínimos Quadrados Parciais; PCR: Regressão dos Componentes Principais; MLR: Regressão Múltipla Linear; SIMCA: Análise Independente por Analogia de Classes; KNN: k-Vizinhos Mais Próximos; LDA: Análise Discriminante Linear. Modificado de Blanco & Villaroya (2002).

Entretanto, os dados espectrais possuem particularidades e requerem as ferramentas matemáticas apropriadas. Em geral, são utilizadas análises multivariadas, que visam a identificar os padrões latentes existentes entre as amostras. Para isso, são identificadas quais comprimentos de onda, as variáveis dependentes estão correlacionadas. Estas podem ser eliminadas para reduzir o conjunto de dados apenas às variáveis latentes. A partir destas são reconhecidos os padrões (Munck, 2007).

Normalmente, o número de variáveis dos espectros é muito superior ao de amostras e os dados são fortemente correlacionados (Wold, 2001; Faber & Rajkó, 2007; Moros *et al.*, 2007). Por consequência, na calibração dos modelos existe a chance de haver sobreajuste (“overfitting”). Isto ocorre quando existe excesso de parâmetros utilizados e parte do ruído existente no espectro é incluído no modelo, o que leva aos chamados “erros aleatórios” (Wiklund *et al.*, 2007). Por outro lado, se o modelo é calibrado com poucos comprimentos de onda, o número de variáveis pode ser insuficiente e levar aos “erros sistemáticos”. Em ambos os casos, a capacidade do modelo de prever as variáveis químicas é reduzida, o que significa que é preciso haver um balanço entre o

número de parâmetros utilizados para que se obtenha o modelo ótimo. Portanto, o critério de seleção de comprimentos de onda é um fator importante na escolha do algoritmo adequado (Faber & Rajkó, 2007; Wiklund *et al.*, 2007).

O processo de desenvolvimento e seleção dos modelos é auxiliado por etapas anteriores e posteriores à calibração. A etapa que a antecede é conhecida como pré-processamento. Nela, os espectros são matematicamente transformados para que possam se adequar aos métodos analíticos (Feundale *et al.*, 2002; Cheewapramong, 2007). As transformações padronizam os espectros e corrigem influências de fatores como o espalhamento da luz, tamanho das partículas, entre outros. Uma combinação efetiva de transformações é capaz de minimizar o ruído e favorecer a identificação de variação nas regiões mais informativas do espectro, isso facilita a obtenção de informações sobre as propriedades do material (Cheewapramong, 2007). Existe um repertório muito grande de transformações matemáticas, e uma escolha adequada pode aumentar significativamente o poder de predição dos modelos (Blanco & Villaroya, 2002).

As etapas posteriores à calibração dividem-se em validação e predição, e visam a testar a capacidade de predição dos modelos para aperfeiçoá-los. É preciso que estes sejam rigorosamente testados para garantir a confiabilidade e comparabilidade das medições (De Bievre, 2005; Munck, 2006). A validação interna utiliza o próprio conjunto de dados do modelo para testá-lo. Um teste bastante utilizado é a validação cruzada (Hubert & Engelen, 2006). Este é um método de re-análise conhecido como *leave-one-out*, no qual uma amostra é retirada por vez do conjunto de calibração e um novo modelo é calibrado com o conjunto restante. A amostra excluída é validada e depois adicionada novamente ao grupo. A seguir, uma nova amostra é excluída e, assim, o processo é repetido até que todas as amostras tenham sido retiradas do grupo e validadas pelo modelo (Xu, 2001; Cheewapramong, 2007).

Já na etapa de predição, os modelos são testados com o intuito de prever as propriedades de amostras de conteúdo desconhecido. As amostras independem do conjunto que foi utilizado na calibração do modelo e por esse motivo, esta etapa também é conhecida como validação externa (Cheewapramong, 2007). É possível que mesmo modelos com alto ajuste não sejam capazes de prever corretamente as amostras externas e por isso, a predição é considerada o método ideal para testar a confiabilidade dos modelos (Faber & Rajkó, 2007). No entanto, exige um número maior de amostras para compor o conjunto externo, o que nem sempre é viável para um conjunto experimental reduzido. A validação, por outro lado, consegue trabalhar com um conjunto restrito de amostras, mas tende a sobreajustar os dados (Faber & Rajkó, 2007).

Os métodos analíticos mais adequados para a quimiometria (Cheewapramong, 2007) são aqueles que conseguem trabalhar com todo o espectro de uma vez. Isso impede que sejam

descartadas variáveis que possam fornecer informações úteis. Por outro lado, a maior dificuldade dessa abordagem é que estes dados espectroscópicos são, em geral, fortemente correlacionados (Wold *et al.*, 2001). É crucial que a análise selecionada seja capaz de extrair as informações suficientes sobre as estruturas latentes dos dados e filtrar os ruídos que possam influenciar a análise (Faber & Rajkó, 2007).

Embora os métodos analíticos possuam funções relativamente simples, seu funcionamento é complexo, e nem sempre as ferramentas matemáticas são facilmente compreendidas. Aqui, serão brevemente introduzidas apenas as análises empregadas no presente estudo.

2.2.1 Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais (PCA) é um método matemático de reorganização dos dados em novos eixos. O número de variáveis do espectro é reduzido, as variáveis são combinadas e substituídas por outras novas e não correlacionadas (Davies, 2004; Davies, 2005). Os eixos ortogonais denominados componentes principais (PCs) são plotados nas direções onde os pontos se concentram e cada PC corresponde à parte da variação dos dados. Os conjuntos de eixos formam subespaços que permitem a visualização em até três dimensões, e podem ser rotacionados para evidenciar os padrões existentes entre as amostras (Munck, 2006).

2.2.2 Análise Discriminante Linear

A Análise Discriminante Linear (ADL) é uma análise multivariada semelhante ao PCA, ambas buscam encontrar a melhor combinação de variáveis para explicar os dados (Williams & Titus, 1988). Enquanto o PCA procura o conjunto de PCs que corresponda à máxima variação dos dados, o ADL é direcionado para a distinção entre os grupos (Williams & Titus, 1988). O ADL procura as combinações lineares, também conhecidas como variáveis canônicas, que maximizem as diferenças entre os grupos e minimizem as diferenças dentro do grupo (Martinez, 2001). As distâncias relativas entre os pontos no subespaço indicam o quanto eles diferem e podem ser testadas estatisticamente para definir a qual grupo pertencem (Martinez, 2001).

As variáveis preditoras são selecionadas na modelagem por um processo gradativo Passo a Passo (“Stepwise”). O método acrescenta ou retira os comprimentos de onda para encontrar a estrutura de grupos determinada (Williams & Titus, 1988).

2.2.3 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

A Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) é uma das ferramentas mais utilizadas em quimiometria. Ela utiliza um modelo de regressão linear para comparar matrizes de variáveis preditoras X com matrizes de variáveis observadas Y (Wold, 2001). Quanto maior o ajuste do modelo, maior a sua capacidade de prever os dados observados. O PLS busca encontrar a direção multidimensional no espaço X que explique a maior variação da direção multidimensional no espaço Y, sendo capaz de modelar a estrutura tanto de X como de Y (Wold, 2001). No desenvolvimento dos modelos, as variáveis preditoras são selecionadas pela análise dos coeficientes para explicar o padrão das variáveis observadas. Este passo descarta as variáveis menos informativas e é um eficiente método para filtragem de ruídos. Isto confere ao método a capacidade de analisar grandes conjuntos de dados mesmo na presença de ruídos e variáveis colineares ou incompletas (Blanco & Villaroya, 2002; Wiklund *et al.*, 2007).

Por isso, apesar deste método ter sido criado inicialmente para o desenvolvimento de modelos de economia, encontrou grande aplicação em quimiometria, onde em geral são fortemente correlacionados (Wold, 2001).

2.3 Metabolômica e Aplicações

Uma das principais características das técnicas espectroscópicas como o NIRS é a alta sensibilidade capaz de obter informações dos principais grupos funcionais presentes nas amostras. É possível detectar substâncias com diferenças de concentração de até 100 ppm (Blanco & Villaroya, 2002). A radiação eletromagnética possui poder de penetração e consegue atingir níveis além dos superficiais. Portanto, cada espectro carrega as informações sobre quase a totalidade da amostra (Munck, 2007). Isto torna possível reconhecer padrões que inicialmente não estavam evidentes.

Autores como Munck (2007), ressaltam a importância de elaborar hipóteses a partir dos padrões encontrados nos próprios espectros, com o mínimo de hipóteses definidas *a priori*. A abordagem é exploratória e flexível, e seu objetivo é que as relações encontradas entre as variáveis latentes direcionem as análises. O PCA é uma ferramenta simples e útil para este propósito pela sua capacidade de visualizar os padrões latentes (Davies, 2004; Davies, 2005).

Esta perspectiva exploratória contrasta com outros métodos mais complexos, que são pejorativamente comparados a “caixas pretas” (Munck, 2006). Esses métodos possuem mecanismos complexos e as hipóteses definidas *a priori* ignoram padrões latentes, que poderiam mudar a direção da análise e que muitas vezes permanecem desconhecidos.

A capacidade das técnicas espectroscópicas como o NIRS de obter informações sobre praticamente todas as moléculas das amostras é de grande valia para a metabolômica. Este ramo do conhecimento é uma das “ômicas” que enfatiza a distinção e quantificação de todos os compostos químicos resultantes dos processos celulares dos seres vivos (Aliferis & Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

O conjunto dos metabólitos expressos por um organismo forma um perfil característico que se traduz no espectro. Através das análises quimiométricas é possível caracterizar e reconhecer os padrões específicos que formam uma “impressão digital” metabólica própria de cada indivíduo (Gidman *et al.*, 2004). A assinatura pode sofrer influência tanto de fatores genéticos quanto ambientais (Fiehn, 2002). Diferentes partes do espectro alteram-se de maneiras distintas, e as técnicas quimiométricas são capazes de detectar a influência destas variáveis. Desta forma, a espectroscopia pode ser uma ferramenta útil para recuperar informações sobre parte da história de vida destes organismos (Gidman, *et al.*, 2004).

Com o uso do NIRS, foram observadas variações em diferentes grupos taxonômicos resultantes de processos de especiação (Rodriguez-Fernandez, 2008). A possibilidade de utilização da técnica na identificação rápida de espécies é promissora, com potencial de aplicação na taxonomia de forma semelhante ao DNA barcoding (Hebert *et al.*, 2004; Cruickshank & Munck, 2011; Rodriguez-Fernandez *et al.*, 2011). A precisão do método tem sido confirmada ao identificar complexos de espécies crípticas, como em *Anopheles gambiae* (Mayagaya *et al.*, 2009).

A capacidade de identificação de espécies também pode ser empregada em estudos ecológicos. O NIRS tem obtido sucesso em reconhecer os recursos alimentares utilizados por diferentes espécies analisando os metabólitos presentes nos conteúdos intestinais e fecais. Estas evidências mostram que é possível caracterizar a preferência alimentar da fauna silvestre com o uso do NIRS (Foley *et al.*, 1999; Gillon & David, 2001; Foley, 2009). Além disso, a ferramenta também pode quantificar a composição nutricional de alimentos utilizados pelos animais e verificar a qualidade da dieta com o espectro infravermelho (Landau *et al.*, 2006; Kidane *et al.*, 2008). Tais resultados permitem compreender as pistas utilizadas na escolha do recurso alimentar a partir da perspectiva do animal (Foley, 2009).

Estes estudos sugerem que o NIRS também poderia ser empregado para conhecer os hábitos alimentares de animais predadores, em especial, para detectar a presença de IGP. O NIRS trabalha utilizando medições de referência para a calibração dos modelos (Faber & Rajkó, 2007). Os resultados obtidos com as ferramentas moleculares de análise de conteúdo intestinal seriam úteis para fornecer os valores de referência necessários para a elaboração dos modelos. Desta maneira os métodos poderiam funcionar de forma complementar.

Com os modelos prontos, o NIRS apresenta grandes vantagens em relação aos demais métodos pela rapidez das análises e o baixo-custo dos equipamentos (Blanco & Villaroya, 2002). Assim será possível determinar os hábitos alimentares de uma grande quantidade de predadores, compreender o fluxo energético através das teias alimentares e quantificar relações tróficas como, por exemplo, a IGP.

Visando a avaliação do NIRS como uma ferramenta útil para diferenciar hábitos alimentares de predadores foram escolhidas três espécies de organismos-modelos de acordo com a abundância, criação e aceitação das presas em condições de laboratório. As espécies selecionadas foram o coccinelídeo *H. axyridis*, uma espécie invasora predadora intraguilha (Martins *et al.*, 2009); o crisopídeo *C. externa* como presa intraguilha (Freitas, 2003), e como presa extraguilha o afídeo *M. persicae*, uma praga polífaga e cosmopolita (Van Emden, *et al.*, 1968).

3. OBJETIVOS

Analisar o potencial da tecnologia do NIRS na detecção de IGP na alimentação do predador intraguilha *Harmonia axyridis* em condições de laboratório utilizando ferramentas multivariadas.

Elaborar e testar modelos com os espectros de amostras de alimentos macerados e dos conteúdos intestinais e fecais de *H. axyridis* compostos por diferentes concentrações de ovos da presa intraguilha *Chrysoperla externa* e da presa extraguilha *Myzus persicae*.

Demonstrar a capacidade de NIRS na detecção das fontes alimentares de *H. axyridis* que suportem sua utilização também em campo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das espécies e criação em laboratório

Os insetos foram coletados manualmente em plantas ou capturados com rede entomológica na horta da Fazenda Experimental do Canguiri e no Centro Politécnico, da Universidade Federal do Paraná, localizados nos municípios paranaenses de Pinhais e Curitiba, respectivamente.

As colônias de manutenção do afídeo *M. persicae* foram estabelecidas em plantas de repolho, *Brassica oleraceae* var *Capitata* L. (Brassicales: Brassicaceae), cultivadas em vasos (25 x 25 cm) com terra adubada em casa de vegetação. As plantas foram irrigadas a cada dois dias e condicionadas em gaiolas de madeira (50 x 80 x 50 cm) com aberturas teladas.

Adultos do crisopídeo *C. externa* foram capturados e mantidos individualmente em potes plásticos (7 x 5 cm) com alimentação à base de uma mistura sólida de mel e levedo de cerveja. Quando constatada a oviposição nas paredes dos potes, a fêmea foi separada e os fios de seda que sustentam os ovos foram cuidadosamente cortados. Em seguida, os ovos foram condicionados nos potes plásticos e conservados em freezer.

Os adultos do coccinelídeo *H. axyridis* coletados em campo foram criados em gaiolas cilíndricas de PVC (40 x 25 cm), com cobertura de vidro e duas aberturas laterais revestidas com tela de nylon (30 x 30 cm), e alimentados com uma mistura sólida de mel com levedo de cerveja.

4.2 Preparo das amostras

4.2.1 Preparo do macerado

Os afídeos e os ovos de crisopídeos tiveram as médias de peso fresco estimadas na balança eletrônica (Bioprecisa, Balança Eletrônica, Curitiba, PR, Brasil) com precisão de 0,01 mg. Foram formados cinco grupos de amostras de 2 mg cada. Os grupos representaram níveis crescentes de predação intraguilada de acordo com a representatividade dos ovos de crisopídeo existentes na amostra. Foram formados dois grupos homogêneos, um com afídeos (0%), outro com ovos de crisopídeos (100%) e três heterogêneos, com misturas nas proporções de 1:3 (25%); 2:2 (50%); 3:1 (75%) (Figura 3). Em seguida, as amostras foram maceradas com um bastão até a formação de massas uniformes. Foram obtidas aproximadamente dez repetições de cada nível, totalizando 47 amostras. As amostras foram desidratadas em estufa a 40°C por 24 h para posterior análise.

4.2.2 Preparo dos intestinos e fezes

A etapa de alimentação dos coccinelídeos foi realizada em sala de criação à temperatura de 25°C±3°C, umidade relativa de 80±10% e fotofase de 12 h. Primeiramente, duzentos exemplares de *H. axyridis* de cada sexo foram individualizados em potes plásticos (7 x 5 cm) e mantidos em jejum por 48 h. Cinquenta fêmeas e cinquenta machos foram sacrificados, dissecados e tiveram os intestinos retirados e desidratados em estufa à 40°C por 48 h. Os demais coccinelídeos foram colocados individualmente em placas de petri (7 cm de diâmetro) com papel filtro e foram ofertadas refeições de peso fresco de 2 mg compostas por afídeos e ovos de crisopídeos em diferentes concentrações. Assim como na etapa de obtenção dos macerados, foram separados cinco grupos com níveis crescentes de predação intraguilada de acordo com a representatividade dos ovos de

crisopídeo existentes na amostra: um apenas com dieta de afídeos (0%), um com ovos de crisopídeos (100%) e três com misturas nas proporções de peso de 1:4 (25%), 2:4 (50%) e 3:4 (75%). Os coccinelídeos dispuseram de acesso ao alimento por 24 h quando, então, foram sacrificados, dissecados e também tiveram os intestinos retirados e desidratados em estufa a 40°C por 48 h.

Assim como foi feito com os intestinos, as fezes de cada indivíduo foram coletadas e separadas de acordo com o tratamento (Figura 4). Em seguida foram desidratadas a 40°C por 48 h.

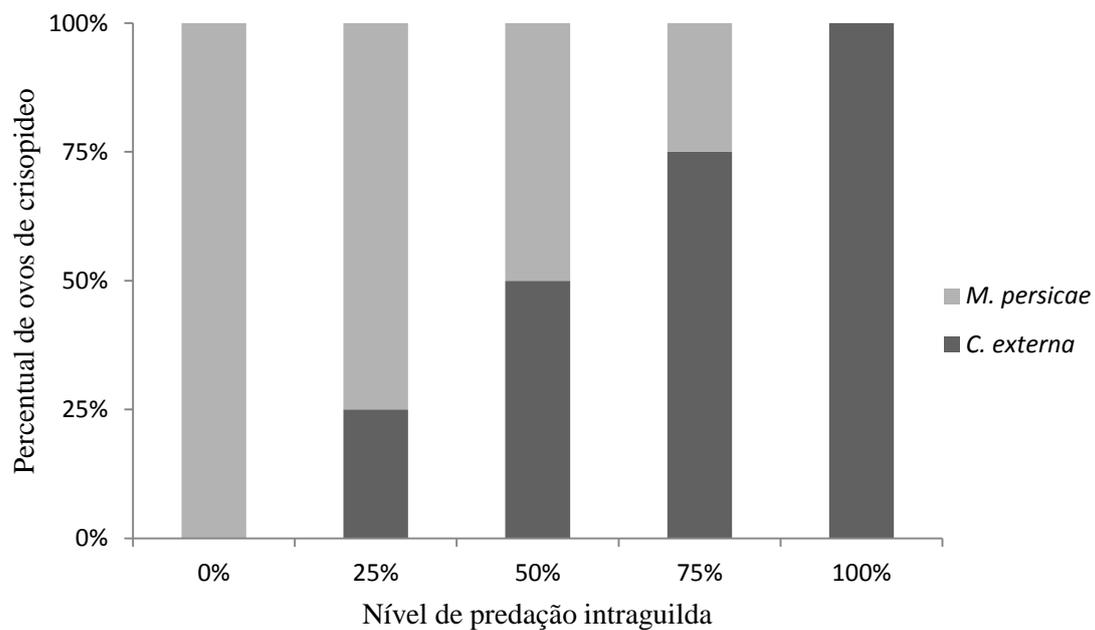


Figura 3. Divisão do alimento preparado com o afídeo *Myzus persicae* e ovos do crisopídeo *Chrysoperla externa* nos níveis de 0%, 25%, 50%, 75% e 100% de predação intraguilda, definidos pela concentração de ovos de *C. externa*. Peso total por amostra de 2 mg.

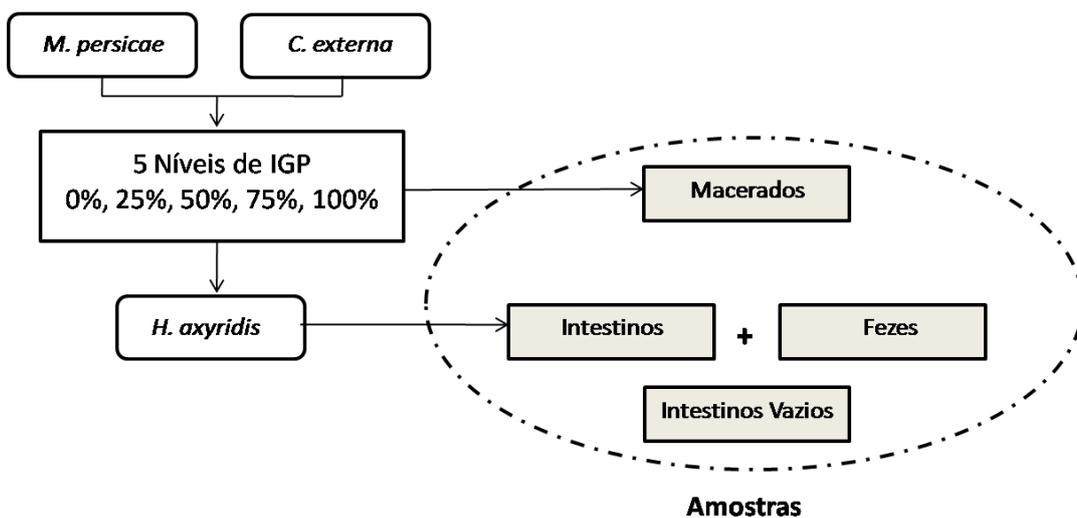


Figura 4. Fluxograma de preparação da amostra para *Harmonia axyridis* usando *Myzus persicae* e ovos de *Chrysoperla externa* em cinco níveis de Predação Intraguilda, resultando em amostras de macerados, intestinos, fezes e intestinos vazios.

4.3 Aquisição dos espectros

As amostras foram medidas em um espectrofotômetro FT-IR Vertex 70, equipado com esfera de integração. As amostras foram analisadas na faixa espectral compreendida entre 8000 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} , com intervalo de 2 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos de médias de 32 varreduras com o software de espectroscopia OPUS v. 6.5.

4.4 Pré-tratamento

Os espectros foram transformados com o programa Unscrambler v. 9.7. Previamente foram testadas diversas combinações de transformações com o intuito de reduzir o ruído, padronizar as amostras e aumentar o ajuste dos modelos (Cheewapramong, 2007; Rinnan *et al.*, 2009) Estas incluíram: derivação de 1º e 2º grau, alisamento, normalização, redução de ruído, entre outras disponibilizadas pelo programa.

Os melhores modelos foram obtidos utilizando a fórmula log 1/R BL MSC: transformação de transmitância para absorbância (log 1/R); seguida de correção de linha base (*Baseline offset*, BL); e correção multiplicativa do sinal (*Multiplicative Scatter Correction*, MSC). Esta fórmula foi elaborada a partir da modificação da transformação log 1/R MSC utilizada por Munck (2006).

4.5 Análises multivariadas

Os modelos de Análise dos Componentes Principais (PCA) e Método dos Quadrados Mínimos Parciais (PLS) foram calibrados com o programa Unscrambler v. 9.7 e a Análise Discriminante Linear (ADL) com o programa JMP v. 7.0. O PLS e o PCA foram testados para validação cruzada. Para o PLS e a ADL foram deixadas de fora duas amostras de cada grupo para serem validadas externamente.

Os parâmetros utilizados para a seleção dos modelos mais adequados com PLS foram: número de variáveis latentes, valor de interseção da reta, erro médio quadrático da calibração (RMSEC), ajuste da reta (R^2); erro médio quadrático da validação (RMSEV), erro padrão da predição (SEP) e porcentagem de acerto na predição de amostras externas (% de acertos). Os

parâmetros utilizados para a escolha dos melhores modelos com ADL foram: porcentagem de acerto da calibração, número de comprimentos de onda e valor de Wilk's Lambda.

A sequência de preparação dos espectros, calibração, validação e predição estão esquematizados no fluxograma na Figura 5.

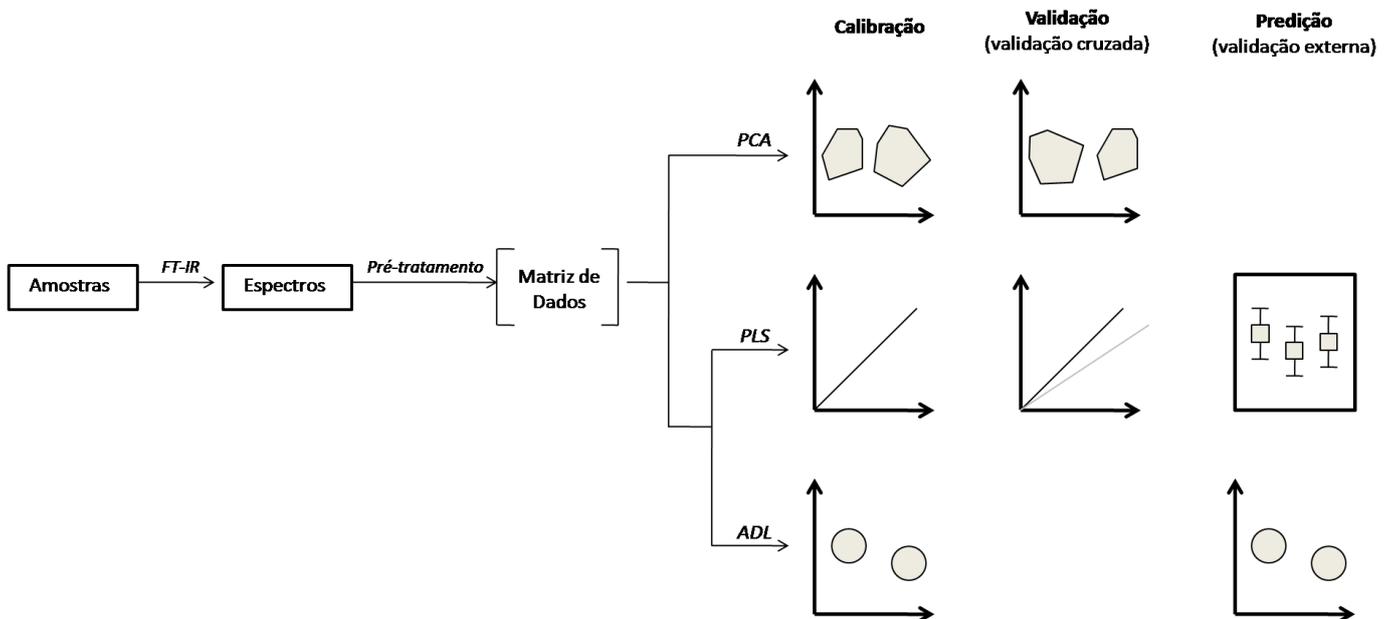


Figura 5. Fluxograma com a ordem de obtenção dos espectros (*Fourier Transformed Infrared*, FT-IR), pré-tratamento, calibração, validação e predição dos modelos através da Análise de Componentes Principais (PCA), Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e Análise Discriminante Linear (ADL).

4.6 Seleção de outliers

Os pontos extremos foram detectados durante a calibração com PLS pela observação da influência de cada variável, de acordo com a variância residual e de leverage, seguindo as recomendações de Munck (Kjeldahl & Bro, 2010) para que não influenciassem negativamente o poder de predição dos modelos. As amostras foram identificadas como *outliers* pelo PLS através da análise de resíduos também foram excluídas com ADL.

4.7 Análises

4.7.1 Análise da Atividade Digestiva

Utilizando PLS, foram obtidos modelos para discriminar intestinos de coccinelídeos em jejum dos intestinos de coccinelídeos que foram alimentados. Na etapa de calibração, foram utilizados os

intestinos vazios (n=80) e intestinos de predadores alimentados com dietas com cinco níveis de IGP, 0%, 25%, 50%, 75% e 100% (n=89). Para a validação externa foram utilizados vinte intestinos de coccinelídeos em jejum e 20 intestinos de coccinelídeos que haviam se alimentado, quatro para cada nível de IGP.

4.7.2 Análise do Conteúdo Alimentar

Para acessar a totalidade dos dados de conteúdo alimentar foi empregada uma estratégia cíclica de análise. Para tanto, a capacidade exploratória do PCA foi utilizada com o objetivo de evidenciar os padrões emergentes.

Conforme a Figura 6, cada volta no ciclo representa a exploração dos dados na busca por padrões latentes no espaço multivariado. Os padrões encontrados ao final do ciclo servem para a elaboração de novas hipóteses secundárias. Os dados podem ser analisados novamente com PCA, percorrendo mais uma volta no ciclo à procura de outras hipóteses. Alternativamente, é possível testar as hipóteses encontradas com métodos de classificação, como o PLS (Wold & Sjostrom, 2001; Munck, 2006). Neste caso, os padrões emergentes foram encontrados com PCA e então testados com PLS e ADL.

Para analisar o conteúdo alimentar de *H. axyridis*, cada análise calibrou os modelos para as etapas de macerado, intestino e fezes separadamente. As análises também consideraram a influência do sexo dos insetos, por isso os modelos foram calibrados para machos e fêmeas em conjunto e separadamente.

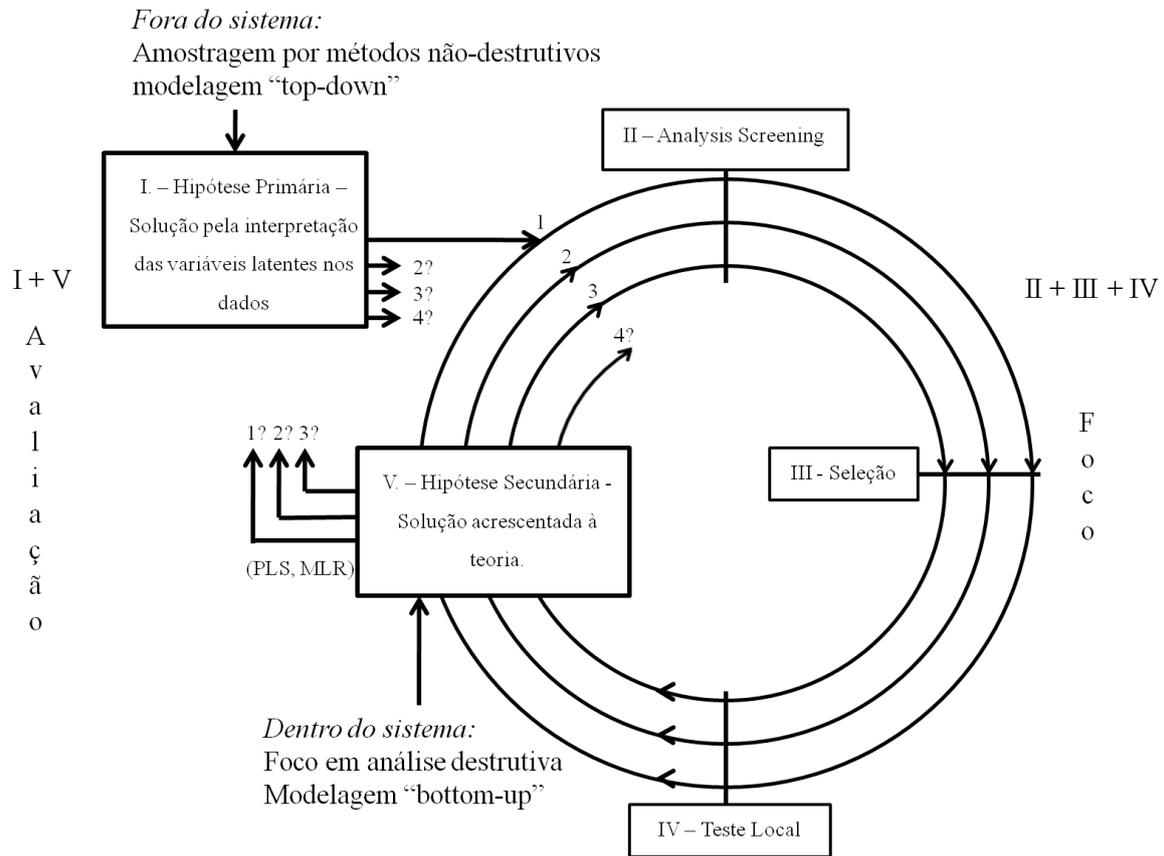


Figura 6. Ciclo de seleção de variáveis latentes modificado de Munck (2006). As setas representam hipóteses, que podem ser testadas de forma cíclica em diversas etapas pelas ferramentas de modelagem. Análises geram novas hipóteses, que podem ou não serem testadas de forma cíclica novamente.

4.7.2.1 Análise Exploratória

O PCA foi utilizado como ferramenta exploratória para evidenciar padrões entre as amostras. Foram analisados os espectros das amostras com os níveis de IGP de: 0 e 100%; 0, 50 e 100%; 0, 25, 50, 75 e 100%; e 25, 50, 75%.

Todos os resultados foram testados com validação cruzada.

4.7.2.2 Teste de Homogeneidade

O padrão de divisão de observado na Análise Exploratória foi testado qualitativamente através do Teste de Homogeneidade. Os espectros do alimento macerado foram separados em dois grupos de acordo com a homogeneidade das dietas ofertadas ao predador. Foram consideradas homogêneas as amostras que continham apenas uma das espécies de presa (*M. persicae* ou *C. externa*) e heterogêneas as misturas entre as espécies (Figura 7). Esta divisão foi utilizada como valores de referência para os modelos calibrados com PLS e ADL.

Desta maneira, os espectros das dietas homogêneas (0% e 100%) foram comparados aos das heterogêneas (25%, 50% e 75%). Em seguida, foi feita a comparação entre os espectros da dieta homogênea de afídeos (0%) e de ovos de crisopídeos (100%); e entre as heterogêneas de 25%, 50% e 75% e entre as amostras de 0%, 50% e 100%. Este processo foi repetido separadamente para intestino e fezes.

Para verificar a capacidade de predição dos modelos foram realizados testes de validação cruzada e predição com amostras externas. Para o PLS ambos os testes foram possíveis, já para ADL, foi feita apenas a predição.

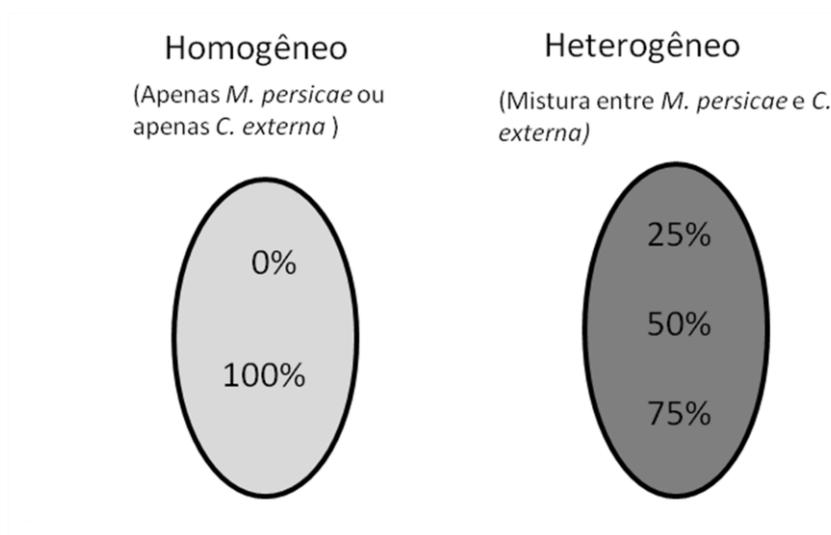


Figura 7. Representação da divisão entre conteúdos homogêneos e heterogêneos encontrados na análise exploratória com PCA e utilizados como valores de referência para os modelos com PLS e ADL. Foram consideradas homogêneas as amostras com apenas *Myzus persicae* (0%) ou apenas *Chrysoperla externa* (100%), e heterogêneas as misturas entre ambas (25%, 50% e 75%).

4.7.2.3 Testes entre Níveis

Neste grupo de testes, os modelos foram ajustados para distinguir quantitativamente entre os diferentes níveis de IGP utilizando PLS e ADL. Os modelos serviram para comparar as dietas contendo apenas *M. persicae* e *C. externa* (0 e 100%); as duas espécies, incluindo os níveis intermediários (0, 50 e 100% e 0, 25, 50, 75 e 100%); e apenas os níveis intermediários (25, 50 e 75%). Foram calibrados modelos que compararam separadamente os espectros das etapas de macerados, intestinos e fezes.

Novamente, a estabilidade dos modelos foi verificada através de testes de validação cruzada e predição com amostras externas. Ambos os testes foram realizados para PLS, mas para ADL foi testada apenas a predição.

5. RESULTADOS

Ao todo, foram obtidas 312 amostras: 109 intestinos e 103 fezes de *H. axyridis* com alimentação em cinco níveis (Tabela 1) e 100 amostras de intestinos de machos e fêmeas em jejum.

Tabela 1. Número de amostras de intestinos e fezes de machos e fêmeas de *Harmonia axyridis* 24 h após a alimentação e de macerados. Os grupos 0%, 25%, 50%, 75% e 100% referem-se à concentração crescente dos ovos de crisopídeo que representam os diferentes níveis de predação intraguildd (IGP).

Níveis de IGP	Macerado	Intestino		Fezes	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0%	10	10	12	10	10
25%	11	9	11	9	11
50%	9	10	13	11	12
75%	10	10	12	11	10
100%	7	12	10	10	9

5.1 Pré-tratamento

Os espectros de macerado, conteúdo intestinal, e conteúdo fecal geraram perfis distintos, conforme os exemplos ilustrados na Figura 8-a. Os dados foram então transformados matematicamente com o pré-tratamento ($\log 1/R$ BL MSC), para corrigir os efeitos de espalhamento da luz e tamanho das partículas (Figura 8-b).

Os espectros apresentaram picos de absorção em 5774 cm^{-1} e 5657 cm^{-1} referentes ao estiramento do primeiro harmônico da ligação C-H; em 4841 cm^{-1} e 4578 cm^{-1} devido à combinação do estiramento da ligação N-H; e em 4321 cm^{-1} e 4255 cm^{-1} devido à combinação do estiramento da ligação O-H e C-H (Stuart, 2004).

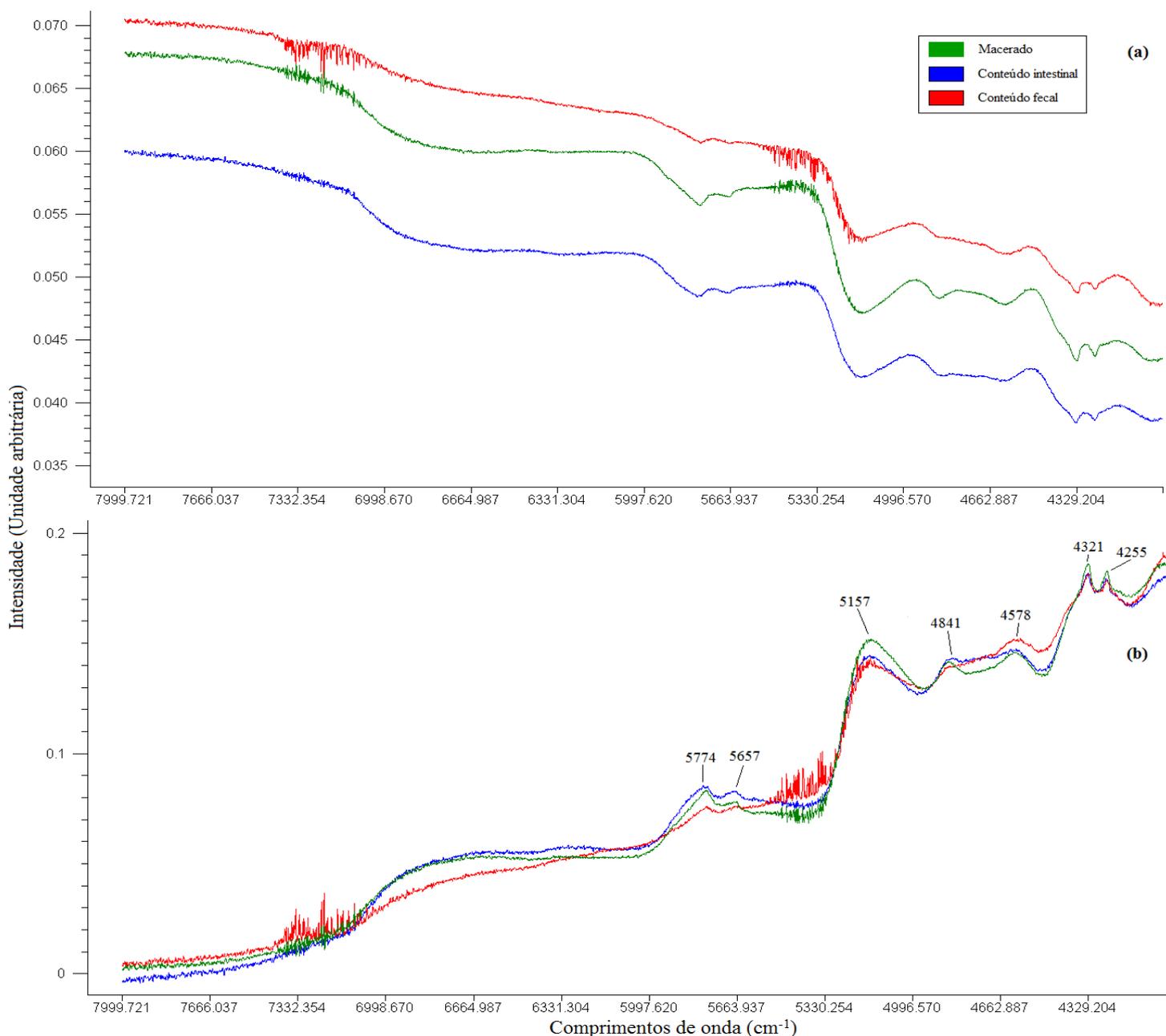


Figura 8. Visão geral ($8000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) do perfil de: (a) três espectros originais do macerado dos alimentos e conteúdo intestinal e fecal de fêmeas de *Harmonia axyridis*; (b) três espectros após o pré-tratamento com conversão para absorvância, correção da linha base e correção multiplicativa do sinal ($\log 1/R$ BL MSC). Destaque para os picos de absorção. Todas as amostras com conteúdo apenas de afídeos (0% de IGP).

5.2 Análises

5.2.1 Teste da Atividade Digestiva

O modelo de calibração obtido com PLS para avaliar a presença de atividade digestiva de *H. axyridis* apresentou alto valor de correlação de ajuste da reta ($R^2 = 0,948$) e RMSEC de 11,3. Foram obtidos altos valores de ajuste da reta para modelos de validação ($R^2 = 0,891$; e RMSEV = 16,6) e de predição (validação externa), com 38 acertos em 40 amostras externas (95,0%; e SEP = 37,1) (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de interseção, erro médio quadrático (RMSE), erro padrão da predição (SEP) e R^2 dos modelos de calibração, validação do teste de atividade digestiva entre os intestinos de *Harmonia axyridis* cheios e vazios. Modelo com 8 variáveis latentes. Predição (validação externa) com 38 acertos para 40 amostras (95,0%). Metade das amostras de cada sexo.

	Intestinos vazios	Intestinos cheios	Interseção	RMSE	SEP	R²
Calibração	80	89	2,72	11,3	-	0,948
Validação	20	20	8,14	16,6	-	0,891
Predição			-	-	37,1	-

O modelo de calibração da Análise Discriminante Linear com intestinos cheios e vazios separou as amostras com 97% de acerto (Wilks' Lambda = 0,283; $F < 0,0001$), conforme a Figura 9. Todavia, a predição externa obteve menor taxa de acerto (68,8%) com mais erros na predição dos intestinos com conteúdo; cinco erros para apenas um de intestino vazio.

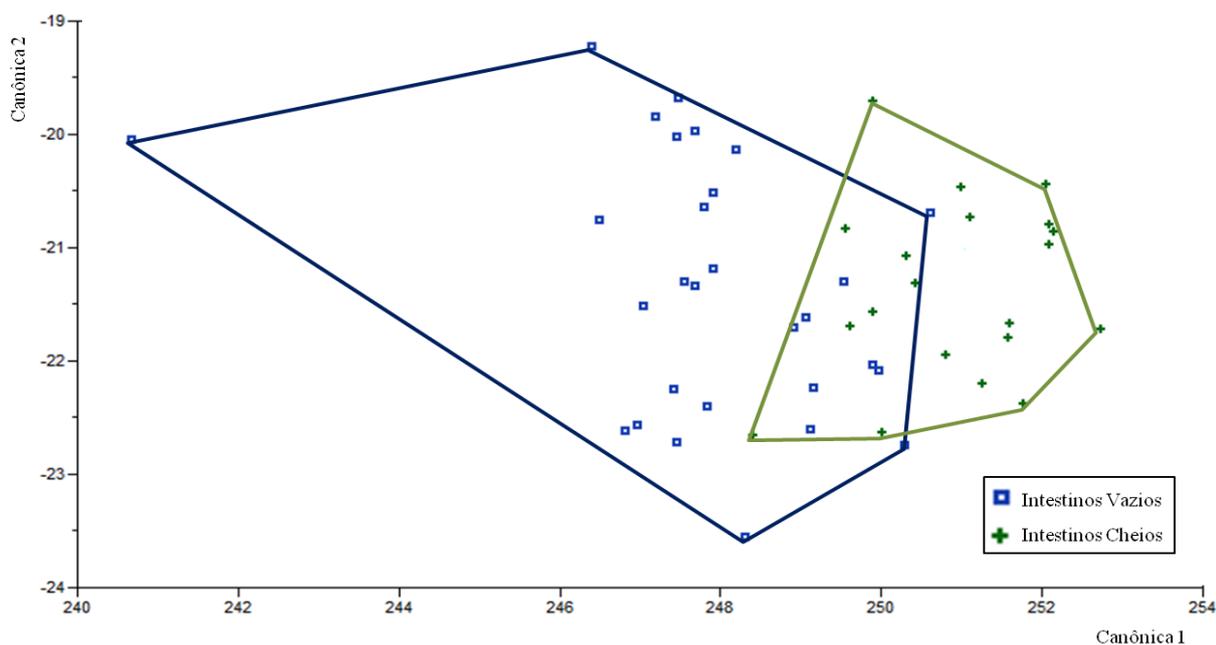


Figura 9. Análise Discriminante Linear do conteúdo intestinal de *Harmonia axyridis* alimentados (Intestinos Cheios) e em jejum (Intestinos Vazios) (Wilks' Lambda = 0,283; $F < 0,0001$). Calibração com 14 intestinos vazios e 4 amostras de intestinos cheios de cada um dos 5 níveis de IGP (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). Amostras da predição com 6 intestinos vazios e 2 amostras de intestino de cada um dos 5 níveis de IGP. Metade das amostras de cada sexo.

5.2.2 Macerados

5.2.2.1 Análise Exploratória

O PCA dos alimentos foi capaz de distinguir entre os macerados de *M. persicae* e dos ovos de *C. externa* como observado na comparação entre as amostras com nível de IGP de 0% e 100% (Figura 10-a). Quando estes macerados de crisopídeo e afídeo foram comparados à mistura de 50%, foi constatada a formação de dois grupos: o primeiro das amostras puras de *M. persicae* (0%) e *C. externa* (100%) e o outro da mistura com nível de 50% de IGP (Figura 10-b). O padrão se repetiu com o PCA quando analisados os cinco níveis simultaneamente, no qual se observou a separação entre as composições homogêneas de 0% e 100% e heterogêneas, de 25%, 50% e 75% (Figura 10-c). Esse padrão detectado de separação entre amostras puras e misturas foi utilizado como referência nas análises denominadas Testes de Homogeneidade (HxH). Quando analisadas com PCA apenas as amostras heterogêneas, não foi encontrado nenhum padrão evidente (Figura 10-d).

5.2.2.2 Teste de Homogeneidade

A análise dos alimentos macerados utilizando PLS resultou em alta correlação e baixo erro médio quadrático para todos os modelos de calibração ($R^2 > 0,99$; $RMSEC < 5$) e validação ($R^2 > 0,97$; $RMSEV < 8$) (Tabela 3). Os modelos do teste de homogeneidade (HxH 0; 100% x 50% e HxH 0; 100% x 25; 50; 75%) foram capazes de predizer o conjunto das amostras externas com 100% sucesso, entretanto, apresentaram valores de SEP elevados (125,8 e 108,2, respectivamente), superiores aos dos testes entre níveis, indicando maior dispersão dos dados (Tabela 3).

A análise com ADL (HxH 0; 100% x 50% e HxH 0; 100% x 25; 50; 75%) obteve alta porcentagem de acerto na calibração (100% e 94,6%, respectivamente), e 100% de acerto na predição, com menos de três comprimentos de onda selecionados pelo Stepwise Backward (Tabela 4).

5.2.2.3 Teste entre Níveis

Entre os Testes entre Níveis com PLS, o modelo contendo os espectros apenas das misturas heterogêneas (Nv 25 x 50 x 75%) não foi capaz de predizer nenhuma amostra externa, embora o ajuste da validação fosse alto ($R = 0,981$). Os demais modelos tiveram predição com taxa de acerto superior a 80% (Tabela 3).

Os Testes entre Níveis realizados com ADL não foram tão bem sucedidos. A análise Nv 0% x 100% distinguiu os macerados de *M. persicae* dos ovos de *C. externa* com 100% de acerto na calibração quanto na predição (Tabela 4). Já os modelos Nv 25 x 50 x 75%, Nv 0 x 50 x 100% e Nv 0 x 25 x 50% x 75 x 100% obtiveram taxa de acerto, respectivamente, de 100%, 80% e 70,3% para calibração e 50%, 66,7% e 50% para predição (Tabela 4).

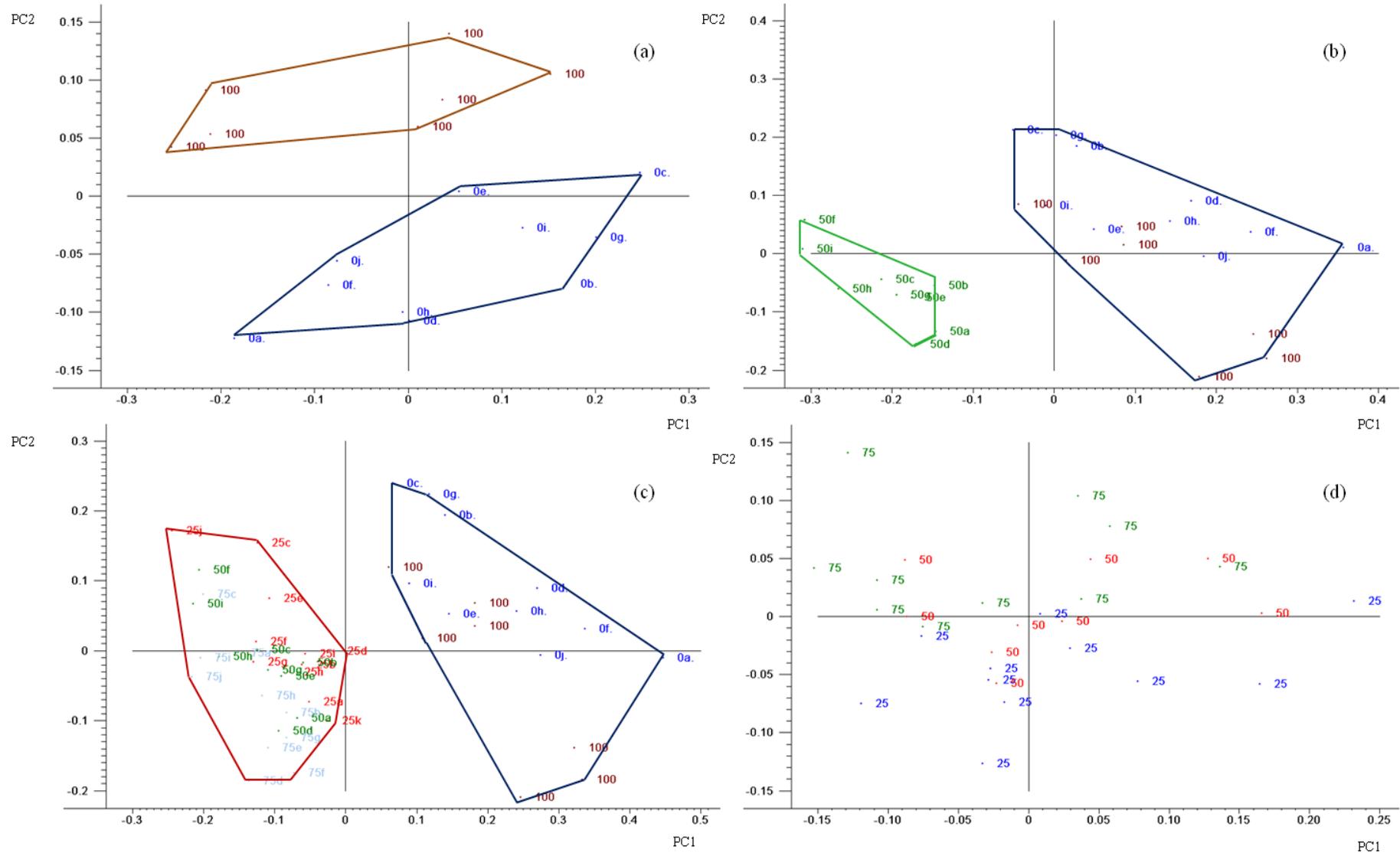


Figura 10. PCAs dos espectros de 8000 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} dos macerados de *Myzus persicae* e ovos de *Chrysoperla externa* divididos em níveis crescentes de IGP de acordo com a concentração de ovos do crisopídeo. Variação explicada: (a) 0% e 100%, PC1 = 64%, PC2 = 18%; (b) 0%, 50% e 100%, PC1 = 66%, PC2 = 23%; (c) 0%, 25%, 50%, 75% e 100%, PC1 = 65%, PC2 = 23%; (d) 25%, 50% e 75%, PC1 = 60%, PC2 = 21%.

Tabela 3. Valores obtidos no PLS para os modelos de calibração, validação e predição obtidos da comparação dos macerados de afídeos e ovos de crisopídeo divididos em 5 níveis de IGP (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). Parâmetros analisados: interseção da reta de ajuste, valor do erro médio quadrático (RMSE), coeficiente de determinação (R²), erro padrão da predição (SEP) e número de acertos da predição. As análises foram feitas com distinção entre amostras homogêneas e heterogêneas (HxH) e entre níveis diferentes (Nv).

Grupos	Níveis Comparados	N	Nº de Variáveis Latentes	Calibração			Validação			Predição	
				Interseção	RMSEC	R ²	Interseção	RMSEV	R ²	SEP	Acertos da predição
HxH	0; 100% x 50%	20	6	0,074	2,20	0,998	1,51	7,71	0,976	126	6/6 (100%)
HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	37	6	0,372	3,61	0,994	0,654	6,68	0,982	108	10/10 (100%)
Nv	0 x 100%	13	3	0,267	4,05	0,993	1,26	6,29	0,986	13,4	4/4 (100%)
Nv	25 x 50 x 75%	24	5	0,231	1,44	0,995	1,17	2,85	0,981	41,7	0/6 (0%)
Nv	0 x 50 x 100%	20	6	0,086	1,78	0,998	1,70	4,27	0,989	16,6	6/6 (100%)
Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	37	7	0,122	1,75	0,997	0,720	3,35	0,990	16,2	8/10 (80,0%)

Tabela 4. Parâmetros descritivos dos modelos de calibração e predição feitos com Análise Discriminante Linear utilizando macerados de *Myzus persicae* e *Chrysoperla externa* com cinco níveis de IGP (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). Modelos calculados para ambos os sexos e para machos e fêmeas separadamente. Parâmetros analisados: acertos do modelo de calibração, número de comprimentos de onda pelo modelo, valor de Wilks' Lambda e acertos da predição. As análises foram feitas com distinção entre amostras homogêneas e heterogêneas (HxH) e entre níveis diferentes (Nv). $F < 0,0001$.

Grupos	Níveis comparados (%)	Calibração		Predição	
		Acertos	Nº de comprimentos de onda	Wilks' Lambda	Acertos
HxH	0; 100% x 50%	20/20 (100%)	1	0,147	6/6 (100%)
HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	35/37 (94,6%)	2	0,290	10/10 (100%)
Nv	0 x 100%	13/13 (100%)	1	0,176	4/4 (100%)
Nv	25 x 50 x 75%	24/24 (100%)	5	0,121	3/6 (50%)
Nv	0 x 50 x 100%	16/20 (80,0%)	3	0,270	4/6 (66,7%)
Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	26/37 (70,3%)	4	0,077	5/10 (50,0%)

5.2.3 Intestinos

5.2.3.1 Análise Exploratória

Os PCAs das amostras de intestinos de *H. axyridis* evidenciaram os mesmos padrões encontrados anteriormente entre os macerados. Os modelos de 0% e 100% distinguiram com sucesso os intestinos de *H. axyridis* alimentados com *M. persicae* daqueles alimentados com *C. externa* (Figura 11-a). Quando adicionadas as amostras com níveis de IGP de 50% e, após, 25% e 75%, o padrão de separação entre as amostras homogêneas (0% e 100%) e as heterogêneas (25%, 50% e 75%) se repetiu (Figuras 11-b e 11-c). Novamente, a análise entre as amostras heterogêneas não sugeriu nenhum padrão evidente (Figura 11-d). Entretanto foi observado que apenas no modelo entre 0% e 100% o somatório dos componentes principais foi capaz de explicar mais de 95% da variação da amostra. Nos demais modelos, o somatório dos PCs onde foi encontrado o padrão de distinção de homogeneidade foi inferior a 5% (Figura 11).

5.2.3.2 Teste de Homogeneidade

Os Testes de Homogeneidade com PLS calibrados com espectros dos intestinos resultaram em modelos com alta correlação com amostras dos sexos separados e juntos (Tabela 5). Todos os modelos obtiveram validação com correlação superior a 0,9 e foram capazes de prever as amostras externas com porcentagem de acerto superior a 90%. O SEP dos modelos que combinaram machos e fêmeas foram superiores aos demais (Tabela 5).

A análise com ADL obteve acerto próximo de 100% em todos os modelos de calibração e superior a 90% nos de predição (Tabela 6).

5.2.3.3 Teste entre Níveis

Os Testes entre Níveis com PLS obtiveram valores de correlação da validação, superiores a 0,83. Entretanto, apenas os modelos Nv 0 x 100% conseguiram acertos de predição superiores a 75% (Tabela 5). Os demais previram as amostras externas com taxa de acerto variando entre 20% a 75%. Também foi observado que o SEP dos modelos de fêmeas foi maior que os de machos e de ambos os sexos (Tabela 5).

Entre os modelos calibrados com ADL, os modelos Nv 0 x 100% e Nv 0 x 50 x 100% obtiveram a melhor taxa de acerto na calibração, superior a 89% (Tabela 6). Nos modelos de predição, apenas os modelos Nv 0 x 100%, Nv 0 x 50 x 100% e Nv 0 x 25 x 50 x 75 x 100% de fêmeas e o Nv x 100% de machos conseguiram prever todas as amostras externas (Tabela 6). Os modelos com os sexos separados conseguiram resultados superiores aos com os dois sexos combinados (Tabela 6).

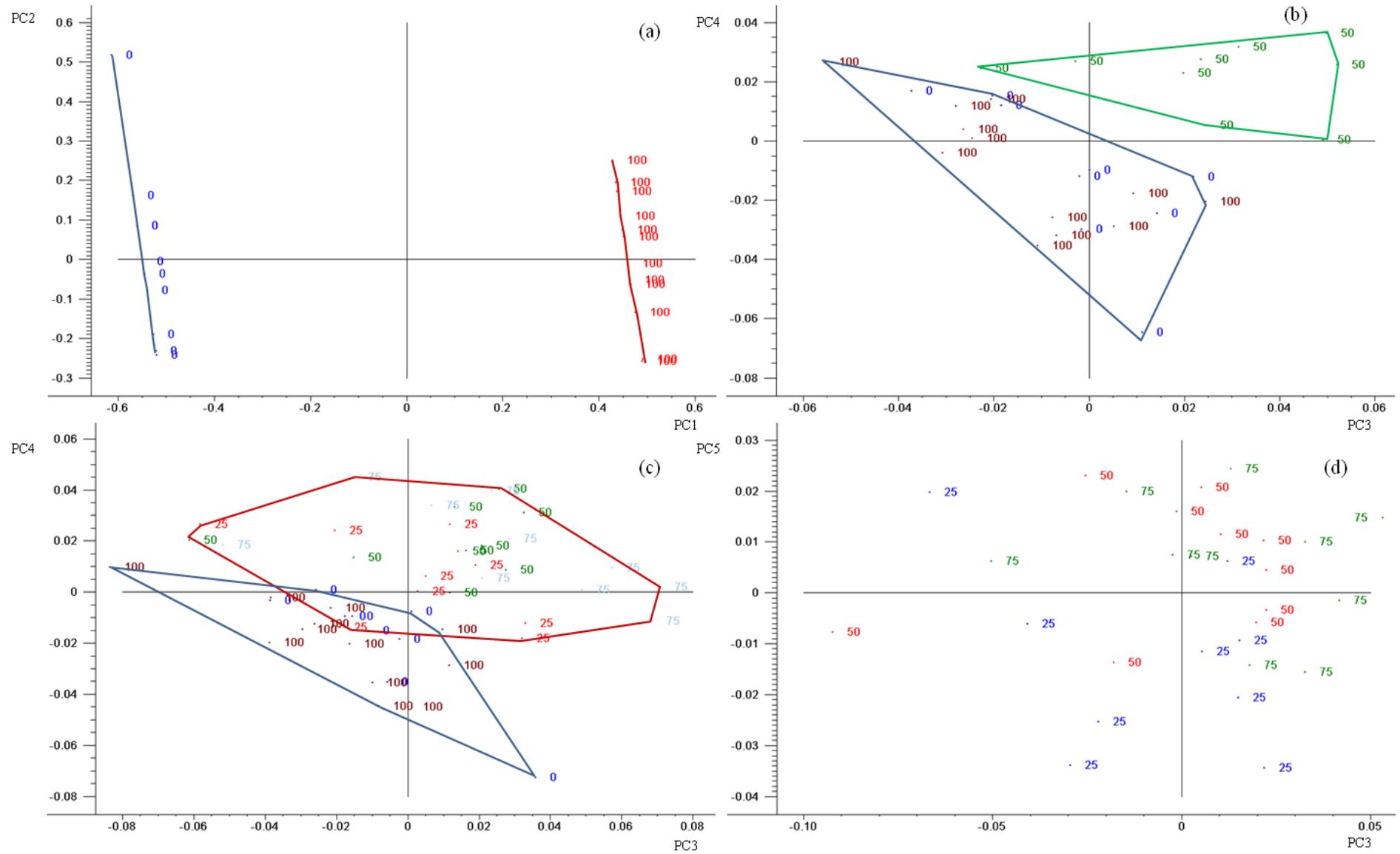


Figura 11. PCAs dos espectros de 8000 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} dos intestinos de machos de *Harmonia axyridis* alimentados com níveis crescentes de IGP de acordo com a concentração de ovos do crisopídeo. Variação explicada: (a) 0% e 100%, PC1 = 86%, PC2 = 12%; (b) 0%, 50% e 100%, PC3 = 1%, PC4 = 1%; (c) 0%, 25%, 50%, 75% e 100%, PC3 = 2%, PC4 = 1%; (d) 25%, 50% e 75%, PC3 = 2%, PC5 = 1%.

Tabela 5. Parâmetros descritivos dos modelos de calibração, validação e predição obtidos no PLS utilizando amostras de intestinos de *Harmonia axyridis* alimentados com cinco níveis de IGP (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). Modelos calculados para ambos os sexos e para machos e fêmeas separadamente. Parâmetros analisados: interseção da reta de ajuste, valor do erro médio quadrático (RMSE), coeficiente de determinação (R^2), erro padrão da predição (SEP) e número de acertos da predição. As análises foram feitas com distinção entre amostras homogêneas e heterogêneas (HxH) e de níveis diferentes (Nv). Valor de N indica o número de amostras utilizado para construir cada modelo.

	Grupos	Níveis comparados	N	Nº de Variáveis Latentes	Calibração		Validação			Predição		
					Interseção	RMSEC	R^2	Interseção	RMSEV	R^2	SEP	Acertos da predição
Machos e Fêmeas	HxH	0; 100% x 50%	55	4	2,42	12,6	0,930	2,36	15,1	0,904	18,0	12/12 (100%)
	HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	89	3	4,55	13,6	0,923	5,27	14,5	0,914	23,7	18/20 (90,0%)
	Nv	0 x 100%	36	4	1,20	7,74	0,976	8,06	16,0	0,902	34,5	7/8 (87,5%)
	Nv	25 x 50 x 75%	53	5	2,64	4,55	0,948	1,00	7,23	0,880	19,0	5/12 (41,7%)
	Nv	0 x 50 x 100%	55	5	1,70	7,44	0,965	8,54	12,5	0,903	13,1	9/12 (75,0%)
	Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	89	11	0,129	1,79	0,997	8,12	8,13	0,949	33,0	4/20 (20,0%)
Machos	HxH	0; 100% x 50%	26	5	0,062	2,08	0,998	1,20	6,71	0,978	7,39	6/6 (100%)
	HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	41	6	0,195	2,93	0,997	3,15	6,24	0,985	7,72	9/10 (90,0%)
	Nv	0 x 100%	18	4	0,428	4,36	0,992	3,15	10,9	0,957	12,0	3/4 (75,0%)
	Nv	25 x 50 x 75%	23	4	0,512	2,02	0,990	2,44	4,13	0,960	4,27	4/6 (66,7%)
	Nv	0 x 50 x 100%	26	3	2,38	8,71	0,956	13,3	14,1	0,889	16,2	3/6 (50,0%)
	Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	41	8	0,104	1,61	0,998	13,7	11,0	0,911	11,2	3/10 (30,0%)
Fêmeas	HxH	0; 100% x 50%	29	3	2,20	11,7	0,942	2,21	13,8	0,919	15,6	6/6 (100%)
	HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	48	1	4,79	13,5	0,923	5,07	13,9	0,916	15,9	10/10 (100%)
	Nv	0 x 100%	18	4	0,507	5,31	0,988	5,48	14,8	0,920	57,1	4/4 (100%)
	Nv	25 x 50 x 75%	30	5	1,24	3,10	0,976	7,45	5,26	0,941	38,3	3/6 (50,0%)
	Nv	0 x 50 x 100%	29	8	0,058	1,39	0,999	9,94	16,8	0,840	79,6	3/6 (50,0%)
	Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	48	4	4,93	11,0	0,898	7,91	14,3	0,830	18,1	4/10 (40,0%)

Tabela 6. Parâmetros descritivos dos modelos de calibração e predição feitos com Análise Discriminante Linear utilizando amostras de intestinos de *Harmonia axyridis* alimentados com cinco níveis de IGP (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). Modelos calculados para ambos os sexos e para machos e fêmeas separadamente. Parâmetros analisados: acertos do modelo de calibração, número de comprimentos de onda pelo modelo, valor de Wilks' Lambda e acertos da predição. As análises foram feitas com distinção entre amostras homogêneas e heterogêneas (HxH) e de níveis diferentes (Nv).

	Grupos	Níveis Comparados	Calibração		Predição	
			Acertos	Nº de comprimentos de onda	Wilks' Lambda	Acertos
Machos e Fêmeas	HxH	0; 100% x 50%	56/56 (100%)	2	0,103	12/12 (100%)
	HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	49/50 (98,0%)	3	0,163	9/10 (90,0%)
	Nv	0 x 100%	34/38 (89,5%)	5	0,498	4/8 (50,0%)
	Nv	25 x 50 x 75%	37/53 (69,8%)	4	0,451	4/12 (33,3%)
	Nv	0 x 50 x 100%	49/55 (89,0%)	5	0,055	10/12 (83,3%)
	Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	30/50 (60,0%)	3	0,107	3/10 (33,0%)
Machos	HxH	0; 100% x 50%	26/26 (100%)	2	0,106	6/6 (100%)
	HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	41/41 (100%)	3	0,130	9/10 (90,0%)
	Nv	0 x 100%	18/18 (100%)	3	0,135	4/4 (100%)
	Nv	25 x 50 x 75%	17/23 (73,9%)	4	0,319	2/6 (33,3%)
	Nv	0 x 50 x 100%	23/26 (88,5%)	5	0,025	4/6 (66,7%)
	Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	31/41 (75,6%)	3	0,059	5/10 (50,0%)
Fêmeas	HxH	0; 100% x 50%	29/29 (100%)	1	0,125	6/6 (100%)
	HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	48/48 (100%)	2	0,069	10/10 (100%)
	Nv	0 x 100%	18/18 (100%)	5	0,216	4/4 (100%)
	Nv	25 x 50 x 75%	26/30 (86,7%)	4	0,140	2/6 (33,3%)
	Nv	0 x 50 x 100%	29/29 (100%)	5	0,012	6/6 (100%)
	Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	32/48 (66,7%)	5	0,030	7/10 (70,0%)

5.2.4 Fezes

5.2.4.1 Análise Exploratória

A análise exploratória dos espectros das fezes utilizando PCA revelou mais uma vez o padrão de distinção entre amostras homogêneas e heterogêneas observados anteriormente em macerados e intestinos (Figuras 12-a, 12-b e 12-c). Da mesma forma que os modelos com intestinos, o somatório de variação explicada pelos componentes principais foi inferior a 5% (Figura 12). Novamente o modelo de amostras heterogêneas 25%, 50% e 75% não revelou nenhum padrão emergente (Figura 12-d).

5.2.4.2 Teste de Homogeneidade

Os Testes de Homogeneidade com PLS dos espectros das fezes apresentou excelentes resultados. Todos os modelos foram ajustados com valores superiores a 0,95 e foram capazes de prever 100% das amostras externas com erro médio quadrático inferior a 15,0 (Tabela 7).

As análises utilizando ADL também obtiveram excelentes performances. Os modelos conseguiram validar amostras internas com eficiência próxima a 100%, e prever as amostras externas com eficiência superior a 90% (Tabela 8).

5.2.4.3 Teste entre Níveis

Diferentemente das análises de homogeneidade, os Testes entre Níveis tiveram resultados insatisfatórios. Embora o modelo Nv 0 x 25 x 50 x 75 x 100% tenha obtido ajuste de validação inferior a 0,9, a capacidade de predição dos modelos esteve aquém do esperado (Tabela 7). Em especial, o modelo com fezes de fêmeas teve porcentagem de predição inferior a 33,3%. Os modelos apenas de machos conseguiram as maiores porcentagens de acerto nos modelos de Nv 0 x 100% e Nv 0 x 50 x 100% (Tabela 7). Modelos com os dois sexos também tiveram resultados fracos, influenciados pelas amostras com fezes de fêmeas e teve porcentagem de acertos com variação de 20% a 62,5% (Tabela 7).

As análises com ADL mostraram novamente baixos resultados de predição das amostras externas. Apenas os modelos Nv 0 x 100% e Nv 0 x 25 x 50 x 75 x 100% de fêmeas conseguiram validar 100% das amostras de calibração (Tabela 8). Os modelos apenas de machos tiveram acerto superior a 95% das amostras de calibração, entretanto os que incluíram ambos os sexos tiveram acerto com variação de 80% a 97,9%, influenciados pelas amostras de fêmeas (Tabela 8). Contudo, quando considerados os acertos de predição de amostras externas, os valores de todos os modelos foram inferiores a 75%. Os melhores resultados foram obtidos pelos modelos que compararam *M. persicae* e *C. externa* Nv 0 x 100% com os sexos separados (Tabela 8).

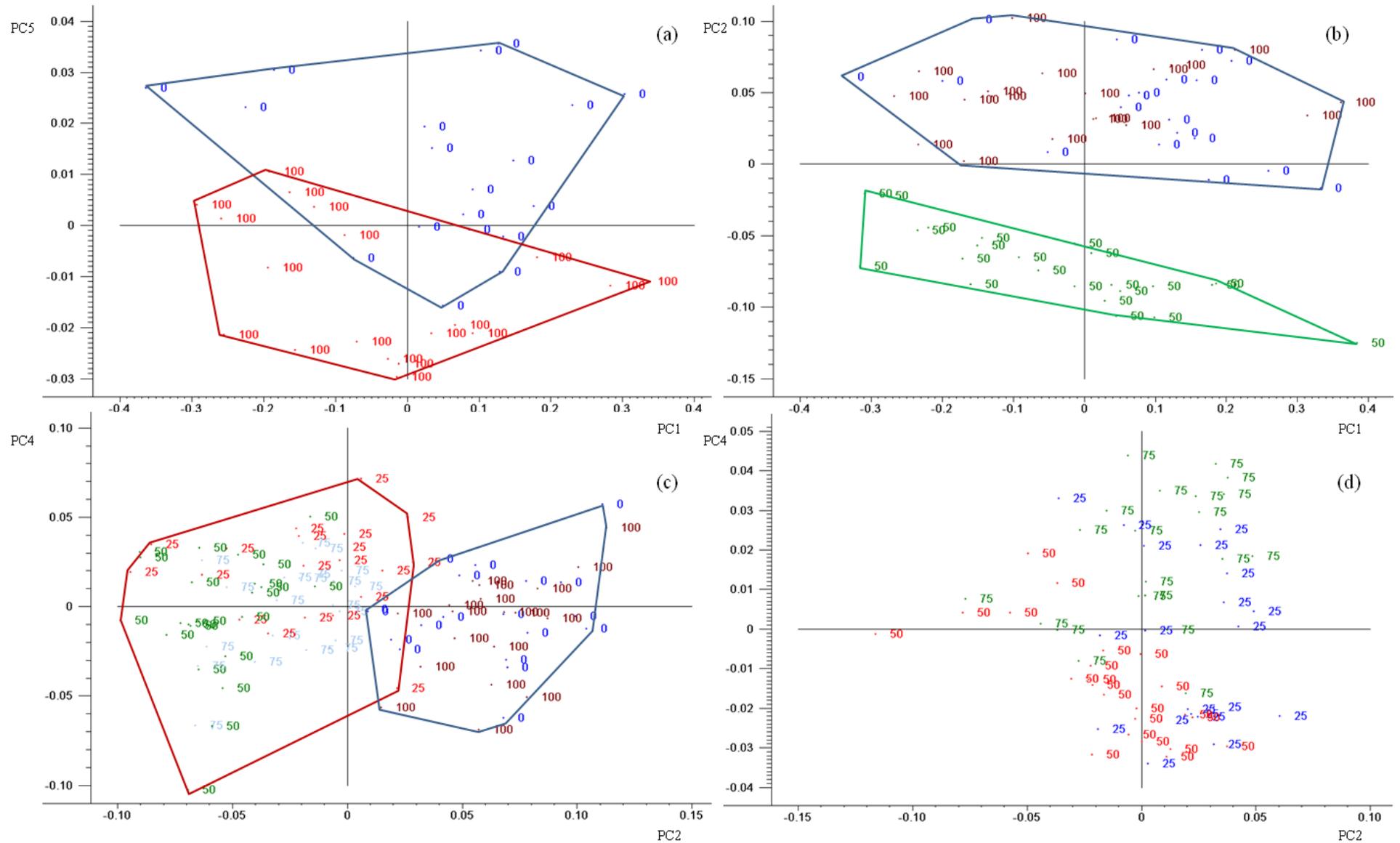


Figura 12. PCAs dos espectros de 8000 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} das fezes de machos e fêmeas de *Harmonia axyridis* alimentados com níveis crescentes de IGP de acordo com a concentração de ovos do crisopídeo. Variação explicada: (a) 0% e 100%, PC1 = 86%, PC2 = 12%; (b) 0%, 50% e 100%, PC1 = 78%, PC2 = 10%; (c) 0%, 25%, 50%, 75% e 100%, PC2 = 7%, PC4 = 2%; (d) 25%, 50% e 75%, PC2 = 3%, PC4 = 1%.

Tabela 7. Parâmetros descritivos dos modelos de calibração, validação e predição obtidos no PLS utilizando amostras de fezes de *Harmonia axyridis* alimentados com cinco níveis de IGP (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). Modelos calculados para ambos os sexos e para machos e fêmeas separadamente. Parâmetros analisados: interseção da reta de ajuste, valor do erro médio quadrático (RMSE), coeficiente de determinação (R^2) e número de acertos da predição. As análises foram feitas com distinção entre amostras homogêneas e heterogêneas (HxH) e de níveis diferentes (Nv). Valor de N indica o número de amostras utilizado para construir cada modelo.

	Grupos	Níveis comparados	N	Nº de Variáveis Latentes	Calibração			Validação			Predição	
					Interseção	RMSEC	R^2	Interseção	RMSEV	R^2	SEP	Acertos da predição
Machos e Fêmeas	HxH	0; 100% x 50%	49	4	0,417	5,05	0,989	0,693	6,60	0,982	13,0	12/12 (100%)
	HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	82	7	2,08	8,73	0,967	2,97	10,5	0,953	14,9	20/20 (100%)
	Nv	0 x 100%	30	3	2,94	12,1	0,941	6,34	16,6	0,904	44,6	5/8 (62,5%)
	Nv	25 x 50 x 75%	52	6	0,620	2,21	0,988	7,43	4,67	0,952	11,4	4/12 (33,3%)
	Nv	0 x 50 x 100%	49	5	2,16	8,14	0,957	6,46	12,5	0,902	39,8	6/12 (50,0%)
	Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	82	3	11,2	16,2	0,776	14,1	18,3	0,722	55,8	4/20 (20,0%)
Machos	HxH	0; 100% x 50%	24	3	0,102	2,52	0,997	-0,299	4,97	0,989	5,24	6/6 (100%)
	HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	40	3	1,75	8,10	0,972	3,34	10,8	0,952	14,8	10/10 (100%)
	Nv	0 x 100%	15	2	5,81	16,5	0,891	7,51	21,4	0,840	34,0	4/4 (100%)
	Nv	25 x 50 x 75%	25	4	0,899	2,62	0,983	6,71	5,18	0,933	6,66	2/6 (33,3%)
	Nv	0 x 50 x 100%	24	5	0,305	3,02	0,994	12,4	13,1	0,902	30,6	5/6 (83,3%)
	Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	40	7	0,116	1,61	0,998	10,3	8,88	0,936	55,4	4/10 (40,0%)
Fêmeas	HxH	0; 100% x 50%	25	4	0,072	2,08	0,998	-0,271	4,83	0,991	8,85	6/6 (100%)
	HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	42	5	0,369	3,63	0,994	-0,239	7,45	0,979	11,2	10/10 (100%)
	Nv	0 x 100%	15	2	2,10	10,6	0,955	4,39	14,0	0,932	18,4	1/4 (25,0%)
	Nv	25 x 50 x 75%	27	4	1,14	3,02	0,977	7,10	4,32	0,961	18,7	2/6 (33,3%)
	Nv	0 x 50 x 100%	25	3	2,14	8,14	0,955	5,57	11,8	0,903	35,2	2/6 (33,3%)
	Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	42	3	2,85	8,22	0,941	3,85	10,0	0,914	45,1	1/10 (10,0%)

Tabela 8. Parâmetros descritivos dos modelos de calibração e predição feitos com Análise Discriminante Linear utilizando amostras de fezes de *Harmonia axyridis* alimentados com cinco níveis de IGP (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). Modelos calculados para ambos os sexos e para machos e fêmeas separadamente. Parâmetros analisados: acertos do modelo de calibração, número de comprimentos de onda pelo modelo, valor de Wilks' Lambda e acertos da predição. As análises foram feitas com distinção entre amostras homogêneas e heterogêneas (HxH) e de níveis diferentes (Nv).

	Grupos	Níveis Comparados	Calibração		Predição	
			Acertos	Nº de comprimentos de onda	Wilks' Lambda	Acertos
Machos e Fêmeas	HxH	0; 100% x 50%	49/49 (100%)	2	0,091	12/12 (100%)
	HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	50/50 (100%)	2	0,150	9/10 (90,0%)
	Nv	0 x 100%	28/30 (93,3%)	3	0,246	5/8 (62,5%)
	Nv	25 x 50 x 75%	41/52 (78,8%)	4	0,288	7/12 (58,3%)
	Nv	0 x 50 x 100%	48/49 (97,9%)	5	0,029	7/12 (58,3%)
	Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	40/50 (80,0%)	5	0,034	5/10 (50,0%)
Machos	HxH	0; 100% x 50%	24/24 (100%)	1	0,065	6/6 (100%)
	HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	37/98 (97,4%)	1	0,282	10/10 (100%)
	Nv	0 x 100%	15/15 (100%)	4	0,143	3/4 (75,0%)
	Nv	25 x 50 x 75%	25/25 (100%)	3	0,013	4/6 (66,7%)
	Nv	0 x 50 x 100%	24/24 (100%)	5	0,008	4/6 (66,7%)
	Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	38/40 (95,0%)	2	0,037	6/10 (60,0%)
Fêmeas	HxH	0; 100% x 50%	25/25 (100%)	1	0,108	25/25 (100%)
	HxH	0; 100% x 25; 50; 75%	42/42 (100%)	1	0,100	10/10 (100%)
	Nv	0 x 100%	18/18 (100%)	4	0,143	3/4 (75,0%)
	Nv	25 x 50 x 75%	18/27 (66,7%)	5	0,404	1/6 (16,7%)
	Nv	0 x 50 x 100%	24/24 (100%)	5	0,008	4/6 (66,7%)
	Nv	0 x 25 x 50 x 75 x 100%	30/42 (71,4%)	3	0,034	6/10 (60,0%)

6. DISCUSSÃO

Com base nas análises exploratórias de macerados, intestinos e fezes, o PCA mostrou-se capaz de distinguir predação intraguilda pois detectou adultos de *M. persicae* e ovos de *C. externa* nas concentrações de IGP de 0% e 100%, respectivamente (Figuras 11-a, 12-a e 13-a). Este resultado ilustra a capacidade do NIRS de reconhecimento de espécies de ordens diferentes a partir do espectro dos seus produtos metabólicos conforme o conceito de metaboloma (Rodriguez-Fernandez, 2007; Cruishanck & Munck, 2011). Além disso, também é capaz de detectar diferenças entre indivíduos de estágios ontogenéticos distintos (Perez-Mendoza *et al.*, 2002). Desta maneira, é provável que a combinação destes dois fatores, adultos de *M. persicae* e ovos de *C. externa* tenha facilitado a discriminação das amostras.

Quando as amostras de *M. persicae* ou *C. externa* foram comparadas com a mistura das duas na proporção de 1:1 foi possível observar o padrão característico de divisão entre grupos homogêneos e heterogêneos. Os espectros de 0% e 100% de IGP foram agrupados em oposição aos de 50% (Figuras 11-b 12-b 13-b). O padrão ainda se repetiu na análise dos cinco níveis de IGP (Figuras 11-c 12-c e 13-c), o que sugere que amostras homogêneas, mesmo de organismos muito diferentes e ainda de distintos estagios podem compartilhar mais semelhanças ou diferenças químicas entre si do que com as misturas heterogêneas de ambas. Além disso, a distinção foi possível desde os macerados até as fezes. Isto significa que os padrões com o alimento macerado fresco puderam ser reconhecidos, mesmo após as alterações resultantes da digestão.

Todavia, entre os modelos de intestinos e fezes que observaram a divisão de homogeneidade, o somatório da variação explicada pelos componentes principais foi capaz de explicar menos de 7% da variação dos dados (Figuras 12-b 12-c 13-c). A porcentagem foi muito inferior à encontrada para alimentos macerados, o que sugere a influência de outros fatores, possivelmente transformações do alimento digerido e o acréscimo do metabolismo de *H. axyridis*. O fato de haver maior variação nas etapas de intestinos e fezes do que nos macerados observado já na fase exploratória pode ser um elemento importante para compreender as variações provocadas pelo processo digestivo evidenciado nas análises posteriores.

Desta forma, a fase exploratória cumpriu sua função, simbolizada pelos círculos concêntricos da Figura 6. As relações encontradas entre as amostras geraram hipóteses secundárias que ainda poderiam levantar novas hipóteses em um novo ciclo exploratório e assim por diante. Neste caso, a opção foi por testar as hipóteses secundárias da fase exploratória com PLS e ADL com o intuito de

trabalhar as hipóteses secundárias da fase exploratória e ainda analisar quantitativamente os dados, o que não foi possível com PCA.

Na segunda fase dos testes foram utilizados os algoritmos PLS e ADL para calibrar e validar os modelos. Os espectros das amostras se dividiram em duas categorias principais: os Testes de Homogeneidade (HxH), que separaram as amostras em homogêneas (0% e 100%) e heterogêneas (25%, 50% e 75%); e os Testes entre Níveis (Nv), que incluíram as comparações entre os diferentes níveis de IGP. Os primeiros utilizaram como valores de referência os resultados do PCA e geraram modelos qualitativos, enquanto os segundos calibraram quantitativamente os níveis de IGP.

A porcentagem de acertos da predição de amostras externas foi empregada como o principal critério que definiu a escolha dos modelos calibrados e validados com PLS e ADL. Desta maneira, os valores de predição dos Testes de Homogeneidade apresentaram taxa de acerto superior a 90% e resultados superiores aos Testes entre Níveis, em quase todos os modelos de macerados, intestinos e fezes (Tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8). Os resultados dos Testes de Homogeneidade corroboram a divisão qualitativa das amostras anteriormente evidenciada com o PCA. Uma vez visualizada esta relação, a nova hipótese foi elaborada intuitivamente e empregada como variável de referência por PLS e ADL, com excelentes resultados.

A relação entre amostras homogêneas e heterogêneas foi uma descoberta inesperada, identificada graças à natureza exploratória do PCA, que reduziu o espaço multidimensional com os componentes principais. É surpreendente que um padrão inesperado encontrado nos macerados ainda possa ter sido reconhecido nas etapas subsequentes de intestinos e fezes do predador. Pela natureza das amostras, foi considerado que a leitura destes espectros não continha apenas informações sobre o alimento digerido, mas também sofreu influência da resposta metabólica de *H. axyridis*. Mesmo estas influências não impediram a categorização de grupos homogêneos e heterogêneos.

Este resultado corrobora as observações com o PCA que a relação entre os grupos homogêneos e heterogêneos pode ser rastreada através do processo de digestão. Tal propriedade é de grande relevância para a aplicação da técnica na análise dos conteúdos intestinal e fecal. Ela sugere que o Teste de Homogeneidade é um bom indicador das características das fontes alimentares de *H. axyridis*, sendo capaz de recuperar informações de suas últimas 24 horas de vida e responder se um exemplar se alimentou de apenas uma espécie de presa ou de duas. A mistura de ambas produz um espectro bastante distinto da soma dos originais, sendo classificada como heterogênea. Desta forma, esta análise consegue fornecer informações importantes sobre a dieta do predador com base apenas no espectro de seu conteúdo intestinal ou fecal.

O exemplo suporta a estratégia cíclica para análises quimiométricas sugerida por Munck (2006) para explorar as relações entre as amostras (Figura 6). A partir de observações das relações entre os dados, foi possível criar novas hipóteses *a posteriori*, que evidenciaram outras oportunidades de análise antes desconhecidas. As novas hipóteses testadas ainda foram confirmadas por dois outros métodos estatísticos com alta porcentagem de acerto.

Nos Testes entre Níveis utilizando PLS e ADL observou-se que a ação do processo digestivo prejudicou consideravelmente a capacidade de predição dos modelos. Por isso, foram obtidos resultados apenas modestos nas etapas de intestinos e fezes, que contrastam com os bons resultados dos modelos qualitativos dos Testes de Homogeneidade.

Os modelos com macerados apresentaram alta porcentagem de acerto de predição, exceto pela análise de 25, 50 e 75% (Tabela 3). Entretanto, com os espectros de intestinos e fezes, a porcentagem foi inferior a 70% (Tabela 5 e 7). Apenas os modelos que compararam *M. persicae* e *C. externa* (0% e 100%, respectivamente) foram capazes de predizer acima de 90% das amostras.

PLS e ADL são importantes para análises quantitativas, mas nas etapas de intestinos e fezes apenas os modelos cujos valores de referência repetiram os padrões visualizados com PCA obtiveram resultados satisfatórios. Isto mostra que os modelos dos Testes entre Níveis possuem baixo poder de predição externa quando analisadas mais de duas categorias e sugere que a abordagem quantitativa é inadequada para analisar conteúdo intestinal e fecal dos predadores.

Existem estudos que utilizaram o NIRS com sucesso para analisar conteúdo intestinal e fecal de vertebrados, muitos deles domésticos (Foley *et al.*, 1999; André & Lawler, 2003; Tolleson *et al.*, 2005; Sheppard *et al.*, 2006; Showers *et al.*, 2006; Kidane *et al.*, 2008). Vários deles empregam esta técnica com o intuito de verificar a qualidade nutricional dos alimentos, dada, por exemplo, pelo percentual de proteínas ou fibras presente nas amostras (Landau *et al.*, 2006). Alguns casos visavam investigar quantitativamente a composição das espécies presentes no conteúdo intestinal (Walker *et al.*, 2002; André & Lawler, 2003; Kaneko & Lawler, 2006; Landau *et al.*, 2008; Glasser *et al.*, 2008; Heroldova *et al.*, 2010). Esta utilização do método é semelhante ao proposto no presente estudo, entretanto, conforme relatam Dixon & Coates (2009), apenas poucos casos (Walker *et al.*, 2002; André & Lawler, 2003; Landau *et al.*, 2008) empregaram métodos mais rigorosos de validação utilizando subconjuntos de dados independentes. O sucesso obtido destes estudos sugere um conjunto de dados maior e que comparou amostras mais distintas quimicamente (Dixon & Coates, 2009).

Comparativamente, a baixa porcentagem de acerto em modelos com conteúdo intestinal e fecal, os altos valores de SEP (Tabelas 5 e 7) são evidência de grande variação entre as amostras. Eles podem justificar a imprecisão da análise, apesar de ter sido encontrado um número

relativamente pequeno de *outliers*. A variação dos dados é corroborada pela observação anterior com PCA, na qual os componentes principais dos modelos de intestinos e fezes explicaram menos de 5% da variação total dos dados (Figuras 12-b, 12-c, 13-b e 13-c). Isto sugere a existência de mais fatores nas etapas de intestino e fezes que poderiam ter influenciado as análises e afetado negativamente o poder de predição dos modelos quantitativos. As ferramentas utilizadas não permitem apontar exatamente quais os fatores. Todavia, durante os experimentos foram enfrentadas muitas dificuldades inerentes ao desenho experimental do projeto e ao organismo-modelo escolhido que poderiam ser fonte significativa de variação. Estas possibilidades são deveras especulatórias, mas merecem ser discutidas, pois condições semelhantes podem vir a se repetir em futuras aplicações em condições de campo. Além disso, o NIRS é uma ferramenta sensível a outros tipos de variações no metabolismo do predador que poderiam influenciar a variação.

Além das transformações mecânicas e químicas do alimento digerido, deve-se considerar a influência do metabolismo do predador *H. axyridis* na fase de intestinos e fezes. É possível que os animais utilizados nos experimentos apresentassem variações de fenótipo e de comportamento que o desenho experimental não foi capaz de controlar. Estes fatores ilustram parte das dificuldades inerentes em se trabalhar com indivíduos capturados do ambiente.

Parte importante da variação poderia ser explicada pela procedência dos animais utilizados nos experimentos, em especial, *H. axyridis*, o predador intraguilda. Embora todos os experimentos deste estudo tenham sido realizados em condições controladas, os insetos utilizados foram capturados em campo. Não foram utilizados indivíduos provenientes de linhagens de laboratório, que são mais homogêneas e, muitas vezes, submetidas a processos de seleção de características (Parra *et al.*, 2002). Estas condições diferem das populações naturais, nas quais o fenótipo é influenciado por uma grande diversidade de fatores genéticos e ambientais (Babbitt, 2008).

As diferenças são evidentes quando comparados organismos provenientes de diferentes localidades e o NIRS pode utilizar essa informação para correlacionar as populações a seus locais de origem (Tsuchikawa, 2007). Ainda que neste estudo as espécies tenham sido capturadas no mesmo local, houve variação nas datas de coleta. É possível que a análise com NIRS tenha sido influenciada por diferenças no metabolismo dos indivíduos devido à variação temporal e à potencial variabilidade genética.

Além disso, também pode ter ocorrido variação no desenvolvimento do inseto. Os experimentos utilizaram animais com diferentes idades, sem que houvesse sincronia do seu tempo de vida. *H. axyridis* pode sobreviver mais de um mês no estágio adulto (Osawa, 2005; Agarwala *et al.*, 2008), o que indica que a probabilidade de captura de indivíduos de faixas etárias distintas é grande. O desenvolvimento dos insetos é fortemente influenciado pela temperatura (Dixon *et al.*,

2009) e alimentação (Dadd, 1973; Evans & Gunther, 2005; Agarwala *et al.*, 2008) e o NIRS é eficiente em reconhecer as diferenças metabólicas no desenvolvimento (Perez-Mendoza *et al.*, 2002; Perez-Mendoza *et al.*, 2004; Perez-Mendoza *et al.*, 2005).

Finalmente, o sexo é outro fator possível de ser discriminado com NIRS (Dowell *et al.*, 2005; Tolleson *et al.*, 2005). Felizmente, esta variável pode ser testada com sucesso com os dados disponíveis. Observou-se que os modelos de intestinos e fezes feitos com machos e fêmeas separadamente resultaram em predições sensivelmente superiores comparados aos modelos de ambos os sexos simultaneamente (Tabelas 5, 6, 7 e 8). Este é um indicativo de maior dispersão dos dados, devido ao fator sexo do animal modelo. Por isso, em pesquisas farmacológicas a maior parte dos experimentos utiliza animais do sexo masculino como modelo, pois é reconhecido que o ciclo reprodutivo das fêmeas gera variações cíclicas do metabolismo, o que pode interferir nas respostas de acordo com o gênero (Greek & Menache, 2013). Isto sugere que esta variável exerce influência sobre a predição e, portanto, é recomendável que os modelos que testem conteúdo intestinal e fecal sejam calibrados para cada sexo separadamente para aumentar o poder de predição dos modelos.

Estas hipóteses são plausíveis e fazem parte do desafio de se trabalhar com populações naturais. Sem dúvida seria possível reduzir significativamente a variação se fossem empregados animais provenientes de criações de laboratório. Entretanto, é preciso ressaltar que esta argumentação é igualmente válida para os afídeos e crisopídeos, uma vez que estes também foram provenientes de coletas de campo, mas isso não impediu que fossem obtidos altos valores de predição para os modelos de macerados. Além disso, *M. persicae* e *H. axyridis* também puderam ser diferenciados nas etapas de intestinos e fezes. Por isso, embora estes fatores possam influenciar os resultados como o verificado para o sexo do predador, os problemas enfrentados com as análises quantitativas parecem mais estar relacionados com as amostras heterogêneas.

Parte desse problema pode ser esclarecido quando analisado o processo de digestão de *H. axyridis*. Os conteúdos observados na dissecação de animais sacrificados 24 horas após a alimentação registram apenas um instante da digestão, que é um processo transitório (Harwood & Obricky, 2005). Eles podem ser influenciados tanto pela fisiologia como pelo comportamento do predador e resultar em concentrações das amostras diferentes dos valores fornecidos na alimentação.

No processo de digestão, ocorre a passagem do alimento digerido pela estrutura anatômica generalizadamente referida neste estudo como intestino, que abrange do estomodeu ao proctodeu (Gullan & Cranston, 2008). As diferenças anatômicas entre as partes da estrutura se traduzem em adaptações do aparelho digestivo para cumprir funções específicas. Disso resultam variações de

secreções devido a ação específica de vários órgãos e grande diversidade química nesta etapa (Klowden, 2007; Gullan & Cranston, 2008).

Além disso, a velocidade de digestão de *H. axyridis* à temperatura ambiente é rápida (Hoogendoorn & Heimpel, 2002; Weber & Lundgren, 2009) em relação ao período em que o animal teve o alimento disponível. Por isso, o período de 24 horas até o sacrifício do inseto poderia ter sido demasiadamente longo e no momento da dissecação restaria no tubo digestivo apenas uma fração do alimento ofertado. No experimento, as presas foram ofertadas vivas em experimentos de arena, isso não impediria que *H. axyridis* escolhesse ingerir primeiro somente uma espécie de presa e depois apenas a outra. Sabe-se que a ingestão de presas intraguilda é menos adequada para o coccinelídeo e o consumo desse alimento pode causar redução do desempenho (Sato *et al.*, 2008). Entre os efeitos estão o prolongamento do tempo de desenvolvimento, aumento da mortalidade e diminuição do potencial reprodutivo (Michaud, 2005). Como a digestão é rápida em comparação ao período de análise (Hoogendoorn & Heimpel, 2002; Weber & Lundgren, 2009), é possível que no momento da dissecação houvesse concentrações de ovos de crisopídeo diferentes da quantia disponibilizada. Consequentemente, a estratégia alimentar do predador pode gerar variações do conteúdo intestinal avaliado.

Se essa possibilidade se confirmar, até a presença de alimento nas amostras obtidas do conteúdo intestinal de *H. axyridis* é questionável. Uma vez que o processo de digestão desses animais é rápido, no momento da dissecação os intestinos poderiam estar vazios tais como os de animais em jejum, o que colocaria em dúvida se os padrões encontrados realmente traduziriam as alterações devido à alimentação e poderia comprometer a confiabilidade de todas as análises posteriores com amostras de intestinos. Tendo em vista esta possibilidade, foi realizado o Teste de Atividade Digestiva, que comparou os intestinos vazios dos coccinelídeos que foram sacrificados em jejum aos intestinos daqueles que haviam se alimentado. A alta porcentagem de acerto dos modelos com PLS (Tabela 2) demonstrou diferença entre os grupos. Isto sugere que a atividade metabólica e o conteúdo do intestino de *H. axyridis* na presença de alimento diferem do de um animal em jejum e são indicativos de eventos de alimentação nas 24 horas anteriores. Este resultado é de grande importância para a aplicação em campo, uma vez que a condição de jejum é habitual para os insetos afidófagos em condições naturais (Toft, 2005).

Ainda que o comportamento e a fisiologia do animal sejam capazes de influenciar negativamente as análises quantitativas, deve ser ressaltado que os resultados das análises qualitativas foram positivos. Isso significa que mesmo a presença de uma pequena concentração de ovos de crisopídeo na amostra foi detectada com sucesso e classificada como heterogênea. Inclusive, testes exploratórios posteriores reconheceram como heterogêneas amostras ofertadas com

concentrações de ovos de *C. externa* menores, com 21%, 14% e até 7% de IGP (observação pessoal). Embora o objetivo de estabelecer o limite mínimo da capacidade de detecção da técnica seja além das pretensões do presente estudo, esta tendência corrobora com a capacidade do NIRS de discernir diferenças de concentrações entre substâncias químicas de até 100 ppm (Blanco & Villaroya, 2002).

A abordagem utilizada neste estudo não depende de apenas uma única molécula definida, mas em um conjunto de compostos que formam uma impressão digital metabólica reconhecível (Fiehn, 2002). Para conhecer exatamente quais as moléculas que permitiram o reconhecimento das impressões digitais metabólicas, são necessárias abordagens metabolômicas que visam listar os metabólitos presentes nas amostras traçando um perfil metabólico (Fiehn, 2002). Técnicas como a Ressonância Magnética Nuclear teriam maior precisão em traçar o perfil metabólico das amostras e informar quais foram as moléculas presentes nas amostras de cada uma das etapas do processo digestivo (Fiehn, 2002). Tal informação comparada aos perfis das regiões mais informativas dos espectros poderia informar quais os metabólitos presentes que levaram aos padrões obtidos. Isso seria importante para compreender como as amostras interagiram para levar a padrões tão distintos como os observados nos Testes de Homogeneidade.

A questão seria relevante se o padrão de divisão entre amostras homogêneas e heterogêneas puder se repetir também para outras análises de conteúdo intestinal ou qualquer mistura que envolva duas espécies diferentes. Se o exemplo aqui ilustrado não for uma exceção, então será relevante compreender como esta interação ocorre. Análises preliminares com misturas de ovos de *C. externa* com uma outra espécie de afídeo, *Cinara atlantica* (Hemiptera: Aphididae) indicam que também ocorre um padrão de grupos homogêneos e heterogêneos (observação pessoal), entretanto, são necessários mais testes para a confirmação. E na literatura consultada não foram encontrados registros que fizessem este tipo de comparação.

O ideal da análise da interação entre as espécies na cadeia trófica seria que o método pudesse obter uma resposta quantitativa (Ings *et al.*, 2009). No entanto, a dificuldade das análises quantitativas em prever os conteúdos de intestinos e fezes como discutido anteriormente mostra que por enquanto a técnica é capaz de distinguir as amostras qualitativamente.

Felizmente, a estratégia exploratória forneceu respostas que podem ser utilizadas como parte de uma solução qualitativa do problema. Os modelos qualitativos obtiveram resultados expressivamente superiores aos quantitativos (Tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8). Se estas análises forem aplicadas em uma sequência ordenada a uma amostra desconhecida, poderiam ao menos informar indiretamente sobre a ocorrência de IGP nos intestinos e nas fezes do predador. O organograma

mostrado na Figura 14 exhibe esquematicamente a proposta de divisão seqüencial das amostras para se acessar qualitativamente a IGP de *H. axyridis*.

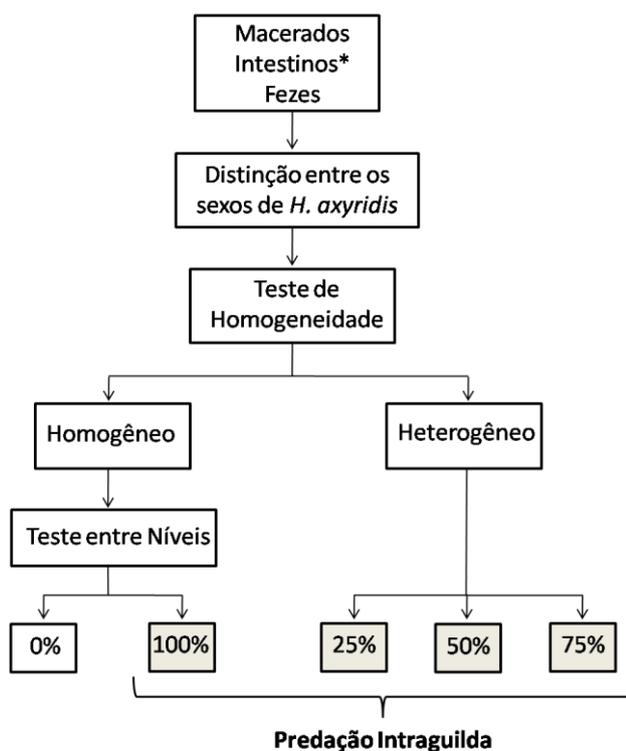


Figura 14. Organograma proposto para detecção de Predação Intraguilda em amostras de macerados, intestinos ou fezes de conteúdo desconhecido. São consideradas amostras com presença de IGP as que continham porcentagem de ovos de *Chrysoperla externa* de 25%, 50%, 75% e 100%. *Amostras de intestinos ainda devem ser testadas em relação à atividade intestinal para verificar a presença de alimento no tubo digestivo.

A primeira etapa é o Teste de Atividade Digestiva. O intuito é confirmar se de fato ocorreu algum evento de alimentação nas últimas 24 horas de vida do inseto. Este teste é exclusivo da etapa de intestinos e, apesar da obviedade, é importante, pois não há sentido em se testar a ocorrência de IGP em um animal que não se alimentou. Além disso, é comum que insetos afidófagos passem grande parte do tempo em jejum (Toft, 2005) e, portanto, seria plausível que numa aplicação de campo parte significativa dos indivíduos capturados estivessem sem alimentos no tubo digestivo.

O sexo é a variável a ser testada a seguir. Como discutido anteriormente, os modelos dos dois sexos juntos obtiveram resultados inferiores aos calibrados com machos e fêmeas separadamente (Tabelas 5, 6, 7 e 8). Por isso, é recomendável que machos e fêmeas sejam analisados separados. *H. axyridis* é uma espécie que apresenta dimorfismo sexual evidente e isto não representaria maiores dificuldades (McCornack *et al.*, 2007).

Em seguida, é recomendável realizar o Teste de Homogeneidade. Todos os modelos desta análise foram considerados qualitativos, uma vez que testaram de forma binária conteúdos homogêneos e heterogêneos. Apesar desta relação não ser capaz de responder diretamente a ocorrência de IGP, todas as amostras de conteúdo heterogêneo são compostas por uma parcela de ovos de crisopídeo e, por consequência, são resultantes de eventos de IGP.

Contudo, esta condição não inclui todas suas possibilidades de ocorrência. Uma amostra na qual o animal tenha se alimentado unicamente de ovos de crisopídeo seria classificada como homogênea. Por isso, o Teste entre Níveis é necessário para separar aquelas nas quais os predadores consumiram exclusivamente *M. persicae* ou *C. externa*. Os modelos de 0% e 100% foram as únicas análises qualitativas deste teste e dentre as amostras homogêneas classificaram quais delas respondem positivamente para a ocorrência de IGP.

Desta maneira, os resultados dos modelos qualitativos combinados podem informar com grande precisão a ocorrência de IGP e detectar a presença de ovos de crisopídeo até em concentrações muito pequenas. O diagrama informa se o animal de fato se alimentou, se a dieta incluiu mais de uma espécie de presa e, em caso negativo, qual foi a presa. Essas informações podem ser interpretadas para verificar a ocorrência de IGP embora não respondam se a proporção de IGP na dieta foi predominante ou não. Por esse motivo, as análises de conteúdos intestinais utilizando técnicas moleculares (Sheppard *et al.*, 2005; King *et al.*, 2008; Weber & Lungdren, 2009) e imunológicas (Symondson, 2002; Calder *et al.*, 2005) são mais eficientes já que possuem sensibilidade suficiente para quantificar detectar fragmentos do DNA de presas de até 100 nucleotídeos (Hoogendorn & Heimpel, 2002). Além do mais, existe a vantagem de identificar as presas em complexos multiespecíficos com precisão (Harwood & Obrycki, 2005). *H. axyridis* é uma espécie reconhecidamente polífaga (Martins *et al.*, 2009), mas com o uso destas técnicas foi possível verificar a relevância de recursos alimentares além de afídeos, como fungos e pólen na dieta do predador (Evans, 2009).

As redes de interações que envolvem esta espécie podem ser muito mais complexas, com muitas possibilidades de fontes alimentares diferentes (Ings, *et al.*, 2009). O sistema aqui mostrado com este organismo-modelo foi apenas binário. Por isso, existe o desafio de adaptar a técnica para investigar como ela funcionaria com três ou mais presas antes de aplicá-la em condições de campo. Pelos padrões encontrados nas análises qualitativas, o entendimento de como a análise reconhece as amostras heterogêneas é parte importante desse processo. Contudo, o modelo simplificado apresentado ainda poderia ser útil em outros sistemas nos quais há poucas possíveis fontes alimentares (Dziock, 2005).

Por enquanto, a técnica do NIRS mostra que é possível recuperar parte da história de vida dos organismos a partir dos seus vestígios. Ainda existe uma grande gama de opções de análises quimiométricas a serem exploradas e que possuem potencial de aprimorar a técnica significativamente (Blanco & Villaroya, 2002). O grande obstáculo reside na compreensão do funcionamento dessas técnicas por usuários com formação em outras áreas. Isto muitas vezes justifica a opção por métodos que permitam uma compreensão mais intuitiva por não funcionarem como “caixas-pretas” (Munck, 2006).

Existe a possibilidade de que todos os algoritmos utilizados para calibrar tenham sido inadequados para a natureza dos dados. Análises multivariadas como PCA, PLS e ADL pressupõem uma organização linear dos dados no espaço multidimensional (Blanco & Villaroya, 2002). Se a distribuição for não-linear, então a interpretação fica dificultada. Eles podem ser modelados linearmente mesmo assim, no entanto, necessitam de um número maior de variáveis, que por consequência podem incluir ruído aos modelos (Despaigne & Massart, 2000; Moros *et al.*, 2007). Nestes casos, é aconselhável a utilização de modelos não-lineares.

Entre os modelos não-lineares, os Algoritmos Genéticos são uma aposta particularmente promissora. Estes algoritmos são empregados em processos industriais para calibrar modelos de controle de qualidade (Moros *et al.*, 2007). Rodrigues *et al.* (2008) utilizaram algoritmos genéticos para que uma única calibração fosse suficiente para acompanhar a transformação da concentração do sítio ativo de um fármaco por toda a cadeia de produção. Este exemplo acena para uma perspectiva promissora na qual o processo de digestão dos alimentos poderia ser visto de forma análoga. Seria possível integrar as etapas de macerados, intestinos e fezes, compará-las e compreender como as moléculas se alteram através do sistema digestivo do inseto? Esta seria a hipótese mais desafiadora a ser testada com estes dados, que nem chegou a ser explorada neste estudo. Isto representaria um grande diferencial em relação aos métodos moleculares e imunológicos de análise. Se esse padrão puder ser compreendido, então talvez seja possível fazer previsões sobre o estado final apenas conhecendo as fontes alimentares (“reconhecer o bolo conhecendo apenas com os ingredientes”) ou vice-versa.

Estas alternativas mostram parte do imenso potencial a ser explorado com os métodos espectroscópicos e quimiométricos. Por essa perspectiva, o resultado alcançado parece ser só o primeiro passo.

7. CONCLUSÃO

Os resultados conseguidos mostraram que a tecnologia da espectroscopia no infravermelho próximo foi uma ferramenta eficaz, capaz de identificar com sucesso as fontes alimentares do predador *H. axyridis*. Isto permitiu reconhecer a ocorrência da relação de IGP em condições de laboratório, sugerindo a possibilidade de futura aplicação em condições de campo.

Para tanto, as ferramentas quimiométricas foram utilizadas de forma não-supervisionada para traçar hipóteses com base nos padrões emergentes. Os resultados obtidos neste estudo utilizando NIRS constituem um notável exemplo dos benefícios de se empregar uma abordagem exploratória nas análises quimiométricas, e de como os padrões emergentes de um conjunto de amostras são capazes de direcionar a análise para aumentar substancialmente o poder de predição dos modelos.

A surpreendente distribuição qualitativa entre amostras homogêneas e heterogêneas encontrada nas análises exploratórias direcionou os subseqüentes Testes de Homogeneidade com excelentes resultados. Os valores de predição foram iguais ou superiores aos obtidos com os modelos das análises direcionadas e quantitativas chamadas de Teste entre Níveis em todos os casos.

O organograma elaborado a partir destes testes permitiu que uma série de análises multivariadas dos espectros de infravermelho extraísse informações valiosas sobre os hábitos alimentares do predador intraguilda mesmo que o alimento já tivesse sido digerido. Ainda que a técnica tenha se mostrado particularmente sensível à alterações provocadas pelo meio ambiente e variações dos indivíduos coletados, há evidência de que parte importante da informação contida nos alimentos ainda pode ser recuperada com sucesso.

Tal tecnologia é promissora e devido aos baixos custos e velocidade de processamento, tem potencial para avançar o conhecimento em larga escala das relações tróficas em comunidades de artrópodes terrestres. Seria possível esclarecer a extensão do impacto causado pela introdução de espécies polífagas e cosmopolitas tais como *H. axyridis* e compreender seu papel tanto como espécie invasora quanto como agente de controle biológico observando as interações na teia trófica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWALA, B. K.; YASUDA & H.; SATO, S. Life history response of a predatory ladybird, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae), to food stress. **Applied Entomology and Zoology**, v. 42, n. 2, p. 183-189, 2008.
- ALIFERIS, K. A. & CHRYSAYI-TOUKOUSBALIDES, M. Metabolomics in pesticide research and development: a review and future perspectives. **Metabolomics**, v. 7, p. 35-53, 2011.
- ANDRÉ, J. & LAWLER, I. R. Near infrared spectroscopy as a rapid and inexpensive means of dietary analysis for a marine herbivore, dugong *Dugong dugon*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 257, p. 259-266, 2003.
- BABBITT, G. A. How accurate is the phenotype? – An analysis of developmental noise in a cotton aphid clone. **BMC Developmental Biology**, v. 19, n. 8, p. 1-9, 2008.
- BAISER, B.; RUSSELL, G. J. & LOCKWOOD, J. L. Connectance determines invasion success via trophic interactions in model food webs. **Oikos**, p. 1-7, 2010.
- BLANCO, M. & VILLARROYA, I. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 240-250, 2002.
- BOZZA, A. Detecção e quantificação de ocratoxina A produzida por espécies de *Aspergillus* isoladas de grãos de café. **Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- CALDER, C. R.; HARWOOD, J. D. & SYMONDSON, W. O. C. Detection of scavenged material in the gut content of predators using monoclonal antibodies, a significant source of error in measurement of predation? **Bulletin of Entomological Research**, v. 95, p. 57-62, 2005.
- CARREON-MARTINEZ, L. & HEATH, D. D. Revolution in food web analysis and trophic ecology: diet analysis by DNA and stable isotope analysis. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 25-27, 2010.
- CRUICKSHANK, R. H. & MUNCK, L. It's barcoding Jim, but not as we know it. **Zootaxa**, v. 2933, p. 55-56, 2011.
- DADD, R. H. Insect nutrition: current developments and metabolic implications. **Annual Review of Entomology**, v. 18. p. 381-420, 1973.
- DAVIES, A. M. C. Back to basics: the principles of principal component analysis. **Spectroscopy Europe**, v. 16, n. 6, p. 20-23, 2004.
- DAVIES, A. M. C. Back to basics: applications of principal component analysis. **Spectroscopy Europe**, v. 17, n. 2, p. 30-31, 2005.
- DESPAGNE, F. & MASSART, D. L. Development of a robust calibration model for a nonlinear inline process data. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 1657-1665, 2000.

- DIXON, A.; HEMPTINNE, J., & KINDLMANN, P. Effectiveness of ladybirds as biological control agents: patterns and processes. **Entomophaga**, v. 1, n. 2, p. 71-83, 1997.
- DIXON, A. F. G.; HONEK, A.; KEIL, P.; KOTELA, M. A. A.; SIZLING, A. L. & JAROSIK, V. Relationship between the minimum and maximum temperature thresholds for development in insects. **Functional Ecology**, v. 23, p. 257-264, 2009.
- DIXON, R. & COATES, D. Near infrared spectroscopy of faeces to evaluate the nutrition and physiology of herbivores. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 17, p. 1-31, 2009.
- DOWELL, F. E.; PARKER, A. G.; BENEDICT, M. Q.; ROBINSON, A. S.; BROCE, A. B. & WIRTZ, R. A. Sex separation of tsetse fly pupae using near-infrared spectroscopy. **Bulletin of Entomological Research**, v. 95, p. 249-257, 2005.
- DZIOCK, F. Evolution of prey specialization in aphidophagous syrphids of the genera *Melanostoma* and *Platycheirus* (Diptera: Syrphidae) 1. Body size, development and prey traits. **European Journal of Entomology**, v. 102, p. 413-421, 2005.
- EVANS, E. W. Habitat displacement of north american ladybirds by an introduced species. **Ecology**, v. 85 n. 3, p. 637-647, 2004.
- EVANS, E. W. Lady beetles as predators of insects other than hemiptera. **Biological Control**, v. 51, p. 255-267, 2009.
- EVANS, E. W. & GUNTHER, D. I. The link between food and reproduction in aphidophagous predators: a case study with *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). **European Journal of Entomology**, v. 102, p. 423-430, 2005.
- FABER, N. M. & RAJKÓ, R. How to avoid over-fitting in multivariate calibration – the conventional validation approach and an alternative. **Analytica Chimica Acta**, v. 595 p. 98-106, 2007.
- FEUNDALE, R. N.; WOODY, N. A.; TAN, H.; MYLES A. J.; BROWN, S. D. & FERRÉ, J. Transfer of multivariate calibration models: a review. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 64, p. 181-192, 2002.
- FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155-171, 2002.
- FINKE, D. L. & DENNO, R. F. Predator diversity dampens trophic cascades. **Nature**, v. 429, p. 407-410, 2004.
- FOLEY, W. J. Near infrared reflectance spectroscopy in ecological studies of plant – animal interactions. **Spectroscopy Europe**, v. 21, n. 5, p. 6-9, 2009.
- FOLEY, W. J., LAWLER, I. R., & MOORE, B. D. NIR reveals why koalas eat from certain Eucalyptus trees. **NIR News**, v. 10, n. 1, p. 21-23, 1999.
- FRAZER, B. D. Predators in: MINKS, A. K. & HARREWIJN, P. **Aphids: their biology, natural enemies and control**, Volume B. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. v. 1988, p. 364.

FREITAS, S. *Chrysoperla Steinmann*, 1964 (Neuroptera, Chrysopidae): descrição de uma nova espécie do Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 3, p. 385-387, 2003.

FRÉCHETTE, B.; ROJO, S.; ALOMAR, O. & LUCAS, E. Intraguild predation between syrphids and mirids: who is the prey? Who is the predator? **BioControl**, v. 52, p. 175-191, 2007.

GIDMAN, E.; GOODACRE, R.; EMMETT, B.; SHEPPARD, L. J.; LEITH, I. D. & GWYNN-JONES, D. Applying metabolic fingerprinting to ecology: the use of fourier-transform infrared spectroscopy for the rapid screening of plant responses to N deposition. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 4, p. 251-258, 2004.

GILLON, D., & DAVID, J. The use of near infrared reflectance spectroscopy to study chemical changes in the leaf litter consumed by saprophagous invertebrates. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 2159-2161, 2001.

GLASSER, T.; LANDAU, S.; UNGAR, E. D.; PEREVOLOTSKY, A.; DVASH, L.; MUKLADA, H.; KABABYA, D. & WALKER, J. W. A fecal near-infrared reflectance spectroscopy-aided methodology to determine goat dietary composition in a Mediterranean shrubland. **Journal of Animal Science**, v. 36, p. 1345-1356, 2008.

GREEK, R. & MENACHE, A. Systematic reviews of animal models: methodology versus epistemology. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, p.206-221, 2013.

GULLAN, P. J. & CRANSTON, P. S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. 1. ed. São Paulo: Editora Roca, 2008. p. 456.

HARWOOD, J. D. & OBRYCKI, J. J. Quantifying aphid predation rates of generalist predators in the field. **European Journal of Entomology**, v. 102, p. 335-350, 2005.

HEBERT, P. D.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H. & HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **PNAS**, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004.

HEROLDOVA, M.; CIZMAR, D. & TKADLEC, E. Predicting rodent impact in crop fields by near-infrared reflectance spectroscopy analysis of their diet preferences. **Crop Protection**, v. 29, p. 773-776, 2010.

HINDAYANA, D.; MEYHÖFER, R.; SCHOLZ, D. & POEHLIN, H. M. Intraguild predation among the hoverfly *Episyrphus balteatus* de Geer (Diptera: Syrphidae) and other aphidophagous predators. **Biological Control**, v. 20, p. 236-246, 2001.

HODEK, I. Bionomics and ecology of predaceous coccinellidae. **Annual Review of Entomology**, v. 12, p. 79-104, 1965.

HODEK, I. & MICHAUD, J. P. Why is *Coccinella septempunctata* so successful? (A point-of-view). **European Journal of Entomology**, v. 105, p. 1-12, 2008.

HOOGENDOORN, M. & HEIMPEL, G. E. PCR-based gut content analysis of insect predators: a field study. In: **International Symposium on Biological Control of Arthropods**, 1, 2002. Honolulu. USDA – Forest Service, 2002, p. 96.

HUBERT, M. & ENGELEN, S. Fast cross-validation of high-breakdown resampling methods for PCA. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 51, p. 5013-2024, 2006.

INGS, T. C.; MONTOYA, J. C.; BASCOMPTE, J.; BLUTHGEN, N.; BROWN, L.; DORMANN, C. F.; EDWARDS, F.; FIGUEROA, D.; JACOB, U.; JONES, J. I.; LAURIDSEN, R. B.; LEDGER, M. E.; LEWIS, H. M.; OLESEN, J. E.; VAN VEEN, F. J.; WARREN, P. H. & WOODWARD, G. Ecological networks – beyond food webs. **Journal of Animal Ecology**, v. 78, p. 253-269, 2009.

ILHARCO, F. A. **Equilíbrio biológico de afídeos**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1992, p. 303.

KANEKO, H.; LAWLER, I. R. Can near infrared spectroscopy be used to improve assessment of marine mammal diets via fecal analysis? **Marine Mammal Science**, v. 22, n. 2, p. 261-275, 2006.

KAARTINEN, R.; STONE, G. N.; HEARN, J.; LOHSE, K. & ROSLIN, T. Revealing secret liaisons: DNA barcoding changes our understanding of food webs. **Ecological Entomology**, v. 35, n. 5, p. 623-638, 2010.

KIDANE, N. F.; STUTH, J. W. & TOLLESON, D. R. Predicting diet quality of donkeys via fecal-NIRS calibrations. **Rangeland Ecology & Management**, v. 61, n. 2, 232-239, 2008.

KINDLMANN, P. & HOUDKOVÁ, K. Intraguild predation: fiction or reality? **Population Ecology**, v. 48, n. 4, 317-322, 2006.

KING, R. A.; READ, D. S.; TRAUGOTT, M. & SYMONDSON, W. O. C. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 947-963, 2008.

KJELDAHL, K. & BRO, R. Some common misunderstandings in chemometrics. **Journal of Chemometrics**, v. 24, p. 558-564, 2010.

KLOWDEN, M. J. **Physiological systems in insects**. 2. ed. San Diego: Elsevier, 2007, p. 688.

KOCH, R. L. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control and non-target impacts. **Journal of Insect Science**, v. 3, n. 32, p. 1-16, 2003.

KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYNSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THÖMING, J. & STEPNOWSKI, P. Application of spectroscopy methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1567-1636, 2010.

LANDAU, S.; GLASSER, T. & DVASH, L. Monitoring nutrition in small ruminants with the aid of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology: A review. **Small Ruminant Research**, v. 61 n. 1, p. 1-11, 2006.

LANDAU, S.; GINGER-REVERDIN, S.; RAPETTI, L.; DVASH, L.; DORLEANS, M. & UNGAR, E. D. Data mining old digestibility trials for nutritional monitoring in confined goats with aids of near infra-red spectrometry. **Small Ruminant Research**, v. 77, p. 146-158, 2008.

LOUDA, S. M.; PEMBERTON, R. W.; JOHNSON, M. T. & FOLLETT, P. A. Nontarget effects - the Achilles' heel of biological control? Retrospective analyses to reduce risk associated with biocontrol introductions. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 365-396, 2003.

LUCAS, É. Intraguild predation among aphidophagous predators. **European Journal of Entomology**, v. 102, p. 351-364, 2005.

LUCK, R. F.; SHEPARD, B. M. & KENMORE, P. E. Experimental methods for evaluating arthropod natural enemies. **Annual Review of Entomology**, v. 33, p. 367-391, 1988.

MARTINS, C. B. C.; ALMEIDA, L. M.; ZONTA-de-CARVALHO, R. C.; CASTRO, C. F. & PEREIRA, R. A. *Harmonia axyridis*: A threat to Brazilian Coccinellidae? **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 4, p. 663-671, 2009.

MAYAGAYA, V. S.; MICHEL, K., BENEDICT, M. Q.; KILLEEN, G. F.; WIRTZ, R. A.; FERGUSON, H. M. & DOWELL, F. E. Non-destructive determination of age and species of *Anopheles gambiae* s. l. using Near-Infrared Spectroscopy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 4, p. 622-630, 2009.

MCCORNACK, B. P.; KOCH, R. L. & RAGSDALE, D. W. A simple method for in-field sex determination of the multicolored asian lady beetle *Harmonia axyridis*. **Journal of Insect Science**, v. 7, n. 10, p. 1-12, 2007.

MEYHOFER, R., & HINDAYANA, D. Effects of intraguild predation on aphid parasitoid survival. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 97, p. 115-122, 2000.

MICHAUD, J. P. On the assessment of prey suitability in aphidophagous Coccinellidae. **European Journal of Entomology**, v. 102, p. 385-390, 2005.

MOROS, J.; IÑÓN, F. A.; GARRIGUES, S. & DE LA GUARDIA, M. Near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and neural networks for measuring nutritional parameters in chocolate samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 584, p. 215-222, 2007.

MUNCK, L. Conceptual validation of self-organisation studied by spectroscopy in an endosperm gene model as a data-driven logistic strategy in chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 84, p. 26-32, 2006.

MUNCK, L. A new holistic exploratory approach to systems biology by Near Infrared Spectroscopy evaluated by chemometrics and data inspection. **Journal of Chemometrics**, v. 21, p. 406-426, 2007.

OBRYCKI, J. J. & KRING, T. J. Predaceous coccinellidae in biological control. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 69, p. 295-321, 1998.

OSAWA, N. The effect of prey availability on ovarian development and oosorption in the ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). **European Journal of Entomology**, v. 102, p. 503-511, 2005.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. & BENTO, J. M. S. Controle **biológico: uma visão inter e multidisciplinar**. In PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. & BENTO, J. M. S. 1. ed. Controle Biológico no Brasil – Parasitóides e Predadores. São Paulo, Manole, 2002, 635p.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S. & KRIEG, N. R.. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996, 524 p.

PEREZ-MENDOZA, J.; DOWELL, F. E.; BROCE, A. B.; THRONE, J. E.; WIRTZ, R. A. & XIE, F. Chronological Age-Grading of House Flies by Using Near-Infrared Spectroscopy. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 3, p. 499-508, 2002.

PEREZ-MENDOZA, J.; THRONE, J. E.; DOWELL, F. E. & BAKER, J. E. Chronological age-grading of three species of stored-product beetles by using near-infrared spectroscopy. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 3, p. 1159-1167, 2004.

PEREZ-MENDOZA, J.; THRONE, J. E.; MAGHIRANG, E. B.; DOWELL, F. E. & BAKER, J. E. Insect fragments in flour: relationship to lesser grain borer (Coleoptera: Bostrichidae) infestation level in wheat and rapid detection using Near-Infrared Spectroscopy. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 6, p. 2282-2291, 2005.

POLIS, G. A.; MYERS, C. A. & HOLT, R. D. The ecology and evolution of intraguild predation: potential competitors that eat each other. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, p. 297-330, 1989.

POLIS, G. A.; SEARS, A. L. W.; HUXEL, G. R.; STRONG, D. R. & MARON, J. When is a trophic cascade a trophic cascade? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 11, p. 473-475, 2000.

RINNAN, A.; VAN DEN BERG, F. & ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009.

RODRIGUES, L. O.; CARDOSO, J. P. & MENEZES, J. C. The use of FT-NIR for API content assay in organic solvent media: A single calibration for multiple downstream processing streams. **Talanta**, v. 75, p. 1203-1207, 2008.

RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. I. Coenosiini neotropicais (Diptera: Muscidae): Taxonomia, filogenia e contribuição da espectroscopia no infravermelho próximo. **Tese de Doutorado em Entomologia**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. I.; CARVALHO, C. J. B.; PASQUINI, C.; DE LIMA, K. M. G.; MOURA, M. O. & ARIZAGA, G. G. C., Barcoding without DNA? Species identification using near infrared spectroscopy. **Zootaxa**, v. 2933, p. 46-54, 2011.

ROSENHEIM, J. A. Higher-order predators and the regulation of insect herbivore populations. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 421-447, 1998.

- ROSENHEIM, J. A.; KAYA, H. K.; EHLER, L. E.; MAROIS, J. & JAFFEE, B. A. Intraguild predation among biological control agents: theory and evidence. **Biological Control**, v. 5, p. 303-335, 1995.
- SATO, S.; DIXON, A. F. & YASUDA, H. Effect of emigration on cannibalism and intraguild predation in aphidophagous ladybirds. **Ecological Entomology**, v. 28, n. 5, p. 628-633, 2003.
- SATO, S.; JIMBO, R.; YASUDA, H. & DIXON, A. F. Cost of being an intraguild predator in predatory ladybirds. **Applied Entomology and Zoology**, v. 43, n. 1, p. 143-147, 2008.
- SHEPPARD, S. K.; BELL, J.; SUNDERLAND, K. D.; FENLON, J.; SKERVIN, D. & SYMONDSON, W. O. C. Detection of secondary predation by PCR analyses of the gut contents of invertebrate generalist predators. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 4461-4468, 2005.
- SHEPPARD, J. K.; LAWLER, I. R. & MARSH, H. Seagrass as pasture for seacows: landscape-level dugong habitat evaluation. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 71, p. 117-132, 2007.
- SHOWERS, S. E.; TOLLESON, D. R.; STUTH, J. W.; KROLL, J. C. & KOERTH, B. H. Predicting diet quality of white-tailed deer via NIRS fecal profiling. **Rangeland Ecology & Management**, v. 59, p. 300-307, 2006.
- STRAUB, C. S.; FINKE, D. L., & SNYDER, W. E. Are the conservation of natural enemy biodiversity and biological control compatible goals. **Biological Control**, v. 45, p. 225-237, 2008.
- STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2004, 244 p.
- SYMONDSON, W. O. C. Molecular identification of prey in predator diets. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 627-641, 2002.
- SYMONDSON, W. O. C.; SUNDERLAND K. D. & GREENSON M. H. Can generalist predators be effective biocontrol agents? **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 561-594, 2002.
- TOFT, S. The quality of aphids as food for generalist predators: implications for natural control of aphids. **European Journal of Entomology**, v. 102, p. 371-383, 2005.
- TOLLESON, D. R.; RANDEL, R. D.; STUTH, J. W. & NEUENDORFF, D. A. Determination of sex and species in red and fallow deer by near infrared reflectance spectroscopy of the faeces. **Small Ruminant Research**, v. 57, p. 141-150, 2005.
- TSUCHIKAWA, S. A review of recent Near Infrared research for wood and paper. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, p. 43-71, 2007.
- VAN EMDEN, H. F.; EASTOP, V. F.; HUGHES, R. D. & WAY, M. J. The ecology of *Myzus persicae*. **Annual Review of Entomology**, v. 14, p. 197-270, 1968.
- WALKER, J. W.; McCOY, S. D.; LAUNCHBAUGH, K. L., FRAKER, M. J. & POWELL, J. Calibrating fecal NIRS equations for predicting botanical composition of diets. **Journal of Range Management**, v. 55, p. 374-382, 2002.

WEBER, D. C. & LUNDGREN, J. G. Assessing the trophic ecology of the Coccinellidae: Their roles as predators and as prey. **Biological Control**, v. 51, p. 199-214, 2009.

WILLIAMS, B. K. & TITUS, K. Assessment of sampling stability in ecological applications of discriminant analysis. **Ecology**, v. 69, n. 4, p. 1275-1285, 1988.

WIKLUND, S.; NILSSON, D.; ERIKSSON, L.; SJÖSTRÖM, M.; WOLD, S. & FABER, K. A randomization test for PLS component selection. **Journal of Chemometrics**, v. 21, p. 427-439, 2007.