

Controle larvário de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) com aplicação de Pyriproxyfen (Sumilarv 0.5G®): efeitos das variações térmicas de diferentes regiões brasileiras simuladas em laboratório.

Lidia Moura

Orientador: Prof. Dr. Juliano José Corbi

LIDIA MOURA

Controle larvário de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) com aplicação de Pyriproxyfen (Sumilarv 0.5G®): efeitos das variações térmicas de diferentes regiões brasileiras simuladas em laboratório

Tese de doutorado apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências: Área de concentração Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Juliano José Corbi

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos - SP

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

M929c Moura, Lidia
Controle larvário de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) com aplicação de Pyriproxyfen (Sumilarv 0.5G®): efeitos das variações térmicas de diferentes regiões brasileiras simuladas em laboratório / Lidia Moura; orientador Juliano José Corbi. São Carlos, 2023.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Temperatura. 2. Culicídeos. 3. Reguladores de Crescimento do Inseto. 4. Controle de Vetores. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **LÍDIA MOURA**.

Título da tese: "Controle larvário de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) com aplicação de Pyriproxyfen (Sumilarv 0.5G®): efeitos das variações térmicas de diferentes regiões brasileiras simuladas em laboratório".

Data da defesa: 03/03/2023.

Comissão Julgadora

Resultado

Prof. Associado **Juliano Jose Corbi**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

APROVADO

Profa. Dra. **Odete Rocha**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADO

Dra. **Flávia Virginio Fonseca**
(Instituto Butantan)

APROVADO

Prof. Dr. **Wilton Rogerio Lustrri**
(Universidade de Araraquara/UNIARA)

APROVADO

Dra. **Cristiane Matavelli**
(BioUrbanus)

APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Carlos De Marqui Junior**

Dedico esta tese ao meu núcleo familiar, meu pai Valter, minha mãe Silvia, minha avó Marlene e meu irmão Fernando. Sem vocês, este trabalho não seria possível. Dedico, também, ao amor da minha vida, Hélio, pois sem seu amor, haveria menos sentido.

Agradecimentos

É incrível a aparente contradição no desenvolvimento de uma tese de doutorado: ao mesmo tempo que boa parte do processo é solitário (a escrita, por exemplo) se não fosse o apoio, o incentivo, a ajuda e o amor de tantas pessoas, este trabalho não seria possível de ser concluído.

Em um momento tão delicado como o que vivemos, especialmente durante os anos mais críticos da emergência global de saúde da pandemia de COVID-19, agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de estar viva, com saúde, para desenvolver essa tese. Neste sentido, é um privilégio enorme ter minha família ao meu lado, com saúde, apoiando-me. Obrigada a minha mãe, Silvia Helena, minha avó Marlene, pela grande companhia e compreensão durante tantos momentos. Agradeço ao meu pai, Valter, pelo apoio de sempre independente da distância que foi maior ainda durante a pandemia. Obrigada ao meu irmão e melhor amigo, Fernando, pelo incentivo durante tantos momentos. Você é a minha grande inspiração para a vida e é um orgulho imenso saber que uma pessoa incrível como você é meu irmão e grande amigo. Obrigada, Thais, por tanta confiança e apoio em diversos momentos que fizeram diferença!

Não há palavras suficientes para expressar meu amor e agradecimentos ao amor da minha vida, Hélio Pinheiro. Unir-me a você foi um grande presente e privilégio que só agregou ao meu propósito de vida. No ciclo da vida, fazendo analogia à escrita de um artigo, é uma honra tê-lo como co-autor e poder dividir a autoria principal em diversos aspectos. Te amo muito! Obrigada por tanto!

Agradeço imensamente ao meu orientador, Juliano Corbi, por tantos ensinamentos que vão além da área acadêmica. Um exemplo de ser humano com o qual foi um privilégio enorme trabalhar junto. Obrigada pela confiança, pelo incentivo e pela parceria!

Sou muito grata às minhas melhores amigas, Joseana MacGyver e Kamila Jessie que são pilares da minha vida em todos os aspectos, cujo evento Chá de Sexta se tornou o mais sagrado na minha vida, por envolver vocês! À Isabela Pereira que, apesar da distância que a vida nos impôs, é extremamente importante na minha vida. A grande amizade que faz toda diferença em alguns caracteres de mensagem, minutos de áudio, conversas em videoconferência. Você existir e estar na minha vida é um grande presente! Obrigada por todo apoio! À Katia Carnier que é minha irmã de alma e que, ao mesmo tempo que faz falta em sua presença se faz presente em sua existência, cujo apoio me trouxe até aqui e me incentiva todos os dias mesmo que não perceba. É uma honra ter sua amizade e apoio! À Letícia Zago, pela confiança enorme no meu potencial que tem grande efeito sobre mim justamente por ser uma inspiração pra mim na ciência e na vida. Seu apoio e sua amizade me incentivaram ao longo do caminho até aqui e sei que irão além. À Karyna Neves, minha grande irmã de alma, que compartilha do mesmo propósito de vida desde a graduação. Crescemos e amadurecemos juntas e tal parceria se transforma a cada ano que passa e a cada etapa da vida e naturalmente se faz presente no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por todo amor e apoio! Ao grande amigo Marco Leão, por tanta companhia, tanto apoio e incentivo e que, apesar da distância, a amizade só se fortaleceu pelo apoio mútuo em tantos desafios ao longo da vida. Obrigada por me lembrar que os valores que levamos pra vida e que os nossos propósitos ao longo dela são muito

importantes. São amizades assim que mostram como a vida vale a pena e como é importante confiar no futuro da humanidade. Meus melhores agradecimentos!

Todo meu agradecimento ao Paulo Guimarães, pelas diversas discussões inspiradoras e incentivadoras que sempre me estimulavam a refletir o meu propósito de vida na pesquisa em busca da carreira como docente. Por tais discussões transpassarem o âmbito acadêmico e refletirem ao propósito de vida. É por pessoas assim que, também, acredito no futuro da humanidade. Obrigada pela amizade e contribuição na minha vivência nessa Terra!

Aos amigos do grupo Among da Raça. Apesar de, muitas vezes, serem impostores no jogo, foram companheiros de tripulação importantes nessa nave da vida ao longo desse doutorado. Obrigada, Anira, Groselha, Miranha, Miguel, Lerigou, Cadu, Lince, Andressita, Cris, AwP, Leticiano e principalmente ao ph (ou Wixxos, ou Ciano, ou...Pedro!) pelos momentos de descontração. E pelo apoio e leveza em busca de um futuro melhor (para além das *bad calls*).

Aos amigos, além de companheiros de bancada, do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos. Mesmo que, infelizmente, muito da convivência tenha sido prejudicada pelo distanciamento social imposto pela Pandemia, poder contar com vocês fez toda diferença. Obrigada, Aline Bernegossi, Barbara Lepretti de Nadai, Gleyson Castro, Bruna Cardoso, Daniel Abrahão, Mayara Felipe, Fernanda Pinheiro, Tallyson Tavares, por dividirem a esperança em um amanhã melhor para a ciência e para a sociedade! Agradeço especialmente à Maria Eduarda Yumi Oyamaguti pela confiança e companhia (presencial e virtualmente) em seu desenvolvimento de iniciação científica. Levarei pra vida toda confiança que você me depositou e fico muito feliz que tenha se desenvolvido em amizade.

Agradeço especialmente ao Professor Dr Guilherme Rossi Gorni pelas contribuições que enriqueceram esse trabalho desde sua concepção no projeto até sua finalização e à Dra Maria de Lourdes da Graça Macoris por tanto apoio no período da qualificação, que fez toda diferença às etapas posteriores.

Quero agradecer imensamente ao Laboratório ASR de Charqueada, em especial à Drielen Conceição e ao Ivan Bortoli que foram muito receptivos comigo e me auxiliaram com as provisões de desovas de *Aedes aegypti*. Sem vocês, este trabalho não seria possível e é muito gratificante que existam empresas cuja missão e valores são inspiradores como é o caso da ASR. Obrigada!

Ao Valter Iosti da Vigilância Epidemiológica de Araraquara, que incentivou nosso trabalho desde sempre com informações e materiais essenciais para o trabalho. Este trabalho só foi viável graças a sua contribuição.

Muito obrigada, Dra Silmara Lazarini e Dr Wilton Rogério Lustri, pelas riquíssimas contribuições nas discussões deste trabalho e pelo apoio com as análises no QUIMMERA.

Não posso deixar de agradecer ao Dr Luis Augusto Ebert que confiou em mim para a tutoria do curso de engenharia ambiental e sanitária na Uniasselvi onde, diariamente, posso por em prática todo o conhecimento adquirido ao longo desses anos de estudo.

Obrigada Sá, Priscila e Rose pelo acolhimento e orientação formidáveis desde o ingresso no mestrado até aqui. Vocês são profissionais e seres humanos inspiradoras que fazem diferença na vida de todos nós!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento: 88887.352964/2019-00. Muito obrigada, CAPES, por tornarem esse trabalho viável e possível!

Aos gatinhos Sofia, Shampoo, Nymeria, Lyanna, Galadriel, Pipoca, Tomás (*Petit Gatão*), Luna, Nina e filhotinhos pela companhia em vários momentos durante a escrita da tese e pela paciência em aceitar os agarrões dessa humana babona durante as pausas da escrita da tese. Juro que vou recompensar com sachê. Miau miau!

Outras tantas pessoas passaram em minha vida e foram significativas, no entanto, o tempo é curto e finalizo agradecendo a todos. Desejo que todos que cruzaram meu caminho vivam bem cada minuto dessa experiência terrena, pois o amanhã é incerto. Desejo que cada um encontre motivos para ser feliz durante o ciclo da vida!

“The Road goes ever on and on
Down from the door where it began.
Now far ahead the Road has gone,
And I must follow, if I can,
Pursuing it with eager feet,
Until it joins some larger way
Where many paths and errands meet.
And whither then? I cannot say”

John Ronald Reuel Tolkien

RESUMO

MOURA, L. **Controle larvário de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) com aplicação de Pyriproxyfen (Sumilarv 0.5G®): efeitos das variações térmicas de diferentes regiões brasileiras simuladas em laboratório.** 2023. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023

As doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) são um grande desafio para as sociedades humanas, especialmente em regiões tropicais. Neste desafio, cabe destacar as populações de mosquito que se tornam resistentes aos inseticidas aplicados para os fins de controle populacional, que justifica a diversidade de compostos que existem atualmente. Um dos larvicidas desta variedade é o Pyriproxyfen um análogo do hormônio juvenil que age no desenvolvimento imaturo e previne a emergência do mosquito adulto. No Brasil, o Ministério da Saúde determina a aplicação deste larvicida com base na concentração preconizada pela Organização Mundial da Saúde (0,01 mg/L) em todo território nacional. Considerando as dimensões continentais do território brasileiro, a aplicação de uma estratégia nacional desconsidera variações regionais de condições ambientais que podem interferir na eficiência do composto. O objetivo da presente pesquisa foi analisar se variações de temperatura simuladas em laboratório para as cinco regiões brasileiras interferem na eficiência do Pyriproxyfen em inibir a emergência de adultos de *Aedes aegypti*. Para isso, foram feitos experimentos para analisar o efeito combinado entre cinco concentrações do Pyriproxyfen (0,0025; 0,005; 0,01; 0,02; 0,04 mg/L) e cinco combinações de temperaturas (17 a 26,1 °C para Sul; 20 a 28,5 °C para Sudeste; 19,5 a 31 °C para Centro-Oeste; 23 a 32,3 °C para Norte e 23 a 30,3 °C para Nordeste), sendo as mais quentes programadas para o fotoperíodo claro (14 horas de duração) e as mais frias para o fotoperíodo escuro (10 horas de duração), simulando os ciclos térmicos diários). Também foram analisados os efeitos sub-letais do composto, nas respostas de longevidade e da morfologia alar. De forma geral, as concentrações que inibem a emergência de 50% da população (IE₅₀) não ultrapassaram 0,01 mg/L entretanto, nas condições mais frias referentes às regiões Sul e Sudeste as IE₅₀ foram três e duas vezes menor a preconizada pela Organização Mundial da Saúde respectivamente. Houve evidências de que a sensibilidade dos organismos testados foi maior nas condições térmicas mais frias, simuladas para as regiões Sul e Sudeste ($p < 0,05$). A longevidade média foi significativamente maior para os mosquitos sobreviventes aos tratamentos em temperaturas mais quentes (Centro-Oeste). O tamanho dos centroides alares foi maior no tratamento com temperaturas menores (Sul). Os resultados podem contribuir com o ajuste das recomendações de uso do Pyriproxyfen com base na regionalização, considerando as peculiaridades de temperatura para promover aplicação racional do composto e ajudar na prevenção do desenvolvimento de populações de mosquito resistentes ao composto.

Palavras-Chave: Temperatura. Culicídeos. Reguladores de Crescimento do Inseto. Controle de Vetores.

ABSTRACT

MOURA, L. **Controlling *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae with Pyriproxyfen (Sumilarv 0.5G®): Effects of thermal fluctuation from different Brazilian regions simulated in laboratory.** 2023. 149 p. Thesis (Doctor degree in Science) – School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2023.

Diseases transmitted by the mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) are a major challenge for human societies, especially in tropical regions. Given this challenge, it is worth highlighting the development of resistance to insecticides applied for mosquito population control purposes, which explains the diversity of compounds that currently exist. One of the larvicides from this variety is Pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue that acts during immature development and prevents the emergence of the adult mosquito. In Brazil, the Ministry of Health determines the application of this larvicide based on the concentration recommended by the World Health Organization (0.01 mg/L) throughout the country. Given the continental dimensions of the Brazilian territory, the application of a national strategy disregards regional variations in environmental conditions that may interfere with the efficiency of the compound. The goal of this research was to analyze whether temperature variations simulated in the laboratory for the five Brazilian regions interfere with the efficiency of Pyriproxyfen in inhibiting the emergence of *Aedes aegypti* adults. Then, experiments were carried out to analyze the combined effect between five concentrations of Pyriproxyfen (0.0025; 0.005; 0.01; 0.02; 0.04 mg/L) and five combinations of temperatures (17 to 26.1 °C for the South; 20 to 28.5 °C for the Southeast; 19.5 to 31 °C for the Central-West; 23 to 32.3 °C for the North and 23 to 30.3 °C for the Northeast), with the hottest scheduled for the light phase of the photoperiod (14 hours duration) and the coldest ones for the dark phase (10 hours duration), simulating daily thermal cycles). The sub-lethal effects of the compound on longevity responses and wing morphology were also analyzed. In general, the concentrations that inhibit the emergence of 50% of the population (IE50) did not exceed 0.01 mg/L. World Health Organization respectively. There was evidence that the sensitivity of the tested organisms was higher in the colder thermal conditions, simulated for the South and Southeast regions ($p < 0.05$). Mean longevity was significantly higher for mosquitoes that survived treatments in warmer temperatures (Midwest). The wing centroid size was larger in the treatment with lower temperatures (South). The results can contribute to the adjustment of recommendations for the use of Pyriproxyfen based on regionalization, considering the peculiarities of temperature to promote rational application of the compound and help prevent the development of mosquito populations resistant to Pyriproxyfen.

Keywords: Temperature; Culicidae; Insect Growth Regulators; Vector Control

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	28
Figura 2: Vista dorsal do tórax de um <i>Aedes aegypti</i> adulto	30
Figura 3: Larva de <i>Aedes aegypti</i> com 9 dias de idade vista sob magnificação de 15x	35
Figura 4: Representação esquemática da dinâmica hormonal nos eventos do primeiro ciclo reprodutivo de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	39
Figura 5: Composições de Pyriproxyfen aplicadas nos experimentos. a) Embalagem do Sumilarv 0,5G. b) Embalagem do Pyriproxyfen de alta pureza	46
Figura 6: Amostras de soluto de Pyriproxyfen (pureza 99%)	47
Figura 7: Equipamento utilizado para leitura de espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier. a) vista superior do equipamento; b) Equipamento com sensor em contato com uma amostra de Pyriproxyfen de alta pureza	48
Figura 8: Desova de <i>Aedes aegypti</i> (Rockefeller) fixa em papel poroso	49
Figura 9: Representação esquemática da indução à eclosão de ovos e criação das larvas de <i>Aedes aegypti</i> antes dos experimentos	50
Figura 10: Potes contendo as criações de <i>Aedes aegypti</i> dentro de incubadora	51
Figura 11: Água turva contendo larvas de <i>Aedes aegypti</i>	52
Figura 12: Preparação da solução-estoque de Pyriproxyfen utilizando.....	53
Figura 13: Unidade experimental dos testes para inibição de	54
Figura 14: Resumo geral do desenho experimental adotado	55
Figura 15: Solução-estoque de Pyriproxyfen mantido na incubadora	56
Figura 16: Exemplo do método de criação dos mosquitos adultos para análise de longevidade	57
Figura 17: Lâminas montadas com asas de fêmeas	59
Figura 18: Posição dos pontos anatômicos na asa esquerda de <i>Aedes aegypti</i>	60
Figura 19: Fator de escala utilizado nas conversões no tpsdig para as coordenadas posicionais dos pontos anatômicos das asas.....	61
Figura 20: Representação gráfica da proporção de inibição da emergência de adultos em diferentes concentrações de Pyriproxyfen nas simulações térmicas para as 5 regiões brasileiras	64
Figura 21: Representação gráfica da inibição de emergência de adultos de <i>Aedes aegypti</i> expostos a diferentes concentrações sob condições térmicas distintas associadas às cinco regiões brasileiras	68

Figura 22: Distribuição dos valores calculados para a IE50 nas simulações térmicas regionais.....	71
Figura 23: Proporção da inibição de emergência de adultos de <i>Aedes aegypti</i> em experimentos com exposição prévia da solução com Pyriproxyfen por diferentes períodos sob as condições térmicas simuladas para Centro-Oeste. A) Pós 15 dias; B) Pós 30 dias.....	73
Figura 24: Inibição de emergência de adultos nos experimentos com exposição prévia da solução com Pyriproxyfen por diferentes períodos sob as condições térmicas simuladas para Sudeste. A) Pós 10 dias; B) Pós 15 dias; C) Pós 30 dias	74
Figura 25: Inibição de emergência de adultos (<i>Aedes aegypti</i>) nos experimentos com exposição prévia da solução com Pyriproxyfen por diferentes períodos sob as condições térmicas simuladas para a região Sul. A) Pós 10 dias; B) Pós 15 dias; C) Pós 30 dias.....	75
Figura 26: Inibição de emergência de adultos (<i>Aedes aegypti</i>) nos experimentos com exposição prévia da solução com Pyriproxyfen sob as condições térmicas simuladas para a região Norte.	76
Figura 27: Perfil de longevidade de machos de <i>Aedes aegypti</i> dos experimentos controle sob diferentes regimes de temperatura simulados para quatro regiões brasileiras.....	81
Figura 28: Perfil de longevidade de fêmeas e machos de <i>Aedes aegypti</i> sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen nas condições térmicas simuladas para região Norte (N).....	82
Figura 29: Longevidade de fêmeas e machos de <i>Aedes aegypti</i> sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen nas condições térmicas simuladas para região Centro-Oeste (CO)	83
Figura 30: Longevidade de fêmeas e machos de <i>Aedes aegypti</i> sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen nas condições térmicas simuladas para região Sul (S)	84
Figura 31: Longevidade de fêmeas e machos de <i>Aedes aegypti</i> sobreviventes a 0,0025 mg/L de Pyriproxyfen na condição de simulação térmica para a região Sudeste	85
Figura 32: Representação gráfica da distribuição de tamanhos do centroide alares das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> sob as cinco condições térmicas simuladas das regiões brasileiras (experimento controle)	89

Figura 33: Representação da variação do formato alar das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> nas condições térmicas simuladas para as cinco regiões brasileiras testadas no tratamento controle, de acordo com a Análise de Variáveis Canônicas com alometria	90
Figura 34: Representação da distribuição do tamanho dos centroides alares das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> provindas dos experimentos com simulações térmicas da região Sul do Brasil	92
Figura 35: Representação gráfica da variação em forma no morfoespaço, segundo a análise de variáveis canônicas (asas das fêmeas provindas das simulações térmicas correspondentes a região Sul do Brasil com alometria)	93
Figura 36: Representação gráfica dos tamanhos de centroides alares –	94
Figura 37: Representação gráfica da variação em forma no morfoespaço, segundo a análise de variáveis canônicas (asas das fêmeas provindas das simulações térmicas correspondentes a região Sudeste do Brasil com alometria)	95
Figura 38: Tamanho do centroide (mm) das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a diferentes concentrações de Pyriproxyfen (Região Centro-Oeste)	97
Figura 39: Representação da variação de forma entre os diferentes tratamentos (Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em condições de temperatura da região Centro-Oeste - CO) de acordo com a análise de variáveis canônicas com alometria	98
Figura 40: Tamanho do centroide alar (mm) das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> na condição térmica da região Nordeste sob diferentes concentrações de Pyriproxyfen.....	100
Figura 41: Representação da variação de forma entre os diferentes tratamentos (Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em condições de temperatura da região Nordeste - NE) de acordo com a análise de variáveis canônicas com alometria	101
Figura 42: Tamanho do centroide alar (mm) das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> na condição térmica da região Norte sob diferentes concentrações de Pyriproxyfen.	102
Figura 43: Representação da variação de forma alar entre os diferentes tratamentos (Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> -condições do Norte - N) de acordo com a análise de variáveis canônicas com alometria.....	103
Figura 44: Tamanho do centroide (mm): Asas de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> de todas as regiões sobreviventes à concentração de 0,0025 mg/L.....	105
Figura 45: Tamanho do centroide (mm): Asas de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> de todas as regiões sobreviventes à concentração de 0,005 mg/L.....	106

Figura 46: Tamanho do centroide (mm): Asas de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> de todas as regiões sobreviventes à concentração de 0,01 mg/L	107
Figura 47: Representação gráfica da distribuição de tamanhos do centroide alares dos machos de <i>Aedes aegypti</i> sob as 5 condições térmicas simuladas das regiões brasileiras no controle	112
Figura 48: Representação da variação da forma alar dos machos nas condições térmicas simuladas para as cinco regiões brasileiras testadas, de acordo com a Análise de Variáveis Canônicas com alometria.....	113
Figura 49: Representação gráfica dos tamanhos dos centroides dos machos sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriroxyfen na simulação térmica da região Sul	114
Figura 50: Representação da variação da forma alar dos machos de <i>Aedes aegypti</i> nas condições térmicas simuladas para a região Sul, de acordo com a Análise de Variáveis Canônicas.....	115
Figura 51: Representação gráfica dos tamanhos dos centroides dos machos de <i>Aedes aegypti</i> sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriroxyfen na simulação térmica da região Sudeste	116
Figura 52: Representação da variação da forma alar dos machos de <i>Aedes aegypti</i> nas condições térmicas simuladas para a região Sudeste, de acordo com a Análise de Variáveis Canônicas com alometria	117
Figura 53: Representação gráfica da distribuição dos valores dos TC dos machos de <i>Aedes aegypti</i> emergidos de diferentes concentrações de Pyriproxifen nas simulações térmicas para a região Centro-Oeste	118
Figura 54: Representação da variação da forma alar dos machos de <i>Aedes aegypti</i> nas condições térmicas simuladas para a região Centro-Oeste, de acordo com a Análise de Variáveis Canônicas com alometria.....	119
Figura 55: Distribuição dos valores de TC para as asas dos machos de <i>Aedes aegypti</i> sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxifen sob as condições térmicas simuladas para a região Nordeste.....	120
Figura 56: Representação da variação da forma alar dos machos de <i>Aedes aegypti</i> nas condições térmicas simuladas para a região Nordeste, de acordo com a Análise de Variáveis Canônicas.....	121

Figura 57: Distribuição dos valores de TC para as asas dos machos de <i>Aedes aegypti</i> sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen sob as condições térmicas simuladas para a região Norte	122
Figura 58: Morfoespaço de variáveis canônicas mais representativas para as asas de machos de <i>Aedes aegypti</i> sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen sob as condições térmicas simuladas para a região Norte com alometria	123
Figura 59: Tamanhos do centroide alares dos machos de <i>Aedes aegypti</i> expostos a 0,0025 mg/L sob diferentes condições térmicas	124
Figura 60: Porcentagem de transmitância de radiação infravermelha de amostra do Pyriproxyfen após análise em espectrometria	126
Figura 61: Porcentagem de transmitância de radiação infravermelha de amostras de Pyriproxyfen expostas a diferentes temperaturas por mais de uma semana	127
Figura 62: Localização dos municípios amostrados para a região Norte do Brasil .	144
Figura 63: Localização dos municípios amostrados para a região Nordeste do Brasil	145
Figura 64: Localização dos municípios amostrados para a região Sudeste do Brasil	146
Figura 65: Localização dos municípios amostrados para a região Sul.....	147
Figura 66: Localização dos municípios amostrados para a região Centro-Oeste ...	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios para temperaturas máximas e mínimas calculadas para cada região brasileira	45
Tabela 2: Características químicas do Sumilarv 0,5G®.	46
Tabela 3: Informações gerais e descritivas da duração (em dias) dos experimentos de exposição das larvas a diferentes concentrações de Pyriproxyfen em diferentes condições simuladas para as regiões brasileiras	63
Tabela 4: Valores da estatística p no teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas de inibição de emergência de adultos para as larvas expostas à 0,0025 mg/L de Pyriproxyfen em diferentes simulações térmicas regionais.	66
Tabela 5: Estatística p no teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas de inibição de emergência de adultos em larvas expostas a 0,02 mg/L de Pyriproxyfen em diferentes simulações térmicas regionais.....	67
Tabela 6: Dados descritivos sobre a longevidade de <i>Ae. aegypti</i> adultos sobreviventes ao Pyriproxyfen em diferentes condições térmicas	78
Tabela 7: Estatística descritiva dos tamanhos do centroide alar das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> em diferentes condições térmicas e expostas a diferentes concentrações de Pyriproxyfen	91
Tabela 8: Valores p da ANOVA de Procrustes para os dados das asas	96
Tabela 9: Valores da estatística p provenientes do teste post hoc de Tukey - Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> testadas nas condições da região Centro-Oeste	96
Tabela 10: Valores da estatística p da ANOVA de Procrustes para as asas das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> para a região Centro-Oeste (CO)	97
Tabela 11: Valores da estatística p para o teste post hoc de Tukey (Tamanho do centroide de Fêmeas na região termicamente simulada do Nordeste)	99
Tabela 12: Dados dos valores de p calculados pela ANOVA de Procrustes (Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em exposição na condição térmica da região Norte N)	102
Tabela 13: Distâncias de Mahalanobis (Fêmeas - Norte).....	104
Tabela 14: Valores de p para o teste post hoc de Tukey com os dados de tamanho dos centroides de asas das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em cada condição testada para a concentração de Pyriproxyfen de 0,005 mg/L	106

Tabela 15: Dados descritivos sobre o tamanho dos centroides das asas de machos de <i>Aedes aegypti</i> nas diferentes condições de experimento.....	110
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

20E – 20-Hidroxicdisona

AVC – Análise de variáveis canônicas

BDMEP – Base de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa

CO – Centro-Oeste

dM – distância de Mahalanobis

dP – distância de Procrustes

HJ – Hormônio Juvenil

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IE – Inibição de emergência

IE₅₀ – Concentração que inibe a emergência de 50% da população

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia

LEAA – Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos

MS – Ministério da Saúde

N – Norte

NE – Nordeste

OMS – Organização Mundial da Saúde

rpm – rotações por minuto

S – Sul

SE – Sudeste

TC – tamanho do centroide

VC – variáveis canônicas

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius;

cm – centímetro;

µL – microlitro;

mL – mililitro;

mg - miligramma

L – litro;

d – dia;

g – grama;

h – hora;

min – minuto;

mg/L – miligramma por litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	23
2. HIPÓTESES E OBJETIVOS	26
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 <i>Aedes aegypti</i> : aspectos biológicos e ecológicos.....	27
3.1.1 <i>Aedes aegypti</i> e sua domesticação	27
3.1.1 Aspectos ecológicos de <i>Aedes aegypti</i> relacionados ao seu sucesso nos ambientes urbanos enquanto espécie invasora.....	29
3.1.2 Morfologia alar e morfometria geométrica	31
3.1.3 Desenvolvimento larval de <i>Aedes aegypti</i>	34
3.1.4 Aspectos reprodutivos de <i>Aedes aegypti</i> adultos	36
3.2 Reguladores de crescimento do inseto	40
3.3 Influência da amplitude térmica na ocorrência de epidemias.....	41
3.4 Variação térmica e aplicação de inseticidas.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Determinação das temperaturas experimentais	44
4.2 Pyriproxyfen: ingrediente ativo e composição	45
4.3 Caracterização térmica do Pyriproxyfen.....	46
4.4 Criação e aclimação das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	48
4.5 Bioensaios utilizando simulações térmicas regionais.....	52
4.5.1 Preparação da solução de Sumilarv 0,5G.	52
4.5.2 Ensaios de inibição de emergência de adultos.....	53
4.5.3 Bioensaios para avaliação de efeito residual do Sumilarv® 0,5G.....	55
4.6 Longevidade de mosquitos adultos sobreviventes ao Pyriproxyfen	56
4.7 Análise de dados.....	57
4.8 Morfometria geométrica	58
4.8.1 Considerações gerais e análise de tamanho	58
4.8.2 Análise de assimetrias alares flutuante e direcional	61
4.8.3 Análise da forma alar com variáveis canônicas	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 Experimentos de toxicidade crônica para avaliação da eficiência de Pyriproxyfen no controle de larvas de <i>Ae. aegypti</i> em simulações térmicas regionais do Brasil.....	63
5.2 Longevidade de <i>Aedes aegypti</i> adultos sobreviventes ao Pyriproxyfen.....	78
5.3 Morfometria geométrica alar: tamanho e forma.....	88
5.4 Caracterização química do Pyriproxyfen em função da temperatura	125

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
7. Conclusões	131
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
9. APÊNDICE A – Localização dos municípios amostrados e agrupados por região, utilizados nos cálculos das temperaturas utilizadas nos experimentos.....	144

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As doenças transmitidas por artrópodes são grandes preocupações para a saúde pública no Brasil e no mundo. As doenças causadas por vírus vetorizadas por meio do mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762, como a dengue, merecem destaque: considerando apenas o continente americano, a incidência dessa enfermidade aumentou em 30 vezes nos últimos 50 anos, sendo que atualmente o Brasil conta com mais da metade dos casos de dengue registrados nas Américas e, só em janeiro e fevereiro de 2023, foram registrados 160 mil casos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

A disseminação das arboviroses tem caráter multifatorial e o crescente número de pessoas sob o risco de contaminação deve-se a: Mudanças climáticas, que favorecem a dispersão dos vetores; A urbanização, que propicia maior variedade de micro habitats para o desenvolvimento larval e refúgio aos mosquitos adultos; Ao aumento da mobilidade intercontinental, que propicia o transporte acidental de vetores e de vírus para novas localidades e ao crescimento populacional humano (RYAN *et al.*, 2019).

Com o objetivo de melhorar a capacidade de controle das arboviroses, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu a Resposta Global para Controle de Vetores para o horizonte temporal de 2017 a 2030, a qual provê estratégias para os países reforçarem seus programas de controle de vetores com foco em quatro pilares: (1) vigilância epidemiológica e de vetores; (2) controle de vetores; (3) engajamento e mobilização social e (4) colaboração inter e intra setoriais (OMS, 2017).

No Brasil, as ações para controlar as populações de *Ae. aegypti* têm sido compostas principalmente por controle químico e mecânico, com objetivo de reduzir a infestação, enquanto as mobilizações sociais, gestão ambiental e legislação ambiental objetivam reduzir as chances de que os ambientes tenham locais que sejam potenciais criadouros larvais (CAMPOS *et al.*, 2020). Para o controle químico, por meio dos inseticidas, os compostos disponíveis apresentam uma variedade de mecanismos de ação que podem ser voltados para o estágio adulto ou larval do inseto.

De acordo com Campos et al. (2020) controlar as populações dos insetos em seu estágio imaturo (ovos, larvas e pupa) é mais viável, considerando que esta fase do desenvolvimento ocorre em locais específicos e restritos, diferente dos adultos que podem dispersar rapidamente em outros ambientes exibindo rápida resposta de fuga. Além disso, os mosquitos adultos oferecem risco direto ao cenário epidemiológico, devido a alimentação de sangue (hematofagia) das fêmeas, o que também contribui com a ideia de que os esforços de controle químico devem ser direcionados às larvas.

No entanto, vários estudos ao longo das últimas décadas reportaram o desenvolvimento de populações resistentes aos larvicidas e adulticidas usados nos programas de controle populacional (LUNA et al., 2004; BRAGA; VALLE, 2007; DIAS et al., 2017; MACORIS et al., 2018), principalmente ao temefós, um organofosforado aplicado extensiva e exclusivamente para controle populacional do mosquito (GARCIA et al., 2018). Os inseticidas compõem parte da pressão seletiva aos indivíduos expostos no ambiente. A aplicação intensa por longos períodos, pode facilitar no desenvolvimento de populações de mosquito resistentes, uma vez que os indivíduos resistentes têm maior chance de sobrevivência e de reproduzir novos indivíduos com tal característica. Como forma de manter a suscetibilidade dos indivíduos aos inseticidas é recomendada a utilização rotacionada de compostos, aplicando uma única classe por um período máximo de quatro anos com posterior reavaliação do nível de suscetibilidade das populações de *Ae. aegypti* (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2012).

Neste contexto, o Ministério da Saúde (MS) (2014) deliberou a substituição do larvicida outrora aplicado (*Novaluron*) pelo Pyriproxyfen, um análogo do hormônio juvenil cujo modo de ação se dá pela inibição da emergência de mosquitos adultos (DEVILLERS, 2020). O Pyriproxyfen foi oficialmente aplicado em todo território brasileiro até 2018 e este foi substituído, recentemente, por um larvicida natural. A reavaliação do nível de suscetibilidade neste período é importante para delinear qual composto pode ser aplicado para que se tenha sucesso nas campanhas de controle, incluindo a reaplicação do Pyriproxyfen caso as populações permaneçam suscetíveis a esse ingrediente ativo.

Em condições laboratoriais e de campo, o Pyriproxyfen tem demonstrado alta eficiência na inibição da emergência dos indivíduos expostos a baixas concentrações, enquanto larvicida granular (HUSTEDT et al., 2020). No entanto

esses experimentos, ao serem realizados em condições controladas, tendem a desconsiderar a possibilidade de interferência pelas variações das condições ambientais (VAN DEN BRINK; KLEIN; RICO, 2017). Uma dessas condições é a temperatura, sendo que sua flutuação já é conhecida por influenciar no tempo de desenvolvimento do mosquito e nas propriedades químicas do Pyriproxyfen (SULLIVAN; GOH, 2008; KODAKA et al., 2011; CARRINGTON et al., 2013; DEVILLERS, 2020).

Além da temperatura constante, a variação térmica ao longo do dia deve ser considerada como possível fator de interferência na eficiência do larvicida, visto que há influência já relatada na literatura sobre o tempo de desenvolvimento das larvas (COSTA et al., 2010; CARRINGTON et al., 2013) e na dinâmica da ocorrência de epidemias (ALTO et al., 2008; SIRAJ et al., 2017; GUTIÉRREZ et al., 2020).

O MS (2014), seguindo preconizações feitas pela OMS, determina a aplicação de 0,01 mg/L de Pyriproxyfen em todo o Brasil durante as campanhas da Vigilância Epidemiológica, o que desconsidera particularidades regionais ao longo do território brasileiro. Em trabalhos anteriores, Moura et al. (2021) apontaram que a eficiência do Pyriproxyfen tem relação com a temperatura do ambiente, detectando evidência de redução da inibição de emergência de adultos com o aumento da temperatura. Em um país de dimensões continentais como o Brasil, há grandes variações de temperatura entre as regiões, que demonstram cenários diferentes mesmo considerando os meses de maior risco das epidemias, entre setembro e abril.

Dessa forma, a presente tese tem como propósito central analisar como a variação térmica padrão para as cinco regiões do Brasil podem influenciar na eficiência de controle larvário de *Ae. aegypti* pelo Pyriproxyfen. A informação sobre amplitude térmica, aplicada aos testes de eficiência do larvicida, pode contribuir com uma compreensão mais ampla sobre o modo de utilização dos inseticidas de forma mais estratégica.

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese foi analisar as diferenças na eficiência do larvicida Sumilarv 0.5G® (Pyriproxyfen) sobre o controle de *Aedes aegypti*, quando submetido a variações térmicas típicas das estações primavera e verão, registradas nas cinco regiões brasileiras. Com isso, foi definida a seguinte hipótese:

Hipótese:

A eficiência do larvicida é menor em regiões com variações de temperaturas diárias em torno de uma média de temperatura mais alta se comparadas às regiões com variações de temperaturas em torno de uma média mais baixa.

Objetivos específicos:

- Determinar as variações térmicas para cada região do Brasil a serem aplicadas nos testes de eficiência do larvicida Sumilarv 0.5G® (Pyriproxyfen);
- Analisar o efeito combinado entre variações térmicas e diferentes concentrações do larvicida Sumilarv 0.5G® na mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*;
- Analisar o efeito residual do larvicida Sumilarv 0.5G®, em cada região termicamente simulada;
- Determinar e analisar a longevidade dos mosquitos sobreviventes às diferentes variações térmicas e concentrações de larvicida;
- Avaliar alterações, em tamanho e simetria, na morfologia alar de fêmeas e machos.
- Caracterizar o Pyriproxyfen após tratamento térmico.

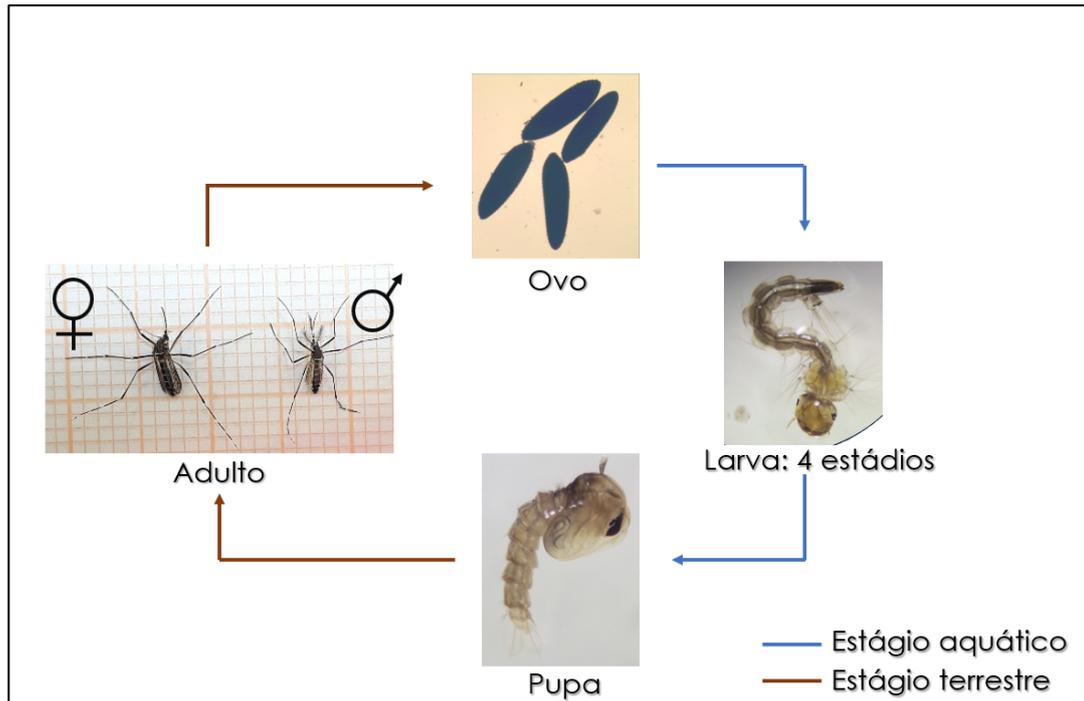
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Aedes aegypti*: aspectos biológicos e ecológicos

3.1.1 *Aedes aegypti* e sua domesticação

Nas últimas décadas, o aumento e consequente expansão das sociedades humanas na ocupação dos territórios levou à supressão do habitat de outros seres vivos, decorrente da transformação do ambiente (BROWN *et al.*, 2014). Deste cenário, existem duas principais possibilidades: a extinção da espécie, devido à supressão de seu habitat, e a domesticação ou sinantropismo resultante da convivência entre a espécie em associação próxima com os humanos. Quando este segundo caso ocorre, considerando insetos hematófagos, o resultado pode ser desastroso (POWELL; TABACHNICK, 2013). A consequência, quando acontece a transição de zoofagia para antropofagia, é a maior probabilidade de transmissão de patógenos aos humanos que outrora estavam restritos a outros hospedeiros vertebrados, favorecendo o salto evolutivo de alguns vírus (HASSELL *et al.*, 2017). Esses insetos que se alimentam de sangue em algum momento do ciclo de vida muito frequentemente desenvolvem preferência pelo sangue mais disponível: o dos humanos. Este foi o caso para a espécie *Aedes aegypti* (HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001; POWELL; TABACHNICK, 2013; SOGHIGIAN *et al.*, 2020).

O *Aedes aegypti* é uma espécie de mosquito da Classe Insecta, Ordem Diptera, pertencente à Família Culicidae. O ciclo de vida do *Ae. aegypti* é holometábolo (i. e. apresenta metamorfose completa), compreendendo quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. Os estágios larvais e de pupa são aquáticos enquanto o estágio adulto é terrestre, conforme ilustrado pela Figura 1 (RUPPERT; FOX; BARNES, 2003).

Figura 1: Ciclo de vida do *Aedes aegypti*

Fonte: Autoria própria (2022)

O *Ae. aegypti* existe em duas subespécies: a subespécie doméstica, encontrada fora do continente africano (*Ae. aegypti aegypti*) e seu ancestral simpátrico que habita a África subsaariana (*Ae. aegypti formosus*) (GLORIA-SORIA et al., 2016; TCHOUASSI et al., 2022). Dados genéticos sugerem que a origem da espécie ocorreu nas ilhas do Oceano Índico e dispersou-se para o continente Africano há cerca de 85.000 anos atrás, posteriormente dispersando dentro das savanas africanas (SOGHIGIAN et al., 2020).

A subespécie doméstica *Ae. aegypti* derivou-se de uma pequena população de *Ae. formosus* a partir de isolamento geográfico no norte do continente africano durante uma seca severa que se iniciou na região do Saara há, aproximadamente, 4000 anos atrás (TABACHNICK, 1991). A hipótese é a de que a paisagem árida contribuiu com a seleção de indivíduos com comportamento doméstico. As comunidades humanas, à época nômades, tinham o hábito de armazenar água devido este ser um recurso escasso em meio ao deserto. Tal armazenamento favoreceu a persistência e dispersão dos *Ae. formosus* que, com as gerações e o isolamento, tornou-se uma nova espécie utilizando deste armazenamento artificial de água como criadouro (TABACHNICK, 1991).

Com a expansão do mercado global e aumento do transporte intercontinental, o *Ae. aegypti* teve sua dispersão favorecida para outras regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a espécie chegou pelo transporte acidental com as embarcações dos colonizadores portugueses a partir do tráfico humano de africanos escravizados, entre os séculos XV e XVIII (GUBLER, 2011; POWELL; TABACHNICK, 2011; ZARA et al., 2016). Tal transporte foi efetivo na introdução da febre amarela na região tropical das Américas. Durante os séculos XVIII e XIX, relatos de doença similar ao que se conhece hoje como a Dengue foram feitos (GUBLER, 2011; RODHAIN, 2022). Corroborando com tais relatos, houve também evidências de circulação dos 4 sorotipos da dengue em outros primatas na Ásia e na África. Notavelmente, o sorotipo DENV-2 se estabeleceu nas Américas antes de emergir na Ásia, sendo também o primeiro arbovírus a ser isolado nas Américas (GUBLER, 2018, 2011; VASILAKIS et al., 2011; MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017;)

Com a expansão e intensificação da urbanização ao longo dos séculos, a espécie exótica tornou-se invasora com alta capacidade adaptativa, favorecendo a dispersão e dificultando o controle populacional. Os ambientes urbanos oferecem grande diversidade de criadouros devido desde a configuração do ambiente, composto por estruturas construídas com brechas capazes de reter água, como o comportamento das sociedades humanas, por exemplo considerando o avanço da indústria automobilística que envolve intenso e extenso comércio de pneus, os quais são potenciais criadouros do mosquito (GUBLER, 2011; WILKE et al., 2020; MOHAMMADI et al., 2022). Neste sentido, diversas são as características da história de vida do mosquito que o tornam bem sucedido no ambiente urbano.

3.1.1 Aspectos ecológicos de *Aedes aegypti* relacionados ao seu sucesso nos ambientes urbanos enquanto espécie invasora

Os adultos de *Ae. aegypti* são facilmente identificáveis por suas características: escamas alternadas entre brancas e escuras, desenho em forma de lira composto por escamas branco-prateadas e um escudo recoberto por escamas mais escuras, o que pode ser observado por meio da Figura 2 (REY, 2001). Nesta espécie, o dimorfismo sexual é bem demarcado, sendo principalmente observado pelas diferenças morfológicas nas antenas, visto que a antena das fêmeas é pilosa enquanto a antena

dos machos é plumosa. Além disso, as fêmeas são maiores e apresentam peças bucais adaptadas do tipo sugador picador.

A fecundidade e fertilidade das fêmeas são cruciais na estrutura populacional dos mosquitos, que impacta diretamente na quantidade de prole viável resultante. Nesse sentido, é importante considerar os machos e seus parâmetros bioecológicos como fatores interferentes no cenário epidemiológico (OLIVA; DAMIENS; BENEDICT, 2014). Para os machos, características como tamanho corporal, idade e longevidade e, capacidade de detecção de fontes de seiva são determinantes para o sucesso do acasalamento (PONLAWAT; HARRINGTON, 2009; BELLINI et al., 2014; JESUS; REISKIND, 2016; SASMITA et al., 2019).

Figura 2: Vista dorsal do tórax de um *Aedes aegypti* adulto



Fonte: Genilton Vieira (Instituto Oswaldo Cruz)

O sistema de acasalamento em mosquitos compreende todo atributo fisiológico, comportamental e ecológico que conduzem ao encontro de machos e fêmeas até a cópula, inseminação e fertilização (LEES et al., 2014).

O acasalamento é precedido pela localização da parceira que normalmente requer comportamento epigâmico apropriado para atração da fêmea (OLIVA; DAMIENS; BENEDICT, 2014). Em relação ao comportamento, os machos da espécie *Ae. aegypti* são capazes de acasalar em qualquer período do dia, sendo que o pico de acasalamento ocorre durante a tarde associado aos sinais de hospedeiros humanos (LEES *et al.*, 2014).

Os mosquitos, de ambos os sexos, alimentam-se de seiva elaborada enquanto apenas a fêmea realiza o repasto sanguíneo para maturação dos ovários, com preferência em humanos para este tipo de alimentação (COSTANZO *et al.*, 2015; DIAS, 2015). Embora seja conhecimento popular que as fêmeas se tornam infectadas a partir da hematofagia em um vertebrado contaminado com algum arbovírus compatível, recentemente observou-se a transmissão venérea entre os mosquitos e a transmissão vertical por meio de ambiente contaminado com partículas virais, ambos para o vírus Zika (PEREIRA-SILVA *et al.*, 2018; DU *et al.*, 2019).

Dissimilar a outros insetos hematófagos, Scott *et al.* (1993) identificaram que a fêmea de *Ae. aegypti* pode se alimentar de sangue mais de uma vez em um mesmo ciclo gonotrófico, característica denominada discordância gonotrófica. A frequência de alimentação, no entanto, é correlacionada positivamente com a condição térmica do ambiente, com maior frequência de alimentação em ambientes mais quentes se comparados com a periodicidade observada em ambientes mais frios (SCOTT *et al.*, 2000).

Após a hematofagia, as fêmeas repousam, realizam a digestão e em seguida buscam locais para oviposição. A deposição dos ovos é feita nas paredes dos criadouros, próximos à lâmina d'água, com preferência por superfícies escuras e/ou sombreadas (WONG *et al.*, 2011; PRADO *et al.*, 2017). As fêmeas do mosquito apresentam comportamento de oviposição aos saltos (*skip-oviposition*), no qual elas distribuem os ovos em múltiplos criadouros em um único ciclo gonotrófico diferentemente de outras espécies que tendem a depositar todos os ovos em um único recipiente (REINBOLD-WASSON; REISKIND, 2022). Este comportamento favorece a dispersão enquanto também facilita a fuga por meio do vôo.

3.1.2 Morfologia alar e morfometria geométrica

As asas dos mosquitos são estruturas rígidas e planas, nas quais forças musculares transmitidas pelas suas bases interagem com forças inerciais e

aerodinâmicas geradas no movimento responsável pelo voo (COMBES; DANIEL, 2003). As asas são compostas por um padrão de venação que garantem suporte às asas e conduzem a circulação de hemolinfa, sendo que seu padrão e arranjo são espécie-específicas (COMBES; DANIEL, 2003; SENDAYDIEGO; TORRES; DEMAYO, 2013).

As asas são estruturas biologicamente simétricas, isso significa que há repetição das partes em diferentes posições e orientações entre si (KLINGENBERG, 2015). A simetria é uma característica frequente nos seres vivos, pois em geral requer menor gasto energético do que alternativas assimétricas, sendo também uma característica adaptativa (GRAHAM *et al.*, 2010). Entretanto, o desenvolvimento do organismo não é totalmente determinístico e alguma pequena variação aleatória inerente pode produzir mudanças a partir da simetria perfeita esperada entre as asas direita e esquerda sendo que tal variação na simetria não é uma característica herdável (KLINGENBERG, 2003; DUJARDIN, 2008). Além disso, pequenas variações na simetria podem ocorrer como resposta ao estresse ambiental. Considerando o cenário em que uma perturbação ambiental seja originalmente uma fonte de estresse, se recorrente, torna-se recorrente ao desenvolvimento dos organismos, passando a não ser mais um agente de instabilidade ao desenvolvimento ao longo das gerações (GRAHAM *et al.*, 2010). Mosquitos que sobreviveram à exposição de concentrações subletais de larvicida durante o desenvolvimento larvário podem apresentar algum grau de assimetria nas asas, o que pode comprometer o voo e, conseqüentemente, outros parâmetros do ciclo de vida (MPHO; HOLLOWAY; CALLAGHAN, 2000; ARAMBOUROU *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2020; LEYTON RAMOS *et al.*, 2020). Um desses parâmetros é o acasalamento em que, segundo Nadai *et al.* (2021) a frequência de batimento de asas entre machos e fêmeas modulam-se durante o acasalamento bem sucedido e, no caso de asas assimétricas, a frequência de batimento de asas pode ser comprometida.

O tamanho das asas está diretamente relacionado com o tamanho corporal do mosquito, sendo esperado que insetos maiores tenham asas proporcionalmente maiores (LOUNIBOS *et al.*, 1995; ARMBRUSTER; HUTCHINSON, 2002). Variações térmicas têm uma relação direta com o tamanho dos organismos, sendo um efeito conhecido como Regra de Bergmann, de acordo com a qual os organismos maiores serão encontrados em ambientes mais frios enquanto os menores serão próprios de regiões mais quentes (JAMES, 1970). Experimentalmente, essa regra pode ser

estendida para seres ectotérmicos como os insetos, relatados por Atkinson (1994), demonstrando em diversos estudos posteriores como insetos menores são resultantes de ambientes mais quentes (BOZINOVIC et al., 2013; JULIANO et al., 2014; PRICE et al., 2015; RYAN et al., 2019; GUTIÉRREZ et al., 2020). De forma complementar, o tamanho das fêmeas é diretamente relacionado com os níveis de fecundidade e fertilidade, que são fatores impactantes no cenário epidemiológico (BRIEGEL, 1990; ARMBRUSTER; HUTCHINSON, 2002; NØRGAARD et al., 2022).

A variabilidade no tamanho das asas é também influenciada por outros fatores abióticos como salinidade da água nos criadouros, disponibilidade e qualidade do alimento durante o desenvolvimento e por competição intraespecífica durante o desenvolvimento larval (JIRAKANJANAKIT et al., 2007; DUJARDIN, 2008; SENDAYDIEGO; TORRES; DEMAYO, 2013; LORENZ et al., 2017; STEINWASCHER, 2018, 2020).

Até o presente, não existem ou são raras as metodologias de estimativas diretas sobre o tamanho corporal de mosquitos. Assim, os estudos que se valem dessa métrica utilizam de aproximação passível de ser inferida por meio de medidas de tamanho alar (LOUNIBOS *et al.*, 1995; NØRGAARD *et al.*, 2022). Da mesma forma, a caracterização morfológica de estruturas tão complexas como as asas são difíceis e influenciadas pela subjetividade, o que frequentemente enfraquece análises comparativas (LORENZ; SUESDEK, 2020). Dessa forma, conforme ressaltam Lorenz e Suesdek (2020), a morfometria geométrica é uma ferramenta útil que permite a sistematização da percepção e quantificação das variações da forma e tamanho entre os indivíduos (ADAMS; ROHLF; SLICE, 2004). Além disso, ao utilizar estruturas bidimensionais, como as asas, nas técnicas de morfometria geométrica tendem a reduzir os erros manuais de digitalização (DUJARDIN, 2008).

Considerando que diversos traços nos mosquitos adultos são reflexo da forma em que os organismos se desenvolveram durante a fase larval, o estudo das variações fenotípicas pode ajudar entomologistas e gestores a detectar populações locais de vetores com potenciais características importantes no controle de epidemias (DUJARDIN, 2008; REISKIND; ZARRABI, 2012; SENDAYDIEGO; TORRES; DEMAYO, 2013; LEYTON RAMOS *et al.*, 2020; LORENZ; SUESDEK, 2020; PRADO *et al.*, 2022)

3.1.3 Desenvolvimento larval de *Aedes aegypti*

A fase larval do mosquito apresenta, ao todo, quatro estádios (I a IV instar). O desenvolvimento desses estádios varia conforme as condições ambientais, mas em média, a fase de desenvolvimento das larvas dura entre seis e oito dias, em condições ideais (CHRISTOPHERS, 1960; CLEMENTS, 1992).

As larvas se alimentam de material particulado, que podem ser fragmentos de vegetais, bactérias, fungos e algas, havendo evidências na literatura de que as larvas ingerem ativamente diversos micro-organismos, que são posteriormente digeridos principalmente pela enzima beta-1, 3 glucanase (KHAWALED; COHEN; ZARITSKY, 1992; AVISSAR; MARGALIT; SPIELMAN, 1994; SOUZA et al., 2016; ZELLER; KOELLA, 2016). A enzima digestiva beta-1,3 glucanase é uma proteína pertencente à família 16 das hidrolases glicosídicas que é produzida pelas larvas tornando-as capazes de digerir hemiceluloses fúngicas e vegetais, o que contribui para explicar a aptidão generalista dessa espécie para diversos criadouros artificiais (GENTA et al., 2009; SOUZA et al., 2016, 2019).

O comportamento de alimentação das larvas é difuso, podendo ser tanto filtradoras passivas quanto forrageadoras ativas no criadouro, a depender do tipo de alimento disponível no ambiente (SOUZA et al., 2016). Apesar de serem generalistas, a quantidade e o tipo de alimento disponível para as larvas têm influência direta no tempo de desenvolvimento larval e nas características que o indivíduo vai exibir em seu estágio adulto. Por exemplo, larvas de *Ae. aegypti* que se alimentam de enterobactérias tornam-se adultos com asas menores e com menor atividade antibacteriana na hemolinfa do que aqueles mosquitos que se alimentaram de bactérias do gênero *Rhizobium* durante a fase imatura (DICKSON et al., 2017).

Para além de criadouros preenchidos com águas “limpas” (i.e.: livre de matéria orgânica de quaisquer fontes), as larvas de *Ae. aegypti* conseguem se desenvolver em águas com diferentes características físico-químicas. Há, na literatura, registros de desenvolvimento larval desta espécie em efluentes domésticos, tanques sépticos, efluentes de reatores anaeróbios de estações de tratamento de esgoto e urina humana (BESERRA et al., 2009; BURKE et al., 2010; CHITOLINA et al., 2016; DU et al., 2019). As larvas têm uma estrutura morfológica chamada sifão respiratório na porção posterior de seu corpo, o que permite a obtenção de oxigênio atmosférico (Figura 2). Essa é uma característica que possibilita que os indivíduos se desenvolvam

em ambientes com maior carga orgânica, devido ao fato de dependerem menos do oxigênio dissolvido do meio se comparadas às larvas de mosquitos de outras espécies que não têm essa morfologia, como por exemplo, *Chironomus sancticaroli*. Além disso, a carga orgânica presente em efluentes, quando em cargas moderadas, propicia fonte nutricional para as larvas se desenvolverem até o estágio de pupa (CHITOLINA *et al.*, 2016; DU *et al.*, 2019).

Figura 3: Larva de *Aedes aegypti* com 9 dias de idade vista sob magnificação de 15x



Fonte: Autoria própria (2021)
OBS: círculo vermelho destacando o sifão respiratório

A mudança de estágio até a fase de pupa é mediada principalmente por meio de dois hormônios: o esteroide 20-hidroxiecdisona (20E) e o hormônio juvenil (HJ) (composto por sesquiterpenos acíclicos) (DUBROVSKY, 2005). O esteroide 20E é secretado no prototorax e nas glândulas ventrais, com função principal na sinalização para o processo de metamorfose, promovendo alterações das expressões gênicas que estão ligadas a morte de células obsoletas, mitose, diferenciação de tecidos imaginiais e síntese e formação de quitina para nova cutícula (RIDDIFORD, 2012; SUBRAMANIAN; SHANKARGANESH, 2016). Durante esse processo, o hormônio juvenil (HJ) inibe a ativação dos genes que desencadeiam o desenvolvimento de características adultas, o que permite o acúmulo de nutrientes durante a fase imatura

para posterior uso metabólico na emergência do mosquito adulto (RIDDIFORD, 2012; SUBRAMANIAN; SHANKARGANESH, 2016). O HJ é sintetizado e secretado pelas *corpora allata*, que são compostas por um par de glândulas endócrinas com conexões nervosas com o cérebro (NORIEGA, 2004). Ao final do quarto e último estágio larval, as *corpora allata* responsáveis pela biossíntese de HJ atrofiam-se e cessam a liberação desse hormônio no corpo da larva, permitindo a metamorfose para o estágio de pupa e, posteriormente, fase adulta (RAMASEHADRI, 2012; SUBRAMANIAN; SHANKARGANESH, 2016).

A massa crítica mínima que a larva deve ganhar durante o estágio larval para engatilhar os mecanismos de metamorfose é atingida quando a larva de IV ínstar está com 24 horas de idade, em média (NORIEGA, 2004). Quando a larva atinge essa massa crítica, as *corpora allata* são desativadas, o que diminui as titulações de hormônio juvenil, facilitado pela HJ-esterase, uma enzima catabólica (RIDDIFORD, 2012; JINDRA et al., 2021). A ausência de HJ estimula a secreção de ecdisteróides pelas glândulas prototorácicas e o aumento do ecdisteróide estimula a larva a parar de comer e se preparar para a pupação. A secreção de ecdisteróides pelos tecidos e os títulos deste hormônio na hemolinfa diminuem quando as larvas no IV ínstar têm entre 48-52 h de idade, momento em que estão próximas a pupação, e aumenta drasticamente nas pupas (TELANG; FRAME; BROWN, 2007). Durante a fase adulta, a dinâmica hormonal entre ecdisteróides e HJ são importantes para outros processos fisiológicos responsáveis pela reprodução.

3.1.4 Aspectos reprodutivos de *Aedes aegypti* adultos

As fêmeas adultas geralmente obtêm nutrientes a partir de três fontes: reservas energéticas provenientes da nutrição durante o estágio larval, néctar ou seiva derivada de vegetais e proteína sanguínea. Processos metabólicos em mosquitos, os quais constantemente reagem às variações nutricionais como resposta às demandas energéticas, relacionam-se diretamente com o desenvolvimento folicular durante o amadurecimento do ciclo reprodutivo (ZHU; NORIEGA, 2016).

O ciclo reprodutivo das fêmeas adultas pode ser dividido em duas etapas: a pré-vitelogênica (logo após a emergência, sendo o primeiro ciclo) e a vitelogênica (após hematofagia), durante as quais as fêmeas passam por dramáticas mudanças

em alimentação, alternando entre consumo de néctar (açúcares) e consumo de sangue (proteínas), respectivamente (ROY et al., 2016).

Muito embora as concentrações de 20E e HJ sejam imprescindíveis para as mudas e metamorfoses no estágio larval, a dinâmica entre esses hormônios também revela importantes efeitos no amadurecimento reprodutivo durante a fase adulta das fêmeas em diferentes etapas dos dois ciclos. As *corpora allata* que outrora atrofiaram-se ao final do estágio imaturo reativam-se concomitantemente à emergência da fêmea adulta, o que permite que o HJ possa ser biossintetizado novamente (ZHU; NORIEGA, 2016).

O HJ é essencial durante a etapa previtelogênica. Durante esta etapa ocorre o amadurecimento da fêmea para a reprodução por meio da preparação dos tecidos envolvidos para a posterior produção dos ovos. Nesse processo, há a proliferação de células biossintéticas nas células do corpo gorduroso e a separação de células foliculares ovarianas para permitir que as moléculas precursoras do vitelo atinjam o oócito maduro (IOSHINO, 2013; HERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2015).

Imediatamente após a emergência da fêmea adulta, um mecanismo de sensibilidade engatilha a biossíntese de alatotropinas, que são peptídeos que estimulam a síntese de HJ junto com outros precursores (NORIEGA, 2004). Por exemplo, a presença mútua de alatotropinas e farnesol em fêmeas tenerais aumentou em 17 vezes a biossíntese de HJ se comparadas às fêmeas que secretaram apenas farnesol ou apenas alatotropinas (LI et al., 2003). O mecanismo de sensibilidade envolvido na produção de alatotropinas está diretamente relacionado com o estado nutricional da fêmea: a biossíntese do peptídeo e, conseqüentemente, do HJ só ocorre caso as reservas nutricionais sejam adequadas (NORIEGA, 2004).

Nas fêmeas tenerais, o aumento gradativo de concentração de HJ na hemolinfa sinaliza o fim da metamorfose e inicia o processo de maturação reprodutiva (HAGEDORN, 1994). As fêmeas emergem com folículos pré-vitelogênicos com tamanho médio de 40 µm que crescem até o tamanho de 100 µm durante o intervalo entre 24 a 48 horas mediado pelo HJ (RIVERA-PEREZ et al., 2014).

Níveis de HJ tendem a ser altos nas fêmeas bem nutridas no primeiro dia de emergência e permanecem altos especialmente em adultas alimentadas com sucrose (SHAPIRO et al., 1986; CAROCI et al., 2014). Rivera-Perez et al. (2014) demonstraram que o pico de concentração do HJ nas fêmeas ocorre após 12 horas decorridas desde sua emergência. Neste período, o HJ controla diretamente a

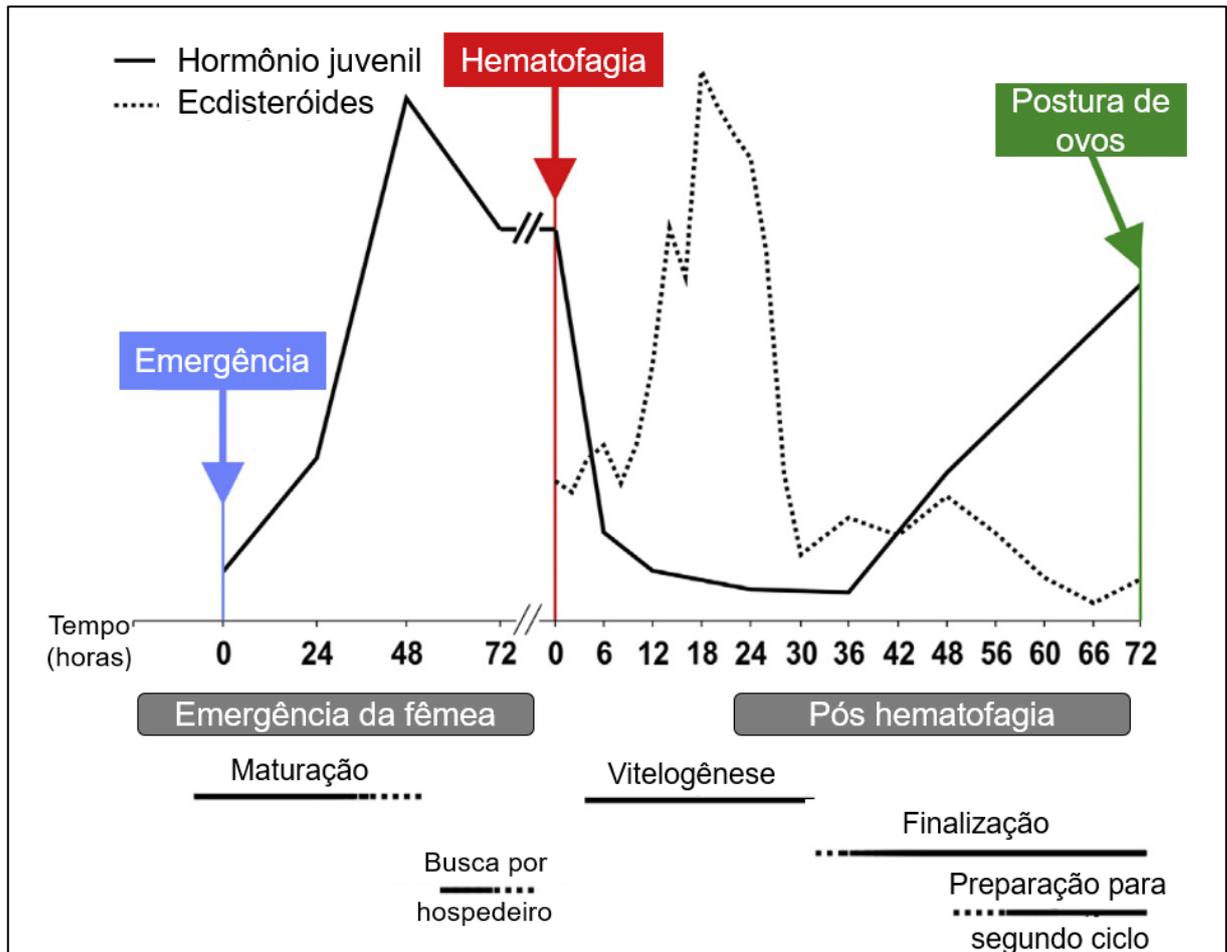
alocação de nutrientes nos ovários, o que permite o crescimento dos folículos e que, posteriormente na etapa vitelogênica, há influência nas quantidades de proteína disponível para formação dos ovos (CLIFTON; NORIEGA, 2011). Após 60 horas da emergência, a fêmea bem nutrida completa o desenvolvimento previtelogênico e então se inicia um breve período de pausa, durante o qual a fêmea se alimenta exclusivamente de néctar até encontrar um hospedeiro (CLEMENTS, 1992; RAIKHEL et al., 2005). Nesta etapa, as reservas de sucrose são importantes devido alta demanda energética da fêmea pela busca de um hospedeiro.

Conforme a fêmea busca por um hospedeiro, os níveis de HJ diminuem lentamente e, após alimentar-se de sangue, há uma redução drástica dos níveis de HJ devido atividade da esterase com conversão em outros metabólitos hormonais (SHAPIRO et al., 1986). A partir da ingestão de sangue inicia-se o período vitelogênico em que a hematofagia induz o cérebro a secretar o hormônio ecdisteroidogênico ovariano (OHE) (VOGEL; BROWN; STRAND, 2015). Esse hormônio estimula os ovários a biossintetizar ecdisona e liberá-la para a hemolinfa, que a transporta até o corpo gorduroso, onde ocorre a conversão da ecdisona em 20E (HAGEDORN et al., 1975; IOSHINO, 2013).

Durante a vitelogênese, o 20E controla a síntese de proteínas precursoras do vitelo no corpo gorduroso e a progressão da oogênese nos ovários (RIKHEL et al., 2005). Hernández-Martínez et al. (2015) afirmaram que os níveis de HJ caem drasticamente durante as primeiras três horas após a hematofagia e alcança as menores concentrações desse hormônio após 24 horas da alimentação de sangue, conforme ilustrado por meio da Figura 4. A redução dos níveis de HJ na hemolinfa acontece devido a inativação das *corpora allata* durante esse período (LI et al., 2003).

O final da vitelogênese é caracterizado pelo fim da síntese das proteínas precursoras do vitelo, quando os folículos maduros secretam a cápsula protetora do ovo (córion) antes de se degenerarem, dando origem aos ovos maduros (IOSHINO, 2013; VALZANIA et al., 2019). Uma única fêmea pode dar origem entre 80 a 120 ovos por cada evento de oviposição (VALZANIA et al., 2019). O fim da vitelogênese ocorre cerca de 30 horas após a hematofagia, período no qual os níveis de 20E caem drasticamente a níveis basais e o HJ passa a subir novamente, para estimular o crescimento dos folículos secundários (AHMED et al., 2020).

Figura 4: Representação esquemática da dinâmica hormonal nos eventos do primeiro ciclo reprodutivo de fêmeas de *Aedes aegypti*



Fonte: Adaptado de Roy et al. (2016) com dados de Zhu e Noriega (2016); Hagedorn (1975) e Shapiro (1986)

O sucesso reprodutivo que garante a manutenção da população de mosquitos depende, portanto, de diversos fatores ambientais que refletem no sucesso dos processos fisiológicos das fêmeas. As fêmeas precisam viver o suficiente para que a maturação ocorra, uma vez que todo o processo depende das cascatas hormonais ao longo dos dias. A disponibilidade de fontes de alimentação de açúcar e de hospedeiros são fatores importantes nesse processo. As condições ambientais, em sua complexidade e flutuações, podem influenciar tanto positivamente quanto negativamente. Um ambiente que contenha resíduos de Pyriproxyfen pode ter influência no desenvolvimento reprodutivo do mosquito, considerando que esse composto é o análogo do mesmo hormônio juvenil (HJ), que se liga estavelmente nos receptores dos sesquiterpenos.

Ahmed et al. (2020) demonstraram que a exposição ao Pyriproxyfen foi efetiva em reduzir a capacidade reprodutiva de fêmeas adultas. O Pyriproxyfen comprometeu

o desenvolvimento dos folículos primários enquanto ativou prematuramente os folículos secundários. A absorção de Pyriproxyfen acima dos níveis normais de HJ estimula a deposição de proteínas precursoras do vitelo antes que a maturidade dos folículos estivesse completa, o que reflete em comprometimento da formação dos ovos na etapa da vitelogênese (AHMED et al., 2020). Sendo assim, mesmo quando as larvas atingem o estágio adulto, o Pyriproxyfen tem o potencial de induzir a esterilização das fêmeas muito embora não possa ser conferido como uma forma efetiva de controle populacional, até o momento.

3.2 Reguladores de crescimento do inseto

O regulador de crescimento do inseto atua no organismo de forma a inibir ou acelerar um processo regulatório crucial ao seu desenvolvimento natural (SIDALL, 1976; JINDRA; BITTOVA, 2019). Inseticidas dessa classe não necessariamente implicam toxicidade direta aos indivíduos expostos, mas têm seu impacto na produção de anomalias fisiológicas e/ou morfológicas. Essas anomalias prejudicam o desenvolvimento de aspectos do ciclo de vida do animal (e.g. emergência, reprodução) resultando em morte do indivíduo como consequência (MULLA, 1995). Diferentes compostos pertencentes a essa classe podem apresentar distintos mecanismos de inibição ao desenvolvimento do inseto e, dessa forma, é necessária aplicação adequada do composto de acordo com o alvo de controle. Um exemplo disso são os compostos que inibem a síntese de quitina (e.g. Novaluron e Diflubenzuron), os quais são efetivos para aplicação em todos os estádios larvais das fases imaturas de mosquitos (OMS, 2005). Existem também os compostos que atuam como os análogos de hormônios juvenis os quais, por sua vez, são adequados aos últimos estádios larvais do mosquito (SIDALL, 1976).

O Pyriproxyfen, da classe dos análogos de hormônios juvenis, é um éter aromático baseado na piridina que age mimetizando os HJ, impedindo o desenvolvimento do indivíduo para a fase adulta, resultando em morte de pupas ou geração de adultos com deficiência (JINDRA; BITTOVA, 2019).

Conforme descreveram Sullivan e Goh (2008), as moléculas que compõem o Pyriproxyfen apresentam alta estabilidade, principalmente por se tratar de um composto que apresenta estrutura molecular cíclica. Segundo orientações técnicas

publicadas pelo Ministério da Saúde (2014), a concentração recomendada do uso de Pyriproxyfen é de 0,01 mg/L, em conformidade com a concentração preconizada pela OMS (2005, 2016).

Ao passo que determinado agente químico pode não causar letalidade à população como um todo, o desenvolvimento larval em criadouro contaminado por um larvicida pode refletir em mudanças para alguma característica biológica do mosquito como custo metabólico de sobrevivência. Como exemplo, Muturi et al. (2011) apontaram que *Ae. aegypti* adultos são vetores mais competentes se estes foram expostos, durante o desenvolvimento larval, a doses subletais de inseticida. Este efeito é decorrente da mortalidade de larvas menos aptas a metabolizar o composto químico, o que como consequência resulta em maior disponibilidade de recursos para as larvas sobreviventes e gera fêmeas maiores (MUTURI; ALTO, 2011).

3.3 Influência da amplitude térmica na ocorrência de epidemias

A transmissão de doenças veiculadas por *Ae. aegypti* ocorre por meio de um processo dinâmico e espaço-temporal, o qual é afetado por múltiplos fatores envolvendo vetores, patógenos e humanos. Quanto a influência aos vetores, fatores ambientais como a qualidade da água (BESERRA *et al.*, 2009; CHITOLINA *et al.*, 2016), a disponibilidade e quantidade de matéria orgânica nos criadouros (COURET; DOTSON; BENEDICT, 2014) e, a suscetibilidade dos criadouros às chuvas (VALDEZ; SIBONA; CONDAT, 2018), são exemplos de condições que afetam diretamente as taxas de sobrevivência, desenvolvimento e suscetibilidade dos organismos às infecções pelos vírus. Dentre os fatores ambientais, a temperatura tem grande potencial de influência nesse processo, seja diretamente por refletirem em mudanças nos aspectos de desenvolvimento dos mosquitos e capacidade vetorial destes, como indiretamente por mudanças na vegetação e características da superfície, como a disponibilidade de criadouros para oviposição (MISSLIN *et al.*, 2016).

No ambiente natural a temperatura não permanece constante, mas oscila em torno de uma mínima durante a noite e um máximo durante o dia, sendo que tal variação ocorre em torno de uma média (CARRINGTON *et al.*, 2013). De acordo com Gutiérrez *et al.* (2020), a variação térmica, junto à disponibilidade de alimento, é um dos fatores ambientais que mais afeta o tamanho, longevidade e capacidade vetorial dos mosquitos. Mudanças na taxa de crescimento e tempo de desenvolvimento,

associadas à temperatura, podem resultar em diferenças significativas na capacidade vetorial devido a alterações no metabolismo de lipídeos (ARRESE; SOULAGES, 2010). Neste sentido, Misslin et al. (2016) observaram que os mosquitos vivem mais e são mais propensos a se tornarem infectados quando em ambientes com amplitudes térmicas moderadas e médias de temperaturas altas, as quais são típicas das estações com alta taxa de transmissão.

Os ciclos diários de temperatura, junto a outros fatores, também estão associados ao padrão de distribuição desta espécie no mundo, sendo encontrada especialmente nas regiões tropicais (DICKENS *et al.*, 2018). As mudanças climáticas, características pelas previsões de aumento nas médias de temperaturas globais, representam ameaça na dispersão desta espécie para regiões sub-tropicais, uma vez que com o aumento da temperatura se amplie as condições favoráveis para o estabelecimento dessa espécie (TRAJER, 2021; SINGH; PANDE; DHIMAN, 2022; WINT *et al.*, 2022). Com populações humanas muito suscetíveis aos vírus transmitidos pelo *Ae. aegypti*, a dispersão e persistência do mosquito nessas novas regiões temperadas trará grande ameaça para ocorrência de epidemias e pandemias (RYAN *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2022). Sendo assim, as temperaturas do ambiente são fatores do ambiente imprescindíveis em serem consideradas na ocorrência de epidemias causadas pelos arbovírus transmitidos pelo *Ae. aegypti*.

O Brasil possui uma vasta área, com extensão territorial superior a 8,5 milhões de km² (IBGE, 2013) a qual compreende diversas características ambientais e climáticas. Ao longo do território brasileiro, os perfis de temperatura são divergentes por influência de fatores ambientais diferentes e por influência de sua posição geográfica compreendendo duas faixas latitudinais distintas: trópico de Capricórnio e Linha do Equador. As regiões mais próximas da Linha do Equador tendem a apresentar temperaturas mais altas.

Segundo dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde (2018), entre 2017 e 2018 as regiões Nordeste e Centro Oeste corresponderam aos maiores números de casos prováveis de dengue para o período (103.153.000 e 120.316.000 respectivamente). Esses dados convergem com as observações apresentadas por Andrioli et al. (2020) que destacaram a maior frequência e incidência de dengue na região Centro Oeste considerando o horizonte temporal de 1990 até 2017, o que demonstra que essa tendência não é recente (444,8 casos para cada 100 mil habitantes). Essas regiões também são correspondentes à altas temperaturas

médias e amplitudes térmicas moderadas nos períodos da primavera e verão (INMET) (2018), o que pode ser correlacionado com as taxas reprodutivas e capacidade vetorial do mosquito (MUTURI e ALTO, 2011; CARRINGTON, 2013).

É importante ressaltar que, por mais que seja possível estabelecer uma relação direta entre fatores limitados, a dinâmica das epidemias é multifatorial. A ineficiência da política de resíduos sólidos, a movimentação constante de pessoas infectadas que possibilita a expansão geográfica dos sorotipos, o inadequado abastecimento de água para a população ocasionando a necessidade destas em estocar este recurso em recipientes “inadequados” e a rápida mutação e adaptação tanto do mosquito quanto dos vírus evidenciam o caráter multifatorial das epidemias e da prosperidade destas ao longo dos anos (GUBLER, 2011).

Considerando tal complexidade do tema, explorar como a amplitude térmica atua sobre a eficiência do larvicida junto ao desenvolvimento do inseto irá fornecer subsídio para melhorar a compreensão desse fator para a dinâmica de ocorrência das doenças como um todo, dentro do contexto de utilização de larvicidas para controle populacional. Esta contribuição é possível pois a inclusão de um estressor ambiental nos experimentos para determinação do efeito de um composto tóxico provê uma medida mais realista da sensibilidade dos organismos (PROCTOR *et al.*, 2017). No ambiente natural, os efeitos e o modo de ação de um determinado composto podem depender não apenas da concentração e dos mecanismos de toxicidade, mas também das condições ambientais apresentadas (NOYES *et al.*, 2009).

3.4 Variação térmica e aplicação de inseticidas

A temperatura do ambiente exerce influência no tempo médio para desenvolvimento das larvas e na longevidade de adultos de *Aedes aegypti* (GUTIÉRREZ *et al.*, 2020). De forma mais precisa e consistente com o propósito deste plano de pesquisa, a amplitude térmica também influencia em características importantes da espécie. Carrington *et al.* (2013) encontraram que, para amplitudes térmicas de 8 °C em torno da média de 26,4 °C, houve aumento na sobrevivência das larvas quando comparadas às larvas que se desenvolveram em ambiente com temperatura constante de 26 °C. Em contrapartida, os autores verificaram efeitos

negativos a respeito da sobrevivência quando os organismos foram submetidos a amplitudes térmicas maiores.

Em estudos avaliando efeitos combinados entre o estresse por Pyriproxyfen e variações na temperatura do ambiente em *Chironomus riparius* (Diptera: Culicidae), Tassou e Schulz (2012) encontraram diferença relacionada à sensibilidade do organismo dentro de um desvio de 4 graus em torno da temperatura de 20°C, sendo os organismos mais sensíveis a 24°C do que a 16°C. Para *Aedes aegypti*, o aumento da temperatura de 25 °C para 30 °C refletiu em uma redução significativa da sensibilidade das larvas ao Pyriproxyfen, demonstrando um efeito inverso dos resultados encontrados para outra espécie de mosquito (MOURA; DE NADAI; CORBI, 2020).

Portanto, avaliar a sensibilidade dos organismos ao larvicida em condições de diferentes amplitudes térmicas com base nas variações observadas nas diferentes regiões brasileiras pode gerar resultados complementares.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos descritos foram realizados no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), na Universidade de São Paulo, Campus São Carlos e no Laboratório de Medicina Regenerativa, Química Medicinal e Biopolímeros da Universidade de Araraquara. A metodologia dos bioensaios foi padronizada e adaptada conforme protocolo da OMS (2005, 2016). As populações de *Ae. aegypti* utilizadas nesse trabalho foram originadas a partir de uma população estabelecida em laboratório, provenientes de uma coleção da linhagem Rockefeller de 1996. Os ovos foram cedidos gentilmente para a realização do presente trabalho pela empresa ASR (*Analytical and Scientific Research*), localizada na cidade de Charqueada, no estado de São Paulo. As desovas foram mantidas em potes de plásticos secos e tampados, com temperatura controlada em incubadora ($26^{\circ}\text{C} \pm 2$) e umidade relativa em $70\% \pm 5\%$, ambas condições monitoradas por meio de termohigrômetro digital, de forma a induzir a eclosão dos ovos somente quando fosse ser realizados os testes.

4.1 Determinação das temperaturas experimentais

A definição das variações térmicas que foram aplicadas aos experimentos para simular termicamente as regiões brasileiras foi realizada a partir da Base de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP) do Instituto Nacional de

Meteorologia (INMET) (2022). No BDMEP, foram selecionados dados das estações convencionais de todas as capitais dos estados brasileiros com exceção do Amapá, pois não havia dados disponíveis para este estado. Adicionalmente, foram amostradas aleatoriamente dados de mais três cidades para cada estado, cuja localização está disposta no Apêndice A. Com essa base de dados, foram utilizadas as temperaturas máximas e mínimas correspondentes às estações da primavera e verão no Brasil (entre os meses de setembro a março), considerando um horizonte temporal de 30 anos (entre 1988 e 2018). Para cada região, para todos os registros selecionados para temperaturas máximas e para mínimas foi calculada a média, sendo essa uma adaptação dos métodos realizados por Gutiérrez et al. (2020) considerando a realidade no território brasileiro. O resultado do cálculo das médias contendo as temperaturas médias para as máximas e mínimas pode ser observado por meio da Tabela 1. Pontos atípicos foram desconsiderados dos cálculos.

Tabela 1: Valores médios para temperaturas máximas e mínimas calculadas para cada região brasileira

Região	°C máxima	°C mínima
Centro-Oeste	31	19,5
Nordeste	30,3	23
Norte	32,3	23
Sudeste	28,4	20
Sul	26,1	17

Fonte: Autoria própria (2022)

4.2 Pyriproxyfen: ingrediente ativo e composição

Para realização dos bioensaios, foi utilizado o inseticida comercializado sob o nome de Sumilarv 0,5G® sintetizado originalmente pela empresa *Sumitomo Chemical Co®* (Osaka, Japão). O Sumilarv 0,5G® é formulado em areia de origem vulcânica (pedra-pomes ou pumice) com um surfactante que determina a lenta diluição do produto na água com concentração de 0,5% de ingrediente ativo (Pyriproxyfen) (SUMITOMO CHEMICAL, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O composto utilizado no presente trabalho foi doado gentilmente pela Vigilância Epidemiológica da cidade de Araraquara, São Paulo, e suas principais características estão dispostas na Tabela 2.

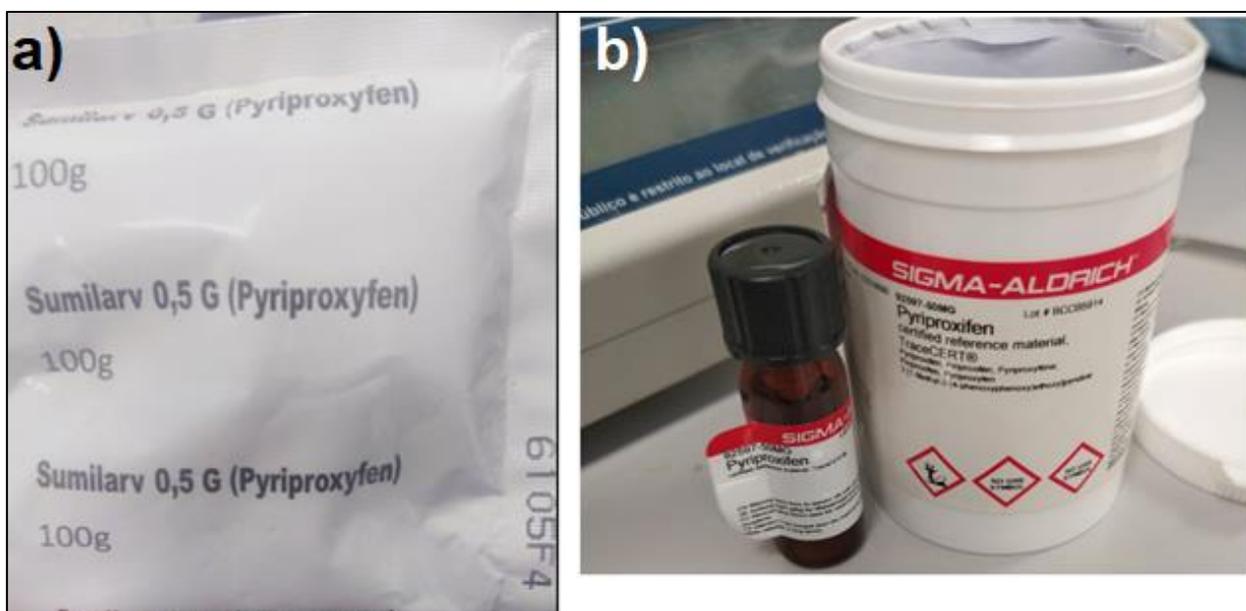
Tabela 2: Características químicas do Sumilarv 0,5G®.

Característica	Descrição
Fórmula empírica	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃
Nomenclatura	2-[1-Methyl-2-(4-phenoxyphenoxy)ethoxy]pyridine
Porcentagem de Pyriproxyfen no produto comercial Sumilarv 0,5G (grau de pureza)	0,5%
Massa molecular relativa	321,4 g/mol
Número CAS	95737-68-1

Fonte: Sumitomo Chemical (2012) e Sigma-Aldrich (2022).

Para ensaios de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) também foi utilizado o material certificado de referência, composto por alto grau de pureza de Pyriproxyfen (99%) (Figura 5) sintetizado pela Sigma-Aldrich®. Ambos compostos foram mantidos ao abrigo da luz, sob temperatura constante 20 ± 2 °C. Os gráficos das leituras e transmissões das bandas foram feitos pelo *software* Origin.

Figura 5: Composições de Pyriproxyfen aplicadas nos experimentos. a) Embalagem do Sumilarv 0,5G. b) Embalagem do Pyriproxyfen de alta pureza



Fonte: Autoria própria (2022)

4.3 Caracterização térmica do Pyriproxyfen

Amostras contendo 1 mg de Pyriproxyfen de alta pureza (Sigma-Aldrich®) foi determinada com balança analítica e disposta em vidro de relógio, como mostrado pela Figura 6, submetidos a quatro diferentes temperaturas em

estufa. A escolha das temperaturas foi baseada nas temperaturas máximas referentes a cada média de temperatura calculada para cada região (Tabela 1), com o objetivo de avaliar se há respostas de degradação térmica nos intervalos experimentados.

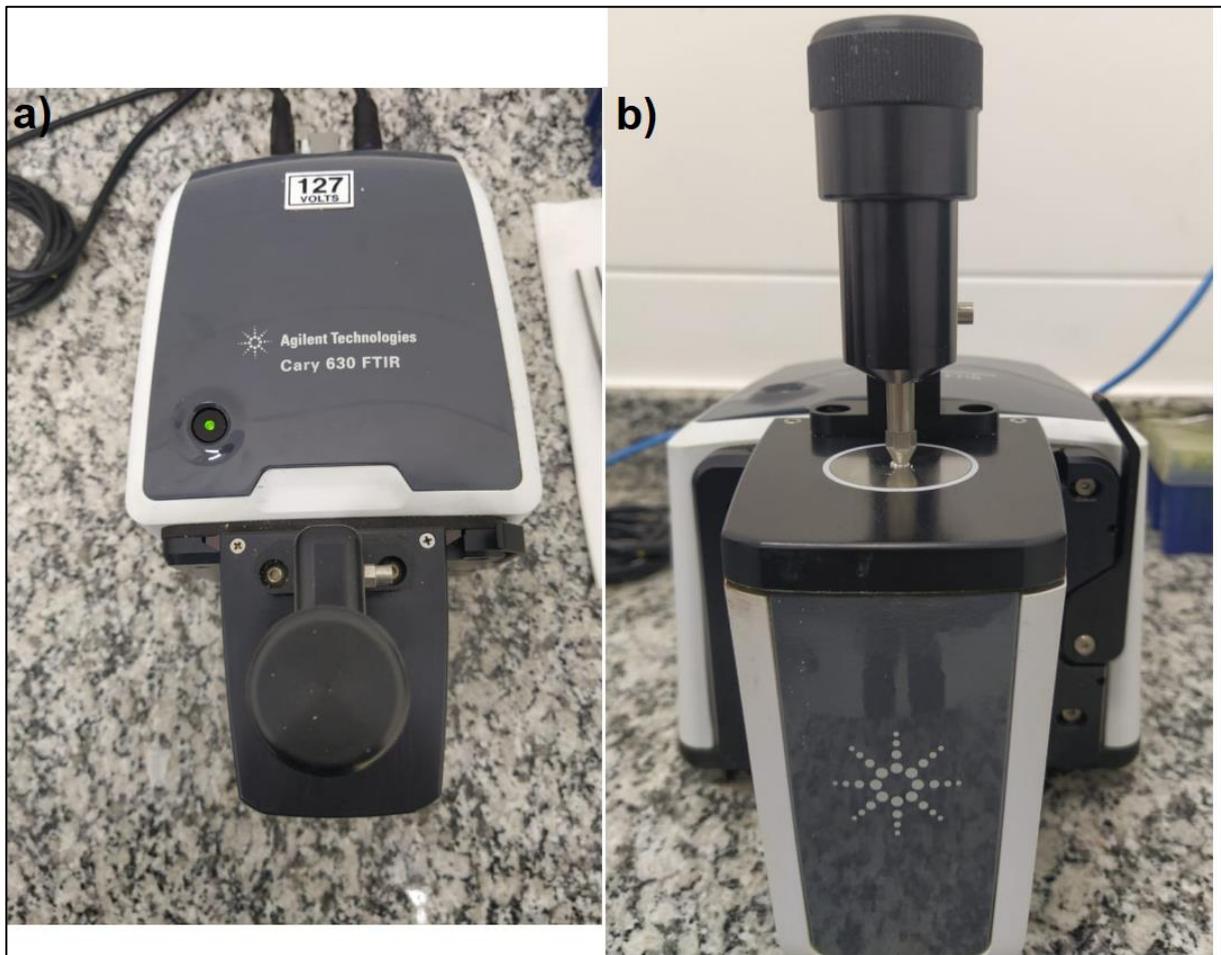
Figura 6: Amostras de soluto de Pyriproxyfen (pureza 99%) para serem expostos a quatro diferentes temperaturas.



Fonte: A autoria própria (2022)

Os vidros de relógio contendo as amostras de Pyriproxyfen foram envolvidos em papel alumínio antes de serem colocados dentro da estufa, para isolar as amostras de qualquer possível interferência luminosa. Este procedimento foi repetido para diferentes tempos de exposição (10, 15 e 20 dias) nas temperaturas de interesse (26, 28, 30 e 33 °C). Após os tempos de exposição, as amostras foram submetidas à análise por espectroscopia na região do espectro de infravermelho por transformada de Fourier (Agilent Cary 360 FTIR®, Figura 7) para registrar o padrão de transmissão de radiação infravermelha entre as amostras. O mesmo procedimento foi realizado com amostras de Sumilarv 0,5G®.

Figura 7: Equipamento utilizado para leitura de espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier. a) vista superior do equipamento; b) Equipamento com sensor em contato com uma amostra de Pyriproxyfen de alta pureza



Fonte: Autoria própria (2022)

4.4 Criação e aclimação das larvas de *Aedes aegypti*

A criação das larvas foi feita em laboratório a partir da eclosão dos ovos, fixos em papel poroso como substrato à oviposição (Figura 8). Para induzir a eclosão dos ovos, 1 cm² de desova foi submerso em 1 litro de água potável em pote plástico contendo 1 g de *Saccharomyces cerevisiae* (MP Biomedicals).

Figura 8: Desova de *Aedes aegypti* (Rockefeller) fixa em papel poroso

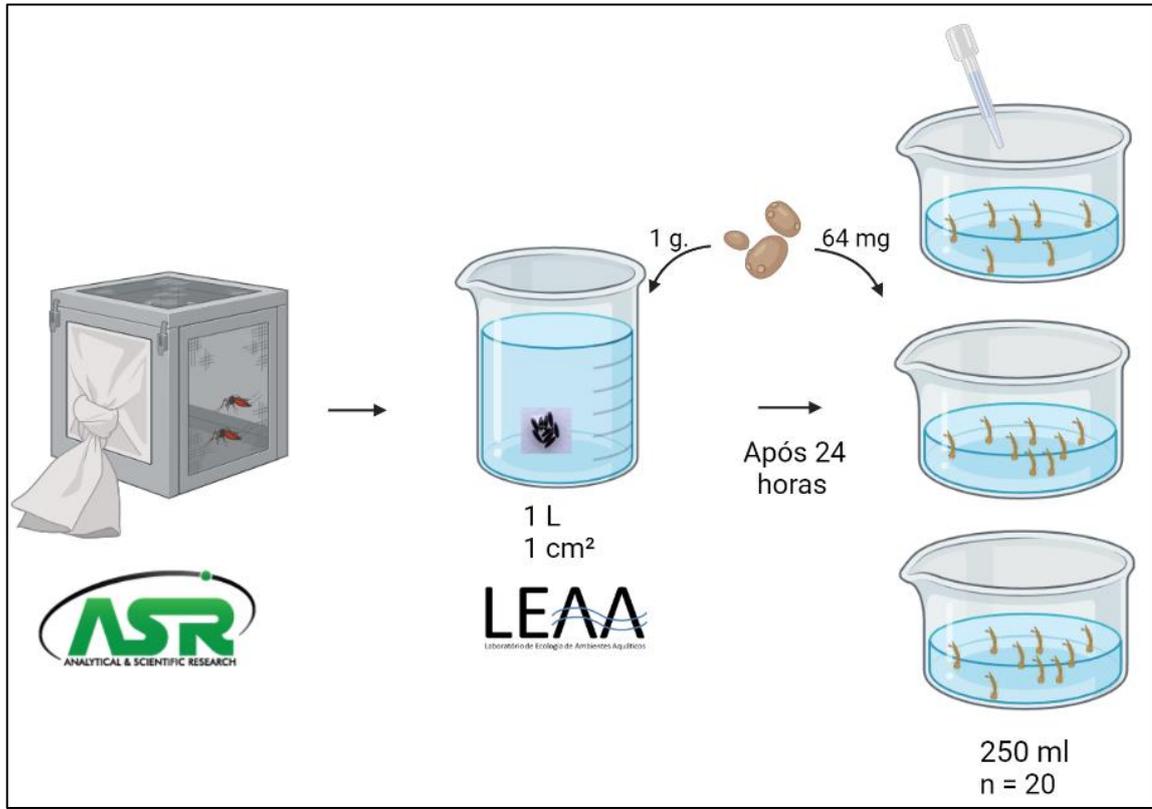


Fonte: Autoria própria (2019)

Após 24 horas da imersão da desova, 20 larvas foram contadas e alocadas em potes contendo 250 ml de água e 64 mg de *S. cerevisiae* como fonte nutritiva (correspondendo a 3,2 mg por larva) (Figura 9). A cada dois dias, novo alimento foi adicionado até que as larvas estivessem entre o III e IV ínstar compreendendo até 5 eventos de adição de alimento, em média. Foi respeitada a quantidade máxima de 16 mg de *S. cerevisiae* por larva durante todo o desenvolvimento interestádios, quantia sugerida como ideal para o crescimento larval de acordo com Souza et al. (2019).

A quantidade padronizada de larvas por pote foi mantida durante toda a manutenção das criações até a montagem de experimentos com exposição do larvicida para evitar estresse por competição intraespecífica (STEINWASCHER, 2018). Os potes das criações foram rotacionados diariamente para evitar probabilidade de efeito da posição (GUTIÉRREZ et al., 2020).

Figura 9: Representação esquemática da indução à eclosão de ovos e criação das larvas de *Aedes aegypti* antes dos experimentos



Fonte: Autoria própria (2022)
Criado com BioRender.com

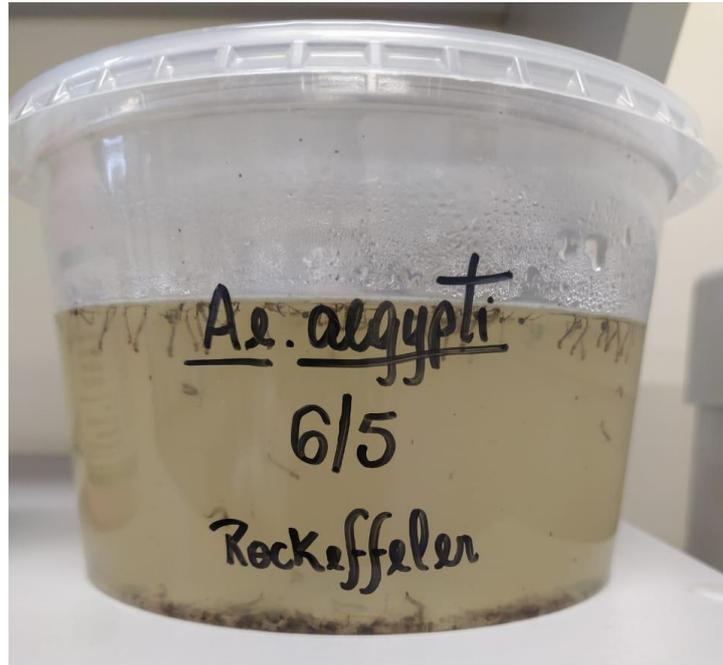
Os potes com as criações foram mantidos em incubadora (Eletrolab, Modelo EL212/4 LED) em fotoperíodo programado para 14 horas claro: 10 horas escuro (simulando o padrão de fotoperíodo que ocorre durante as estações de primavera e verão), seguindo recomendações de Costanzo et al. (2015) (Figura 10).

Figura 10: Potes contendo as criações de *Aedes aegypti* dentro de incubadora



Em sincronia com o fotoperíodo, foram programadas as temperaturas calculadas de acordo com as regiões sendo que a temperatura mais alta foi programada para o fotoperíodo claro enquanto a mais baixa foi programada para o período escuro. Caso algum pote apresentasse algum grau de turbidez, como exemplificado pela Figura 11, a água era trocada e novo alimento foi adicionado, conforme recomendações da OMS (2017).

Figura 11: Água turva contendo larvas de *Aedes aegypti*



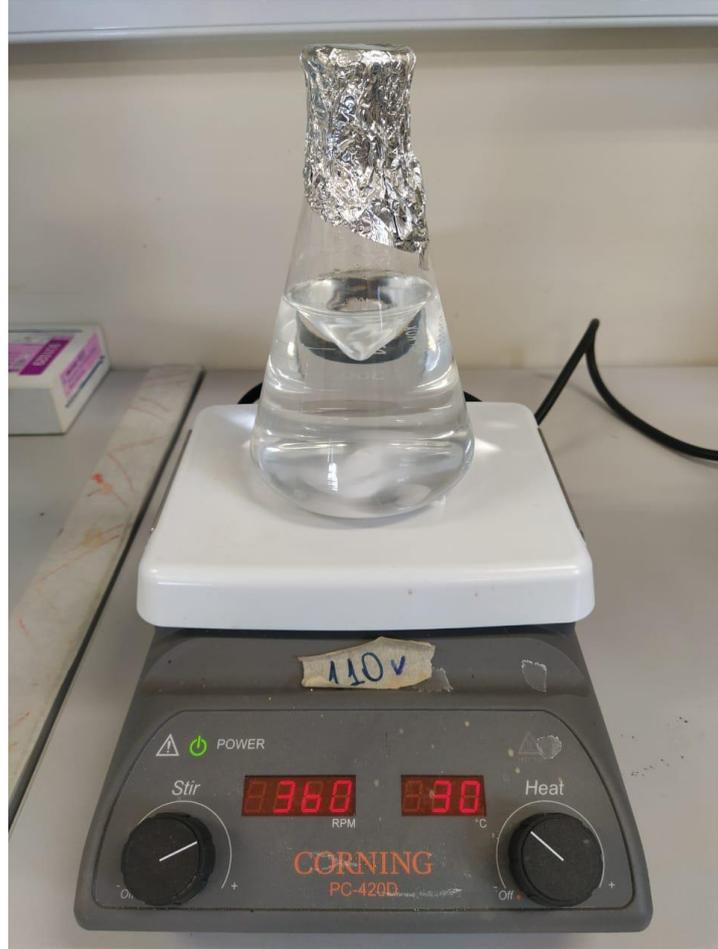
Fonte: Autoria própria (2021)

4.5 Bioensaios utilizando simulações térmicas regionais

4.5.1 Preparação da solução de Sumilarv 0,5G.

As concentrações de Pyriproxyfen aplicadas nos experimentos utilizando as larvas foram escolhidas a partir de uma concentração de referência (0,01 mg de ingrediente ativo por litro), sendo esta preconizada tanto pela OMS quanto pelo MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; OMS, 2005; 2017). Dessa forma, além da concentração de 0,01 mg/L, foram utilizadas duas concentrações abaixo de 0,01 mg/L (0,0025 mg/L e 0,005 mg/L) e duas concentrações acima desta (0,02 mg/L e 0,04 mg/L). Para derivar as concentrações finais dos experimentos, foi feita uma solução-estoque com concentração conhecida de 5 mg/L de Pyriproxyfen a partir do Sumilarv 0,5G®. Esta solução-estoque foi feita a partir da trituração manual de 0,5 g de produto em cadinho de porcelana utilizando pilão, para aumentar a superfície de contato pela redução dos grânulos do composto. Na sequência, foi depositado em Erlenmeyer com capacidade para 500 ml com água de torneira e dissolvido em agitador magnético (Corning PC-420D®) durante uma hora a 360 rotações por minuto (rpm), sob a temperatura máxima de interesse do experimento como exemplifica a Figura 12.

Figura 12: Preparação da solução-estoque de Pyriproxyfen utilizando Sumilarv 0,5G®, com agitador magnético na temperatura de 30 °C, máxima representativa para simulações referentes à região Nordeste



Fonte: Autoria própria (2021)

A solução permaneceu em repouso durante 24 horas para permitir diluição do ingrediente ativo dentro da incubadora programada com as condições térmicas de interesse do experimento de simulação regional, envolta em papel alumínio para abrigar da luz. Em seguida, a solução foi agitada novamente por um período de 30 minutos antes da preparação dos experimentos, seguindo recomendações de Sihuincha et al. (2005) e Mbare et al. (2013).

4.5.2 Ensaio de inibição de emergência de adultos

Grupos de 20 larvas ao final do III ínstar e/ou início do IV ínstar de *Ae. aegypti* foram submetidas a 250 mL de solução contendo Pyriproxyfen em béqueres com capacidade de 500 mL, mantendo a altura da coluna d'água entre 5 a 10 cm. Essa recomendação é importante para que não houvesse mortalidade das larvas devido possível dificuldade em alcançar a superfície para obter oxigênio atmosférico,

seguindo as recomendações do Protocolo desenvolvido pela OMS (2016). Os béqueres foram cobertos com um pedaço de tecido tule, preso por elástico, de forma a permitir a entrada de ar atmosférico aos potes e evitar evasão de mosquitos adultos, como demonstrado na Figura 13.

Figura 13: Unidade experimental dos testes para inibição de emergência de adultos de *Aedes aegypti* expostos ao Pyriproxyfen



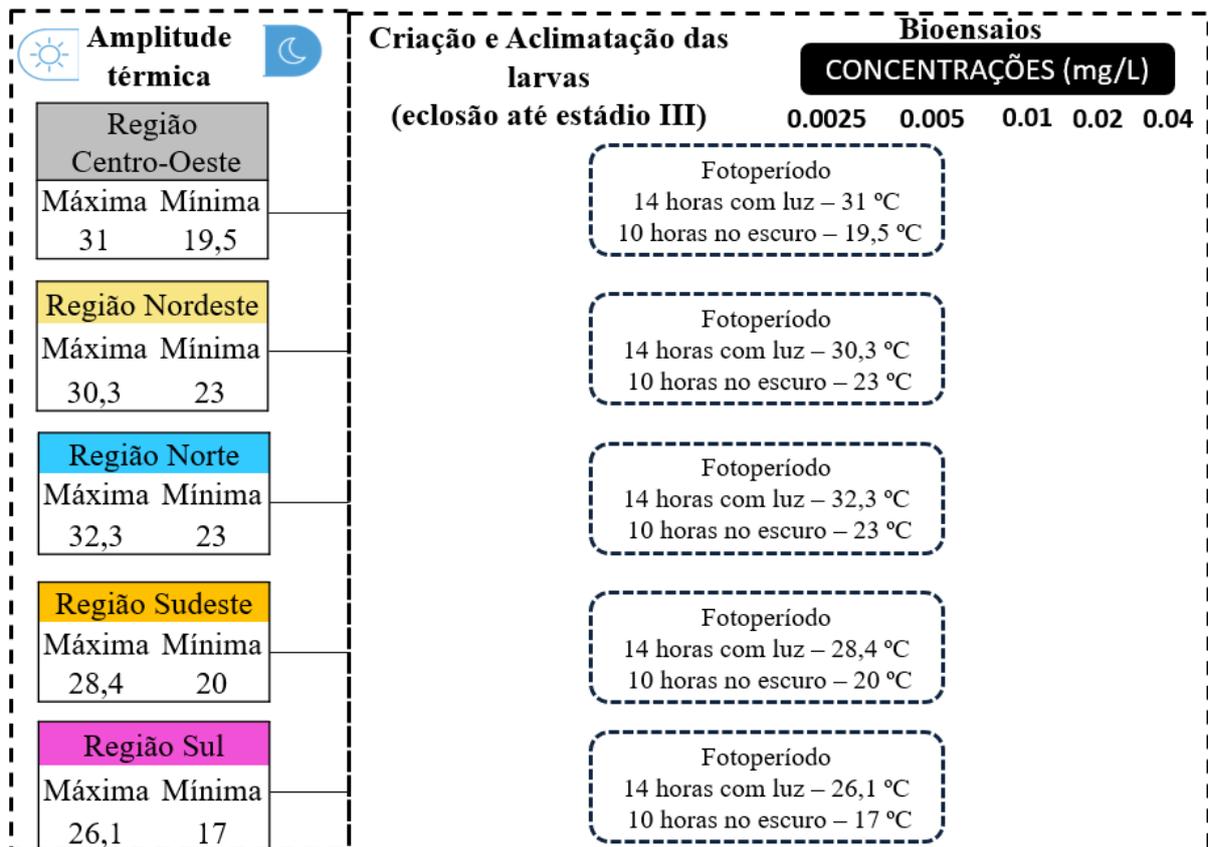
Fonte: A autoria própria (2021)

Em cada experimento, cada concentração foi composta por cinco réplicas. Ao início de cada experimento, as larvas foram realimentadas com 64 mg de *S. cerevisiae* (3,2 mg por larva), sendo o alimento repostado a cada dois dias, cessando alimentação quando haviam apenas pupas (SOUZA et al., 2019). Em cada nova adição de alimento fora subtraído 3,2 mg de levedura para cada pupa presente na unidade experimental, pois considerando que pupas não se alimentam, haveria potencial acúmulo de matéria orgânica no ambiente. Paralelamente, cinco réplicas com as mesmas condições foram atribuídas ao experimento controle, sendo este composto apenas por 250 ml de água da torneira e levedura como fonte de alimento. Os experimentos controle também foram compostos por 20 larvas em cada réplica.

As unidades experimentais foram monitoradas diariamente, com remoção e descarte das larvas e pupas mortas ou moribundas (i.e.: que não respondiam a

estímulos feitos com a pipeta Pasteur). Os experimentos foram considerados finalizados quando todos os indivíduos presentes nas unidades de controle emergiram com êxito para o estágio adulto. A Figura 14 sumariza as condições aplicadas nos experimentos para cada simulação regional.

Figura 14: Resumo geral do desenho experimental adotado



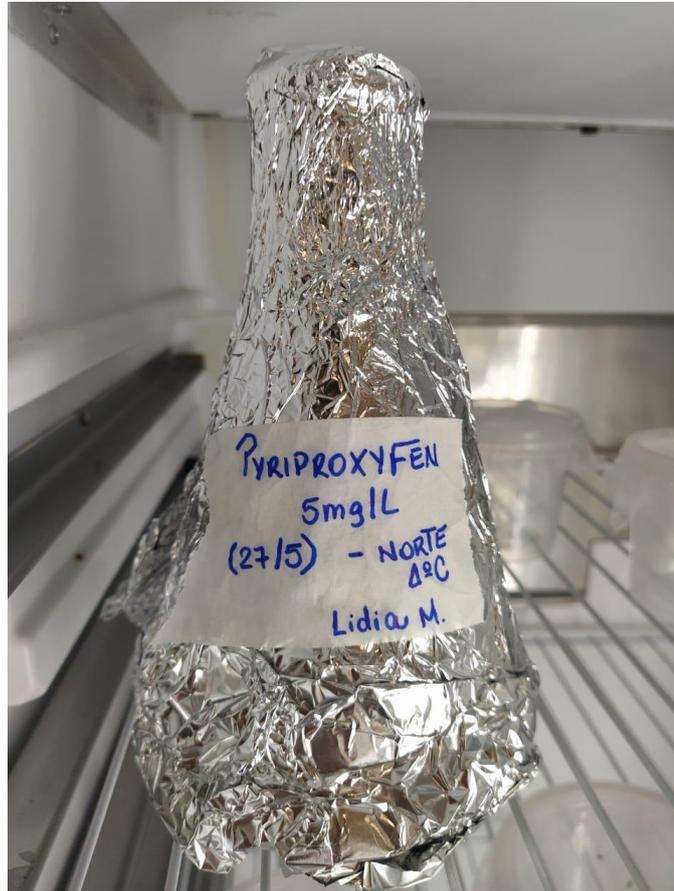
Fonte: Autoria própria (2019)

4.5.3 Bioensaios para avaliação de efeito residual do Sumilarv® 0,5G.

Considerou-se como efeito residual, a capacidade de um composto em manter sua letalidade à população alvo por um determinado período de tempo, neste caso, aferido pela inibição de emergências médias diárias (REGAZZI, 2003). Para este objetivo, utilizou-se de três períodos de aclimação da solução-estoque na incubadora: após 10 dias, após 15 dias e após 30 dias. A solução-estoque foi mantida durante os referidos períodos em Erlenmeyer (500 ml), envolto em papel alumínio de forma a isolar possível efeito de degradação pela luminosidade da incubadora, como ilustrado pela Figura 15. Os experimentos utilizando a solução-estoque mantida a

longo prazo na incubadora seguiram o mesmo procedimento experimental descrito na subseção 4.5.2.

Figura 15: Solução-estoque de Pyriproxyfen mantido na incubadora para os experimentos avaliando efeito residual

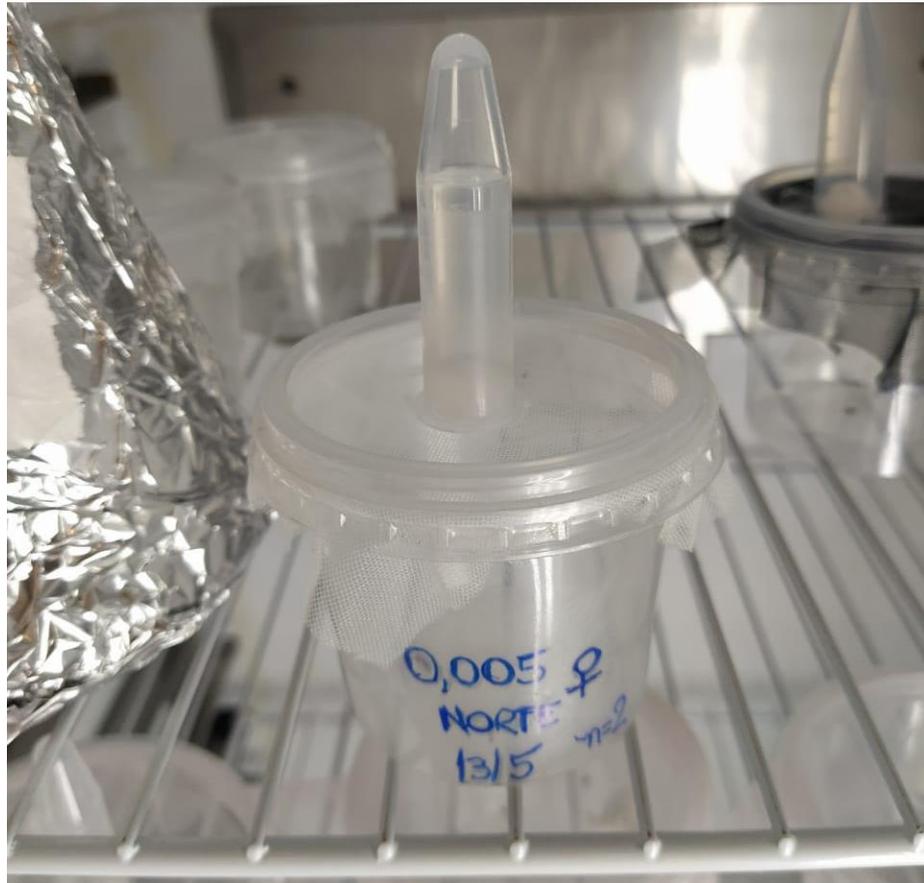


Fonte: Autoria própria (2021)

4.6 Longevidade de mosquitos adultos sobreviventes ao Pyriproxyfen

Durante as manutenções diárias, os mosquitos emergidos das unidades experimentais de controle e os sobreviventes aos tratamentos com Pyriproxyfen foram removidos dos béqueres com o auxílio de um sugador entomológico. Os indivíduos foram transferidos para potes de plástico secos (de dimensões 11,25 x 8,55 x 3,6 cm), sendo separados entre machos e fêmeas e respeitando o limite de 5 mosquitos por pote, para evitar efeitos de competição. Os potes foram cobertos por tecido tule preso por elástico, em cima do qual foi disposto um tubo *Eppendorf* com capacidade para 2 ml preenchido por solução açucarada (concentração de 10% v/v) e tampado com pedaço de algodão a ser embebido para alimentação dos indivíduos, conforme ilustrado na Figura 16.

Figura 16: Exemplo do método de criação dos mosquitos adultos para análise de longevidade



Fonte: Autoria própria (2021)

A solução açucarada foi trocada diariamente enquanto o algodão foi trocado a cada dois dias, para evitar a proliferação de fungos. Os mosquitos mortos foram retirados diariamente durante a manutenção dos experimentos e foram inseridos em microtubos (*Eppendorf*®), preenchidos com álcool isopropílico para conservação dos espécimes para a etapa de análises morfométricas.

4.7 Análise de dados

Os resultados dos experimentos de exposição das larvas ao Pyriproxyfen e de efeito residual do composto foram tabulados conforme proporção de inibição de emergência de adultos e foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk no *software* Statistica (TIBCO, 2022). Os dados foram submetidos ao teste ANOVA para testar a hipótese de que há diferenças na eficiência do larvicida e se há redução no efeito residual do larvicida em função do tempo sob os diferentes regimes térmicos, considerando $\alpha = 0,05$. Também foi aplicada ANOVA para testar a hipótese de que as concentrações do larvicida têm mudanças na sua eficiência considerando as

diferentes temperaturas. Para comparações múltiplas, foi aplicado o teste *post hoc* de Tukey. Os testes estatísticos foram realizados por meio do *software* Statistica (TIBCO, 2022). Adicionalmente, para cada tratamento, as concentrações que inibem a emergência de adultos em 50% da população (IE_{50}) foram calculadas e as curvas dose-resposta foram construídas com o *software* R Studio (R Core Team, 2022), empregando o pacote *ec50estimator* (Alves, 2022). Os resultados dos experimentos de longevidade foram analisados por meio da aplicação da Regressão de Cox para análise de sobrevivência, para testar a hipótese de que mosquitos sobreviventes a concentrações de larvicida vivem menos do que mosquitos provindos do experimento controle. Resultado da regressão de Cox foi representado graficamente pela curva de sobrevida pelo método de Kaplan-Méier, com *software* Statistica (TIBCO, 2022). Para todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância $\alpha=0,05$.

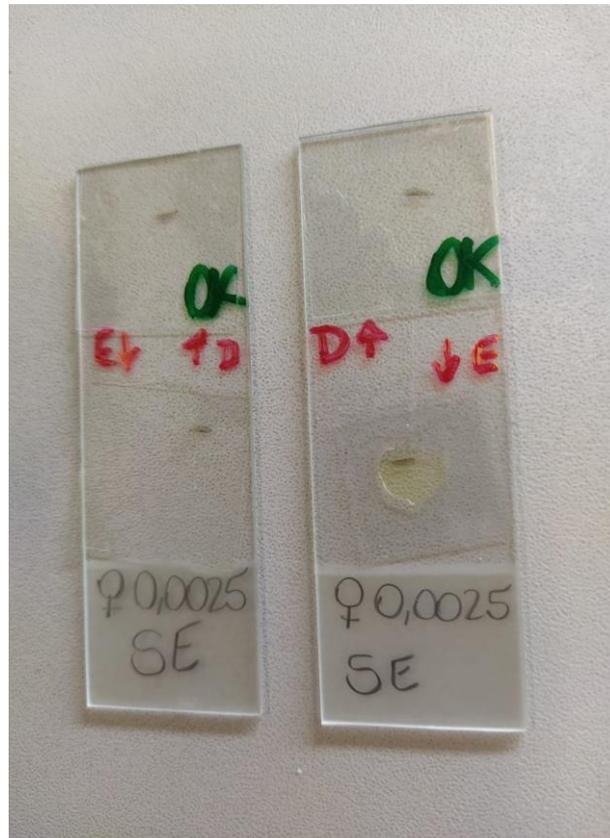
4.8 Morfometria geométrica

4.8.1 Considerações gerais e análise de tamanho

As asas foram removidas do tórax de cada indivíduo com auxílio de um estilete entomológico e montadas entre lâmina e lamínula para microscopia, com discriminação entre asas direitas e esquerdas do mesmo indivíduo (Figura 17). Para facilitar a visualização dos pontos anatômicos, o excesso de escamas de cada asa foi removido com auxílio de um pincel de cerdas macias antes de fixá-las em lâmina para microscopia.

Na sequência, imagens das asas foram obtidas por meio de fotografia digital (extensão jpeg) utilizando máquina fotográfica acoplada em microscópio óptico (Nikon – Eclipse E200), com magnitude de aumento em 40X. As imagens foram digitalizadas com a devida escala e orientação de posição da asa por meio do *software* *TsView Digital Imaging*.

Figura 17: Lâminas montadas com asas de fêmeas sobreviventes a 0,0025 mg/L de Pyriproxyfen



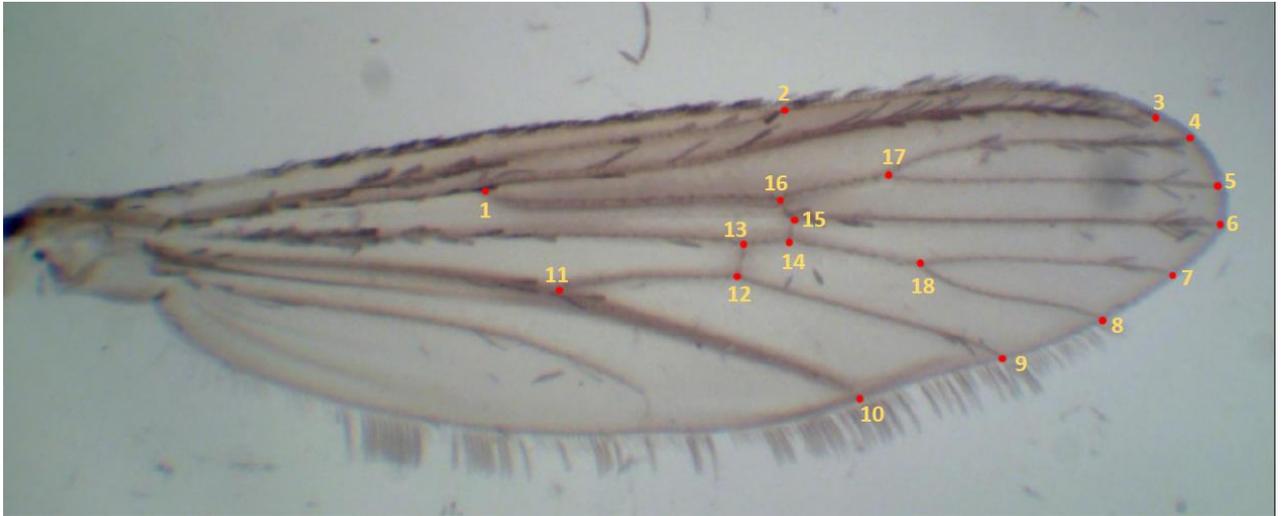
Fonte: Autoria própria (2021)

Foi escolhido um conjunto de 18 pontos anatômicos do tipo 1 com base nas metodologias de Jirakanjanakit et al. (2007) e Lorenz et al (2017) como pode ser observado na Figura 18. Considerando a possibilidade de erros manuais durante a digitalização, foi realizado um teste de repetibilidade no qual dois pontos anatômicos de uma mesma asa são registrados seis vezes. Neste teste, um dos pontos deve ser de difícil identificação visual e o outro, de fácil identificação de acordo com recomendações de Lorenz e Suesdek (2013). Tal teste é realizado no *software* Statistica (TIBCO, 2022), de acordo com protocolo preconizado pela Sociedade Americana para Controle de Qualidade (ARNQVIST; MÅRTENSSON, 1998; IAIG, 1999)

Confirmando-se a confiabilidade por meio do teste de repetibilidade, o conjunto de pontos anatômicos em cada asa foi digitalizado por meio do *software* tpsDig2 (ROHLF, 2004). Cada ponto recebe uma coordenada posicional no plano cartesiano bidimensional (VIRGINIO-FONSECA, 2018). O conjunto de coordenadas foi

agrupado, de acordo com o sexo e tratamento de cada indivíduo, utilizando o *software* tpsUtil (ROHLF, 2004).

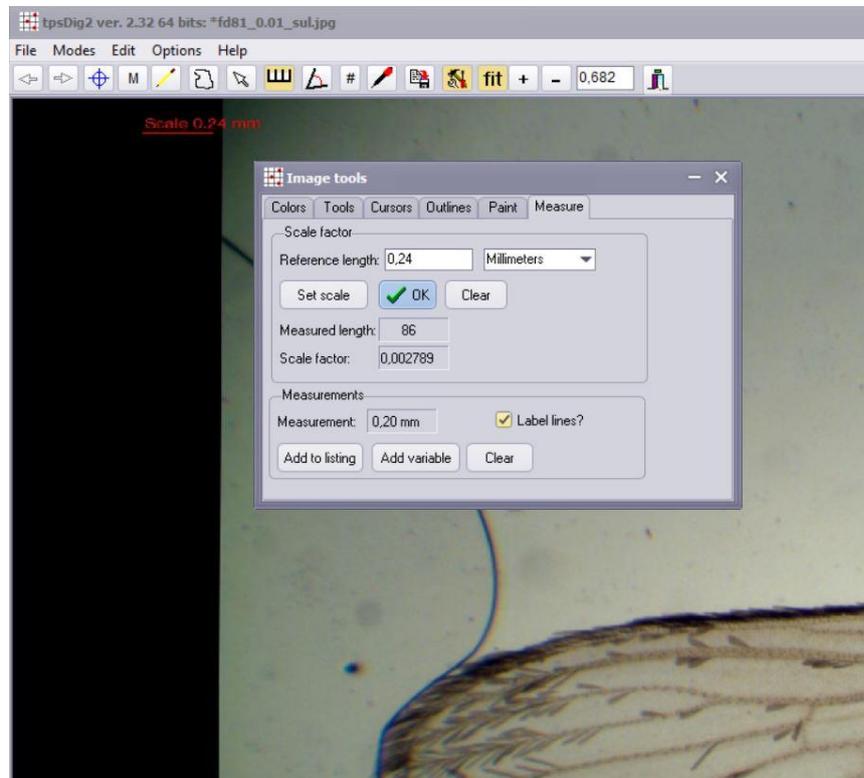
Figura 18: Posição dos pontos anatômicos na asa esquerda de *Aedes aegypti*



Fonte: Autoria própria (2022)

Em seguida, os conjuntos de dados foram utilizados como base para diferentes análises em morfometria, utilizando de diferentes *softwares*. Para a análise de tamanho, realizada por meio do cálculo de tamanho do centroide (TC), a base de dados contendo apenas as asas esquerdas foi submetida ao *software* tpsRelW por onde foram obtidos os valores, em pixels, do tamanho do centroide de cada asa. Esses valores foram multiplicados pelo fator de escala indicado pelo *software* tpsDig2 de forma a quantificar a medida em milímetros (Figura 19).

Figura 19: Fator de escala utilizado nas conversões no tpsDig para as coordenadas posicionais dos pontos anatômicos das asas



Fonte: Autorial própria (2022)

Os dados dos tamanhos do centroide foram convertidos em milímetros e comparados entre amostras por meio do teste ANOVA, dentro de cada condição testada referente às simulações térmicas das regiões. Para os testes ANOVA, foi considerado o nível de significância de $\alpha=0,05$. Quando significativo, realizou-se na sequência o teste *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas nas diferenças. Resultados gráficos do tamanho do centroide das populações foram elaborados com o *software* Origin (ORIGINLAB, 2020).

4.8.2 Análise de assimetrias alares flutuante e direcional

Considerando a hipótese de que o estresse ambiental resulta em assimetria alar como custo de sobrevivência às concentrações do larvicida, analisou-se a ocorrência de assimetria alar bilateral em machos e fêmeas nas diferentes condições analisadas. Para isso, as asas direitas e esquerdas de cada indivíduo foram agrupadas de acordo com as concentrações de larvicida e condições térmicas simuladas pra cada região por meio do *software* tpsUtil e comparadas nessa análise.

O conjunto de dados integrados foi submetido a superimposição de Procrustes utilizando o *software* MorphoJ (KLINGENBERG, 2011), para remover componentes de variação que não fazem parte da variável de forma (tamanho, posição e orientação) (KLINGENBERG, 2015). Pontos atípicos foram removidos das bases de dados antes da execução do teste.

Em seguida, os dados foram submetidos à ANOVA de Procrustes, que testa a diferença entre a posição dos mesmos pontos, porém de lados distintos: direito e esquerdo. O cálculo usa como base a distância de Procrustes, a qual computa a soma dos desvios quadráticos sendo então compatível à ANOVA tradicional e específica para o presente conjunto de dados (KLINGENBERG, 2015).

Aplicou-se a ANOVA de Procrustes, considerando $\alpha=0,05$ para assimetria direcional e flutuante, com o *software* MorphoJ (KLINGENBERG, 2011).

4.8.3 Análise da forma alar com variáveis canônicas

A análise de variáveis canônicas (AVC) é uma técnica multivariada que agrupa as diferenças entre as amostras a partir de variáveis latentes (MONTEIRO & REIS, 1999). As variáveis canônicas (VC) foram obtidas e analisadas por meio do *software* MorphoJ 1.07a, para cada conjunto de dados referente ao sexo e condição térmica analisada, validadas pelo teste de permutação (10.000 repetições). Entre as VC observadas para cada comparação, foram consideradas a primeira e a segunda (VC1 e VC2) por serem as variáveis mais informativas sobre a forma (MONTEIRO & REIS, 1999). A representação do morfoespaço de acordo com as VC foi realizada com o *software* MorphoJ 1.07a em gráficos de dispersão.

As distâncias de Mahalanobis (dM) foram utilizadas na avaliação do grau de diferença relativa entre as amostras. As dM correspondem à distância euclidiana em um espaço multidimensional e são derivadas da AVC, calculadas também pelo *software* MorphoJ 1.07a. Os valores de p foram considerados dentro do critério de significância em 0,05 para comparação das dM entre as amostras.

O efeito da alometria foi estimado com regressão multivariada entre as coordenadas de Procrustes e o tamanho do centroide, com teste de permutação (10.000 repetições) por meio do *software* MorphoJ 1.07a, considerando significância de 0,05. Os valores preditos pela regressão também foram submetidos a nova AVC para avaliar o grau de dissimilaridade entre as amostras sem o efeito alométrico,

comparando-se as dM recalculadas para estimar o efeito do tamanho sobre a forma das asas comparadas.

Todas as análises morfométricas de tamanho e forma também foram realizadas com os indivíduos dos experimentos controle para comparar o efeito isolado das temperaturas nas simulações térmicas das regiões brasileiras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimentos de toxicidade crônica para avaliação da eficiência de Pyriproxyfen no controle de larvas de *Ae. aegypti* em simulações térmicas regionais do Brasil

De forma geral as larvas nos experimentos utilizando as condições térmicas simuladas para a região Nordeste (NE) se desenvolveram mais rápido, o que consequentemente diminuiu o tempo de duração dos experimentos nessa condição (Tabela 3). Em contrapartida, as condições experimentais para a região Sul (S) corresponderam ao tempo mais longo de desenvolvimento das larvas, sendo o dobro do observado nas condições da região NE. Embora os experimentos não tenham sido repetidos pelo mesmo número de vezes, a quantidade de larvas expostas em cada unidade amostral foi de 20 larvas em todas as condições e repetições, mantendo o mesmo padrão de respostas para evitar interferência de competição intraespecífica (STEINWASCHER, 2018, 2020).

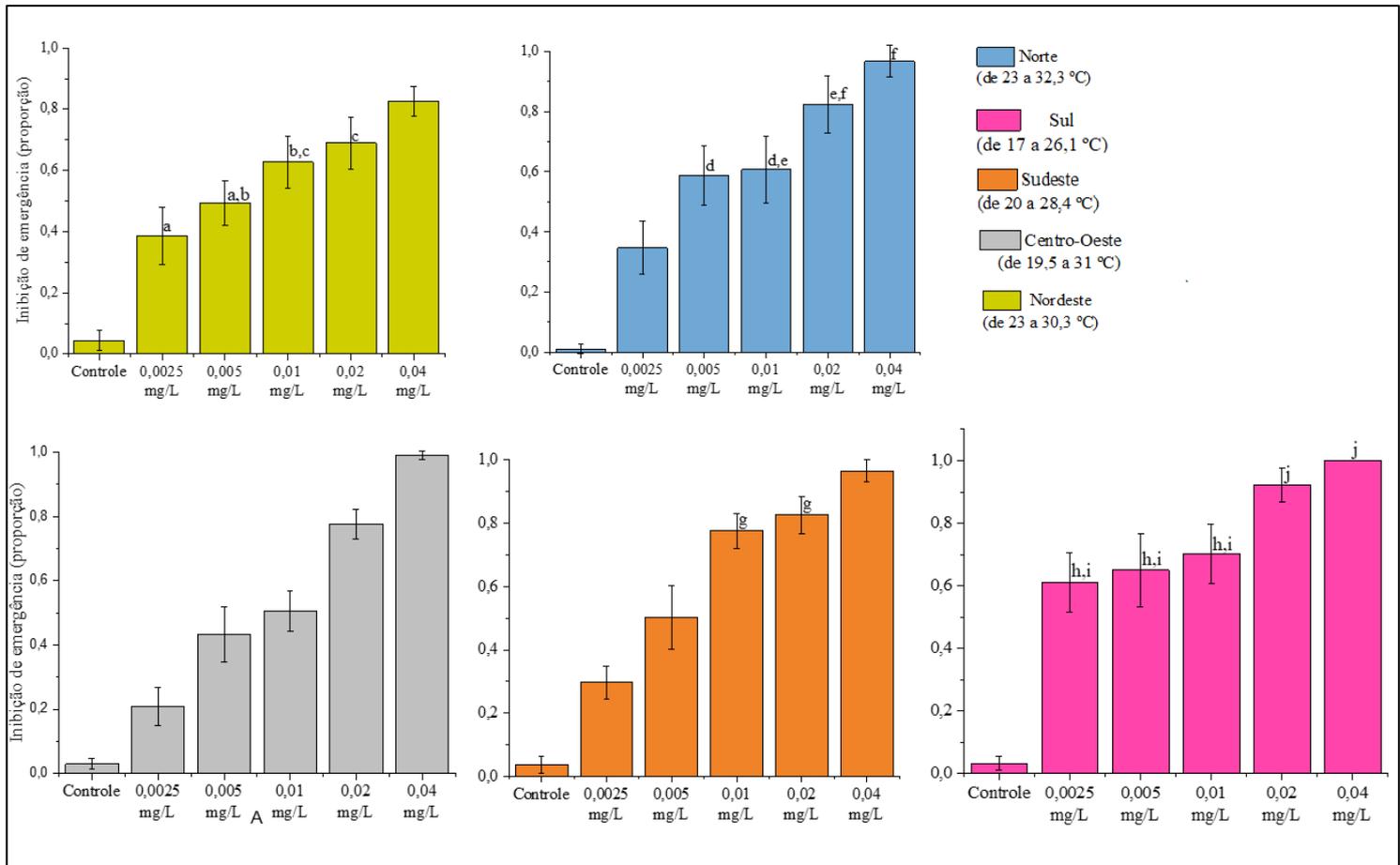
Tabela 3: Informações gerais e descritivas da duração (em dias) dos experimentos de exposição das larvas a diferentes concentrações de Pyriproxyfen em diferentes condições simuladas para as regiões brasileiras

Regiões	Número de experimentos	Dias de experimento (média)	Desvio padrão
Sul (de 17 a 26,3 °C)	4	10,5	2,19
Sudeste (de 20 a 28,4 °C)	4	8,2	1,3
Norte (de 23 a 32,3 °C)	3	8	0,8
Nordeste (de 23 a 30,3 °C)	3	5	0,95
Centro-Oeste (de 19,5 a 31 °C)	5	7	1,6

Fonte: Autoria própria (2022)

A sensibilidade dos organismos foi maior conforme o tempo de exposição ao larvicida, sendo observadas então as taxas mais altas de inibição de emergência (IE) nas simulações para a região S (tempo médio de exposição de 10,5 dias), cuja menor taxa foi de 60% em resposta à menor concentração de Pyriproxyfen aplicada (0,0025 mg/L). A distribuição descritiva da inibição de emergência dos mosquitos adultos para cada condição experimentada pode ser observada na Figura 20. Cabe ressaltar que não há barra de erro na concentração de 0,04 mg/L para as simulações térmicas da região S devido ao IE de 100% das larvas em todas as repetições dos experimentos.

Figura 20: Representação gráfica da proporção de inibição da emergência de adultos em diferentes concentrações de Pyriproxyfen nas simulações térmicas para as 5 regiões brasileiras



Fonte: Autoria própria (2022).

OBS: Barras com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si. A mortalidade nos tratamentos controle foram menores que 10% em todas os experimentos. Sendo assim, não foi corrigida por meio da Fórmula de Abbott conforme o Protocolo da OMS (2016).

Considerando os experimentos simulando região Norte (N), não houve diferença significativa entre os tempos de exposição das larvas ao Pyriproxyfen se comparados ao período médio de exposição registrado para a região SE, sendo uma diferença de apenas 0,2 dias. Entre estes tratamentos, a maior diferença está entre

as temperaturas correspondentes ao fotoperíodo claro, que em N é 4 °C maior do que SE. A região Centro-Oeste (CO) correspondeu às larvas cujo desenvolvimento completo levou, em média, um dia a menos nas exposições às concentrações subletais do larvicida quando comparado com SE e N, e também foi correspondente à menor sensibilidade das larvas ao composto.

Em todas as condições testadas houve evidências de tendência no aumento da mortalidade de larvas como consequência da ação do larvicida devido ao aumento da concentração ($p < 0,05$, no teste *post hoc* de Tukey), o que confirma que a eficiência desse larvicida é dose-dependente. Entretanto, em algumas condições térmicas não houve evidências de que a eficiência do larvicida tenha sido reduzida com o aumento da concentração de Pyriproxyfen.

Nas simulações térmicas para a região N, não houve evidências de que a IE média à concentração de 0,01 mg/L, recomendada pela OMS, foi maior quando comparada a IE média nas concentrações em 0,005 mg/L e 0,02 mg/L ($p = 0,8951$ e $0,18$, respectivamente), e entre as duas maiores concentrações do larvicida ($p = 0,505$). Padrão semelhante foi observado na comparação dos dados da IE média na condição de simulação térmica para a região NE, para a qual não houve evidência de que o aumento de 0,0025 mg/L para 0,005 mg/L refletiu aumento de eficiência em IE de adultos ($p = 0,2493$) assim como não houve evidências de que a IE nas concentrações 0,005 e 0,01 mg/L foram diferentes ($p = 0,7646$). Por outro lado, na condição de experimento para a região CO houve evidência de que todo aumento de concentração resultou em aumento na eficiência do larvicida, sem exceções ($p < 0,001$ nas comparações múltiplas *post hoc*). Na condição térmica simulada para a região SE o aumento da concentração acarretou no aumento significativo da IE de adultos, com exceção da comparação entre 0,01 mg/L e 0,02 mg/L, para a qual não houve evidência de que o aumento da concentração tenha causado aumento na IE ($p = 0,90$). Por fim, para a região S, não houve evidência de que a IE nas menores concentrações (0,0025, 0,005 e 0,01 mg/L) foram diferentes entre si, sendo então o aumento da inibição apenas significativo na maior concentração (0,02 mg/L de Pyriproxyfen).

Para isolar o efeito das combinações de temperatura em função da exposição ao larvicida, é importante a comparação múltipla da IE em uma mesma concentração

nas diferentes simulações térmicas a começar pela menor concentração aplicada (0,0025 mg/L). Houve evidências de que a IE correspondente a região S foi maior que a IE observada para as demais condições térmicas (Tabela 4), indicando maior sensibilidade das larvas ao composto nesta condição experimentada.

Tabela 4: Valores da estatística p no teste *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas de inibição de emergência de adultos para as larvas expostas a 0,0025 mg/L de Pyriproxyfen em diferentes simulações térmicas regionais.

Regiões	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul
Norte		0,90560	0,13759	0,96646	0,00015
Nordeste	0,90560		0,00698	0,49526	0,00081
Centro-Oeste	0,13759	0,00698		0,37862	0,00012
Sudeste	0,96646	0,49526	0,37862		0,00012
Sul	0,00015	0,00081	0,00012	0,00012	

Fonte: Autoria Própria (2022).

OBS: Valores em negrito representam diferença estatisticamente significativa

A mortalidade das larvas decorrente da IE na simulação para a região CO foi menor quando comparada com a IE calculada para a região NE na concentração em 0,0025 mg/L de Pyriproxyfen ($p = 0,00698$). A mesma concentração (0,0025 mg/L) inibiu a emergência de 50% menos mosquitos nas condições simuladas para a região Sudeste (SE), quando comparado à região S. Nesta comparação, vale ressaltar que a temperatura referente ao fotoperíodo claro foi, em média, 2°C maior nos tratamentos associados a região SE, que também correspondeu ao desenvolvimento mais rápido das larvas, com 2,3 dias a menos para atingirem à metamorfose para a fase adulta. Esta relação é corroborada pelo trabalho de Alomar, Eastmond e Alto (2021) que também observaram menor tempo de desenvolvimento larval em indivíduos ambientados a temperatura mais altas (30 °C) comparado a 20°C.

Não houve evidências de que as IE foram diferentes entre as condições térmicas simuladas para as regiões Norte, Nordeste e Sudeste ($p > 0,05$) quando expostas a 0,005 mg/L de Pyriproxyfen. Entretanto, a IE média nesta concentração foi maior nas condições experimentadas para a região S do que na região CO ($p = 0,004768$), inibindo a emergência de adultos em mais de 50% dos indivíduos em S.

Ao considerar a concentração recomendada pela OMS (0,01 mg/L), a mortalidade média decorrente da IE de adultos foi acima de 50% dos indivíduos nas

condições experimentadas, exceto na simulação térmica para a região CO (Figura 22). Entretanto, é possível observar que a inibição de emergência de adultos na concentração de 0,01 mg/L foi 20% menor em N se comparado ao resultado da mesma concentração para SE. Houve evidências de que a IE média registrada nesta última condição foi significativamente menor que a IE média para a região CO ($p = 0,0017$) na concentração de 0,01 mg/L de larvicida. As larvas expostas a 0,01 mg/L de larvicida nas condições simuladas para a região NE foram significativamente menos sensíveis ao composto quando também comparadas com as IE nas condições associadas à região SE ($p = 0,0452$).

Nas duas maiores concentrações do larvicida (0,02 e 0,04 mg/L), a IE ocorreu para mais de 65% dos indivíduos em todas as condições térmicas simuladas (Figuras 23a e b). Para a concentração de 0,02 mg/L de Pyriproxyfen, houve evidências de que a IE média nas condições térmicas para a região S foi maior que nas demais condições, com exceção à IE na região SE, o que pode ser visualizado por meio dos valores de p na Tabela 5.

Tabela 5: Estatística p no teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas de inibição de emergência de adultos em larvas expostas a 0,02 mg/L de Pyriproxyfen em diferentes simulações térmicas regionais

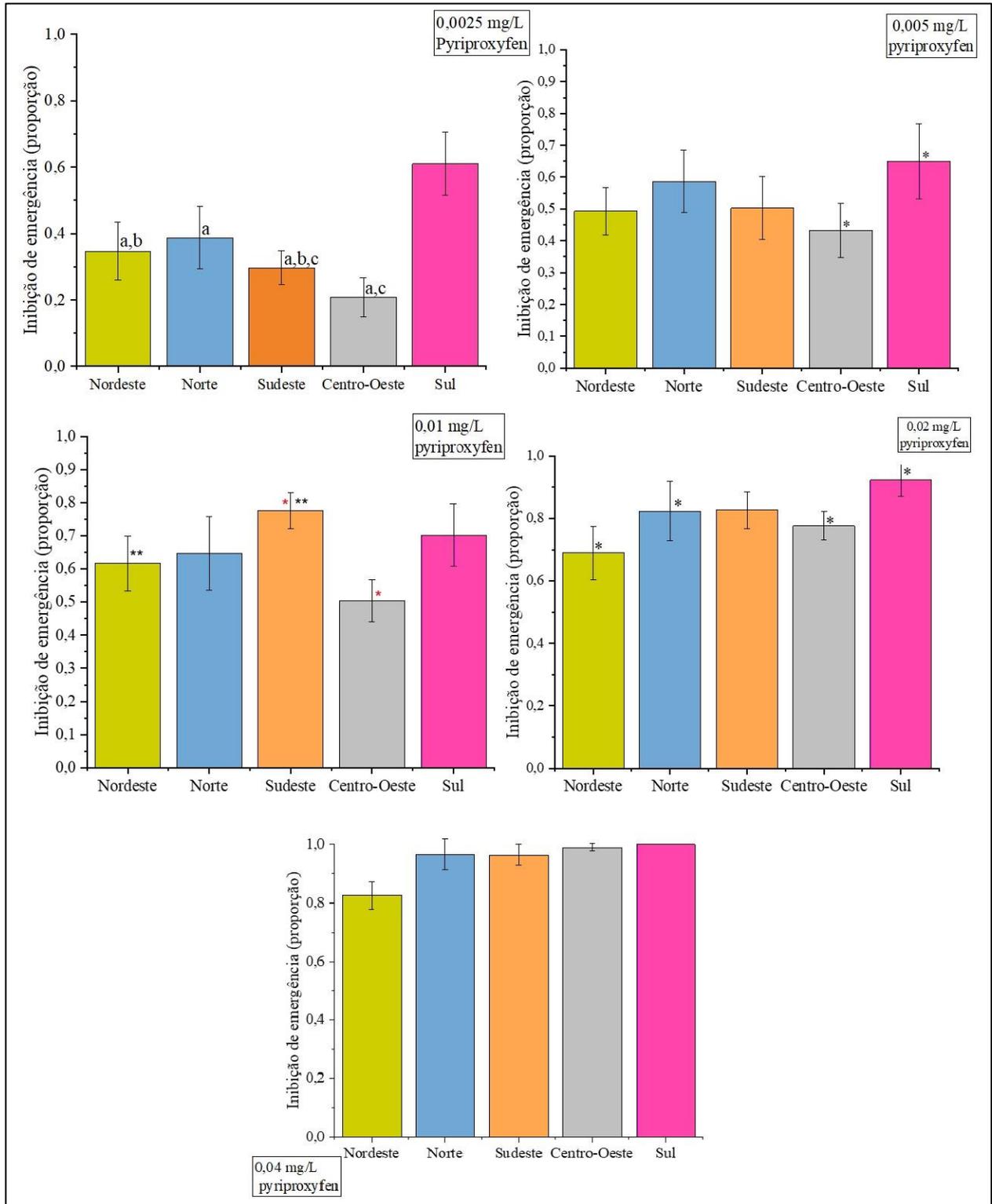
Regiões	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul
Norte		0,264390	0,999651	0,949931	0,019568
Nordeste	0,264390		0,216039	0,035533	0,000122
Centro-Oeste	0,999651	0,216039		0,819858	0,001578
Sudeste	0,949931	0,035533	0,819858		0,084433
Sul	0,019568	0,000122	0,001578	0,084433	

Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: valores em negrito representam diferença estatisticamente significativa

Curiosamente, apesar da semelhanças na eficiência entre as simulações térmicas para as regiões SE e N com aplicação de 0,02 mg/L de larvicida (médias de 0,83 e 0,82, respectivamente), houve evidência de que a mortalidade para a região N foi menor apenas que a mortalidade por IE na região S. Uma alternativa que pode explicar a diferença entre as regiões é o tamanho amostral, considerando que foi realizada uma repetição a mais do experimento com as condições térmicas da SE do que da N, o que produziu diferenças na variabilidade dos dados. Todas as comparações múltiplas para cada concentração aplicada por ser vista graficamente pela Figura 21.

Figura 21: Representação gráfica da inibição de emergência de adultos de *Aedes aegypti* expostos a diferentes concentrações sob condições térmicas distintas associadas às cinco regiões brasileiras



OBS: Barras com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si. Asteriscos denotam tratamentos significativamente diferentes

Apesar da relação dose-dependente verificada em todas as condições, cabe destacar a diminuição da IE observada nos tratamentos da simulação térmica para

NE especialmente nas condições com maior concentração do larvicida, ao passo que nas outras condições térmicas a mortalidade decorrente da IE é próxima de 100%, nas condições para NE a maior taxa de IE é de 80%. Atribui-se tal resultado à combinação de temperaturas, em que a variação de 7°C compreende o intervalo ótimo para essa espécie (SIMOY; SIMOY; CANZIANI, 2015).

É possível observar, pelas comparações múltiplas entre cada concentração, a tendência de aumento de sensibilidade dos indivíduos nas condições térmicas simuladas para a região S. Na concentração mais baixa, de 0,0025 mg/L, em média 60% das larvas expostas não emergiram para o estágio adulto do mosquito. Enquanto isso, a mesma concentração nas condições térmicas para a região CO inibiu em média a emergência de 21% dos indivíduos. Dessa forma, é importante destacar o efeito que a combinação de diferentes temperaturas demonstra ter sobre a eficiência do larvicida em inibir a emergência de adultos.

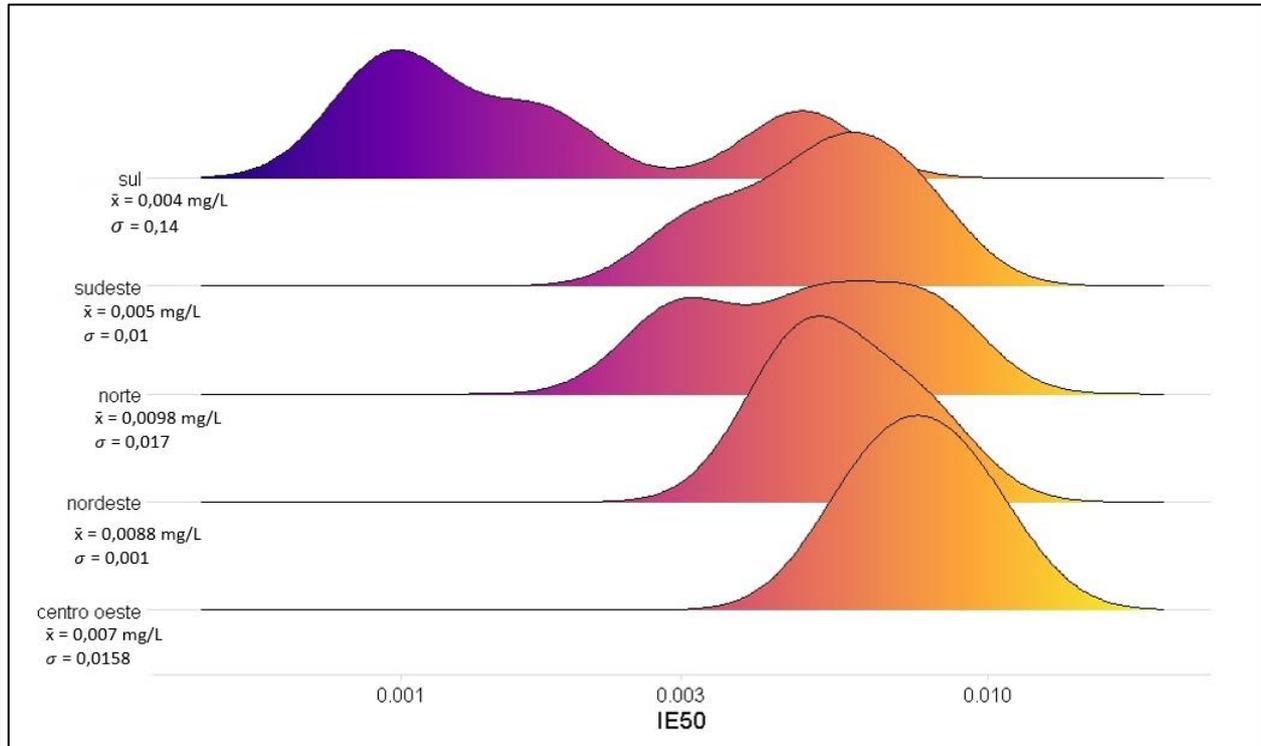
A temperatura é um dos fatores que interfere diretamente nas respostas aos reguladores de crescimento do inseto por alterar as características da história de vida e a sensibilidade dos organismos aos inseticidas (ALOMAR; EASTMOND; ALTO, 2021). Temperaturas mais altas, porém constantes, foram associadas à redução da eficiência de Pyriproxyfen nos experimentos com exposição de larvas de *Ae. aegypti* em condições laboratoriais (MOURA *et al.*, 2021). Entretanto, experimentos com temperaturas constantes não são tão representativas do que ocorre na natureza quanto utilizar de flutuações da temperatura em função do fotoperíodo. A exposição à variação da temperatura ao longo do fotoperíodo, mimetizando a flutuação natural entre dia e noite, influencia a regulação da tolerância térmica e de proteínas do choque térmico, o que também pode influenciar a resistência metabólica envolvida em mecanismos de desintoxicação aos inseticidas (COLINET *et al.*, 2015).

Salinas, Feria-Arroyo e Vitek (2021) demonstraram que a suscetibilidade de *Ae. aegypti* a permetrina e deltametrina foi significativamente menor no regime de temperatura mais alto, considerando uma variação de 11,4°C (36°C durante o fotoperíodo claro e 24,6°C durante o fotoperíodo escuro), o que corrobora os resultados encontrados pelo presente trabalho na exposição ao larvicida Pyriproxyfen. Convém destacar a diferença quanto ao sítio alvo dos compostos experimentados em relação ao Pyriproxyfen bem como ao estágio de vida do ciclo do mosquito, uma vez que o Pyriproxyfen é aplicado para o controle larvário e a permetrina e deltametrina são adulticidas.

Apesar de, até o momento da escrita, não haver registros de trabalhos que tenham considerado efeitos dependentes de variação da temperatura na eficiência da aplicação de Pyriproxyfen, vale ressaltar que este composto, em condições laboratoriais e semi-campo, apresenta alta eficiência em concentrações baixas (GÓMEZ *et al.*, 2011; HUSTEDT *et al.*, 2020). Tal afirmação deve ser considerada em relação à concentração que inibe a emergência de 50% da população nos experimentos, levando em conta a concentração recomendada pela OMS e pelo MS.

Dentre as regiões termicamente simuladas, não houve experimento no qual a IE_{50} fora maior que 0,01 mg/L (com exceção do segundo experimento nas simulações para a região N, na qual a IE_{50} foi calculada em 0,02 mg/L). Em média, houve baixa variabilidade nas IE_{50} , com médias que não ultrapassaram a concentração recomendada pela OMS, como pode ser observado pela Figura 22. Dados das IE_{50} dos experimentos para a região sul corroboram para a observação de que os organismos foram mais sensíveis ao composto nessa condição, considerando que a concentração que inibiu a emergência de 50% da população foi três vezes menor que a concentração recomendada pela OMS (0,01 mg/L). A IE_{50} calculada para a região SE, por sua vez, apresentou concentração duas vezes menor que a preconizada pela OMS, sendo correspondente a segunda condição de experimento com maior sensibilidade. Na sequência em termos de sensibilidade, dados associados à região CO demonstraram que os organismos foram menos sensíveis que as condições anteriores, mas, ainda assim, uma concentração 1,5 vez menor que a indicada pela OMS foi capaz de inibir a emergência de 50% da população de larvas nos experimentos. A IE_{50} para as regiões NE e N aproximaram-se da concentração preconizada pela OMS, de forma que a variação encontrada é desprezível, tanto estatisticamente quanto biologicamente, sendo estas duas condições consideradas as que requerem maior concentração aplicada do larvicida para contemplar resultado de inibição de 50% dos organismos.

Figura 22: Distribuição dos valores calculados para a IE50 nas simulações térmicas regionais



Fonte: Autoria própria (2022)

É importante destacar a relação entre a suscetibilidade das larvas ao composto com o tempo de exposição nas diferentes temperaturas. Partindo-se do pressuposto que todos os indivíduos expostos apresentaram o mesmo nível inicial de sensibilidade por tratar-se de uma cepa laboratorial de referência, cabe notar que quanto mais tempo expostas ao composto, as larvas tiveram menos chances de emergirem para mosquitos adultos.

Como observado por Alomar, Eastmond e Alto (2021), exposição ao Pyriproxyfen em temperaturas mais baixas aumentou o tempo de desenvolvimento larval de *Ae. aegypti*, o que corrobora com os resultados encontrados pelo presente trabalho. Ademais, o maior tempo de exposição ao larvicida nas condições da região S indicam que há maiores chances de que o composto entre no organismo da larva e comprometa seu desenvolvimento para o estágio adulto. O tempo de exposição demonstra ser determinante para que o composto seja eficiente em inibir emergência de adultos e, no caso da região S, em concentrações mais baixas que as demais.

A aplicação de concentrações mais baixas de larvicida, naquelas regiões para as quais a suscetibilidade é maior, pode ser potencial estratégia por reduzir os riscos de exposição em espécies não-alvo, aumentando a segurança ambiental, além de

gerar economia direta de recursos financeiros para a Vigilância Epidemiológica. Além disso, pode estar associada a aplicação de outro composto, com diferente modo de ação. Por exemplo, a associação de baixa dosagem de Pyriproxyfen (0,00063 mg/L) e spinosad (0,00125 mg/L) demonstrou alta eficiência no controle larvário de *Ae. aegypti* e não teve efeito observado em mortalidade e parâmetros reprodutivos de *Daphnia magna* (SANTOS; LIMONGI; PEREIRA, 2020).

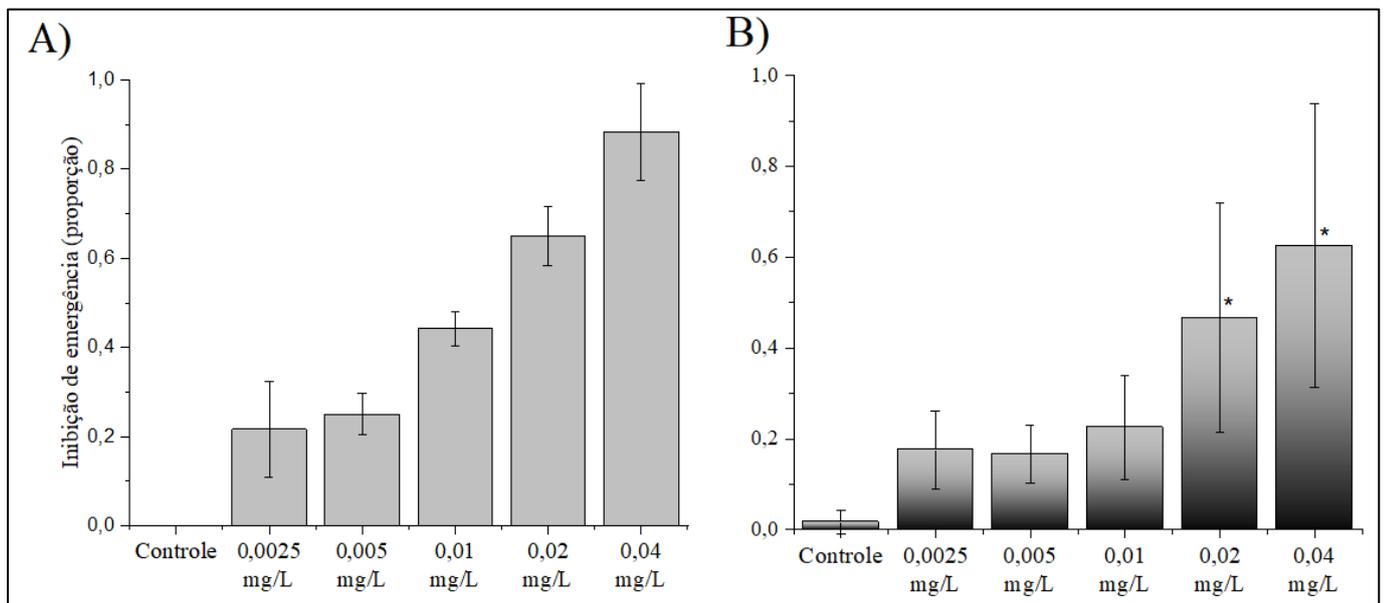
É de suma importância considerar as propriedades locais das cepas considerando as pressões evolutivas do ambiente de cada população, o que contribui diretamente no nível de resistência da população de mosquitos. Recentemente, Campos et al. (2020) demonstraram que 126 de 132 populações de *Ae. aegypti* estão suscetíveis ao Pyriproxyfen em dosagem-diagnóstica baixa (0,000015 mg/L), sendo as seis populações sugestivamente resistentes ao Pyriproxyfen provindas de cidades da região Nordeste. Convém destacar a discrepância entre a dose-diagnóstica encontrada por Campos et al. (2020) e as IE_{50} nas condições testadas pelo presente trabalho. Por um lado, os autores utilizaram-se de cepas coletadas em campo, o que preserva a fidedignidade das respostas dos organismos ao composto. Por outro lado, a variação da temperatura pode ter sido determinante na sensibilidade ao larvicida, com desenvolvimento mais rápido nas condições com temperaturas mais altas (e.g. N, NE e CO).

O tempo de muda e de metamorfose nas larvas está relacionado a diversos fatores bióticos e abióticos, para além da temperatura do ambiente, dentre eles, o tempo de alimentação no estágio larval, independentemente da quantidade de matéria orgânica presente. De forma geral, quanto maior a janela de oportunidade de alimentação para as larvas de *Ae. aegypti* no IV instar, uma maior proporção dos indivíduos consegue transformar-se em pupa e, posteriormente, em adultos (TELANG; FRAME; BROWN, 2007). Contudo, tal regra parece não acontecer na presença de Pyriproxyfen nos criadouros experimentais, mesmo em baixas concentrações. As larvas dos experimentos com as condições da região S tiveram mais oportunidades de acúmulo de nutrientes, o que não demonstrou ter efeito prático sobre a desintoxicação do larvicida.

Considerando a simulação da presença do larvicida em campo a longo prazo, foram feitos os experimentos com exposição prolongada do larvicida ao conjunto de temperaturas em diferentes tempos para testar o efeito residual na inibição de emergência de adultos. O efeito residual em inibição da emergência de adultos nas

condições simuladas para a região CO teve redução quando as larvas foram expostas após 15 e 30 dias (Figura 23 a e b). Nos casos em que a solução-estoque do larvicida esteve exposto na temperatura simulada para a região CO durante 15 dias, houve redução da IE em comparação aos resultados sem aclimatação da solução. Após 30 dias, a IE nas maiores concentrações (0,02 e 0,04 mg/L) foi menor quando comparadas com a mesma resposta obtida no experimento com 15 dias de exposição prévia do larvicida sozinho. A redução foi expressiva na concentração mais alta, 0,04 mg/L, para a qual a IE foi 25% menor após 30 dias na comparação com os resultados para 15 dias.

Figura 23: Proporção da inibição de emergência de adultos de *Aedes aegypti* em experimentos com exposição prévia da solução com Pyriproxyfen por diferentes períodos sob as condições térmicas simuladas para Centro-Oeste. A) Pós 15 dias; B) Pós 30 dias



Fonte: Autoria própria (2022)

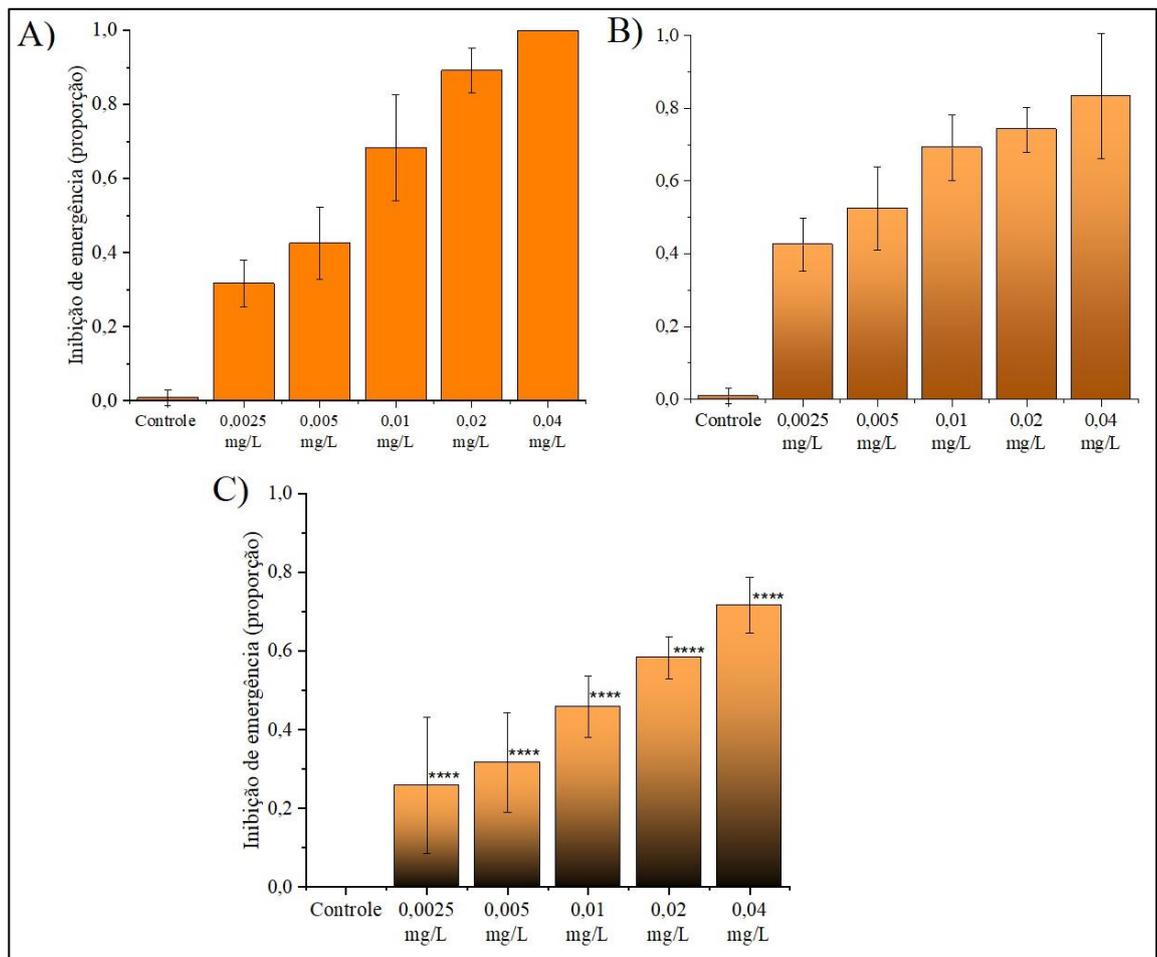
OBS: Barras indicadas por asterisco são significativamente diferentes entre si

Apesar de os resultados indicarem queda na eficiência do larvicida, não houve evidência de redução significativa de mortalidade das larvas à concentração de 0,01 mg/L de Pyriproxyfen entre 15 e 30 dias de exposição da solução do larvicida. Possivelmente o tamanho de amostra pode ter influenciado nos cálculos de comparações múltiplas. De forma semelhante, para simulação térmica da região SE o efeito residual do composto também exibiu redução na mortalidade de larvas em função da inibição de emergência dos adultos em função do tempo em algumas condições (Figura 24 a, b, c). No entanto, houve evidências de que a eficiência do larvicida diminuiu após 15 dias nas duas maiores concentrações aplicadas (0,02 e

0,04 mg/L), quando consideradas as respostas de inibição de emergência de adultos ($p < 0,001$ para ambas comparações). Após 30 dias, a eficiência do larvicida foi menor em todas as concentrações aplicadas, sendo as respostas de inibição de emergência de adultos menores que as obtidas nas condições após 15 dias de aclimatação do larvicida ($p < 0,001$).

Figura 24: Inibição de emergência de adultos nos experimentos com exposição prévia da solução com Pyriproxyfen por diferentes períodos sob as condições térmicas simuladas para Sudeste.

A) Pós 10 dias; B) Pós 15 dias; C) Pós 30 dias



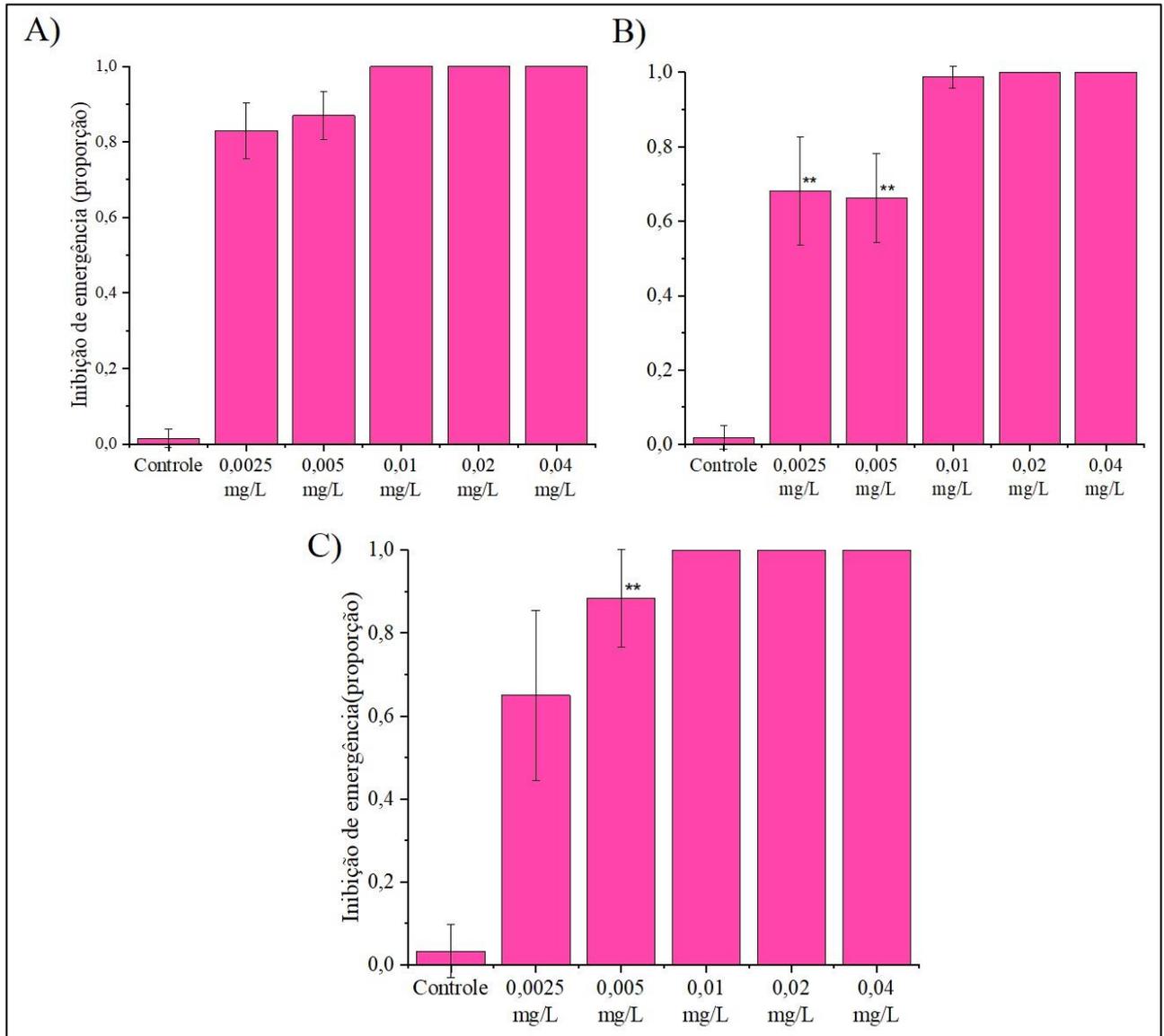
Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: Barras indicadas por asterisco são significativamente diferentes entre si

Considerando as respostas em IE de adultos nas condições de simulação para a região S, houve evidências de que o efeito residual do larvicida permaneceu alto nas concentrações maiores após 10, 15 e 30 dias, sem evidências de diferenças entre esses tratamentos (Figura 25, $p > 0,05$). Por outro lado, na concentração de 0,0025 e 0,005 mg/L de Pyriproxyfen houve evidências de que a IE foi menor quando os indivíduos foram submetidos à solução aclimatada por 15 dias nas temperaturas do

experimento comparados com resultado para solução aclimatada por 10 e 30 dias nas mesmas condições ($p < 0,05$). Convém ressaltar que, embora significativa diferença, a IE ocorreu em mais de 50% da população testada o que indica que o controle da população adulta de *Ae. aegypti* estaria acontecendo.

Figura 25: Inibição de emergência de adultos (*Aedes aegypti*) nos experimentos com exposição prévia da solução com Pyriproxyfen por diferentes períodos sob as condições térmicas simuladas para a região Sul. A) Pós 10 dias; B) Pós 15 dias; C) Pós 30 dias



Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: Barras indicadas por asterisco são significativamente diferentes entre si

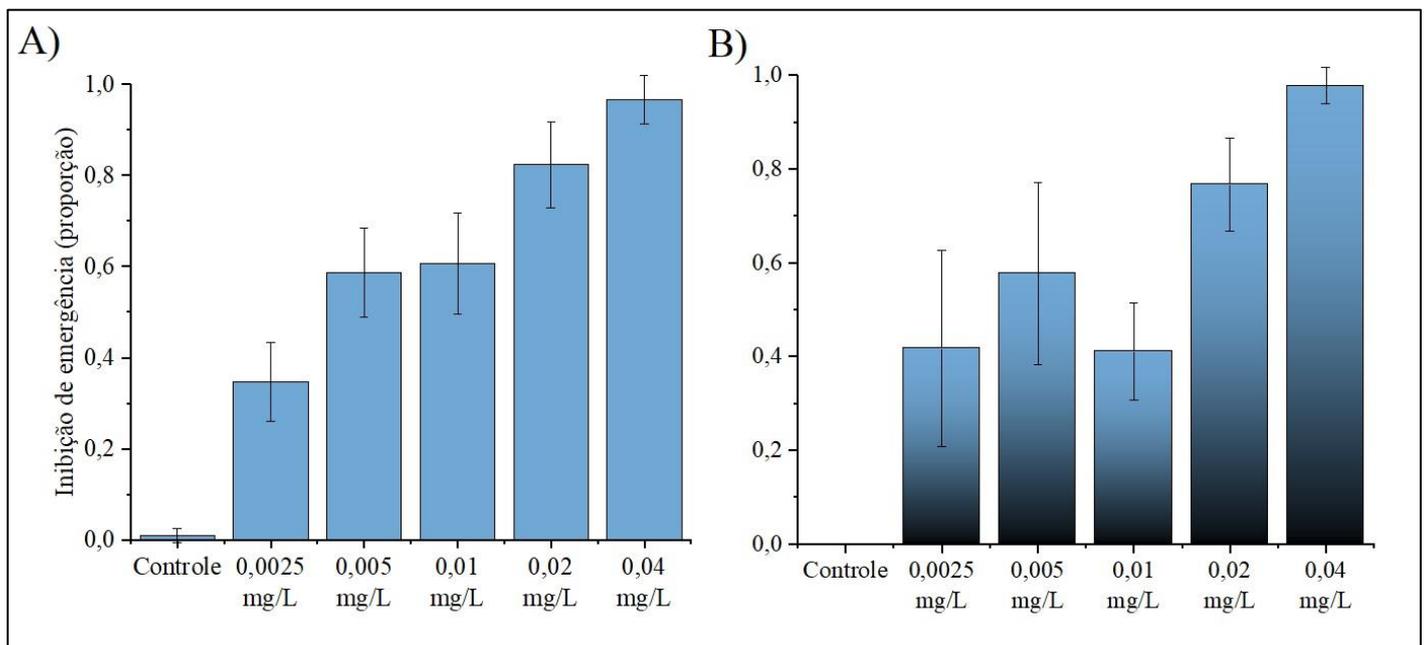
A falta de evidência de diferenças significativas nas respostas após 30 dias de aclimação da solução estoque foi um resultado inesperado, uma vez que o tempo de exposição aos fatores ambientais parece estar associado a redução de eficiência na IE. Uma hipótese do que pode ter influenciado em tal resultado foi o baixo número

de repetições do experimento, uma vez que o experimento foi repetido duas vezes (contando com 10 réplicas para cada concentração).

Nas condições térmicas experimentais associadas à região N ($n = 10$), não houve diferenças significativas entre a IE média encontrada após 30 dias de aclimação do larvicida (Figura 26).

Figura 26: Inibição de emergência de adultos (*Aedes aegypti*) nos experimentos com exposição prévia da solução com Pyriproxyfen sob as condições térmicas simuladas para a região Norte.

A) Sem aclimação prévia; B) Pós 30 dias



Fonte: Autoria própria (2022)

A reaplicação de larvicida, pelos agentes de controle de endemia, é recomendada para ser realizada bimestralmente, especialmente nos criadouros que não podem ser destruídos (CAMPOS et al., 2020). Sendo assim, analisar as respostas em IE ao longo do tempo se faz necessário como um dos indicadores de eficiência do tempo de reaplicação.

A eficiência de um inseticida depende, para além de fatores ambientais, de fatores físico-químicos característicos do ingrediente ativo e seu veículo. Nesse sentido, a estabilidade do composto no ambiente em relação a sua composição química e concentração está sujeita a interação com os fatores ambientais. No caso do Pyriproxyfen, há relatos na literatura que descrevem comportamentos diferentes de estabilidade química considerando o meio (aquático ou terrestre), temperatura, pH, luminosidade e matéria orgânica.

No estudo de Schaefer, Dupras e Mulligan (1991), a concentração média de Pyriproxyfen diminuiu lentamente ao longo de 64 dias de experimento em que o ingrediente ativo se tornou indetectável ao fim do período. Por outro lado, em um estudo analisando degradação em meio aquático contendo sedimento arenoso, Kodaka (2011) relatou meia-vida de 17,5 dias e 21 dias do Pyriproxyfen em água destilada e água coletada em riacho, respectivamente. Schaefer et al. (1988) analisaram a estabilidade do Pyriproxyfen sob diferentes condições e descreveram que a concentração de Pyriproxyfen diminuiu com o aumento da temperatura ambiente, em condições sem influência de luminosidade.

Dessa forma, uma possibilidade, é a relação entre a perda de eficiência de efeito residual a degradação do composto em algumas das condições testadas. Entretanto, apesar dos resultados da literatura corroborarem com as respostas encontradas pelos experimentos, cabe ressaltar que estes não expuseram larvas de *Ae. aegypti* concomitantemente. Neste sentido, Ohashi (2017) avaliou o efeito da matéria orgânica na decomposição do Pyriproxyfen por meio da eficiência biológica em experimentos com *Ae. albopictus* em Takarazuka no Japão observando o efeito residual da exposição durante 4 semanas. O autor encontrou um aumento na IE nas condições em que a matéria orgânica estava presente em comparação aos tratamentos sem matéria orgânica, o que indica uma possível rota de introdução do larvicida por meio da alimentação das larvas, uma vez que estas consomem a matéria orgânica na qual o Pyriproxyfen foi adsorvido.

Para *Ae. aegypti*, a literatura indica forte relação dose-dependente em relação ao efeito residual ao Pyriproxyfen, em condições de semi-campo, em relação ao tempo (HUSTEDT *et al.*, 2020). Enquanto 0,1 mg/L de Pyriproxyfen proveu controle de 50% da população nos experimentos com persistência por 15 dias, uma concentração cem vezes maior foi eficiente para inibir a emergência de 95% da população por 40 semanas (RITCHIE *et al.*, 2013).

Por outro lado, experimentos avaliando respostas de mortalidade em condições de mistura entre Pyriproxyfen e Spinosad demonstraram prolongada eficiência em concentrações muito baixas de ambos compostos, compreendendo mortalidade acima de 85% da população após 60 dias de exposição (SANTOS; LIMONGI; PEREIRA, 2020). Seccacini et al. (2014) demonstraram prolongado efeito residual do Pyriproxyfen na IE de *Ae. aegypti* adultos quando aplicados em biomateriais

compostos de parafina e cera de abelha em formulações de lenta diluição, funcionando como ovitrampas.

Portanto, o efeito residual do Pyriproxyfen deve ser considerado de acordo com as condições de experimento e não se deve descartar combinações de tratamentos para fins de aumento da eficiência dos programas de controle. Considerar o efeito residual pode aumentar potencialmente a eficiência dos programas de controle em relação a segurança para os agentes de controle de endemias, que também podem trabalhar de forma mais eficiente com menor esforço amostral com menos aplicações, possivelmente aplicando menores concentrações o que consequentemente diminui impactos ambientais negativos (SECCACINI et al., 2014). Entretanto, não se pode descartar os riscos em desenvolvimento de subpopulações resistentes especialmente nos casos em que a concentração é sub-letal para os indivíduos, ou a maior parte destes. Entender os efeitos fisiológicos e morfológicos nos adultos que sobreviveram à exposição ao larvicida pode fornecer respostas importantes para analisar o cenário epidemiológico, tanto a médio quanto a longo prazo.

5.2 Longevidade de *Aedes aegypti* adultos sobreviventes ao Pyriproxyfen

Ao todo, emergiram 1126 mosquitos adultos dos experimentos e, dentre esses, 555 mosquitos foram dos experimentos controle e 571 foram sobreviventes às diferentes concentrações de Pyriproxyfen em 4 condições térmicas simuladas. Na Tabela 6 está detalhado o número de indivíduos para cada condição e sua longevidade média, contemplando os respectivos desvios padrão dos dados. Não houve coleta de dados referente à simulação térmica para a região Nordeste. Ambas as limitações decorreram do contexto situacional em restrições ao uso do laboratório devido a emergência de saúde global ocasionada pela pandemia de COVID-19 de forma crítica durante os anos de 2020 e 2021.

Tabela 6: Longevidade de *Aedes aegypti* adultos sobreviventes ao Pyriproxyfen em diferentes condições térmicas

Fêmeas – Norte (de 23 a 32,3 °C)						
Tratamento	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L	0,04 mg/L

n	28	8	8	7	8	8
longevidade média (dias)	8,96	8,25	15	7	11	7
desvio-padrão	6,88	10,5	7,74	3	4,9	1,06

Machos – Norte (de 23 a 32,3 °C)

Tratamento	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L	0,04 mg/L
N	43	17	10	8	9	2
longevidade média (dias)	11,3	13,1	8	8	10	8
desvio-padrão	7,9	9,96	4,7	4,5	6	0

Fêmeas – Sul (de 17 a 26,1 °C)

Tratamento	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L	0,04 mg/L
N	126	41	39	16	-	-
longevidade média (dias)	8,6	4,04	9,2	9	-	-
desvio-padrão	6,01	5,38	8,86	8,19	-	-

Machos – Sul (de 17 a 26,1 °C)

Tratamento	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L	0,04 mg/L
N	165	67	26	15	-	-
longevidade média (dias)	11	6	7	6	-	-
desvio-padrão	8,2	5,92	8,18	4,87	-	-

Fêmeas – Centro-Oeste (de 19,5 a 31 °C)

Tratamento	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L	0,04 mg/L
N	66	56	21	18	18	-
longevidade média (dias)	12	11	8	7	3	-
desvio-padrão	6,19	10,3	5,21	5,18	1,54	-

Machos – Centro-Oeste (de 19,5 a 31 °C)						
Tratamento	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L	0,04 mg/L
N	112	78	37	22	15	-
longevidade média (dias)	14	8	8,5	7	2	-
desvio-padrão	8,1	7,9	9,26	3,8	1,09	-

Fêmeas – Sudeste (de 20 a 28,4 °C)						
Tratamento	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L	0,04 mg/L
N	6	3	-	-	-	-
longevidade média (dias)	8,3	6	-	-	-	-
desvio-padrão	0,51	2,88	-	-	-	-

Machos – Sudeste (de 20 a 28,4 °C)						
Tratamento	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L	0,04 mg/L
N	9	11	-	-	-	-
longevidade média (dias)	6	5	-	-	-	-
desvio-padrão	2,78	3,16	-	-	-	-

Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: células preenchidas por hífen indicam tratamentos para os quais não há dados disponíveis

Em relação aos indivíduos nos experimentos controle sob diferentes regimes de temperatura, não houve evidência de que os padrões de longevidade das fêmeas foram diferentes apesar da maior idade de morte das fêmeas nas temperaturas simuladas para a região CO ($p = 0,5804$; $\chi^2 = 0,1354$).

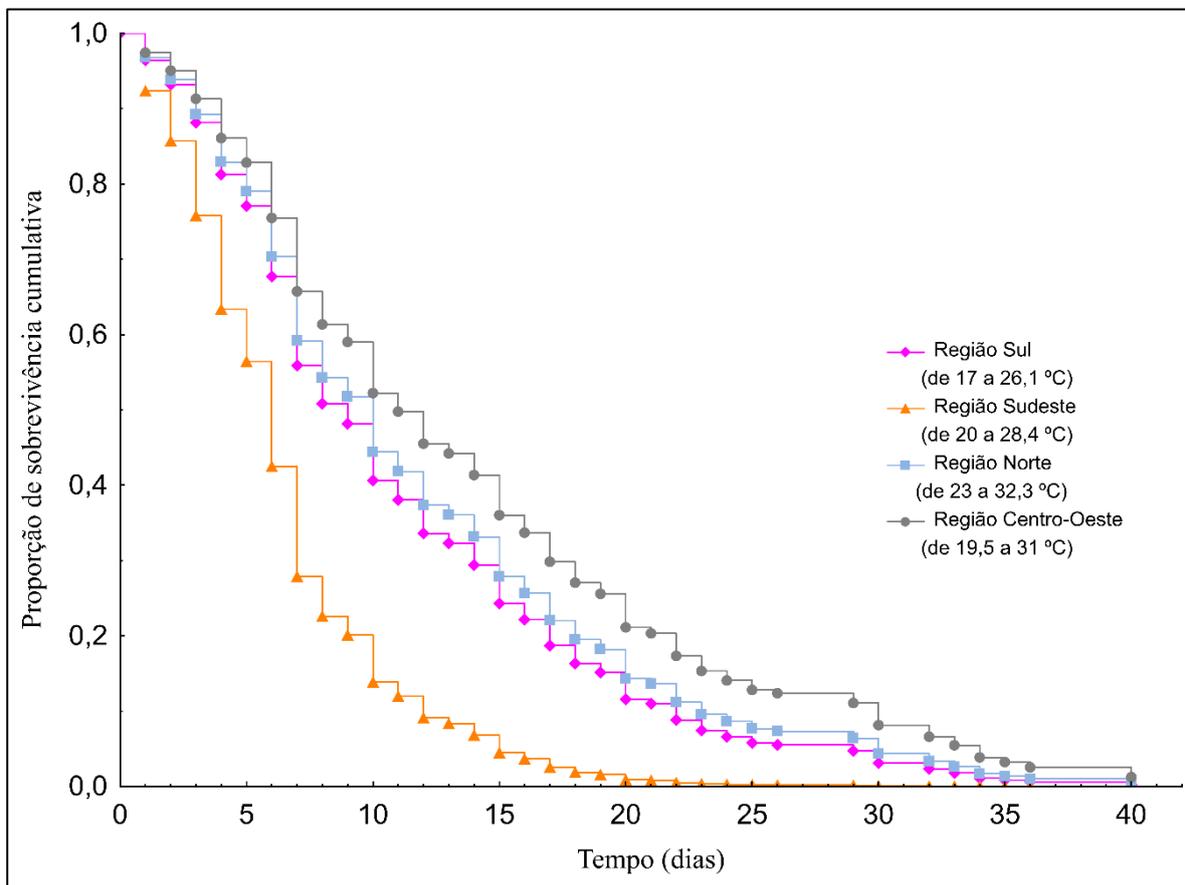
No entanto, entre os machos dos experimentos controle houve evidência de que os indivíduos nas condições simuladas para a região SE viveram menos quando comparados com os machos nas demais condições ($p = 0,007$; $\chi^2 = 7,25$), como pode ser visualizado na Figura 27.

Considerando apenas a variação de temperatura, os dados não indicam influência significativa desta componente na longevidade dos indivíduos, uma vez que os perfis de longevidade dos mosquitos nos controles não diferem significativamente, desconsiderando o sexo. Em condições de temperatura constante, há evidências na literatura de que temperaturas diferentes estão relacionadas aos padrões de

longevidade em mosquitos adultos do gênero *Aedes*, para os quais a tendência geral é de que há maior longevidade em condições de temperatura mais altas com exceção do *Aedes albopictus*, que tende a viver mais em temperatura média de 15 °C quando comparado a longevidade em 30 °C (DELATTE et al., 2009; REUSS et al., 2018; GUTIÉRREZ et al., 2020; MARINI et al., 2020).

Na comparação entre machos e fêmeas dos experimentos controle, houve evidência que os machos viveram mais que as fêmeas em todas as condições experimentais ($p < 0,05$).

Figura 27: Perfil de longevidade de machos de *Aedes aegypti* dos experimentos controle sob diferentes regimes de temperatura simulados para quatro regiões brasileiras

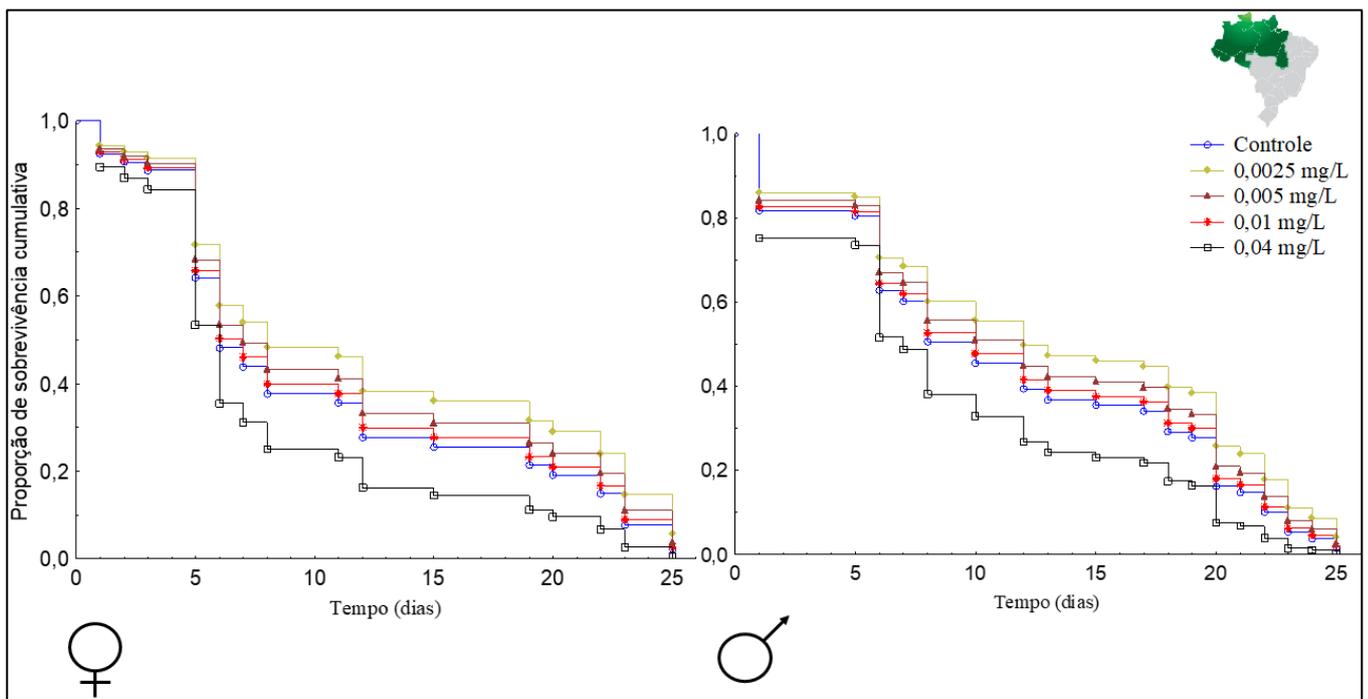


Fonte: Autoria própria (2022)

Considerando apenas os machos e fêmeas adultos sobreviventes à exposição ao Pyriproxyfen nas condições simuladas para a região N, não houve evidência de que *Ae. aegypti* adultos viveram menos quando sobreviventes às diferentes concentrações ($p > 0,15$ em todas as comparações). Apesar da evidente redução de longevidade daqueles sobreviventes à concentração mais alta, que pode ser

observada na Figura 28, não há evidência de que o aumento da concentração esteja relacionado com mosquitos significativamente menos longevos ($p = 0,8213$). Na concentração mais alta (0,04 mg/L), os machos viveram, em média, 3 dias a menos que indivíduos não expostos ao Pyriproxyfen enquanto as fêmeas viveram em média um dia a menos. Curiosamente não houve evidências que os mosquitos dos experimentos controles viveram mais que os sobreviventes à exposição ao Pyriproxyfen, ressaltando ainda que estes últimos, em concentrações menores (0,0025 e 0,005 mg/L) viveram mais dias quando comparado com o controle ($p = 0,8412$ e $0,05747$ respectivamente).

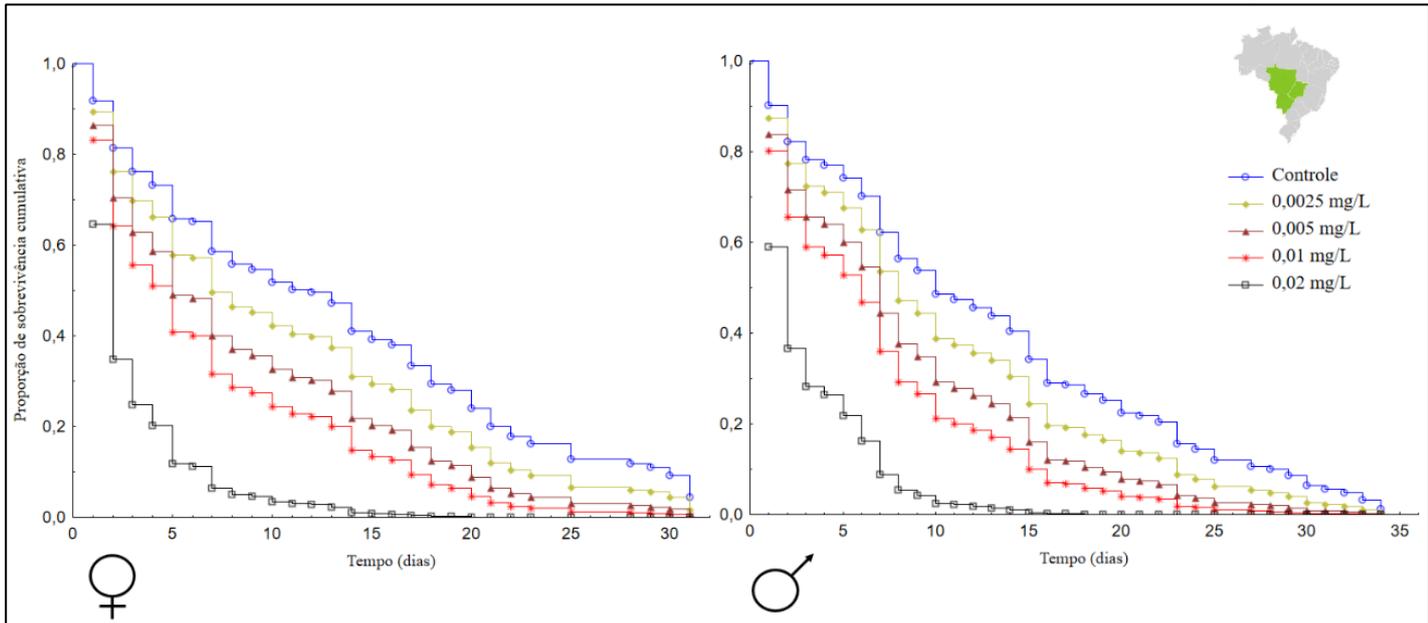
Figura 28: Perfil de longevidade de fêmeas e machos de *Aedes aegypti* sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen nas condições térmicas simuladas para região Norte (N)



Fonte: Autoria própria (2022)

Diferentemente do que se observou para os mosquitos nas condições para a região N, nos experimentos simulando as condições térmicas para a região CO houve evidências de que os mosquitos machos e fêmeas dos experimentos controle viveram mais que os indivíduos sobreviventes ao larvicida ($p < 0,05$). Entretanto, as fêmeas sobreviventes a 0,0025 mg/L foram exceção, pois não houve evidências de que a longevidade tenha sido menor que o das fêmeas do experimento controle ($p = 0,72$; $\chi^2 = 0,125$) (Figura 29).

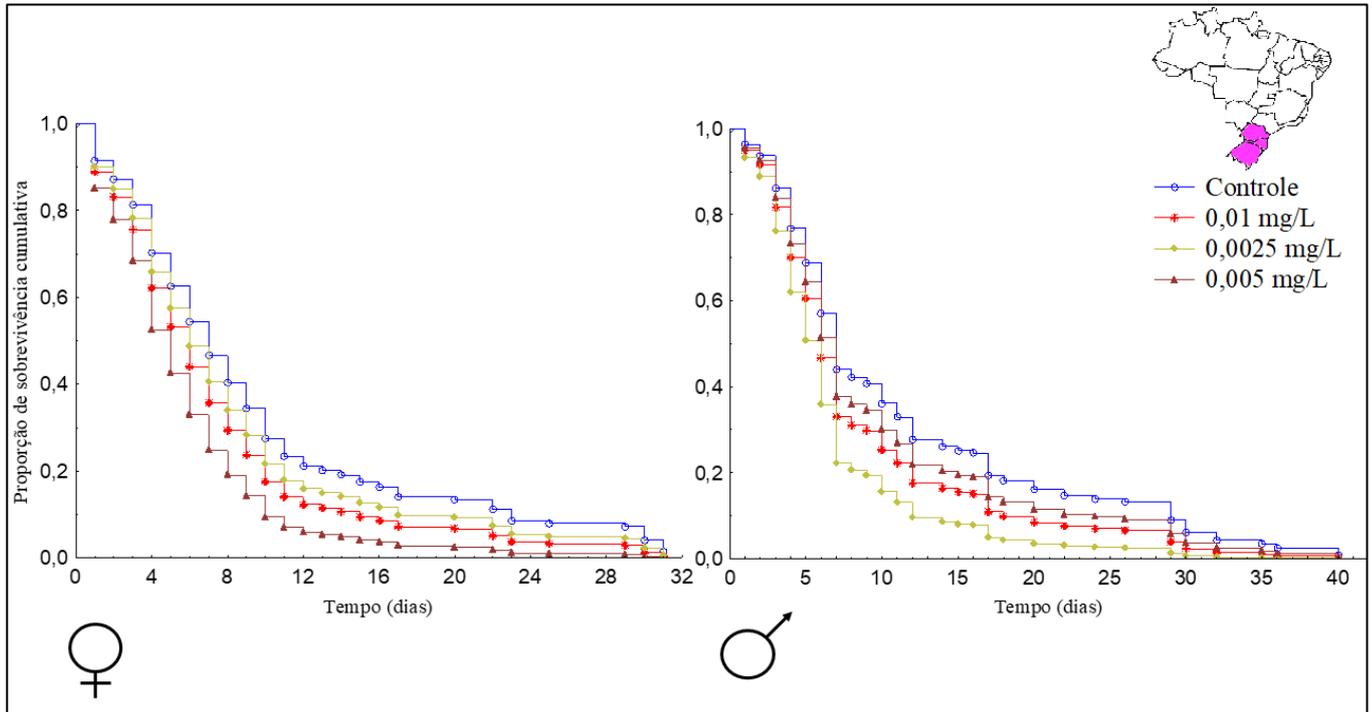
Figura 29: Longevidade de fêmeas e machos de *Aedes aegypti* sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen nas condições térmicas simuladas para região Centro-Oeste (CO)



Fonte: Autoria própria (2022)

De forma semelhante, nos experimentos simulando termicamente a região Sul, os mosquitos machos dos experimentos controles viveram mais que os mosquitos sobreviventes ao Pyriproxyfen em todas as concentrações analisadas ($p < 0,05$). No caso das fêmeas, não houve evidências de que as sobreviventes à aplicação de 0,005 mg/L e 0,01 viveram menos que as fêmeas dos experimentos controle ($p = 0,8357$; $\chi^2 = 0,0492$ e $p = 0,9775$; $\chi^2 = 0,00077$ respectivamente). Curiosamente, houve evidência de que as fêmeas expostas à menor concentração do larvicida (0,0025 mg/L) viveram menos que as fêmeas do experimento controle ($p = 0,000$; $\chi^2 = 25,46$) (Figura 30).

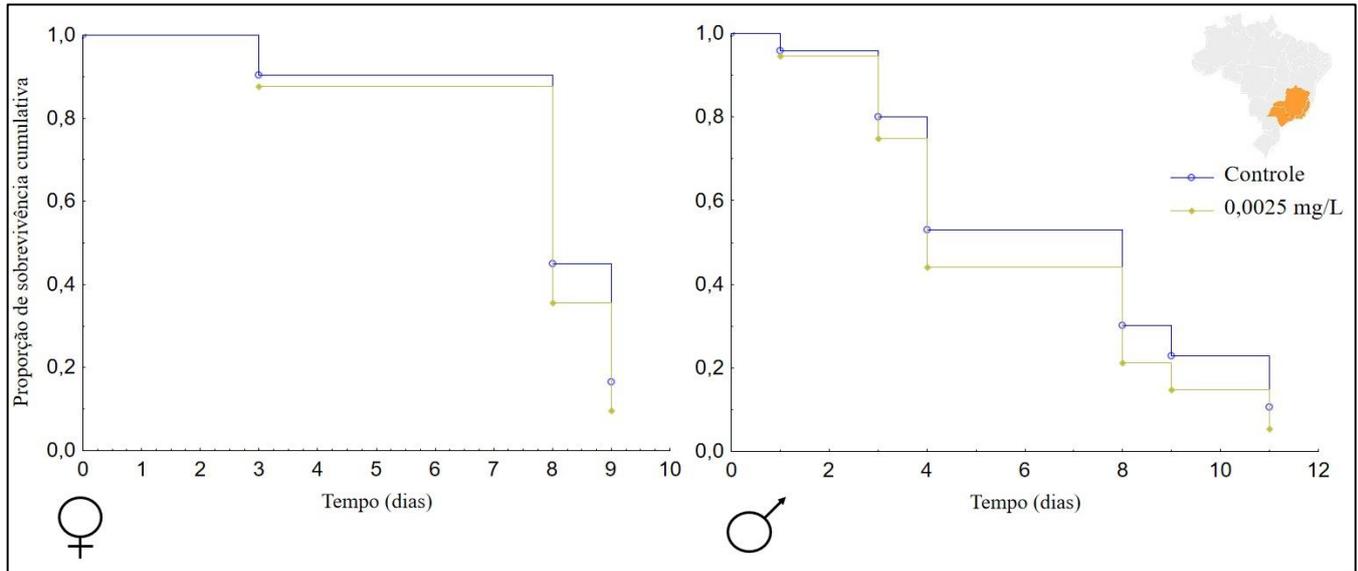
Figura 30: Longevidade de fêmeas e machos de *Aedes aegypti* sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen nas condições térmicas simuladas para região Sul (S)



Fonte: Autoria própria (2022)

Por fim, sobre a longevidade de mosquitos emergentes das condições simuladas para a região Sudeste, houve uma grande limitação na análise e interpretação dos dados devido ao baixo volume amostral para essa condição ($n = 14$). Para dados correspondentes à simulação térmica para a região Sudeste só é possível descrever a longevidade de uma amostra de 14 sobreviventes a 0,0025 mg/L que não diferiu significativamente da longevidade de mosquitos do experimento controle ($p = 0,533$, $\chi^2 = 0,388$). Nota-se que, dentre os mosquitos observados para tal análise, a longevidade foi mais curta com idade máxima de 11 dias para machos e 9 dias para fêmeas (Figura 31).

Figura 31: Longevidade de fêmeas e machos de *Aedes aegypti* sobreviventes a 0,0025 mg/L de Pyriproxyfen na condição de simulação térmica para a região Sudeste



Fonte: Autoria própria (2022)

Embora frequentemente intencionados a matar rapidamente o maior número de indivíduos possíveis de uma espécie alvo, os inseticidas podem sofrer degradação ao longo do tempo no ambiente natural, o que tende a reduzir a concentração letal para uma dose sub-letal aos organismos. Tal degradação pode ser estimulada por fatores ambientais diversos, tais quais a diluição causada por chuva em período próximo a aplicação do composto, irregularidades na aplicação do produto e exposição solar direta por longo período (DEVILLERS, 2020).

Quando os organismos são expostos à concentração sub-letal do inseticida, as chances de sobrevivência são maiores sendo que esta é acompanhada por um custo fisiológico, que gera uma compensação como resposta protetiva a nível individual (MALTBY, 1999). Respostas protetivas envolvem mudanças no metabolismo energético, favorecendo a alocação de recursos para a sobrevivência dos indivíduos em detrimento do gasto energético para crescimento corporal, o que reflete na longevidade, e para a capacidade reprodutiva, afetando a fecundidade e a fertilidade dos mosquitos adultos (JAGER et al., 2004; GUTIÉRREZ et al., 2020). Essas compensações podem afetar profundamente a história de vida das populações de *Ae. aegypti* que, conseqüentemente, têm potencial de afetar o cenário epidemiológico.

As diferenças encontradas na longevidade no presente trabalho, tanto de machos quanto de fêmeas, convergem à interpretação dessa característica como um indicador de estresse como efeito do custo de sobrevivência ao larvicida durante o

desenvolvimento dos imaturos. Além disso, é importante ressaltar que tais compensações fisiológicas podem ser observadas no processo de desenvolvimento de micropopulações resistentes ao composto aplicado (GUEDES; WALSE; THRONE, 2017). Por exemplo, *Ae. aegypti* expostos ao diflubenzuron, um composto cujo modo de ação se dá pela inibição da síntese de quitina nas larvas, apresentaram longevidade reduzida associada ao custo energético de desenvolvimento de resistência ao longo de 6 gerações (BELINATO; VALLE, 2015). Em um trabalho realizado por Da Silva (2009) com exposição sub-letal de diflubenzuron os autores encontraram resultado semelhante ao de Belinato e Valle (2015), porém sem diferenças nas respostas sobre fecundidade e fertilidade de fêmeas. David et al. (2018) demonstraram que há tendência de que fêmeas adultas de *Ae. aegypti* resistentes ao temefós vivam por menos tempo se comparadas a fêmeas suscetíveis. Entretanto, vale ressaltar que no presente trabalho foi utilizada uma cepa suscetível de laboratório e considerada apenas uma geração nos experimentos. Ainda assim, a redução na longevidade foi observada, relacionada especialmente às variações de temperatura.

Considerando os custos de *trade-off* impulsionados pelo estresse químico causado pelo larvicida, podem ser observados impactos negativos associados a reprodução. No caso da exposição ao Pyriproxyfen, Ahmed et al. (2020) demonstraram que o Pyriproxyfen perturbou a reprodução das fêmeas de *Ae. aegypti*, com efeito prejudicial mais intenso no primeiro ciclo gonotrófico. Além disso, fêmeas sobreviventes ao Pyriproxyfen apresentaram níveis menores de sucrose, glucose e frutose, o que pode ter relação com o comprometimento reprodutivo das fêmeas, porém essa relação de causalidade não foi testada pelos autores sendo apenas uma hipótese (AHMED et al., 2020). Fêmeas menos longevas, tais quais as sobreviventes à exposição ao Pyriproxyfen no presente trabalho, terão menos ciclos gonotróficos, o que pode interferir na estrutura populacional. Entretanto, até o momento da escrita, não há resultados na literatura disponíveis que tenham avaliado por tal perspectiva.

O período de incubação extrínseca é sensível a temperatura, o qual se completa mais rápido ou mais devagar de acordo com a variação térmica do ambiente (WATTS et al., 1987). Para que os vírus sejam transmitidos aos hospedeiros vertebrados durante a hematofagia, é necessário que se complete a incubação antes que o mosquito-vetor morra devido diferentes causas. Para as arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti*, dados empíricos demonstram que o tempo de incubação está

intimamente relacionado com a temperatura e com a longevidade das fêmeas (CHAN; JOHANSSON, 2012; KAMIYA *et al.*, 2020). Considerando os sorotipos da dengue, foi demonstrado por Chan e Johansson (2012) que a duração até a completa incubação extrínseca tende a diminuir junto com o aumento da temperatura, levando entre 8 a 10 dias em média para completar a incubação extrínseca quando a temperatura do ambiente é, em média, 30 °C .

Considerando as idades de morte dos mosquitos encontradas pelo presente trabalho, cabe destacar para as devidas discussões que a longevidade dos mosquitos nas condições simuladas para a região N representam alerta, pois em uma situação hipotética há mais tempo disponível para completar o período de incubação extrínseca. Ademais, pela temperatura média mais alta que nas demais condições, espera-se que o período de incubação extrínseca seja menor levando-se em conta as condições laboratoriais testadas. Ainda sobre os mosquitos emergentes nas condições simuladas para a região N, é válido destacar que as fêmeas sobreviventes ao larvicida, em alguns tratamentos, viveram mais dias em média do que as adultas do experimento controle. Apesar de não haver relevância estatística, cabe o destaque no âmbito biológico. Resultados encontrados por Gutiérrez *et al.* (2020) corroboram essa observação, em que fêmeas aclimatadas a temperaturas mais altas tenderam a viver mais.

Cabe ainda destacar fatores bióticos que foram isolados no presente trabalho, para fins analíticos. No presente trabalho, fêmeas e machos foram mantidos isolados para que não houvesse interferência nas leituras de longevidade devido efeitos pós acasalamento. Villareal *et al.* (2018) descreveram que as proteínas seminais dos machos, que são liberadas durante a cópula, têm uma relação de causalidade no aumento da longevidade das fêmeas de *Ae. aegypti*. Considerando a presença de machos e a complexidade do ambiente natural, as longevidades das fêmeas de *Ae. aegypti* nas variações de temperatura para a região N podem ser ainda maiores.

As longevidades observadas nas fêmeas sobreviventes e aclimatadas às temperaturas simuladas para a região CO merecem destaque por serem as que viveram mais, quando comparadas com as demais regiões simuladas. Além disso, dentro das mesmas condições, a não detecção de redução da longevidade nas fêmeas sobreviventes a 0,0025 mg/L quando comparada com a longevidade das fêmeas no controle também merece destaque.

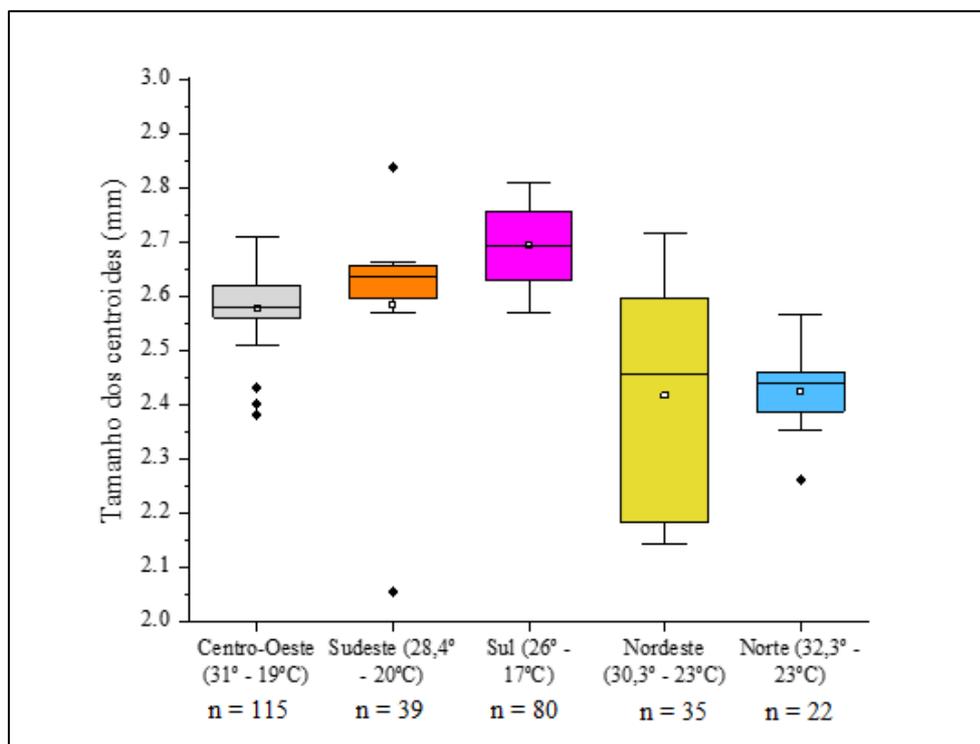
Ao passo que no dogma central da toxicologia espera-se que quanto maior a dose maior a letalidade, o mesmo é esperado para respostas sub-letais em relação à redução da longevidade (GUEDES; RIX; CUTLER, 2022). Entretanto, é importante destacar que a resposta ao composto químico estressor não é sempre monofásica mas pode também ser bifásica. De acordo com Calabrese e Baldwin (2002) a resposta bifásica na toxicologia corresponde ao fenômeno da hormese, que acontece quando. Este pode ter sido o caso das respostas de longevidade de fêmeas sobreviventes a exposição ao Pyriproxyfen nas condições térmicas mais quentes, correspondentes às regiões CO e N, especialmente considerando a longevidade como resposta a 0,0025 mg/L do composto.

Apesar da escassez de resultados que podem ser associados a efeito de hormese em vetores do gênero *Aedes* em resposta à inseticidas, tal hipótese não pode ser descartada tendo em vista a importância que estes vetores têm para o cenário epidemiológico e o relato de efeitos em parâmetros do ciclo de vida de outras espécies de insetos que são importantes pragas agrícolas. Por exemplo, para *Drosophila suzukii*, a exposição a concentrações sub-letais (concentração letal a 20% da população) de duas diferentes classes de inseticidas, a permetrina e a espinosina, foi relacionada com maior longevidade das fêmeas (DEANS; HUTCHISON, 2022). Em um trabalho analisando exposição de *Bombus terrestris* a imidacloprida, Mulvey e Cresswell (2020) relataram aumento na longevidade em concentrações baixas do composto, indicando efeito de hormese. Baixas concentrações de imidacloprida também foram associados ao aumento de fecundidade em besouros do gênero *Paederus*, mostrando outro tipo de compensação que pode acontecer em um fenômeno de hormese (FENG *et al.*, 2019). Considerando a extensão que o efeito hormético em *Ae. aegypti* pode ter sobre o cenário epidemiológico, tal fenômeno não pode ser desprezado quando analisado os efeitos sub-letais que os inseticidas podem exercer em uma base regional, considerando as particularidades de cada região. Bem como outros traços de vida como fecundidade, fertilidade e tamanho corporal de machos e fêmeas da espécie.

5.3 Morfometria geométrica alar: tamanho e forma

Foram digitalizadas, ao todo, 610 asas (direitas e esquerdas) de fêmeas e 556 asas de machos, considerando as cinco regiões termicamente simuladas. Ao considerar apenas o efeito da temperatura, o comportamento do tamanho do centroide alar em relação à condição térmica foi condizente com a teoria, ainda com a variação de temperatura ao longo dos experimentos. Fêmeas provenientes dos ambientes mais quentes apresentaram asas menores quando comparadas com aquelas de ambientes mais frios, independente da exposição ao larvicida Pyriproxyfen (Figura 32).

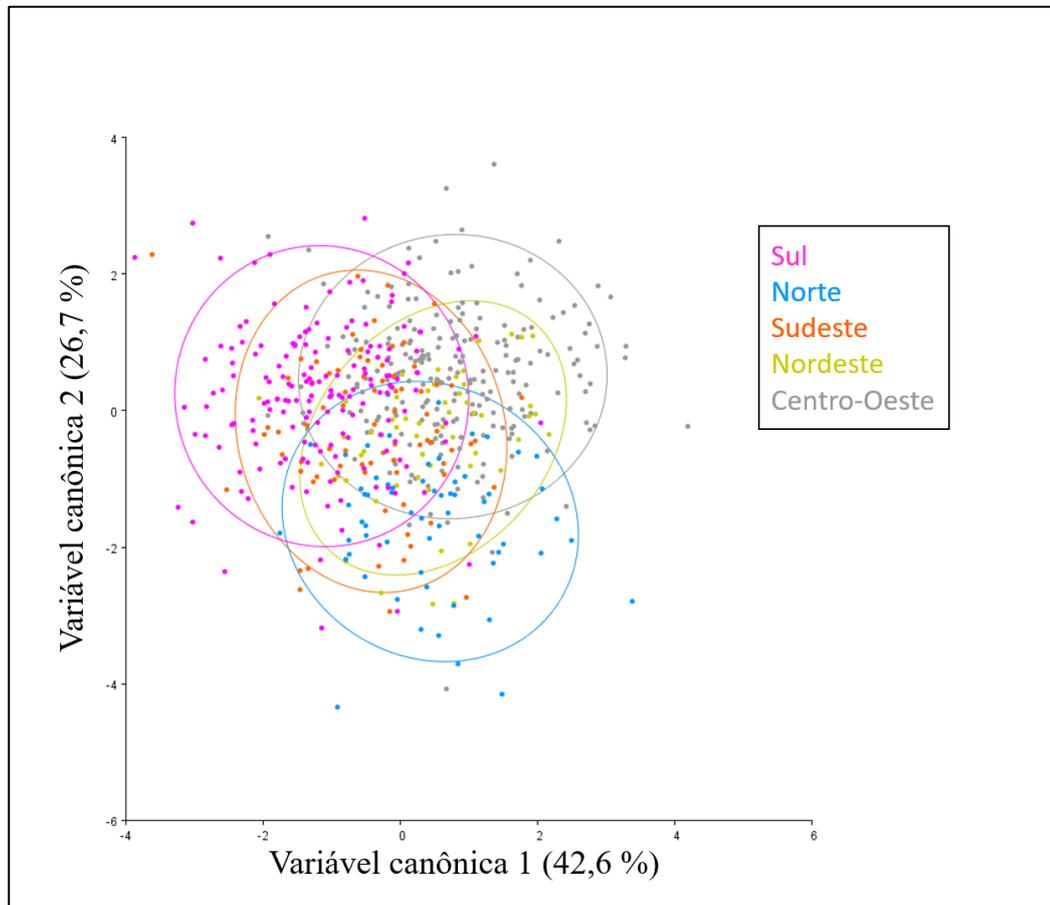
Figura 32: Representação gráfica da distribuição de tamanhos do centroide alares das fêmeas de *Aedes aegypti* sob as cinco condições térmicas simuladas das regiões brasileiras (experimento controle)



Fonte: Autoria própria (2022)

Ao passo que o tamanho é diferente, não há evidências de diferenças na forma em diferentes condições térmicas. O morfoespaço representado por meio das AVCs com os dados contendo alometria demonstra sobreposição em todas as regiões, sem distinções nos agrupamentos (Figura 33).

Figura 33: Representação da variação do formato alar das fêmeas de *Aedes aegypti* nas condições térmicas simuladas para as cinco regiões brasileiras testadas no tratamento controle, de acordo com a Análise de Variáveis Canônicas



Fonte: Autoria própria (2022)

De modo geral, as fêmeas que sobreviveram à exposição a concentrações maiores apresentaram asas significativamente menores ($p = 0,002$). A Tabela 7 apresenta os dados descritivos para os tamanhos do centroide de fêmeas de todos os tratamentos em suas respectivas simulações térmicas regionais. Por meio da tabela, é possível notar o padrão em asas menores conforme exposição às concentrações mais altas do larvicida. No entanto, cada região exibiu peculiaridades em relação às comparações entre tratamentos.

Tabela 7: Estatística descritiva dos tamanhos do centroide alar das fêmeas de *Aedes aegypti* em diferentes condições térmicas e expostas a diferentes concentrações de Pyriproxyfen

Região Sul					
	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L
n	16	34	24	10	0
Média (mm)	2,69	2,57	2,60	2,17	-
Desvio Padrão	0,07	0,21	0,21	0,24	-
Máximo (mm)	2,81	2,87	2,85	2,58	-
Mínimo (mm)	2,57	1,75	2,01	1,85	-
Região Sudeste					
	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L
n	8	12	7	7	0
Média (mm)	2,58	2,44	2,67	1,85	-
Desvio Padrão	0,23	0,09	0,09	0,09	-
Máximo (mm)	2,84	2,60	2,79	1,96	-
Mínimo (mm)	2,05	2,30	2,53	1,70	-
Região Centro-Oeste					
	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L
n	33	36	0	20	20
Média (mm)	2,58	2,51	-	2,41	2,49
Desvio Padrão	0,08	0,25	-	0,23	0,16
Máximo (mm)	2,71	2,82	-	2,65	2,71
Mínimo (mm)	2,38	1,82	-	1,76	2,03
Região Nordeste					
	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L
n	13	0	13	9	0
Média (mm)	2,42	-	2,40	2,04	-
Desvio Padrão	0,21	-	0,09	0,25	-
Máximo (mm)	2,71	-	2,50	2,43	-
Mínimo (mm)	2,14	-	2,20	1,60	-
Região Norte					
	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L
n	10	9	10	0	10
Média (mm)	2,42	2,06	2,07	-	1,97
Desvio Padrão	0,08	0,27	0,21	-	0,27
Máximo (mm)	2,57	2,24	2,41	-	2,44

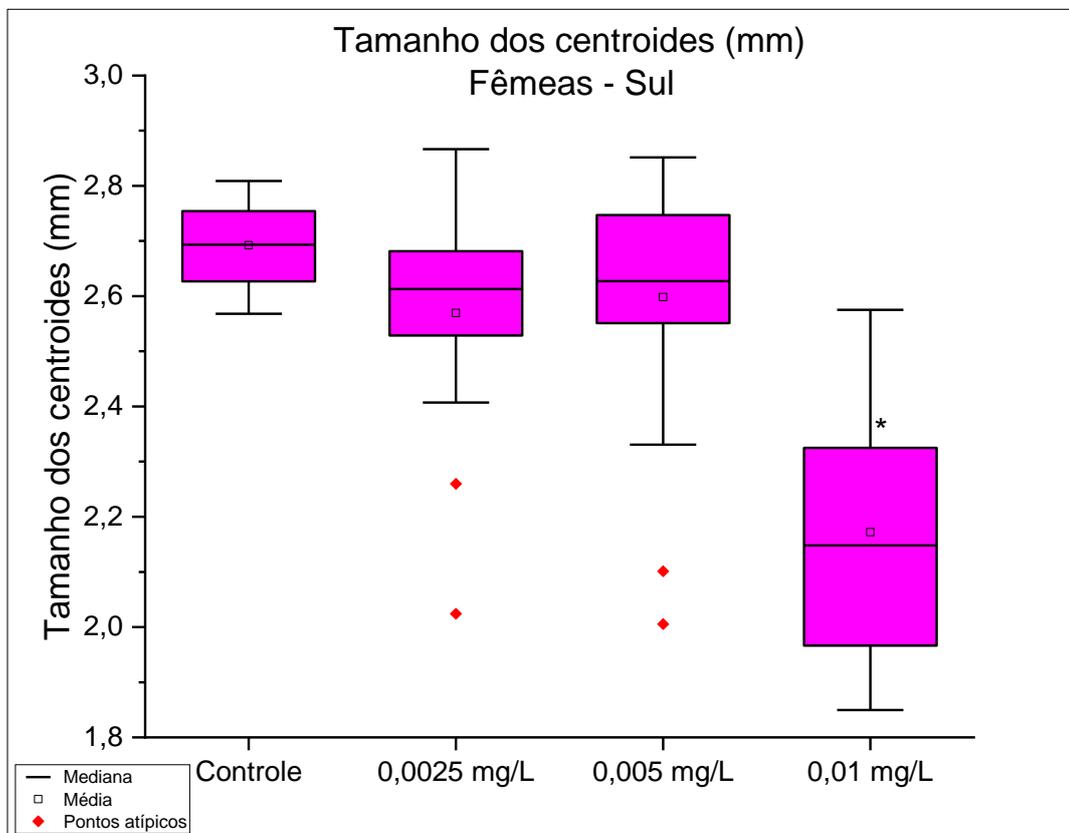
Mínimo (mm)	2,26	1,58	1,70	-	1,70
-------------	------	------	------	---	------

Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: hífen simboliza ausência de dados para a referida concentração.

Na região S, fêmeas sobreviventes à concentração recomendada pela OMS (0,01 mg/L) apresentaram menores asas quando comparadas as fêmeas providas de concentrações menores de larvicidas e do experimento controle ($p = 0,000147$ no teste *post hoc* de Tukey), o que pode ser observado visualmente por meio da Figura 34.

Figura 34: Representação da distribuição do tamanho dos centroides alares das fêmeas de *Aedes aegypti* providas dos experimentos com simulações térmicas da região Sul do Brasil

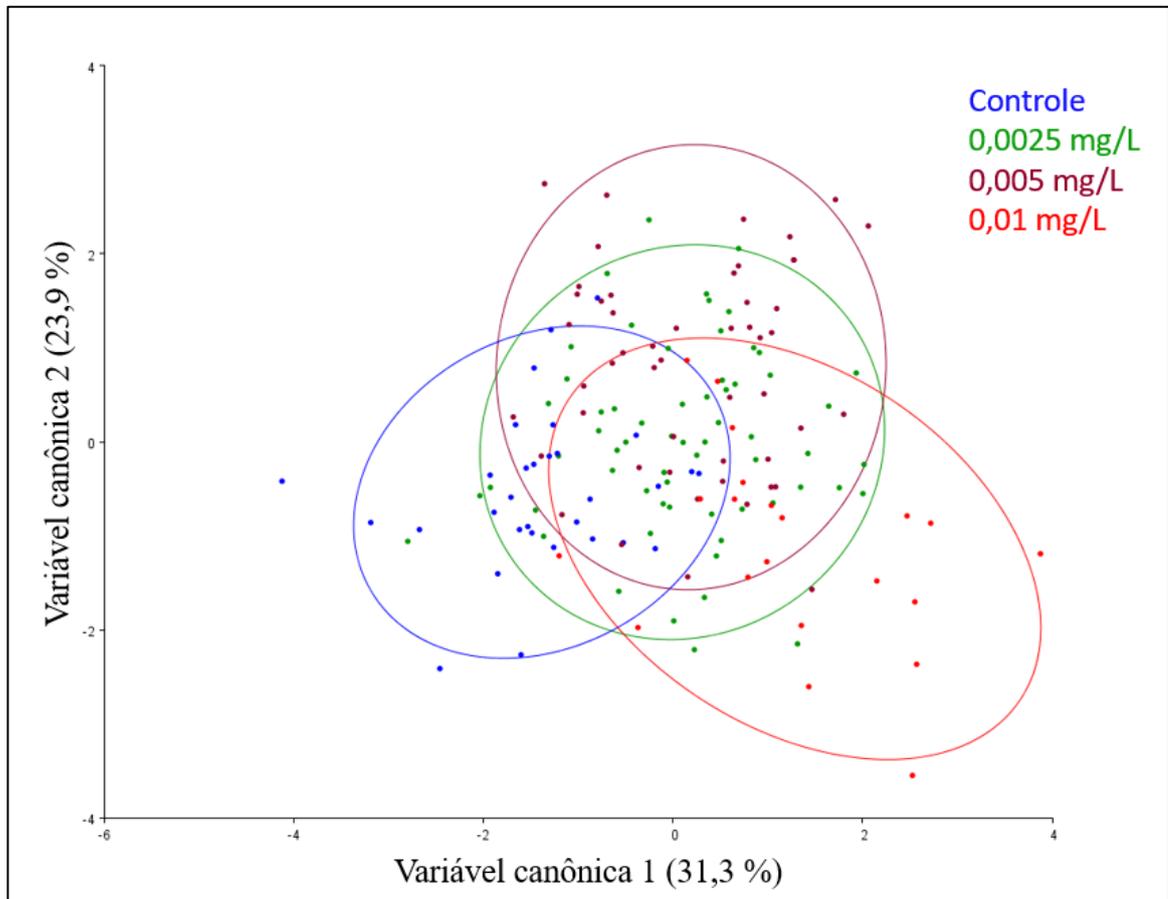


Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: Asterisco denota tratamento que diferiu significativamente dos demais

Ademais, houve evidências de que há assimetria flutuante entre as asas das fêmeas providas dos experimentos com as condições térmicas da região S ($p < 0,0001$). A respeito da forma, pouca variação foi observada no morfoespaço analisado por meio da AVC, considerando que a VC1 corresponde a 31,3% da variação (Figura 37). Considerando esta a variável mais expressiva, nota-se baixa porcentagem em sua explicação. Ainda para as fêmeas nas condições térmicas simuladas para a região Sul, o efeito alométrico apesar de ter sido significativo, foi baixo (2,02%, $p = 0,011$).

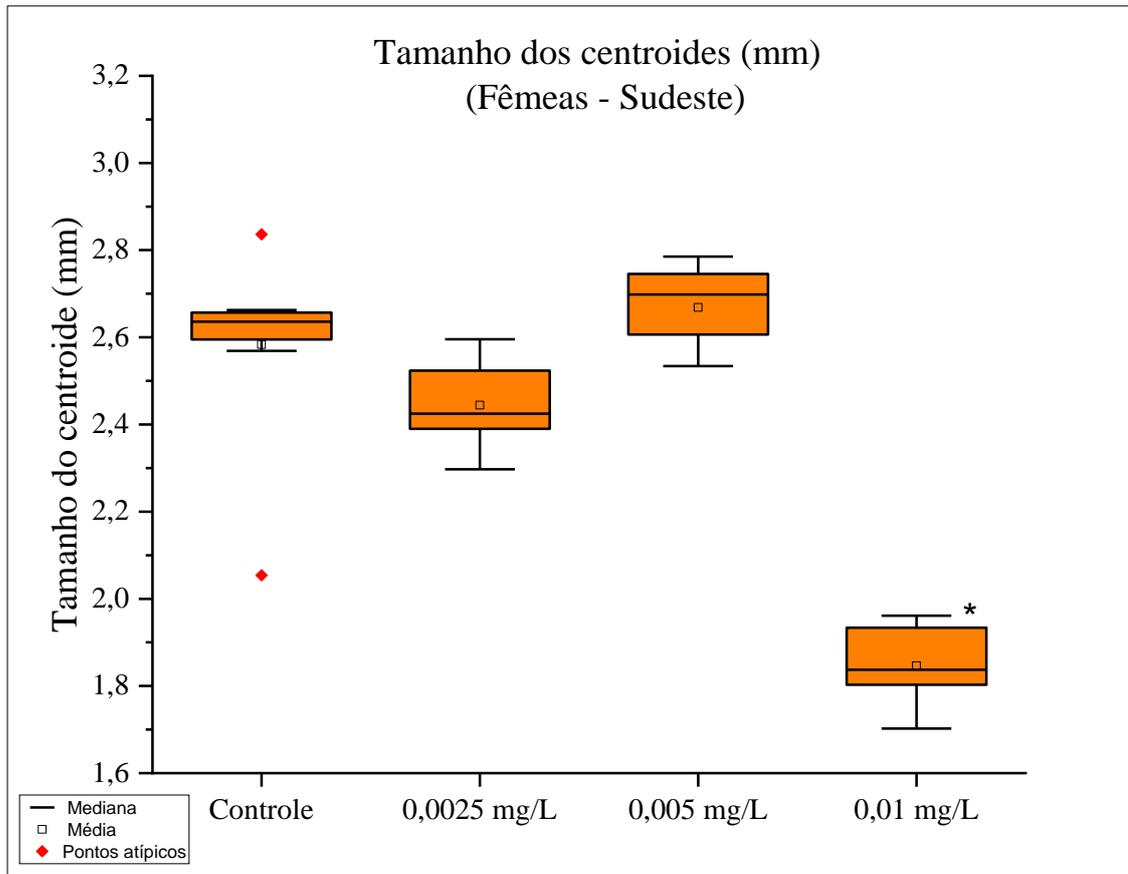
Figura 35: Representação gráfica da variação em forma no morfoespaço, segundo a análise de variáveis canônicas (asas das fêmeas providas das simulações térmicas correspondentes a região Sul do Brasil com alometria)



Fonte: Autoria própria (2022)

As fêmeas providas da região termicamente simulada do SE apresentaram similaridade ao padrão encontrado nas fêmeas da região S. Fêmeas emergentes dos tratamentos com 0,01 mg/L de Pyriproxyfen apresentaram asas menores que as fêmeas das demais condições ($p = 0,00016$). Tal relação é visível pela distribuição em gráfico *boxplot* (Figura 36)

Figura 36: Representação gráfica dos tamanhos de centroides alares –
Fêmeas de *Aedes aegypti* (SE)

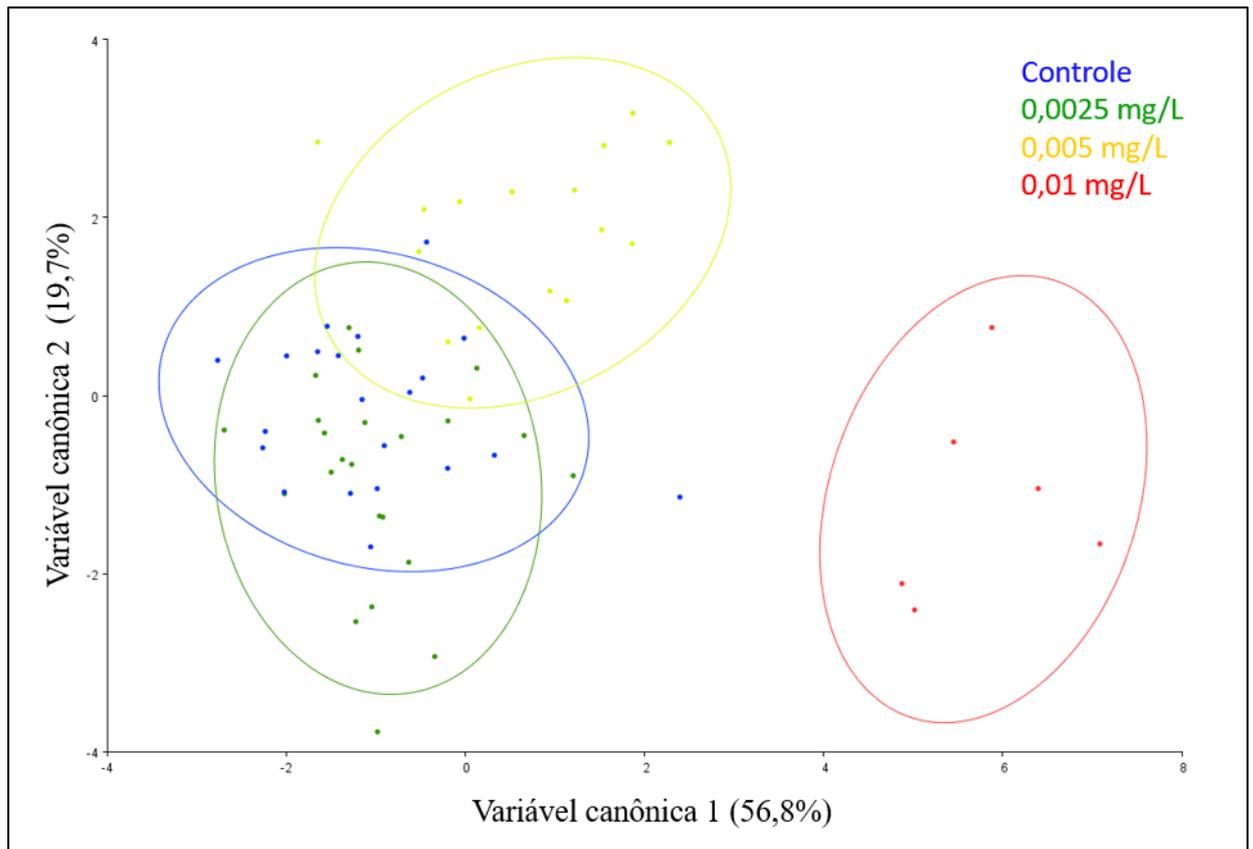


Fonte: Autoria própria (2022)

Obs: Asterisco denota diferença significativa

A respeito da assimetria alar entre as fêmeas da região SE, houve também evidências de que as asas das fêmeas providas de 0,01 mg/L de Pyriproxyfen apresentaram assimetria flutuante quando comparadas com o perfil simétrico das asas de fêmeas do experimento controle. Para as concentrações menores não houve evidências de assimetria (Tabela 8). Em relação a forma, as asas correspondentes as menores concentrações se distribuíram de forma mais próxima e com sobreposições às asas relativas ao experimento controle, o que vai ao encontro da distribuição dos tamanhos dos centroides (Figura 37).

Figura 37: Representação gráfica da variação em forma no morfoespaço, segundo a análise de variáveis canônicas (asas das fêmeas providas das simulações térmicas correspondentes a região Sudeste do Brasil com alometria)



Fonte: Autoria própria (2022)

A partir da distância de Mahalanobis (dM) observou-se maior proximidade morfológica entre fêmeas do experimento controle com as duas concentrações menores, 0,0025 e 0,005 mg/L ($dM = 2,56$ e $3,21$, respectivamente), coincidindo novamente com o padrão encontrado nas comparações de tamanhos do centroide. Não houve evidências de que a distância de Procrustes (dP) foi significativa para as fêmeas dessas concentrações ($p = 0,34$ na comparação entre o controle e a concentração de 0,0025 mg/L; $p = 0,59$ na comparação entre o controle e a concentração de 0,005 mg/L) (Tabela 8). No entanto, na comparação entre o controle e a concentração de 0,01 mg/L, a diferença para a distância de Procrustes foi significativa mesmo considerando o valor de distância baixo em relação a mudança de forma ($p = 0,006$; $dP = 0,03$). O efeito alométrico foi baixo (6,2%) porém, significativo ($p < 0,0001$).

Tabela 8: Valores p da ANOVA de Procrustes para os dados das asas de fêmeas de *Aedes aegypti* testadas nas condições da região sudeste SE

assimetria direcional (fêmeas – SE)		assimetria flutuante (fêmeas – SE)	
Controle		Controle	
0,0025 mg/L	0,0543	0,0025 mg/L	-
0,005 mg/L	0,0557	0,005 mg/L	-
0,01 mg/L	0,0045	0,01 mg/L	0,0004

Fonte: Autoria própria (2022)

Nas fêmeas da região CO, diferentemente às duas regiões apresentadas anteriormente, houve evidência de que apenas sobreviventes à concentração 0,02 mg/L de Pyriproxyfen apresentaram asas reduzidas se comparadas às outras (Tabela 9).

Tabela 9: Valores da estatística p provenientes do teste *post hoc* de Tukey - Tamanho do centroide alar para fêmeas de *Aedes aegypti* testadas nas condições da região Centro-Oeste

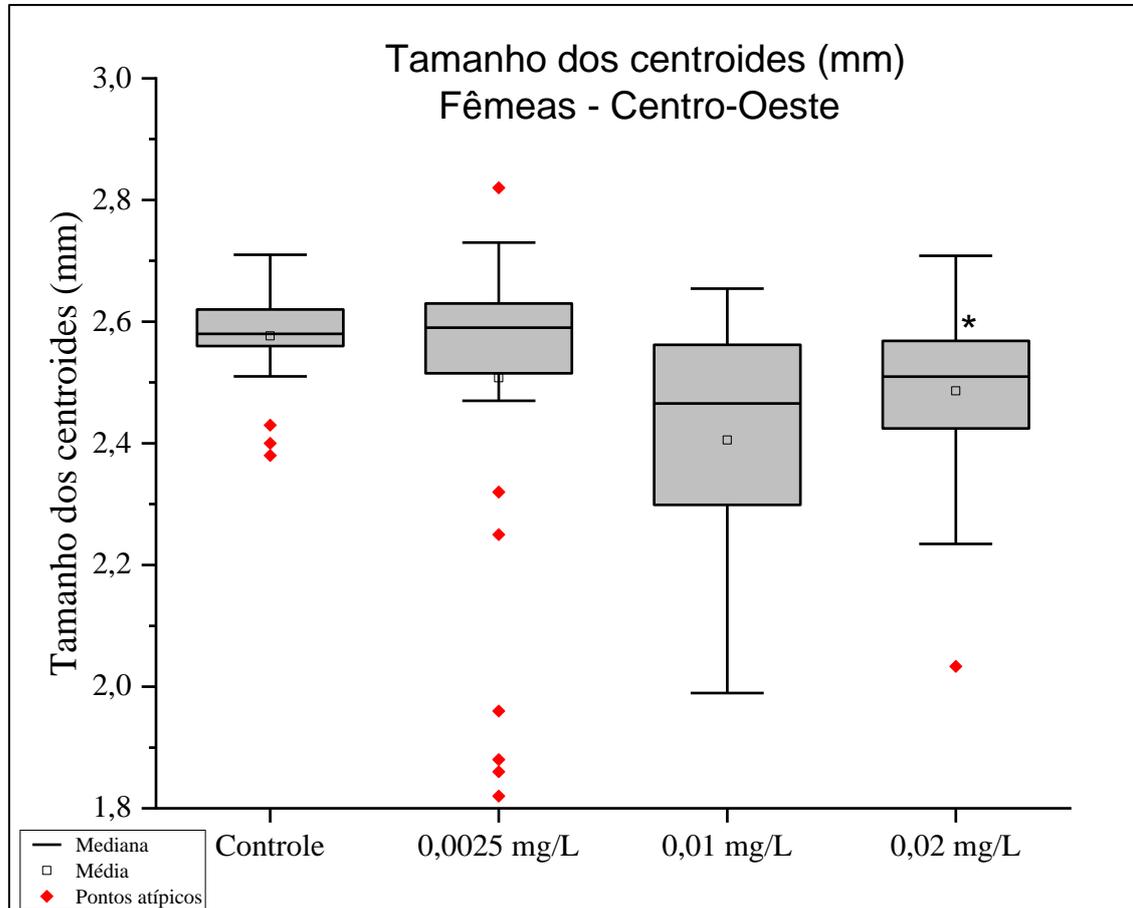
Concentração	Controle	0,0025	0,02	0,01
Controle		0,642893	0,001198	0,403402
0,0025	0,642893		0,022711	0,940076
0,02	0,001198	0,022711		0,173144
0,01	0,403402	0,940076	0,173144	

Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: valores em destaque correspondem a diferença significativa

Para as fêmeas da região CO, o tamanho médio do centroide alar foi de 2,5 mm com maior amplitude em 0,1 mm entre fêmeas sobreviventes a 0,02 mg/L de Pyriproxyfen e as fêmeas proveniente de criadouro não contaminado (Controle). Na Figura 38 pode-se observar as distribuições descritivas dos tamanhos de asa medidos pelo tamanho do centroide. Apesar da diferença evidenciada pelo valor da estatística do teste Tukey, é possível notar que as diferenças são mínimas a ponto de haver sobreposição das médias entre os quartis dos demais tratamentos.

Figura 38: Tamanho do centroide (mm) das fêmeas de *Aedes aegypti* expostas a diferentes concentrações de Pyriproxyfen (Região Centro-Oeste)



A respeito da forma, não houve evidências de que as asas das fêmeas dos experimentos simulando a região CO fossem assimétricas com exceção daquelas provindas da maior concentração (0,02 mg/L de Pyriproxyfen) (Tabela 10). As fêmeas sobreviventes à maior concentração apresentaram assimetria flutuante e direcional.

Tabela 10: Valores da estatística p da ANOVA de Procrustes para as asas das fêmeas de *Aedes aegypti* para a região Centro-Oeste (CO)

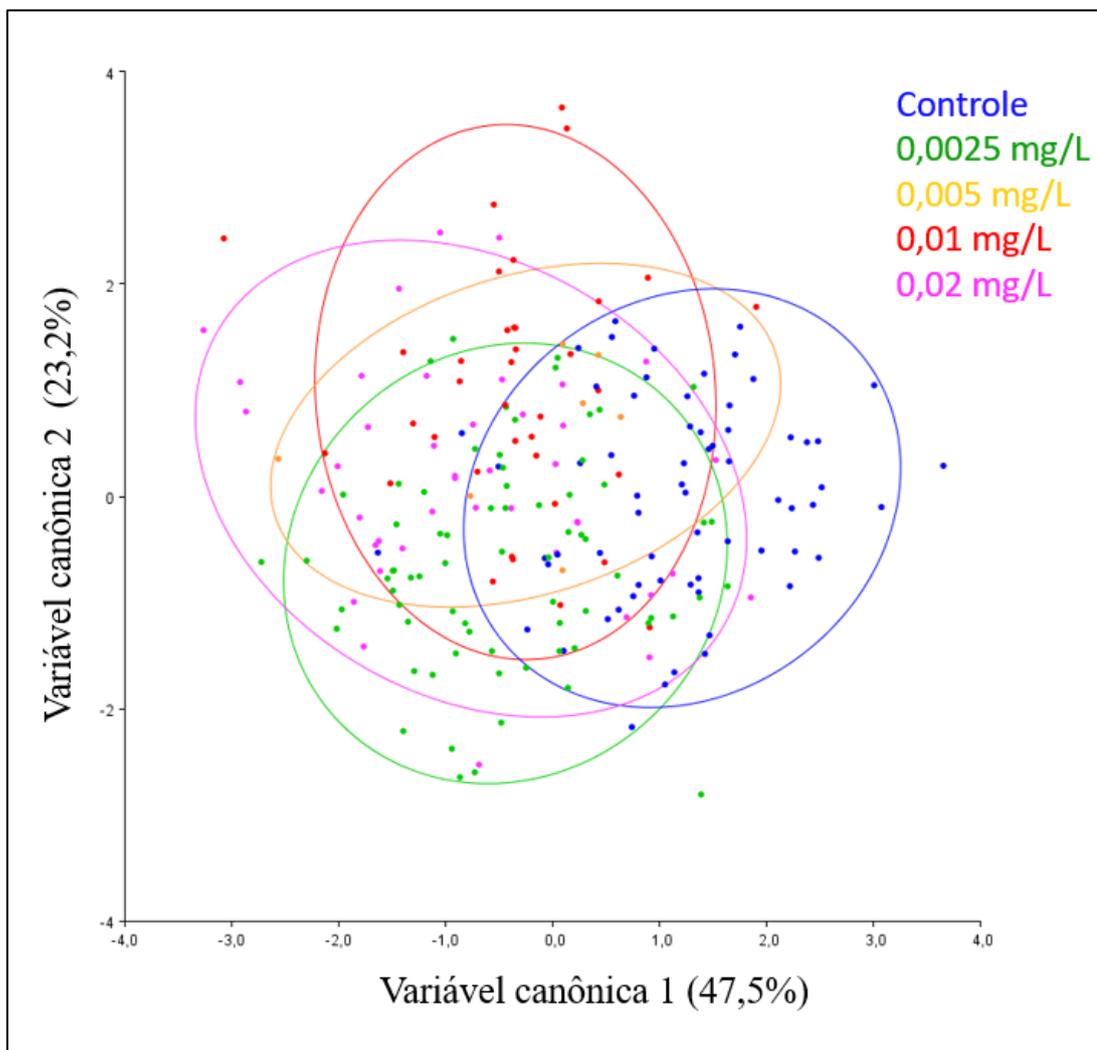
assimetria direcional (fêmeas - CO)		assimetria flutuante (fêmeas - CO)	
	Controle		Controle
0,0025 mg/L	0,061	0,0025 mg/L	0,99
0,01 mg/L	0,051	0,01 mg/L	-
0,02 mg/L	0,0001	0,02 mg/L	0,0001

Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: Valores em negrito denotam diferença significativa

A AVC foi aplicada para analisar a existência de padrões nos agrupamentos entre as fêmeas que sobreviveram a diferentes concentrações sob a simulação térmica para a região CO. Com base na Figura 39, não há evidências de que há agrupamentos diferentes no morfoespaço considerando a sobreposição entre os dados das diferentes concentrações. Portanto, não há evidências de mudanças significativas na forma alar para a região CO.

Figura 39: Representação da variação de forma entre os diferentes tratamentos (Fêmeas de *Aedes aegypti* em condições de temperatura da região Centro-Oeste - CO) de acordo com a análise de variáveis canônicas com alometria



Fonte: Autoria própria (2022)

Com efeito alométrico baixo (5,4%, $p < 0,0001$), nas fêmeas da região CO a maior distância morfológica observada foi entre as fêmeas do experimento controle e as sobreviventes a 0,005 mg/L ($dM = 2,61$, $p = 0,039$).

As fêmeas da região NE apresentaram, em média, tamanho do centroide alar de 2,3 mm considerando todas as condições. Observou-se uma diferença de 0,38 mm entre o tamanho médio menor e maior, além de menor variabilidade entre os tamanhos do centroide alar das fêmeas sobreviventes à 0,005 mg/L.

As fêmeas sobreviventes às concentrações de Pyriproxyfen possuem asas menores que as das fêmeas provenientes do ambiente descontaminado ($p=0,000093$). Ademais, as fêmeas emergentes de 0,01 mg/L de Pyriproxyfen tiveram asas menores que as de fêmeas dos outros tratamentos, o que pode ser observado visualmente por meio da Figura 40, com evidência sustentada por meio do teste *post hoc* de Tukey (Tabela 11).

Tabela 11: Valores da estatística p para o teste post hoc de Tukey (Tamanho do centroide de Fêmeas na região termicamente simulada do Nordeste)

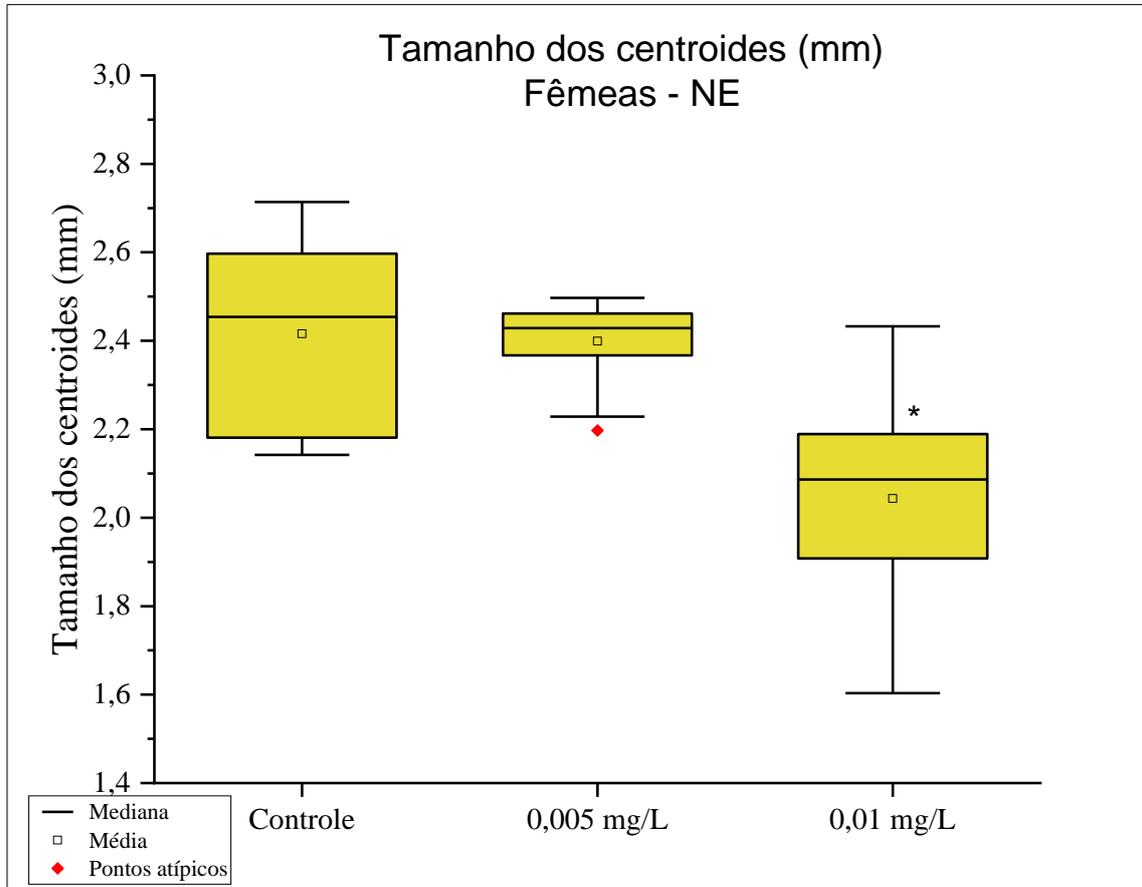
Concentração	Controle	0,005 mg/L	0,01 mg/L
Controle		0,972261	0,000306
0,005 mg/L	0,972261		0,000464
0,01 mg/L	0,000306	0,000464	

Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: Números em destaque representam diferenças significativas

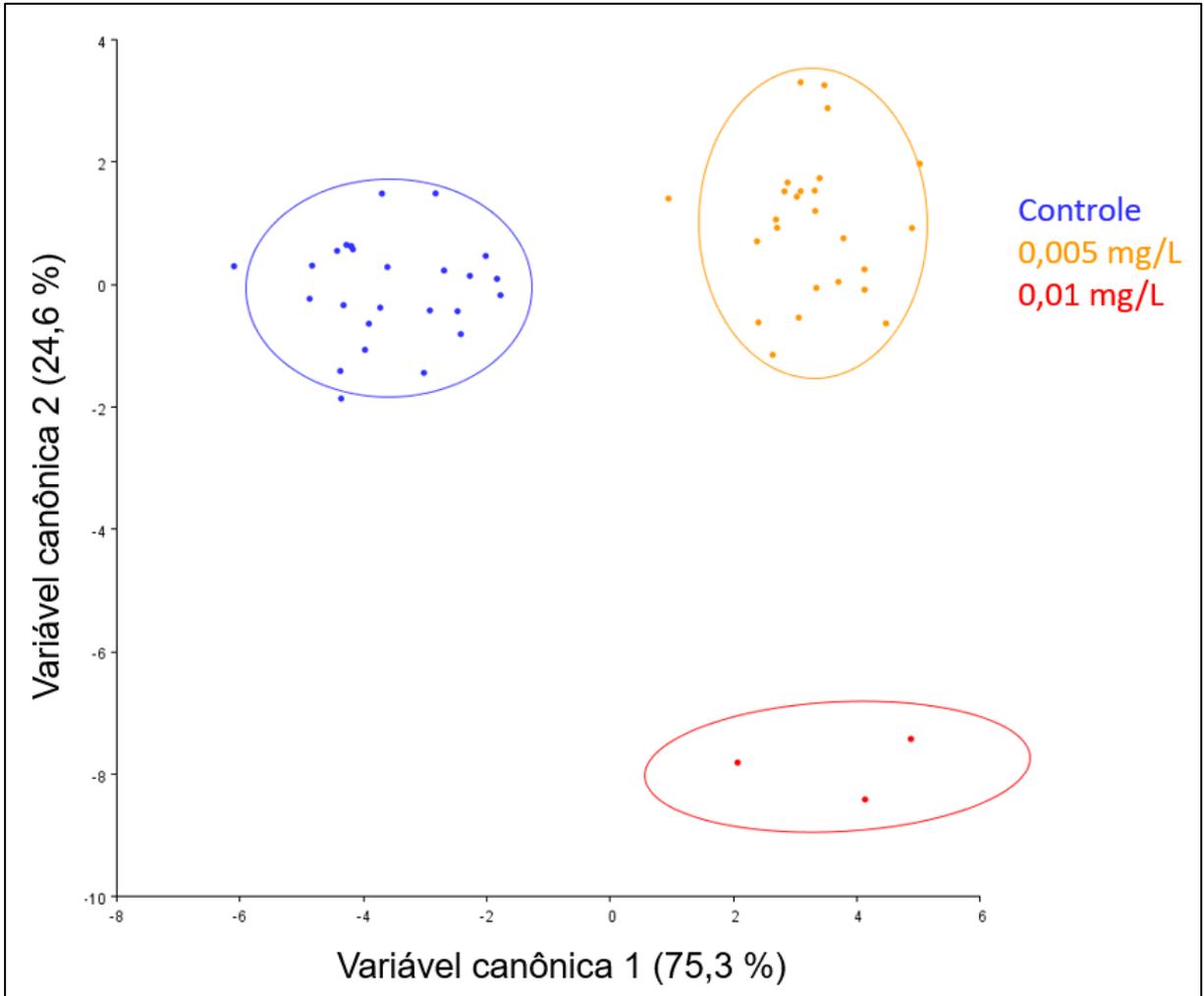
Houve evidências de que as asas das fêmeas, na condição simulada para a região NE, apresentaram assimetrias direcional e flutuante tanto as sobreviventes a 0,005 mg/L quanto a 0,01 mg/L ($p < 0,001$ para todas os cálculos).

Figura 40: Tamanho do centroide alar (mm) das fêmeas de *Aedes aegypti* na condição térmica da região Nordeste sob diferentes concentrações de Pyriproxyfen



A respeito da forma alar, houve evidências de diferenciação observados pelo morfoespaço representado pela AVC que pode ser observado pela Figura 41. A maior dM registrada foi entre as asas das fêmeas sobreviventes ao tratamento com 0,01 mg/L e as fêmeas do controle (dM = 10,68, $p = 0,0003$) embora caiba o destaque da dM comparando fêmeas do controle e sobreviventes a 0,005 mg/L (dM = 6,95, $p = 0,0001$). Para além da forma, houve evidência de que as asas das fêmeas sobreviventes ao Pyriproxyfen sob as condições térmicas para NE apresentaram assimetria flutuante ($p = 0,00034$). O efeito alométrico foi baixo, porém significativo (5,83%, $p = 0,0059$). As dM calculadas após remoção do efeito alométrico apresentaram sutil aumento, o que indica que o tamanho provavelmente tem pouca influência sobre a forma nas fêmeas para a região NE (Tabela 12).

Figura 41: Representação da variação de forma entre os diferentes tratamentos (Fêmeas de *Aedes aegypti* em condições de temperatura da região Nordeste - NE) de acordo com a análise de variáveis canônicas com alometria



Elaborado pela autora (2022)

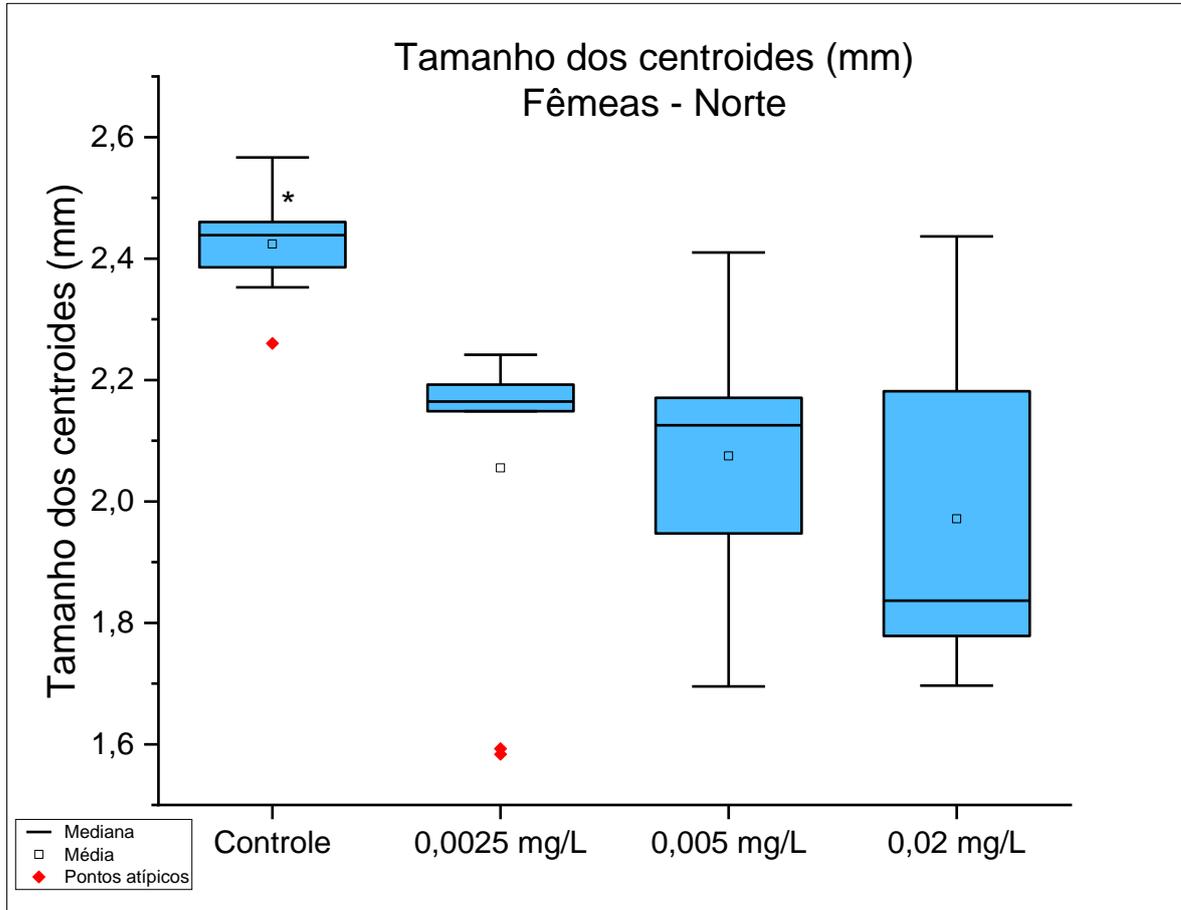
Tabela 12: Distâncias de Mahalanobis (Fêmeas – Nordeste)

Com alometria		Sem alometria	
	Controle		Controle
0,005 mg/L	6,95	0,005 mg/L	7,07
0,01 mg/L	10,98	0,01 mg/L	11,1

Elaborado pela autora (2022). OBS: Números em destaque indicam valores significativos ($p < 0,05$)

Diferindo às demais regiões, as fêmeas correspondentes à região N apresentaram asas significativamente menores em todas as concentrações de Pyriproxyfen em comparação às fêmeas do experimento controle ($p = 0,0002$) (Figura 42).

Figura 42: Tamanho do centroide alar (mm) das fêmeas de *Aedes aegypti* na condição térmica da região Norte sob diferentes concentrações de Pyriproxyfen.



Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: Asterisco denota diferença significativa

No entanto, não há evidência de que o tamanho das asas das fêmeas entre as concentrações testadas sejam diferentes, evidenciando a sensibilidade ao composto independente de sua concentração nas condições testadas em simulação à condição térmica da região N. Na análise de simetria, não houve evidências de assimetria direcional nas asas das fêmeas, mas houve evidências de assimetria flutuante (Tabela 13).

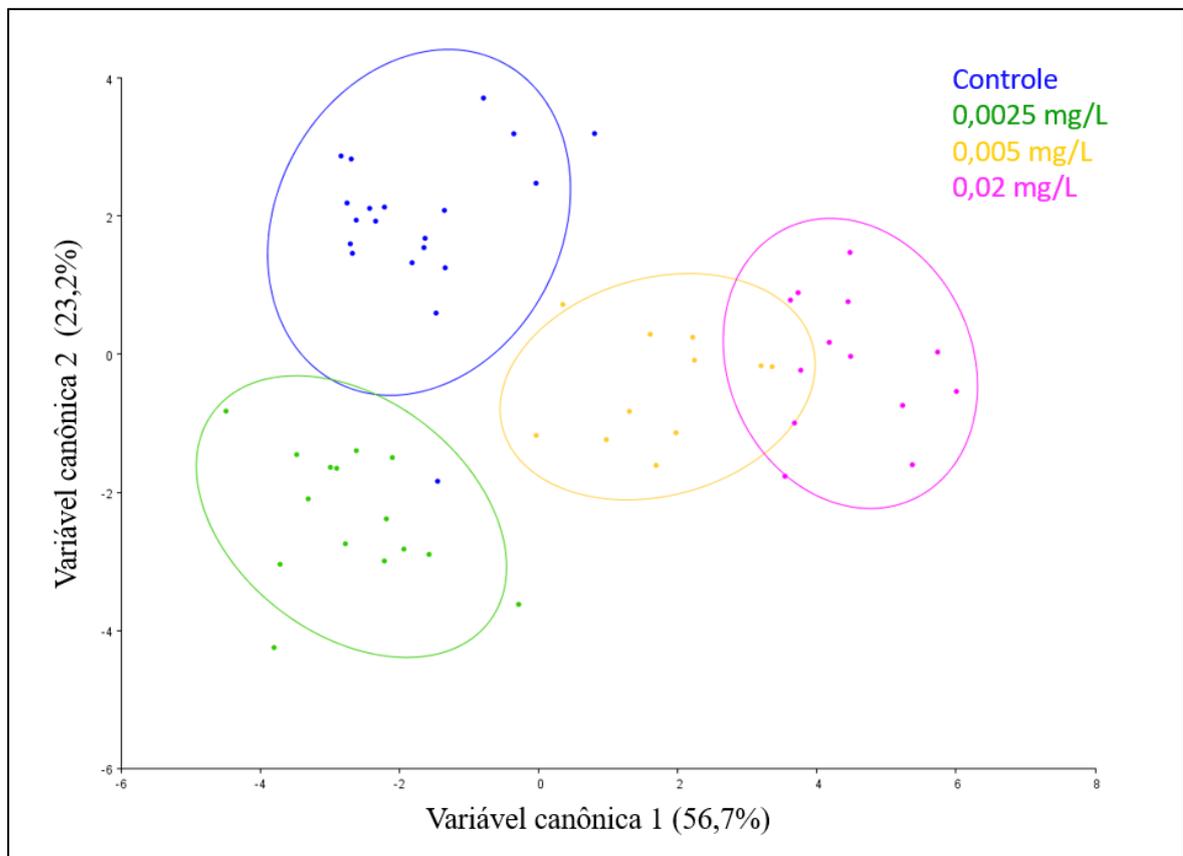
Tabela 13: Dados dos valores de p calculados pela ANOVA de Procrustes (Fêmeas de *Aedes aegypti* em exposição na condição térmica da região Norte N)

assimetria flutuante (fêmeas - N)		Assimetria direcional (fêmeas - N)	
	Controle		Controle
0,0025 mg/L	<0,0001	0,0025 mg/L	0,998
0,01 mg/L	<0,0001	0,01 mg/L	0,984
0,02 mg/L	0,0045	0,02 mg/L	1

Fonte: Autoria própria (2022) OBS: Números em destaque representam valores significativos

A AVC demonstrou agrupamentos distintos entre as formas das asas das fêmeas sobreviventes aos experimentos térmicos simulados à região N (Figura 43). Há uma distância maior entre os grupos da concentração de 0,0025 mg/L e 0,02 mg/L ($dM = 7,55$, $p < 0,0001$) e menor entre as concentrações de 0,005 mg/L e 0,02 mg/L ($dM = 4,03$, $p < 0,0001$).

Figura 43: Representação da variação de forma alar entre os diferentes tratamentos (Fêmeas de *Aedes aegypti* -condições do Norte - N) de acordo com a análise de variáveis canônicas com alometria



Fonte: Autoria própria (2022)

Resultados da regressão linear indicam alometria baixa e significativa (8,32%, $p < 0,0001$) e nova AVC com os escores da regressão produziram significativa redução das dM , o que indica que o tamanho influencia diretamente nos efeitos das formas para as asas testadas nas condições simuladas à região N (Tabela 14). A baixa variabilidade na forma era esperada devido ao fato de o presente trabalho utilizar de apenas uma cepa e em uma única geração para os experimentos.

Tabela 14: Distâncias de Mahalanobis (Fêmeas - Norte)

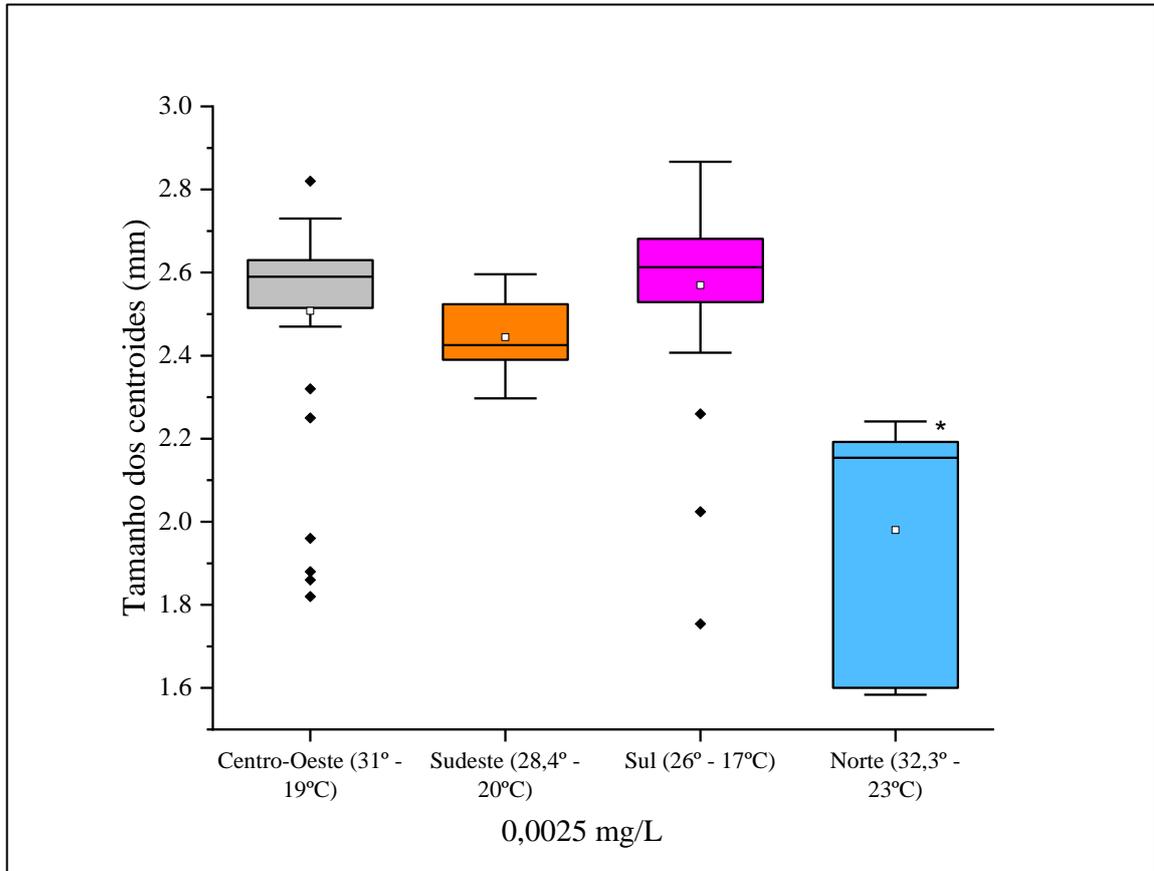
Distâncias de Mahalanobis (com alometria) (Fêmeas N)			
Tratamento	0,0025 mg/L	0.005 mg/L	0.02 mg/L
0,005 mg/L	5,7823		
0,02 mg/L	7,5563	4,0308	
Controle	4,411	4,4598	5,1108

Distâncias de Mahalanobis (sem alometria) (Fêmeas N)			
Tratamento	0,0025 mg/L	0.005 mg/L	0.02 mg/L
0,005 mg/L	1,1899		
0,02 mg/L	0,1971	0,9928	
Controle	1,8609	0,671	1,6638

Fonte: Autoria própria (2022). OBS: Números em destaque denotam valores significativos ($p < 0,05$).

Ao passo da importância de se determinar os tamanhos das asas como parte de efeito subletal do Pyriproxyfen, também é importante a comparação dos tamanhos alares entre as regiões para uma mesma concentração aplicada. Neste sentido, quando comparados os tamanhos de asa das fêmeas provenientes da concentração 0,0025 mg/L, aquelas dos experimentos simulando a região N foram mais sensíveis quando comparados com os resultados das demais regiões (Figura 44).

Figura 44: Tamanho do centroide (mm): Asas de fêmeas de *Aedes aegypti* de todas as regiões sobreviventes à concentração de 0,0025 mg/L



Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: Asterisco denota diferença significativa

Relação semelhante foi observada na comparação da concentração de 0,005 mg/L de Pyriproxyfen. Fêmeas providas dos experimentos com as temperaturas simuladas da região N foram as mais sensíveis em termos de tamanho de asas, apresentando as menores asas entre as demais (Figura 45). Nesta análise, houveram dados para a região NE e esta apresentou também fêmeas com asas menores em comparação às regiões S, SE e CO (Tabela 15).

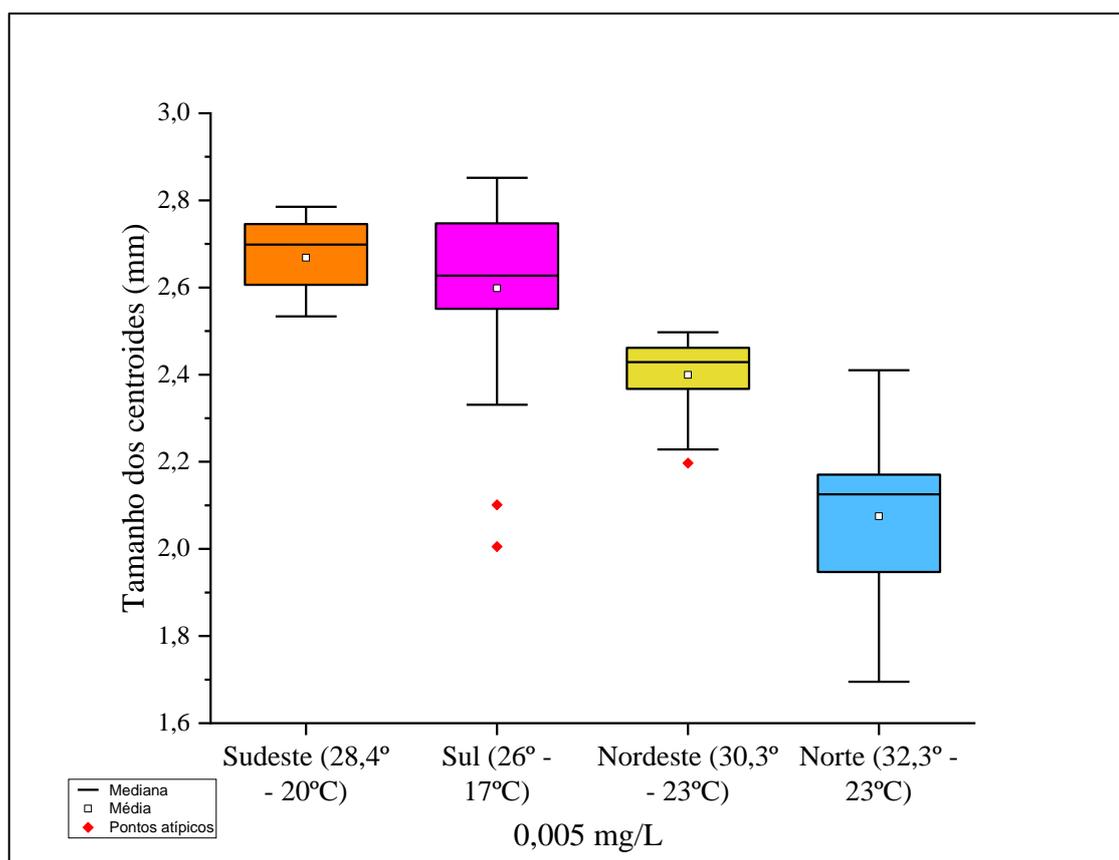
Tabela 15: Valores de p para o teste *post hoc* de Tukey com os dados de tamanho dos centroides de asas das fêmeas de *Aedes aegypti* em cada condição testada para a concentração de Pyriproxyfen de 0,005 mg/L

	Tratamento e condição de teste			
	0,005 mg/L NE	0,005 mg/L N	0,005 mg/L SE	0,005 mg/L S
0,005 mg/L NE		0,000540	0,011383	0,019502
0,005 mg/L N	0,000540		0,000167	0,000167
0,005 mg/L SE	0,011383	0,000167		0,720694
0,005 mg/L S	0,019502	0,000167	0,720694	

Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: Números em destaque representam diferenças significativas

Figura 45: Tamanho do centroide (mm): Asas de fêmeas de *Aedes aegypti* de todas as regiões sobreviventes à concentração de 0,005 mg/L

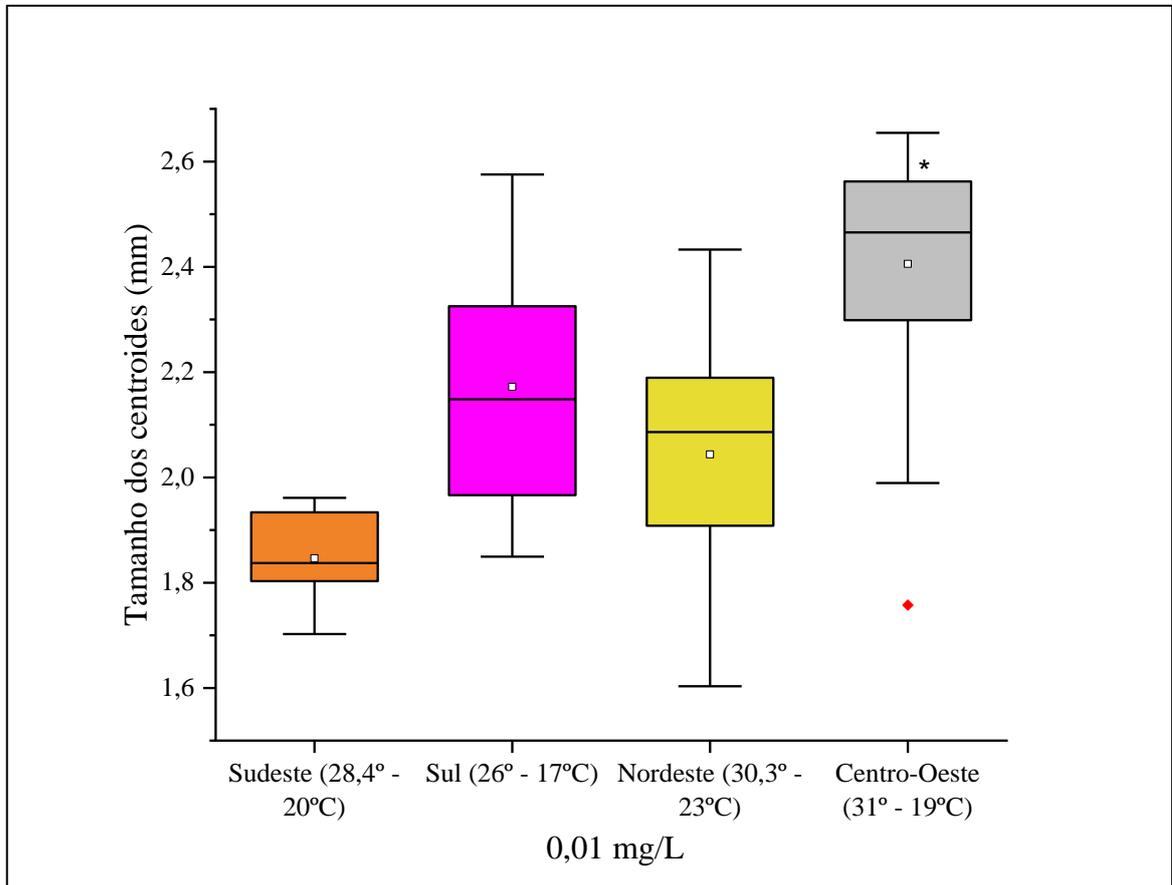


Fonte: Autoria própria (2022)

Considerando a concentração recomendada pela OMS (0,01 mg/L) e também a maior concentração relacionada a fêmeas com menores asas, as adultas provindas dos experimentos com temperaturas da região CO apresentaram asas maiores

quando comparadas com as demais regiões (NE, SE e S), o que pode ser visto na Figura 46.

Figura 46: Tamanho do centroide (mm): Asas de fêmeas de *Aedes aegypti* de todas as regiões sobreviventes à concentração de 0,01 mg/L



Fonte: Autoria própria (2022)

Convém destacar que foi na simulação térmica da região CO que foram encontradas as fêmeas com menor sensibilidade ao composto, em relação aos efeitos sub letais observados nas asas. Apesar de apresentar a maior amplitude térmica, a região CO teve a maior temperatura dentre as testadas, considerando o maior tempo de exposição (14 horas com fotoperíodo claro) sendo então esperado que as asas das fêmeas nessas condições fossem menores em resposta a temperatura mais alta. Há vasta literatura que relata evidências de que as fêmeas tendem a serem menores quando desenvolvidas sob regimes de temperaturas mais altas, devido ao aumento das taxas metabólicas em função do aumento de temperatura (VAN DEN HEUVEL, 1963; BRIEGEL, 1990; MOHAMMED; CHADEE, 2011; REISKIND; ZARRABI, 2012; SIMOY; SIMOY; CANZIANI, 2015). Uma possível explicação para essa mudança é a

exposição de temperaturas diferentes de acordo com o fotoperíodo, tal qual descrito por Rivas et al. (2018).

A temperatura mais baixa durante a noite, simulada pelo fotoperíodo escuro, pode ter influenciado na redução do metabolismo das larvas, o que conseqüentemente aumentou o tempo de desenvolvimento larval e permitiu fêmeas maiores em relação ao esperado caso se mantivesse a temperatura dos experimentos constantemente alta. Tal efeito aproxima-se ao que pode ser esperado em condições naturais de campo. No ambiente natural o ciclo diário de intensidade de luz ocorre concomitantemente com o ciclo de temperatura, no qual a queda de temperatura ocorre junto à diminuição da intensidade da luz ao cair da noite (SAUNDERS, 2002). Esses ciclos exercem influência contínua nas funções biológicas dos organismos ao longo de seus ciclos de vida (FARNESI *et al.*, 2018).

Para uma espécie diurna como *Ae. aegypti*, os regimes de luz e temperatura influenciam diretamente no ritmo de atividade locomotora. Rivas et al. (2018) observaram que o ritmo da atividade locomotora de *Ae. aegypti* adultos é mais sensível à temperatura do que a luminosidade. Por sua vez, Farnesi et al. (2018) observaram que as fêmeas depositam mais ovos no escuro do que no claro em condições laboratoriais, relatando efeito importante em uma característica reprodutiva considerando apenas o fotoperíodo. Costanzo et al. (2015) observaram que a duração do dia afeta a propensão à hematofagia nas fêmeas de *Ae. aegypti*, sendo essas mais propensas a alimentarem-se de sangue nas condições em que o dia dura menos tempo. Tais trabalhos demonstram a importância de ambas condições (temperatura e luminosidade) como interferentes em parâmetros importantes do ciclo de vida das fêmeas.

O efeito do tamanho corporal das fêmeas no cenário epidemiológico é multifatorial, considerando as influências diretas e indiretas na capacidade vetorial, incluindo aspectos sobre a longevidade, o comportamento de hematofagia e fecundidade (ALTO; REISKIND; LOUNIBOS, 2008a; BUCKNER; ALTO; LOUNIBOS, 2016; DUJARDIN, 2008; FARJANA; TUNO, 2013; JULIANO *et al.*, 2014; KOENRAADT, 2008)

De acordo com Costanzo et al. (2015), as fêmeas maiores têm mais probabilidade de sobreviver a períodos de inanição, o que conseqüentemente aumenta a chance de sobrevivência enquanto os recursos estão escassos durante condições desfavoráveis. Juliano et al. (2014) também obtiveram resultados que

corroboram com tal afirmação, nos quais verificaram que fêmeas maiores tiveram maior longevidade. Neste sentido, os resultados encontrados para tamanho do centroide alar corroboram os dados sobre longevidade. As fêmeas providas dos experimentos simulando as temperaturas para a região CO foram maiores e viveram mais.

Há evidências de que a competência vetorial para DENV é influenciada pelo tamanho dos indivíduos e tem relação tanto com a taxa de infecção das fêmeas quanto com a capacidade de transmitirem os vírus para os hospedeiros vertebrados. Fêmeas menores são mais propensas a se infectarem com DENV-2 e depositam mais ovos durante o primeiro ciclo gonotrófico (BRIEGEL, 1990; ALTO; REISKIND; LOUNIBOS, 2008b). Por outro lado, fêmeas menores conseguem comportar uma carga viral menor quando comparadas com fêmeas maiores, o que corroborou com os resultados encontrados por Juliano et al. (2014), nos quais evidenciaram que as fêmeas maiores foram vetores mais eficientes para dengue durante uma epidemia no Rio de Janeiro. Fêmeas maiores são mais pesadas durante a emergência devido ao aumento das demandas de glicogênio e, conseqüentemente, gastam mais recursos durante o voo, o que indica que asas menores para as fêmeas pode ser uma vantagem (REISKIND; ZARRABI, 2012).

Embora durante o presente trabalho não se tenha testado a capacidade vetorial para fêmeas sobreviventes às concentrações do larvicida, não se pode negligenciar a possibilidade de que o efeito combinado entre as concentrações sub-letais e as temperaturas possam também ter o potencial de influenciar na capacidade vetorial. Além disso, mosquitos com fenótipos que exibem perfil de resistência a inseticidas ou experienciam efeitos sub-letais podem estar associados com suscetibilidade alterada à infecção e transmissão de patógenos (MUTURI; ALTO, 2011; GUEDES; WALSE; THRONE, 2017). Alomar, Eastmond e Alto (2021) evidenciaram que *Ae. aegypti* adultas que sobreviveram à exposição ao Pyriproxyfen durante a fase larval foram vetores mais competentes para Zika vírus, tanto a 20°C quanto a 30°C, e independente do tamanho da fêmea.

Desvios no padrão em simetria nas asas são esperadas em resposta a estressores ambientais, dentre eles, temperatura e compostos químicos como inseticidas. No presente trabalho, a assimetria flutuante foi identificada em diversas fêmeas sobreviventes à concentração do Pyriproxyfen. Alves et al. (2020) observaram resultado semelhante em *Culex quinquefasciatus* quando expostos à ivermectina, em

que o efeito de assimetria flutuante foi maior nas fêmeas do que nos machos expostos. No caso da exposição à inseticida a base de organofosfato, machos de *Culex quinquefasciatus* foram mais sensíveis do que fêmeas nos efeitos em assimetria flutuante de forma que a assimetria foi maior conforme o aumento da concentração aplicada, semelhante ao ocorrido com as fêmeas sobreviventes nas condições simuladas para a região CO (MPHO; HOLLOWAY; CALLAGHAN, 2001).

Até o momento da escrita do presente trabalho, não houve registros de trabalhos anteriores que tenham testado o efeito do Pyriproxyfen na simetria de asas de machos e fêmeas adultas sobreviventes. Sendo assim, é importante que novos estudos avaliando modificações nos padrões de voo sejam também realizados de modo complementar, bem como análises em níveis moleculares e trans-geracionais. É importante destacar que os padrões de assimetria são manifestações observáveis dos processos biológicos, porém não são os processos biológicos em si. Portanto, deve-se considerar tal limitação para as inferências considerando apenas o padrão em assimetria estimada por meio da morfometria geométrica (KLINGENBERG, 2015).

Visto que outros estressores ambientais influenciam diretamente no padrão de simetria das asas como, por exemplo, disponibilidade de alimento durante o desenvolvimento larval (REISKIND; ZARRABI, 2012), mais estressores combinados devem ser considerados em futuras pesquisas.

No que se diz respeito aos machos emergidos, foram digitalizadas, ao todo, 767 asas de indivíduos machos sendo destas 281 asas direitas e 276 asas esquerdas. Ao todo, informações das asas de 281 indivíduos foram utilizadas nas análises. A diferença entre o número de asas esquerdas e direitas se dá por eventuais acidentes no momento de manipulação das asas (rompimento devido sensibilidade do espécime). Em geral, o tamanho dos centroides (TC) das asas dos machos sobreviventes aos experimentos variou entre 1,30 mm a 2,68 mm. A Tabela 16 resume os dados descritivos das asas em relação ao tamanho dos centroides para os machos, em todas as condições testadas.

Tabela 16: Dados descritivos sobre o tamanho dos centroides das asas de machos de *Aedes aegypti* nas diferentes condições de experimento

Região Sul				
Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L

n	12	19	12	15	0
Média (mm)	2,03	2,00	2,04	2,03	-
Desvio Padrão	0,07	0,17	0,05	0,19	-
Mínimo (mm)	1,93	1,98	1,95	1,86	-
Máximo (mm)	2,17	2,19	2,12	2,68	-

Região Sudeste					
	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L
n	16	14	12	11	18
Média (mm)	2,07	2,02	2,04	2,01	1,98
Desvio Padrão	0,08	0,08	0,07	0,06	0,07
Mínimo (mm)	1,95	1,85	1,93	1,88	1,87
Máximo (mm)	2,23	2,16	2,13	2,11	2,10

Região Centro-Oeste					
	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L
n	28	15	14	17	11
Média (mm)	1,90	1,87	1,91	1,88	1,87
Desvio Padrão	0,06	0,08	0,07	0,18	0,11
Mínimo (mm)	1,78	1,74	1,76	1,30	1,70
Máximo (mm)	2,00	2,00	2,03	2,04	2,04

Região Nordeste					
	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L
n	12	10	7	-	8
Média (mm)	1,94	1,92	1,84	-	1,79
Desvio Padrão	0,05	0,11	0,16	-	0,09
Mínimo (mm)	1,86	1,76	1,62	-	1,69
Máximo (mm)	2,04	2,03	2,03	-	1,99

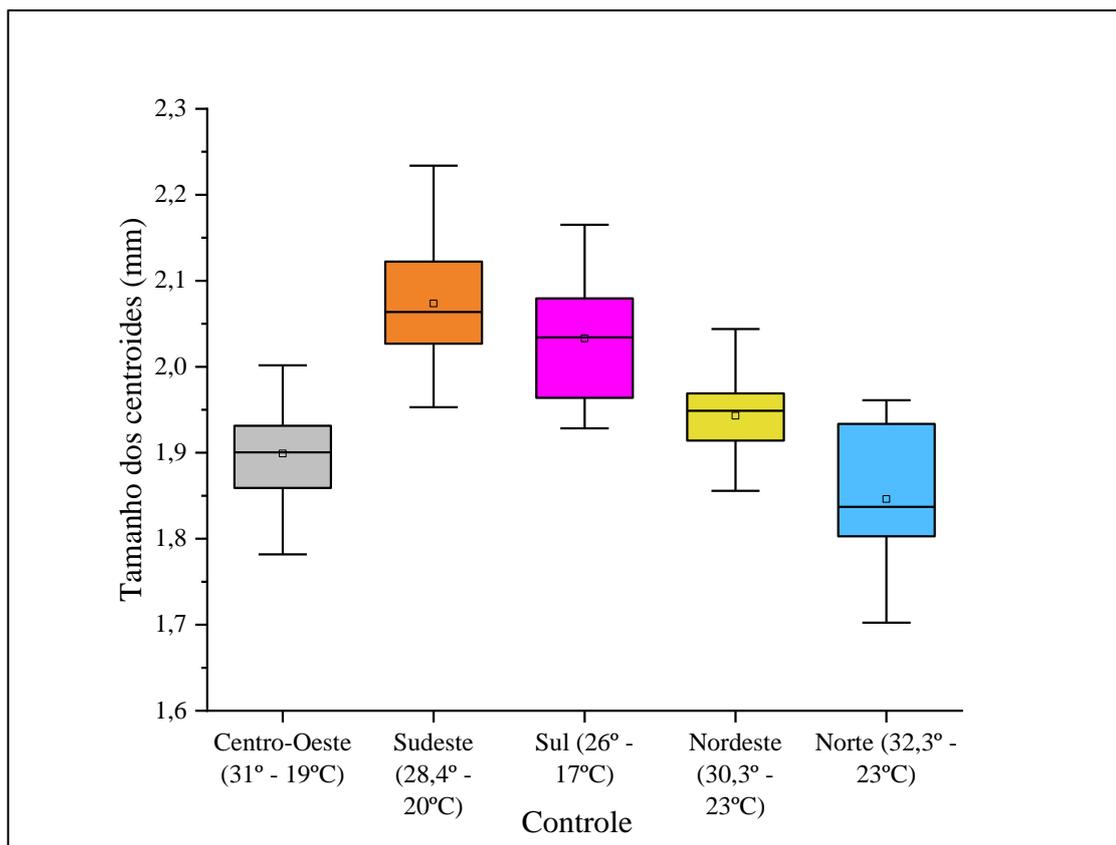
Região Norte					
	Controle	0,0025 mg/L	0,005 mg/L	0,01 mg/L	0,02 mg/L
n	7	7	7	5	0
Média (mm)	1,85	1,57	1,66	1,65	-
Desvio Padrão	0,09	0,02	0,09	0,08	-
Mínimo (mm)	1,70	1,55	1,50	1,58	-
Máximo (mm)	1,96	1,61	1,79	1,77	-

Elaborado pela autora (2022)

OBS: Células preenchidas por hífen denotam tratamentos sem observações

Considerando apenas a temperatura, houve evidência de que os TC médio dos machos foram diferentes entre as condições térmicas simuladas entre as regiões ($p < 0,001$). Quando analisados por meio do teste *post hoc* de Tukey, os TC dos machos provindos das simulações para CO foram menores que SE e S ($p = 0,0001$ para ambas comparações). SE e S, por sua vez, foram correspondentes aos TC maiores quando comparados com os resultados para as regiões N, NE e CO ($p < 0,05$) mas não diferentes entre si ($p = 0,51$). TC dos machos das simulações para a região N foram menores que os da região NE ($p = 0,02$). A Figura 47 ilustra a distribuição gráfica dos dados referentes aos TC dos machos não contaminados (experimento controle) para todas as regiões testadas.

Figura 47: Representação gráfica da distribuição de tamanhos do centroide alares dos machos de *Aedes aegypti* sob as 5 condições térmicas simuladas das regiões brasileiras no controle

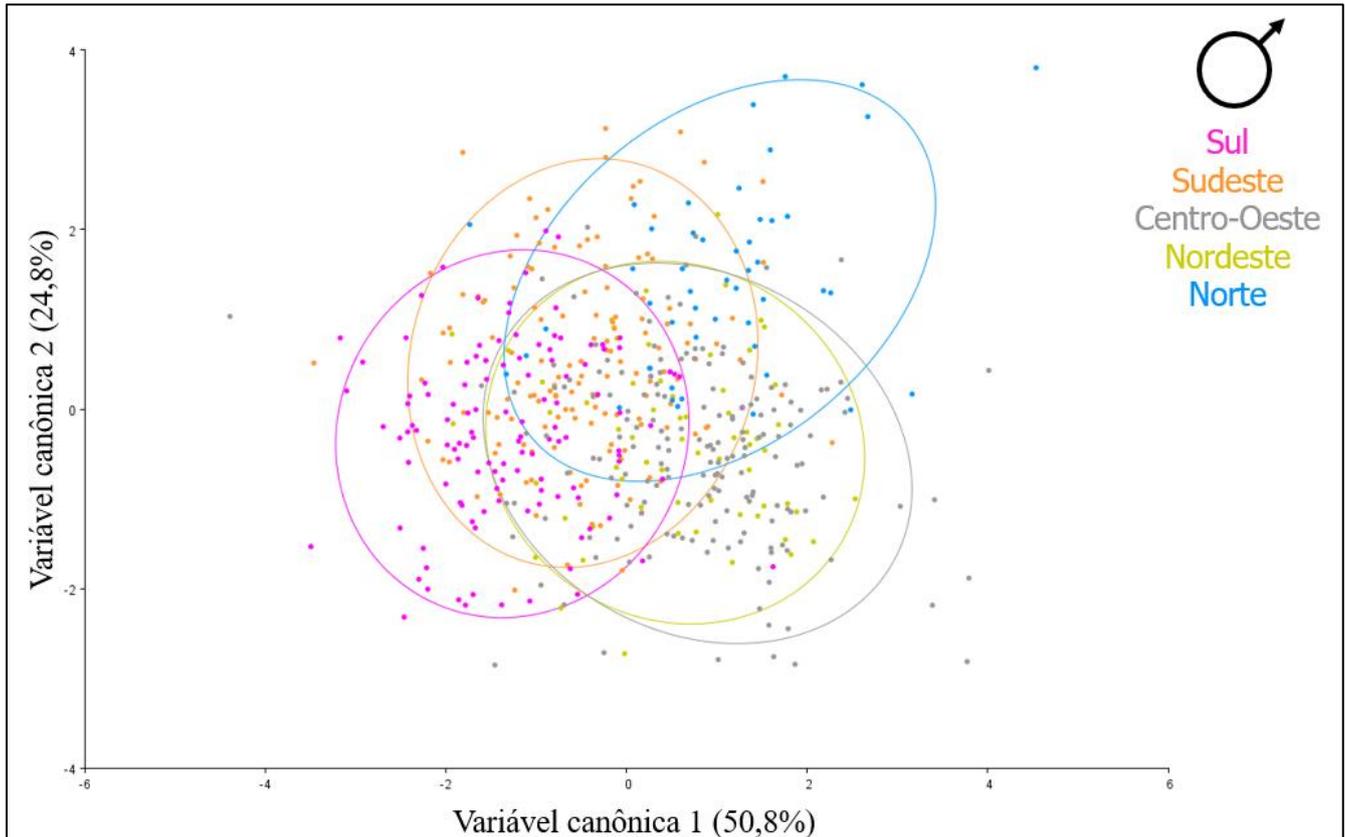


Fonte: Autoria própria (2022)

Por outro lado, não houve evidências de que o formato das asas dos machos dos experimentos controle tivera distribuição diferente no morfoespaço como pode ser observado pela Figura 48. As dM entre os machos provindos de ambiente descontaminado (experimento controle) variaram entre 1,44 (CO e NE, $p < 0,0001$) e

2,8 (S e N, $p < 0,0001$), o que também reforça a similaridade entre os padrões no formato das asas dos machos. A alometria nos machos dos experimentos controle foi baixa (2,013%, $p < 0,0001$).

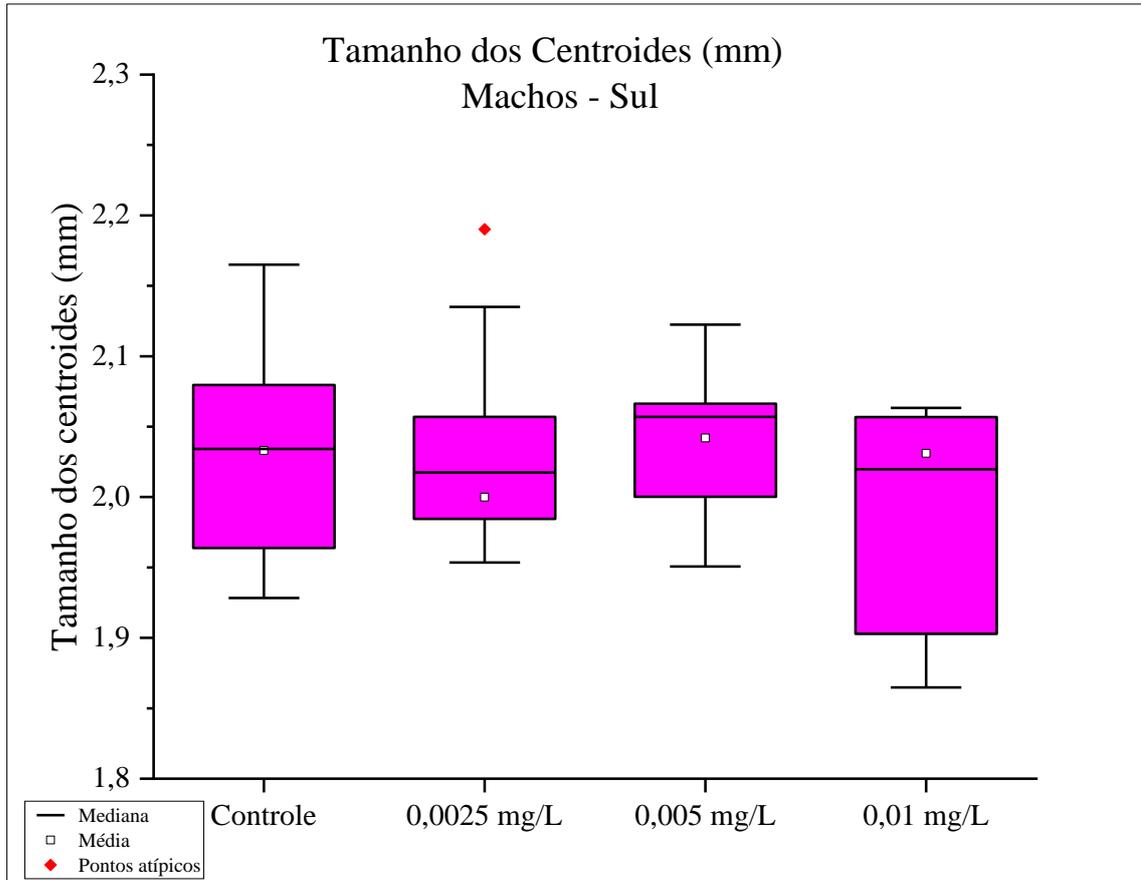
Figura 48: Representação da variação da forma alar dos machos nas condições térmicas simuladas para as cinco regiões brasileiras testadas, de acordo com a Análise de Variáveis Canônicas com alometria.



Fonte: Autoria própria (2022)

Não houve evidências de que o TC médio dos machos nas simulações térmicas referentes à região S fossem diferentes entre si ($p = 0,80$). A distribuição dos TC dos machos nesta condição testada apresenta sobreposição das médias, o que vai ao encontro da falta de evidência sobre diferenças nos TC dos machos em diferentes concentrações de Pyriproxyfen (Figura 47). No que se refere ao formato das asas, não houve evidências de que há diferenças na forma das asas de machos sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen e machos desenvolvidos nos experimentos controle (Figura 49). Também não houve evidências de assimetrias nas asas de machos sobreviventes às diferentes concentrações do larvicida.

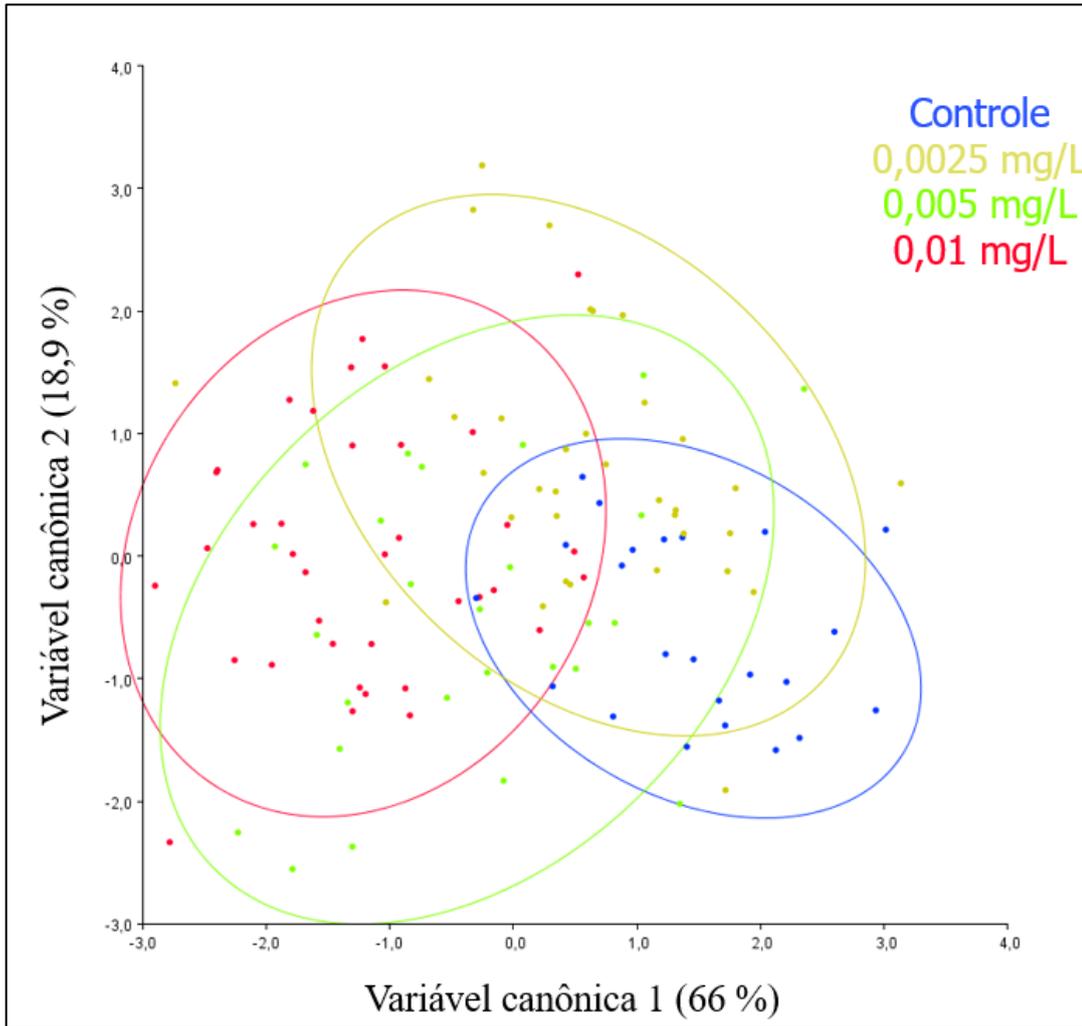
Figura 49: Representação gráfica dos tamanhos dos centroides dos machos sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen na simulação térmica da região Sul



Fonte: Autoria própria (2022)

Considerando a sobreposição entre as concentrações de Pyriproxyfen e o experimento controle no morfoespaço, a maior dM encontrada foi entre a concentração do larvicida 0,01 mg/L e o experimento controle ($dM = 2,74$, $p < 0,0001$). Ainda para os machos das simulações térmicas para a região S, o efeito alométrico foi baixo e significativo (2,7%, $p < 0,0001$). Na Figura 50 é possível observar a sobreposição dos dados no morfoespaço a partir da AVC para machos sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen sob as condições térmicas simuladas para a região S.

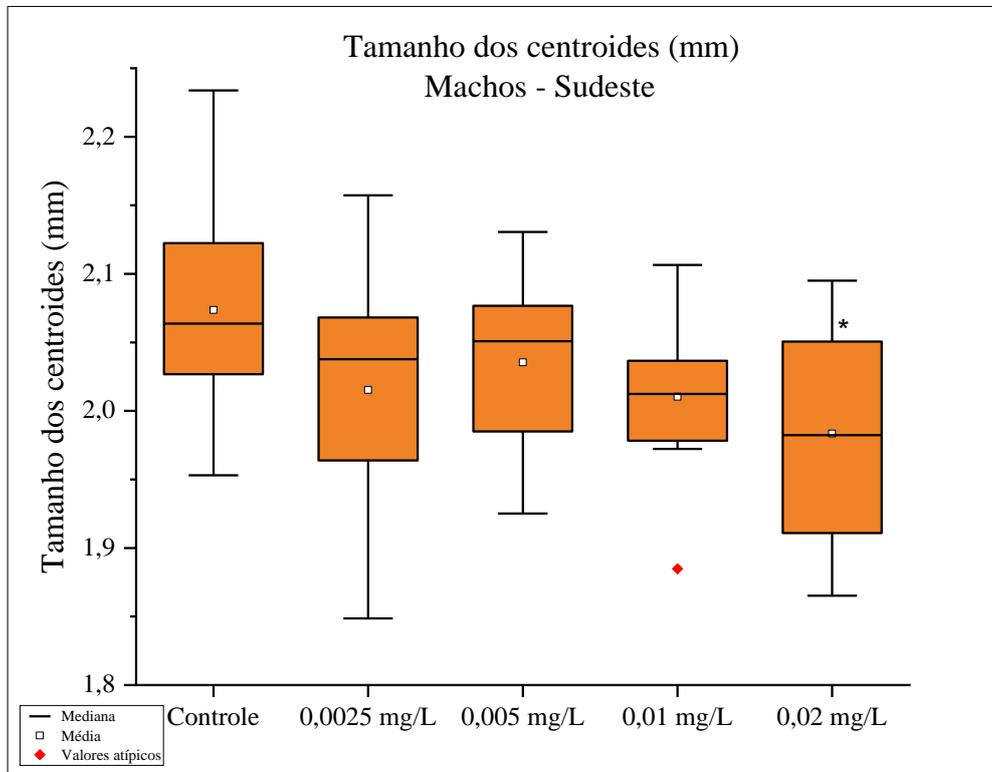
Figura 50: Representação da variação da forma alar dos machos de *Aedes aegypti* nas condições térmicas simuladas para a região Sul, de acordo com a Análise de Variáveis Canônicas



Elaborado pela autora (2022)

Entre os machos sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen sob as condições simuladas para a região SE, por sua vez, houve evidências de que os TC dos sobreviventes à 0,02 mg/L de Pyriproxyfen são menores do que os tamanhos médios para os machos quando emergidos de ambiente descontaminado ($p = 0,004348$, no teste *post hoc* de Tukey). No entanto, na comparação com as demais concentrações do larvicida nas condições testadas não houve evidência de diferenças, o que pode ser visto também na distribuição dos valores na Figura 51. Não houve evidências de assimetria nas asas dos machos nessas condições para a região SE.

Figura 51: Representação gráfica dos tamanhos dos centroides dos machos de *Aedes aegypti* sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriroxyfen na simulação térmica da região Sudeste

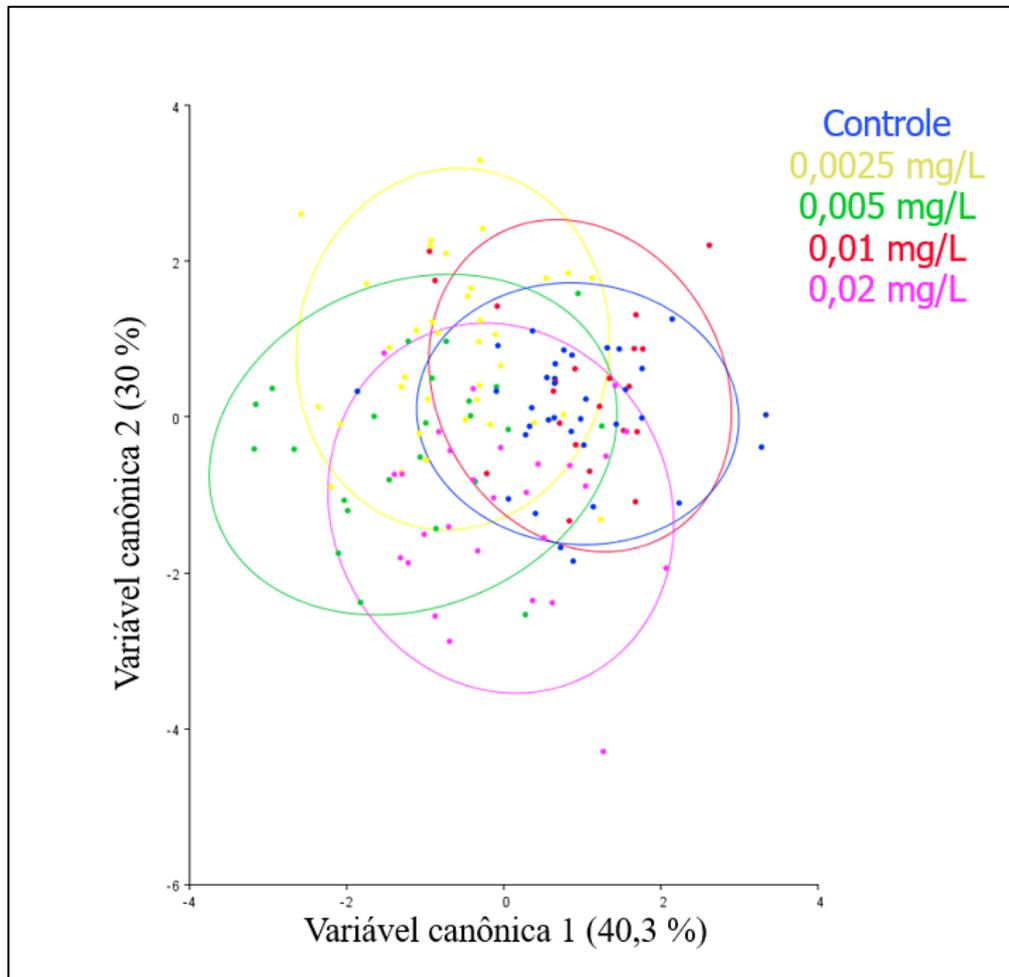


Fonte: Autoria própria (2022)

OBS: Asterisco denota diferença significativa

Houve baixa variabilidade da distribuição das formas das asas dos machos no morfoespaço, considerando as diferentes concentrações testadas nas condições simuladas para a região SE (Figura 52). A dM vai ao encontro com a baixa variabilidade, sendo a distância mais alta entre os machos sobreviventes a 0,005 e 0,01 mg/L (dM = 2,5, $p < 0,0001$). O efeito alométrico da região SE foi mais alto do que o encontrado nos dados para a região S, mas ainda baixo (3,1%, $p < 0,0001$).

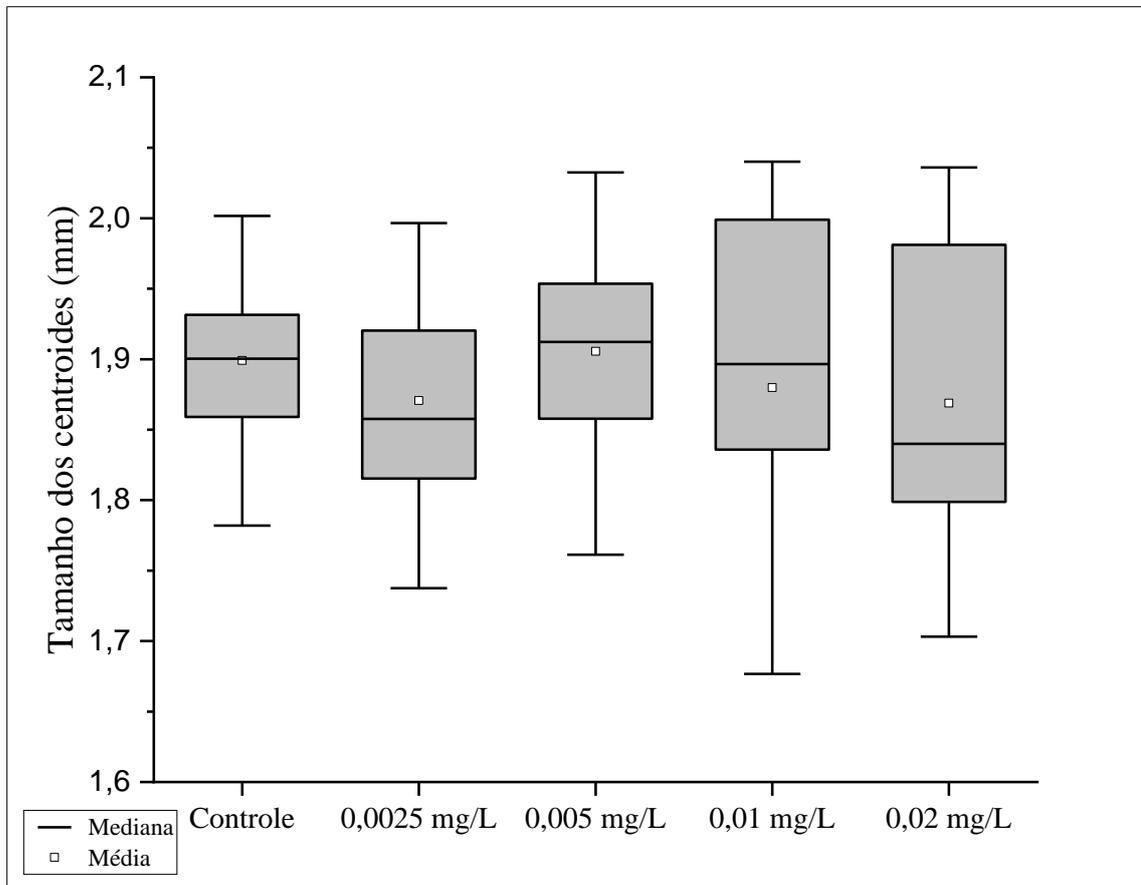
Figura 52: Representação da variação da forma alar dos machos de *Aedes aegypti* nas condições térmicas simuladas para a região Sudeste, de acordo com a Análise de Variáveis Canônicas com alometria



Fonte: Autoria própria (2022)

Nas análises com as asas dos machos nas temperaturas simuladas para a região CO, não houve evidências de que os TC médio fossem diferentes entre os sobreviventes às diferentes concentrações de Pyriprxyfen e o experimento controle ($p = 0,8024$). Pela representação gráfica na distribuição dos valores dos TC para os machos nessas condições térmicas, é possível notar a sobreposição dos valores médios nas distribuições interquartis (Figura 53). Essa sobreposição evidencia a baixa variabilidade dos dados e demonstra a falta de evidência encontrada pelo valor da estatística p . Não houve evidências de assimetria nas asas dos machos sobreviventes a Pyriproxifen na simulação para região CO.

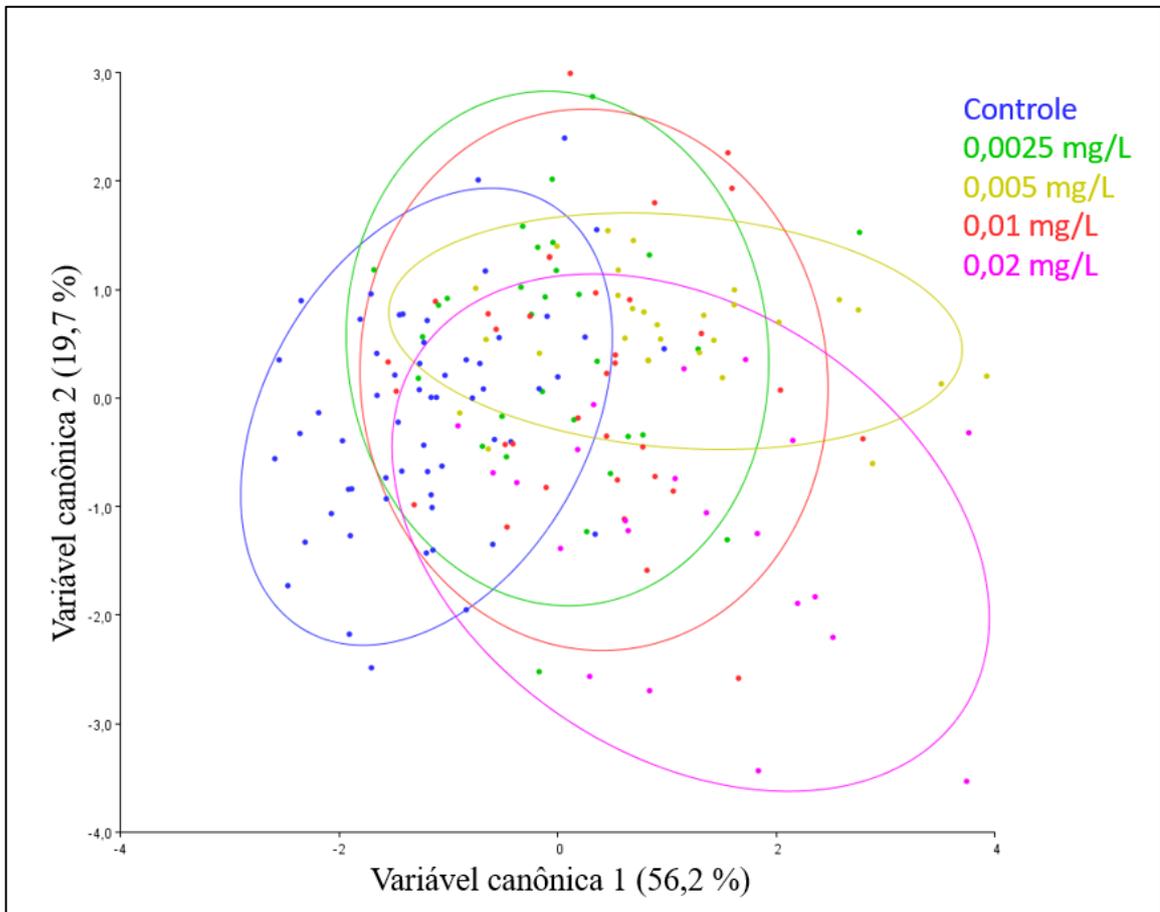
Figura 53: Representação gráfica da distribuição dos valores dos TC dos machos de *Aedes aegypti* emergidos de diferentes concentrações de Pyriproxyfen nas simulações térmicas para a região Centro-Oeste



Fonte: Autoria própria (2022)

De forma semelhante, foi observada baixa variabilidade na distribuição dos dados para as formas no morfoespaço para os dados das asas de machos provindos dos experimentos relacionados às condições térmicas da região CO, ilustrado pela Figura 54. A maior diferença, de acordo com a dM, foi encontrada entre os dados do experimento controle e a concentração de 0,02 mg/L de Pyriproxyfen ($dM = 2,65$, $p < 0,0001$) enquanto a maior similaridade foi observada entre 0,0025 mg/L e o controle ($dM = 1,58$, $p = 0,0020$). O efeito alométrico nas asas dos machos foi baixo, apesar de significativo (2,84%, $p = 0,0058$).

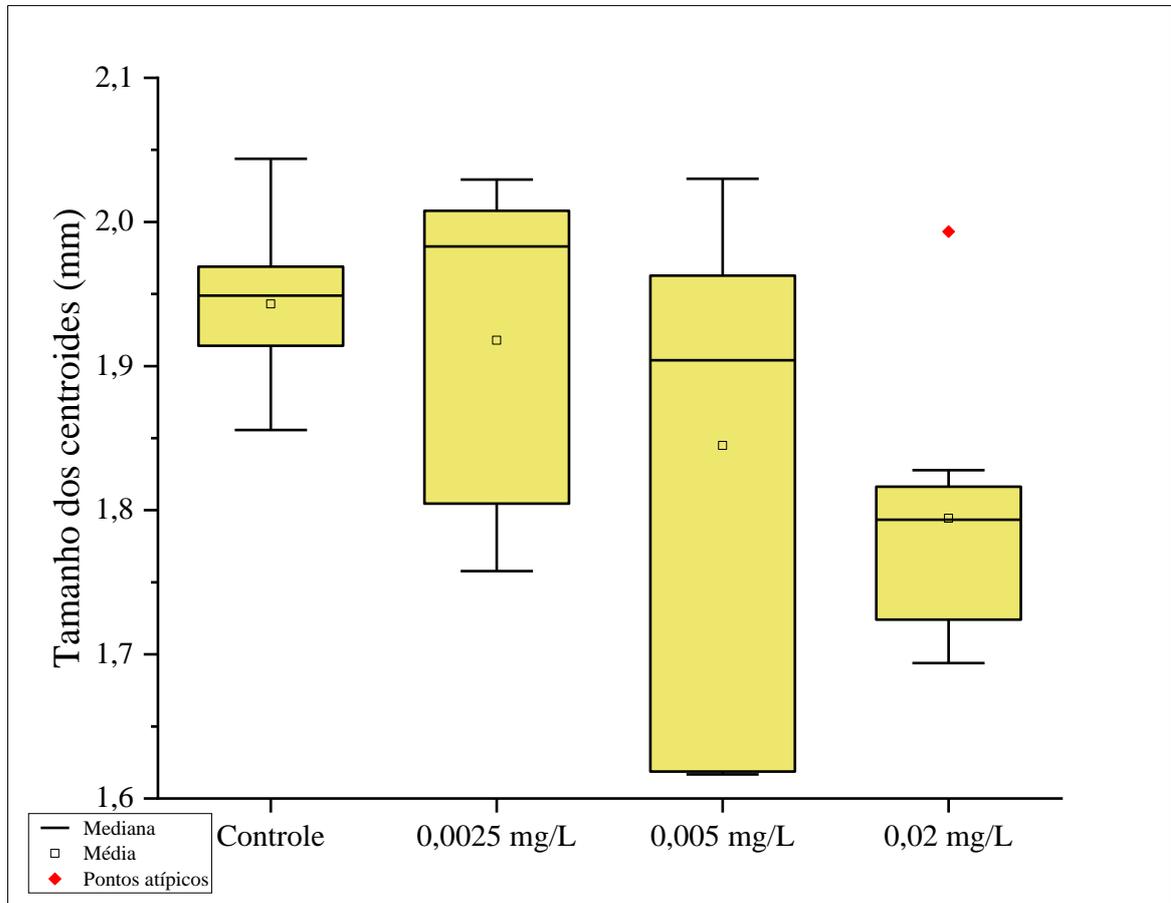
Figura 54: Representação da variação da forma alar dos machos de *Aedes aegypti* nas condições térmicas simuladas para a região Centro-Oeste, de acordo com a Análise de Variáveis Canônicas com alometria



Fonte: Autoria própria (2022)

Considerando os machos emergidos nos experimentos com as simulações térmicas para a região NE, houve evidências de que as asas dos machos sobreviventes a concentração 0,02 mg/L são menores que as dos machos do experimento controle, com base nos valores de TC ($p = 0,019$) (Figura 55). De forma semelhante ao que foi observado com os dados nas simulações da região SE, nestes da região NE também não houve evidências de diferenças nos TC entre os machos sobreviventes às concentrações de larvicida ($p > 0,05$). Não houve observações registradas na concentração 0,01 mg/L devido a problemas na conservação dos indivíduos, impossibilitando as comparações com essa concentração a respeito dos padrões alares.

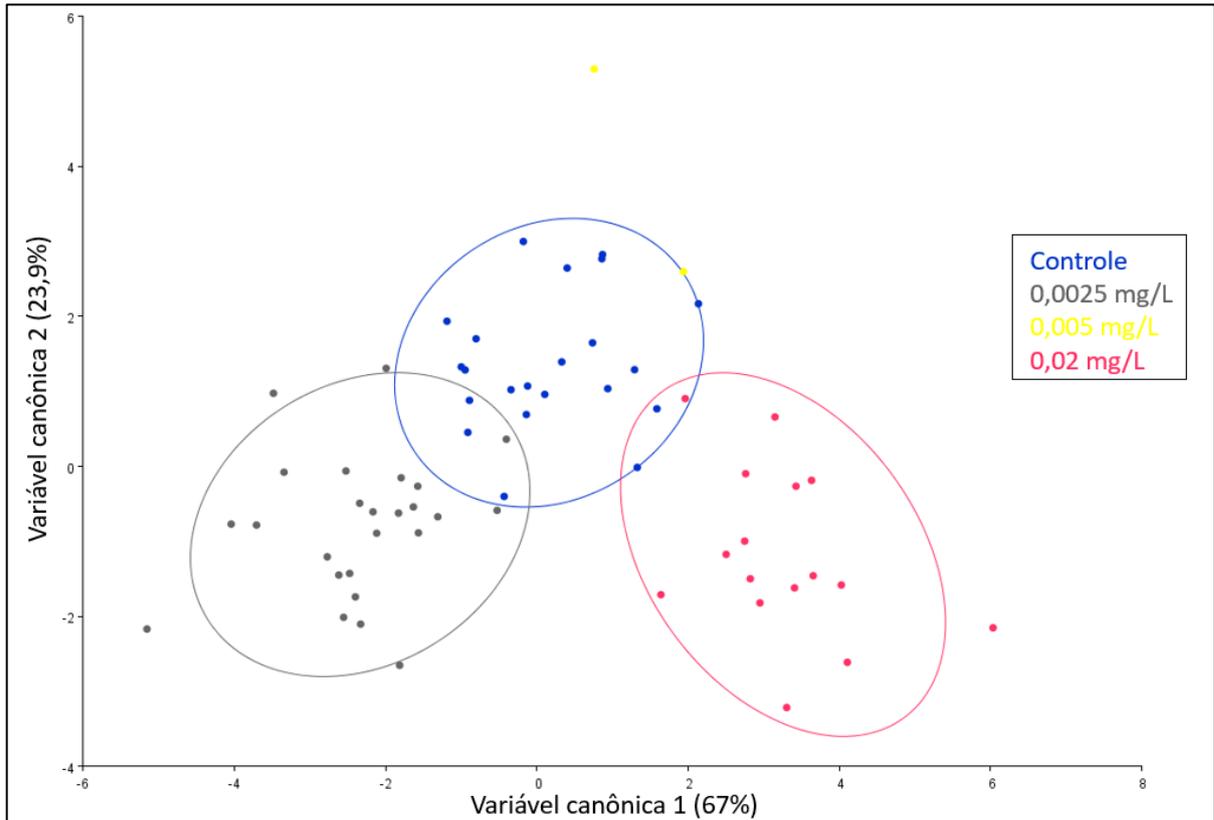
Figura 55: Distribuição dos valores de TC para as asas dos machos de *Aedes aegypti* sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen sob as condições térmicas simuladas para a região Nordeste



Fonte: Autoria própria (2022)

Nesta condição de experimento, observou-se maior variabilidade entre as formas das asas dos machos sobreviventes à concentração de 0,0025 mg/L de Pyriproxyfen e as dos sobreviventes a 0,02 mg/L, que pode ser observado graficamente pela Figura 56 devido agrupamentos que não se sobrepõe no morfoespaço ($dM = 5,82$, $p < 0,0001$). Para 0,005, desconsiderou-se a comparação devido ao número muito mais baixo de observações ($n=7$), o que também pode ser observado na Figura 56 pela baixa distribuição sem formação de elipse de confiança referente a essa concentração.

Figura 56: Representação da variação da forma alar dos machos de *Aedes aegypti* nas condições térmicas simuladas para a região Nordeste, de acordo com a Análise de Variáveis Canônicas

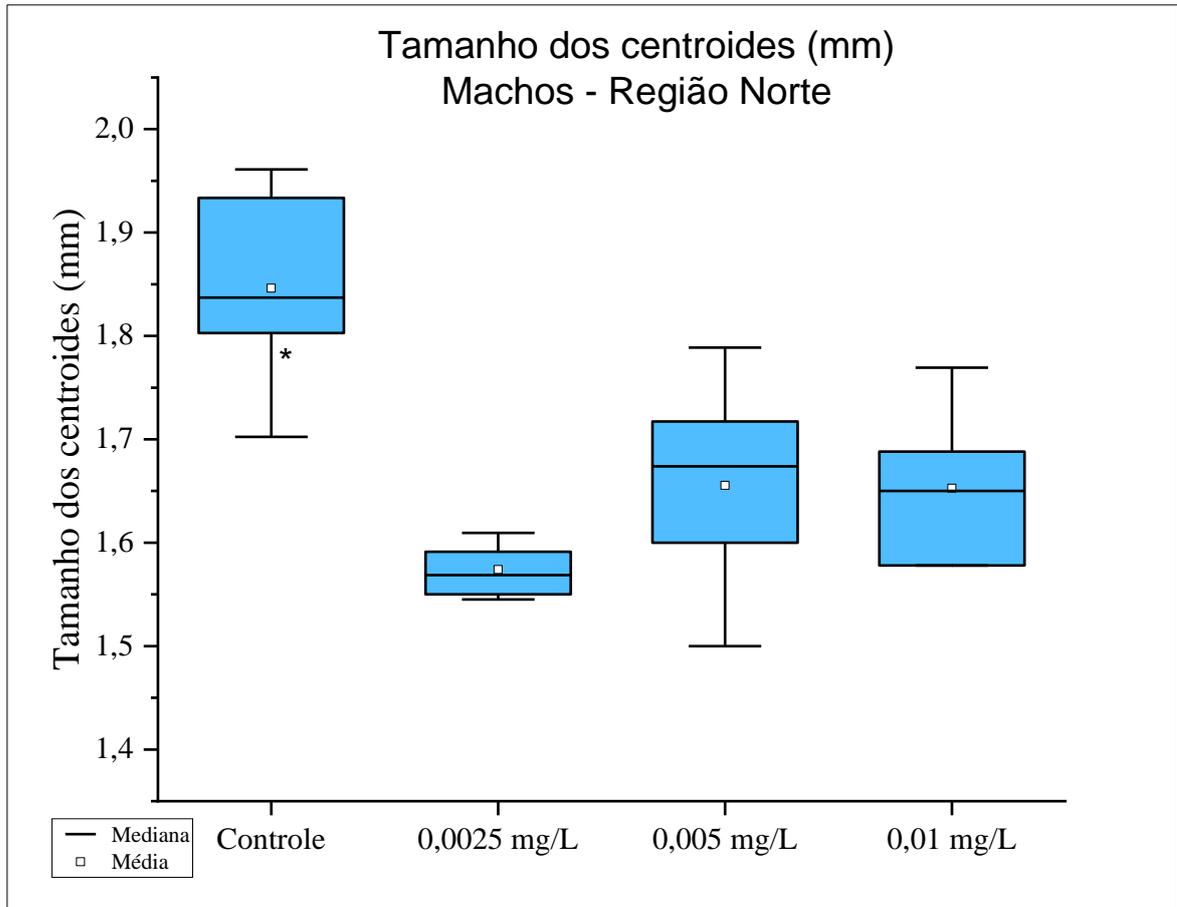


Fonte: Autoria própria (2022)

Comparado ao observado para os machos nas demais regiões simuladas, na região NE houve maior efeito alométrico mesmo que ainda considerado baixo (4,48%, $p = 0,0136$), o que indica que o tamanho da asa dos machos teve pouca influência sobre as diferenças na forma.

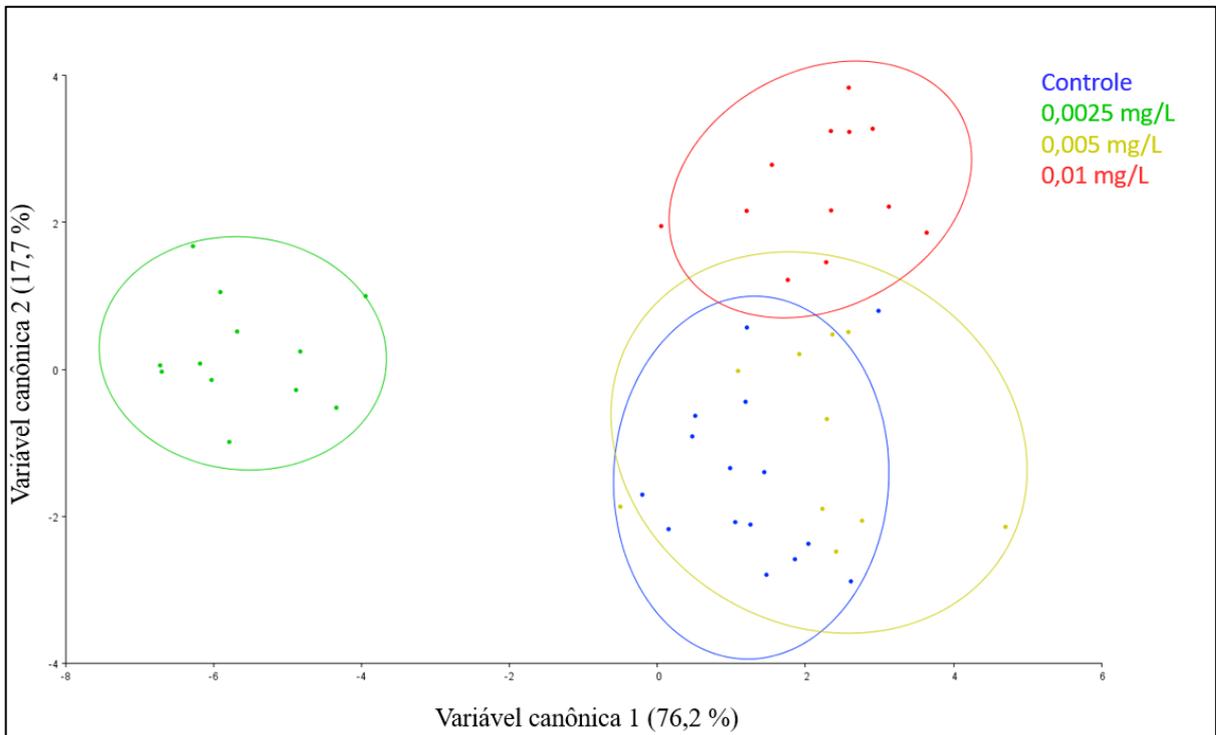
No cenário de simulação térmica correspondente a região N, por sua vez, houve maior sensibilidade a todas as concentrações de Pyriproxyfen aplicadas considerando o TC dos machos sobreviventes (Figura 57). Houve evidências de que os machos sobreviventes ao Pyriproxyfen têm asas menores do que os machos que se desenvolvem em ambiente descontaminado, nas condições testadas com as variações térmicas baseadas na região Norte ($p < 0,05$).

Figura 57: Distribuição dos valores de TC para as asas dos machos de *Aedes aegypti* sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen sob as condições térmicas simuladas para a região Norte



A AVC revelou diferenças na forma alar entre os machos sobreviventes à menor concentração de Pyriproxyfen aplicada (0,0025 mg/L) em comparação com os padrões da forma alar de machos dos ambientes descontaminados e as demais concentrações experimentadas (Figura 58). A comparação de forma também se baseou nos valores calculados nas dMs, a qual demonstrou que a maior diferença encontrada foi entre os machos sobreviventes à 0,0025 mg/L e 0,01 mg/L ($dM = 8,12$, $p < 0,0001$), enquanto a maior similaridade foi observada para as formas alares dos machos sobreviventes a 0,005 mg/L e os indivíduos dos experimentos controle ($dM = 2,84$, $p = 0,0024$).

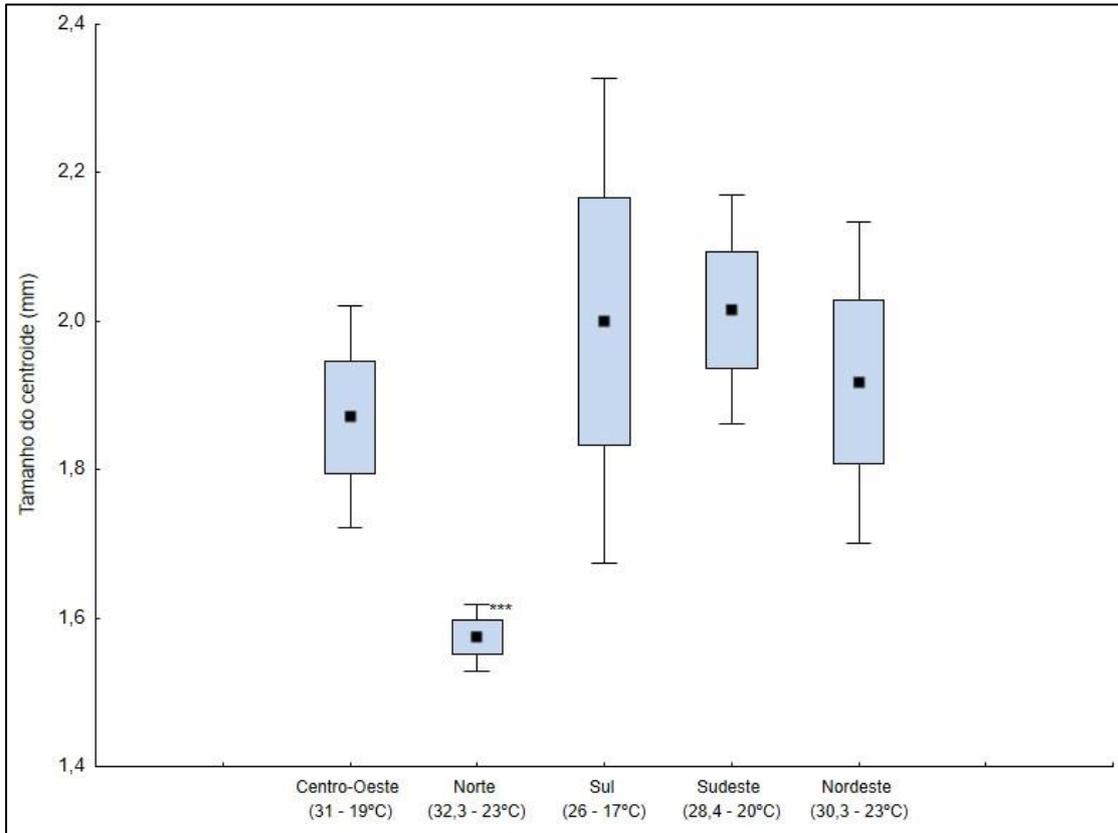
Figura 58: Morfoespaço de variáveis canônicas mais representativas para as asas de machos de *Aedes aegypti* sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen sob as condições térmicas simuladas para a região Norte com alometria



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

A alometria foi baixa e não foi significativa (2,5%, $p = 0,2683$), o que indica que não há evidências de que o tamanho tenha influência sobre a forma para as asas dos machos sobreviventes a diferentes concentrações de Pyriproxyfen sob as condições térmicas simuladas para a região N. Entre os machos, os indivíduos expostos a 0,0025 mg/L de Pyriproxyfen nas condições térmicas simuladas para a região Norte apresentaram o menor tamanho médio do centroide, sendo significativamente menor que os TC dos machos de todas as outras regiões ($p < 0,001$ em todas as comparações), o que é evidente visualmente por meio da Figura 59. A mesma relação foi observada na comparação entre os TC dos machos sobreviventes a 0,005 mg/L ($p < 0,001$ em todas as comparações). Em resposta a 0,01 mg/L, não houve evidência de que o tamanho dos centroides alares dos machos das condições térmicas de S, SE e CO tenham sido diferentes entre si ($p > 0,05$ no teste *post hoc* de Tukey).

Figura 59: Tamanhos do centroide alares dos machos de *Aedes aegypti* expostos a 0,0025 mg/L sob diferentes condições térmicas



Fonte: Elaborado pela autora (2022).
OBS: Asterisco denota diferença significativa.

De forma geral, é possível notar que o efeito sub-letal do Pyriproxyfen foi menor nos parâmetros alares dos machos do que nas fêmeas considerando todas as condições testadas. Os resultados dos machos na simulação para a região N foi uma exceção, na qual foi observado redução geral do tamanho das asas, mas sem significativo efeito entre os machos em diferentes concentrações do larvicida. Uma explicação possível para essa diferença é o desenvolvimento mais rápido de machos do que de fêmeas para o estágio adulto (protandria), o que significa que os machos têm menor exposição ao larvicida durante o período larval e, conseqüentemente, o efeito sub-letal é menor (MPHO; HOLLOWAY; CALLAGHAN, 2001).

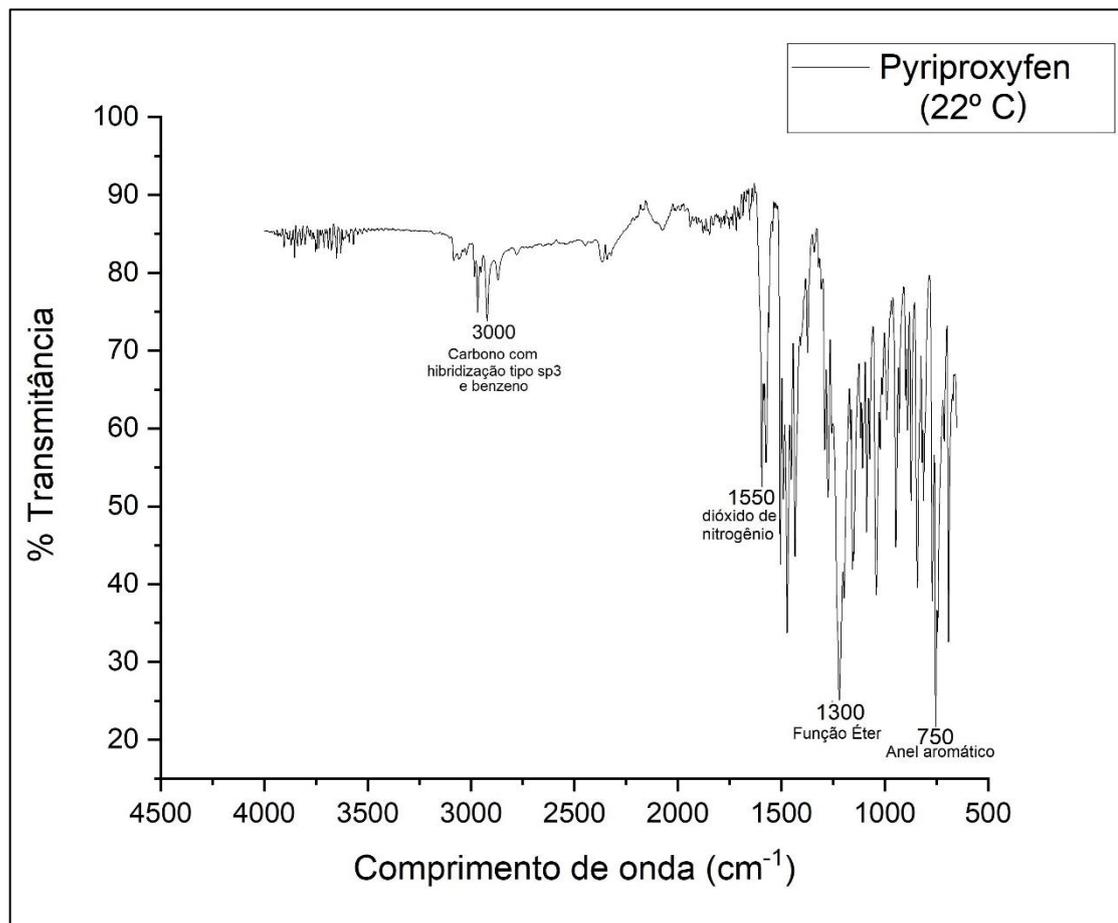
Helinski e Harrington (2014) demonstraram que há evidências de que fêmeas têm fecundidade reduzida após três cópulas com machos pequenos quando comparados com machos grandes sendo observada também depleção de esperma nas fêmeas (JESUS; REISKIND, 2016). É importante destacar que, considerando apenas a primeira cópula, não houve evidências de redução na quantidade de ovos

quando comparados machos grandes e pequenos (HELINSKI; HARRINGTON, 2014). Sendo assim, para os resultados encontrados no presente trabalho, a redução da fecundidade nas fêmeas seria esperada para longo prazo em fêmeas que copulam com machos sobreviventes a alta dose de Pyriproxyfen (0,02 mg/L) na região N, considerando as temperaturas testadas como simulação para essa região. No entanto, outros efeitos devem ser considerados assim como a influência de outras variáveis ambientais na história de vida de machos adultos.

5.4 Caracterização química do Pyriproxyfen em função da temperatura

As amostras de Pyriproxyfen utilizadas na análise com espectrofotômetro demonstraram transmitância dos grupamentos químicos esperados para tal composto, considerando temperatura ambiente sem exposição luminosa. Como pode ser visto por meio da Figura 60, há expressiva transmitância nos comprimentos de onda 1550, 1300 e 750 que correspondem aos grupamentos de dióxido de nitrogênio (NO_2), função éter (-O-) e anel aromático (C_6H_6) respectivamente, sendo todas essas ligações fortes. Vale ainda destacar a presença de segundo anel aromático na estrutura, indicado pela posição 3000 cm^{-1} no comprimento de onda.

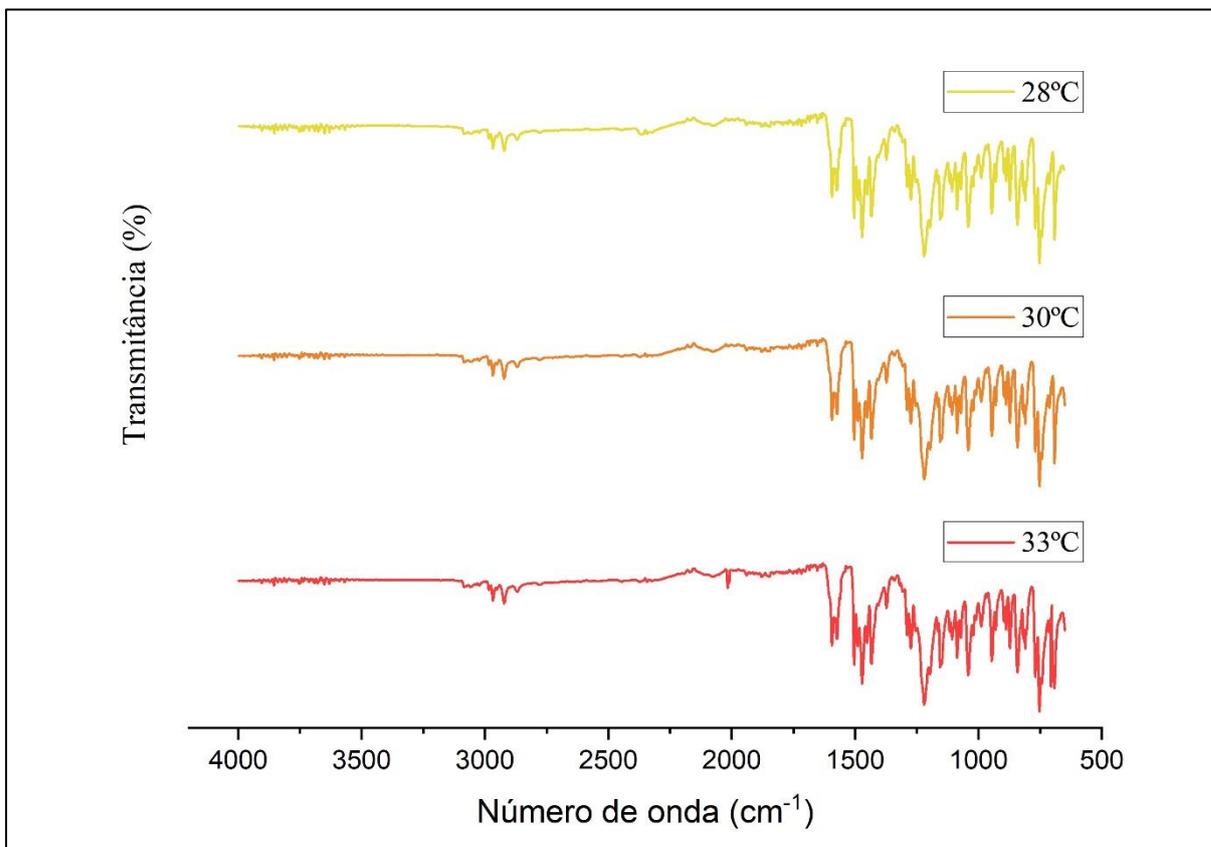
Figura 60: Porcentagem de transmitância de radiação infravermelha de amostra do Pyriproxyfen após análise em espectrometria



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

A análise por FTIR realizada com ambas amostras de Sumilarv 0.5G® e de Pyriproxyfen de alta pureza demonstrou alta estabilidade dos grupamentos orgânicos em função das temperaturas expostas. Adicionalmente, não há evidências de que o tempo de exposição das amostras tenha resultado em alguma modificação dos grupamentos químicos como resposta das temperaturas utilizadas, o que pode ser visto por meio da Figura 61. Qualitativamente, é possível apontar uma expressão menor de transmitância na posição 3000 do comprimento de onda correspondente a um anel benzênico, entretanto é inconclusivo apontar algum tipo de degradação por este método apenas.

Figura 61: Porcentagem de transmitância de radiação infravermelha de amostras de Pyriproxyfen expostas a diferentes temperaturas por mais de uma semana



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

O Pyriproxyfen é um composto cujo modo de ação se destaca pela sua especificidade: ao ser análogo ao hormônio juvenil, o risco de aplicação é reduzido quando se considera a possibilidade de efeitos negativos em organismos não alvo. Além disso, torna-se seguro para aplicação em água potável o que é uma excelente vantagem na aplicação especialmente em locais cuja população humana carece de recursos básicos e tanto o desperdício de água potável quanto a ocorrência de arboviroses são fatores de risco muito grandes.

Conforme observado pelos resultados da análise por FTIR, o Pyriproxyfen apresenta alta estabilidade química por ligações fortes que também ocorrem devido ser composto por anéis aromáticos. Em comparação com a estrutura acíclica dos sesquiterpenoides que compõe o hormônio juvenil natural dos insetos, o Pyriproxyfen também é mais quimicamente estável. Entretanto, é importante destacar que tal estabilidade se confere em situação ideal e, nesse sentido, diversos parâmetros ambientais podem ser considerados como fatores passíveis de influenciar neste equilíbrio.

O presente trabalho testou se há diferença dos padrões de transmitância de radiação infravermelha como forma de identificar mudanças dos grupamentos químicos que naturalmente caracterizam o Pyriproxyfen. Entretanto apesar de não se ter observado nenhuma evidência de degradação por este método, não se pode desconsiderar influência de outros fatores não experimentados no período deste trabalho, mas que estão presentes no campo e fazem parte da realidade.

Trabalhos na literatura indicam que há diferença na estabilidade química que o composto demonstra em solução aquosa quando comparado ao soluto seco, no qual há maior volatilidade em ambiente aquático (DEVILLERS, 2020; SULLIVAN; GOH, 2008). Além disso, a combinação de diferentes fatores também influencia na estabilidade química do larvicida. O efeito da luminosidade sobre a degradação do Pyriproxyfen foi estudada por Kodaka et al. (2011) em sistemas com sedimento composto por areia (66%), argila (22%) e matéria orgânica (12%). Os autores encontraram diferença significativa de fotodegradação em separação de subprodutos do composto em sistema iluminado, simulando a luz natural do dia (KODAKA et al., 2011). As cargas orgânicas no ambiente também são fonte de influência sobre a disponibilidade do larvicida, uma vez que a matéria orgânica potencialmente adsorve o larvicida. Em experimentos conduzidos por Schaefer, Dupras e Mulligan (1991) utilizando Pyriproxyfen em lagoas de estabilização, amostras de fragmentos orgânicos flutuantes e de efluente foram coletadas antes da aplicação do composto e após 1, 4 e 8 dias e em um intervalo semanal durante 2 meses. Os autores identificaram o composto nas amostras de matéria orgânica e redução da concentração no efluente, identificando tempo de meia-vida em 7,47 dias nas condições de experimento aplicadas (SCHAEFER; DUPRAS; MULLIGAN, 1991).

No entanto, é importante destacar que os trabalhos anteriores que testaram diferentes parâmetros ambientais interferentes na degradação do Pyriproxyfen não consideraram se a redução da concentração do composto é acompanhada de diminuição de sua eficiência enquanto larvicida.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A problemática envolvendo as recorrentes epidemias de arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti* é complexa e histórica, especialmente na região tropical, que envolve diferentes atores sociais e diferentes áreas do conhecimento. Na prática, há pouco espaço para o controle das variáveis ambientais que são capazes de interferir em todos os processos relacionados ao ciclo de transmissão. Dessa forma, o trabalho de todas as pessoas envolvidas tem grande importância no resultado final que se espera: a prevenção da ocorrência de epidemias por meio do controle populacional do mosquito.

O objetivo maior da presente tese é em contribuir com o que entendemos sobre a interferência das temperaturas do ambiente na eficiência do larvicida, considerando variações de temperatura que ocorrem naturalmente nos ciclos diários. Apesar de ser uma metodologia limitada no que diz respeito a representar fielmente as flutuações de temperatura, os resultados encontrados que demonstram mudanças na eficiência desse composto devem ser levados em consideração. Para um país de dimensões continentais como o Brasil, a estratégia de aplicação dos larvicidas e adulticidas pode ser adotada com base na regionalização, considerando as peculiaridades de temperatura e monitorando as flutuações para refinar as respostas esperadas de controle larvário.

A forma de aplicação do Sumilarv 0.5G® em campo pelos agentes de controle de endemias é realizada utilizando uma colher dosadora, com duas medidas correspondentes ao tamanho do recipiente a ser tratado: nos grandes, utiliza-se a medida maior (10g) enquanto nos pequenos, aplica-se com o lado da colher de menor volume (1g). Considerando possibilidade de regionalização nas recomendações de aplicação, novas dosagens podem ser determinadas para considerar diferentes peculiaridades (tanto em relação aos recipientes quanto em relação às localidades, no que diz respeito às condições de temperatura esperadas). Nos casos em que a concentração efetiva foi mais baixa (como foi o caso dos resultados encontrados associados às temperaturas da região Sul), pode-se considerar aplicar menor dosagem para atingir nível alto de eficiência. Aplicação de menor concentração do composto é potencialmente positiva, representando menor ameaça para espécies não alvo, maior economia de recursos dos Programas de Controle evitando desperdícios.

Considerando o que se sabe até hoje em relação a suscetibilidade das populações de *Ae. aegypti* em campo ao Pyriproxyfen, poucas populações na região NE exibiram resistência moderada de acordo com o estudo de Campos et al. (2020). Nesse sentido, faz-se necessário continuar monitorando o perfil de resistência local/regional também considerando as flutuações de temperatura desses ambientes. Neste sentido, mais cidades podem ser amostradas para consideração do banco de dados das estações meteorológicas automáticas que abranjam maior alcance em relação a combinação de temperaturas, considerando que diferentes localidades sofrem efeito de diferentes elementos climáticos locais (por exemplo: continentalidade e altitude).

O presente trabalho ressaltou a relação entre o tempo de exposição ao composto e sua eficiência como larvicida em diferentes temperaturas. Para um composto cujo modo de ação não é diretamente tóxico e gera disfunção endócrina, investigações a níveis moleculares em resposta a literatura se fazem importantes para identificar quais os possíveis mecanismos metabólicos estão envolvidos nas mudanças de eficiência observadas. Assim é possível refinar a resposta em respeito a definição de perda de eficiência devido maior eficiência metabólica em função da temperatura ou redução de eficiência devido degradação do composto em maiores temperaturas. Neste último tópico cabe a recomendação a trabalhos futuros que se avalie a perda de eficiência por degradação do composto em solução sob diferentes temperaturas.

7. Conclusões

Hipótese aceita. Os bioensaios cujas médias de temperaturas eram mais baixas corresponderam aos indivíduos mais sensíveis ao composto quando comparados com as respostas de suscetibilidade das larvas em médias de temperatura mais quentes. A variação de temperatura influencia na eficiência do Pyriproxyfen.

- Experimentos de eficiência do composto em diferentes condições de combinações de temperatura:
 - Região Sul > Região Sudeste > Região Norte > Região Nordeste > Região Centro-Oeste
- Experimentos de efeito residual do composto em diferentes condições de combinações de temperatura:
 - Experimentos com as temperaturas simuladas para a região Centro-Oeste evidenciaram redução significativa da eficiência após 15 dias.
- Experimentos avaliando a longevidade de mosquitos sobreviventes à exposição ao Pyriproxyfen não demonstraram evidências de influência da temperatura na longevidade de machos e fêmeas.
 - Em todas as condições testadas, houve evidências de relação dose-dependência na longevidade. Sobreviventes às maiores concentrações tiveram tempo de vida reduzido se comparados aos mosquitos do tratamento controle em cada condição testada.
- A exposição ao Pyriproxyfen e as diferentes variações de temperaturas configuraram estresse ambiental como custo de sobrevivência, o que refletiu em alterações no tamanho das asas e na simetria.
- Entre machos e fêmeas, houve menos diferenças nos efeitos morfológicos para as asas de machos do que para asas de fêmeas. O tempo de exposição de machos é menor que o tempo de exposição de fêmeas devido protandria.
 - Tamanho do centroide alar de fêmeas expostas a 0,0025 mg/L: Sul > Centro-Oeste > Sudeste > Norte
 - Tamanho do centroide alar de fêmeas expostas a 0,005 mg/L: Sudeste > Sul > Nordeste > Norte
 - Tamanho do centroide alar de fêmeas expostas a 0,01 mg/L:

Centro-Oeste > Sul > Nordeste > Sudeste

- Tamanhos do centroide alar de machos expostos a 0,0025 mg/L e a 0,005 mg/L: Sul = Sudeste > Nordeste > Centro-Oeste > Norte
- Tamanhos do centroide alar de machos expostos a 0,01 mg/L: Sul = Sudeste = Centro-Oeste.
- Houve evidência de assimetria flutuante em todas as condições térmicas para as asas de fêmeas, com exceção daquelas provindas de simulação à região Centro-Oeste, cujas fêmeas sobreviventes a maior concentração apresentou assimetria somente. O efeito alométrico nas asas das fêmeas foi baixo.
 - Nível de alometria entre as fêmeas: N (8,32%) > SE (6,2%) > NE (5,83%) > CO (5,4%) > S (2,02%).
- Não houve evidências de que a combinação entre as temperaturas e as concentrações do larvicida produzem assimetria nas asas de mosquitos machos. O efeito alométrico também foi baixo para machos nos experimentos:
 - Nível de alometria entre os machos: NE (4,48%) > SE (3,1%) > CO (2,84%) > S (2,7%) > N (2,5%).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. **Italian Journal of Zoology**, v. 71, n. 1, p. 5–16, 2004.
- AHMED, T. H.; RANDOLPH SAUNDERS, T.; MULLINS, D.; RAHMAN, M. Z.; ZHU, J. Molecular action of pyriproxyfen: Role of the methoprene-tolerant protein in the pyriproxyfen-induced sterilization of adult female mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1–27, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008669>>.
- ALOMAR, A. A.; EASTMOND, B. H.; ALTO, B. W. Juvenile hormone analog enhances Zika virus infection in *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, p. 1–9, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-00432-1>>.
- ALTO, B. W.; REISKIND, M. H.; LOUNIBOS, L. P. Size alters susceptibility of vectors to dengue virus infection and dissemination. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 688–695, 2008a.
- ALTO, B. W.; REISKIND, M. H.; LOUNIBOS, L. P. Size Alters Susceptibility of Vectors to Dengue Virus Infection and Dissemination. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 688–695, 2008b.
- ALVES, S. N.; PUJONI, D. G. F.; MOCELIN, G.; MELO, A. L.; SERRÃO, J. E. Evaluation of *Culex quinquefasciatus* wings asymmetry after exposure of larvae to sublethal concentration of ivermectin. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 3483–3488, 2020.
- ANDRIOLI, D. C.; BUSATO, M. A.; LUTINSKI, J. A. Spatial and temporal distribution of dengue in Brazil, 1990 - 2017. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, p. 1–13, 2020.
- ARAMBOUROU, H.; BEISEL, J. N.; BRANCHU, P.; DEBAT, V. Patterns of Fluctuating Asymmetry and Shape Variation in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) Exposed to Nonylphenol or Lead. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–12, 2012.
- ARMBRUSTER, P.; HUTCHINSON, R. A. Pupal mass and wing length as indicators of fecundity in *Aedes albopictus* and *Aedes geniculatus* (diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 4, p. 699–704, 2002.
- ATKINSON, D. Temperature and Organism Size— A Biological Law for Ectotherms? **Advances in Ecological Research**, v. 25, n. C, p. 1–58, 1994.
- BELINATO, T. A.; VALLE, D. The impact of selection with Diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, on the fitness of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–19, 2015.
- BELLINI, R.; PUGGIOLI, A.; BALESTRINO, F.; BRUNELLI, P.; MEDICI, A.; URBANELLI, S.; CARRIERI, M. Sugar administration to newly emerged *Aedes albopictus* males increases their survival probability and mating performance. **Acta Tropica**, v. 132, n. 1, p. S116–S123, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.022>>.
- BESERRA, E. B.; DE FREITAS, E. M.; DE SOUZA, J. T.; FERNANDES, C. R. M.; SANTOS, K. D. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia Série Zoologia**, v. 99, n. 3, p. 281–285, 2009.
- BOOKSTEIN, F. L. A method of factor analysis for shape coordinates. **American Journal of**

Physical Anthropology, v. 164, n. 2, p. 221–245, 2017.

BOZINOVIC, F.; CATALAN, T. P.; ESTAY, S. A.; SABAT, P. Acclimation to daily thermal variability drives the metabolic performance curve. **Evolutionary Ecology Research**, v. 15, n. 5, p. 579–587, 2013.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 295–302, 2007. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000400007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

BRIEGEL, H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n. 3, p. 165–172, 1990.

BROWN, J. E.; EVANS, B. R.; ZHENG, W.; OBAS, V.; BARRERA-MARTINEZ, L.; EGIZI, A.; ZHAO, H.; CACCONE, A.; POWELL, J. R. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**, v. 68, n. 2, p. 514–525, 2014.

BUCKNER, E. A.; ALTO, B. W.; LOUNIBOS, L. P. Larval temperature-food effects on adult mosquito infection and vertical transmission of dengue-1 virus. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 1, p. 91–98, 2016.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Defining hormesis. **Human and Experimental Toxicology**, v. 21, n. 2, p. 91–97, 2002.

CAMPOS, K. B.; MARTINS, A. J.; RODOVALHO, C. de M.; BELLINATO, D. F.; DIAS, L. dos S.; MACORIS, M. de L. da G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; LIMA, J. B. P.; OBARA, M. T. Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a nation-wide monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–18, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04406-6>>.

CARRINGTON, L. B.; ARMIJOS, M. V.; LAMBRECHTS, L.; BARKER, C. M.; SCOTT, T. W. Effects of Fluctuating Daily Temperatures at Critical Thermal Extremes on *Aedes aegypti* Life-History Traits. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

CHAN, M.; JOHANSSON, M. A. The Incubation Periods of Dengue Viruses. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–7, 2012.

CHITOLINA, R. F.; ANJOS, F. A.; LIMA, T. S.; CASTRO, E. A. Acta Tropica Raw sewage as breeding site to *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, culicidae). **Acta Tropica**, v. 164, p. 290–296, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.07.013>>.

COLINET, H.; SINCLAIR, B. J.; VERNON, P.; RENAULT, D. Insects in fluctuating thermal environments. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 123–140, 2015.

COMBES, S. A.; DANIEL, T. L. Flexural stiffness in insect wings I. Scaling and the influence of wing venation. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 17, p. 2979–2987, 2003.

COSTANZO, K. S.; SCHELBLE, S.; JERZ, K.; KEENAN, M. The effect of photoperiod on life history and blood-feeding activity in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 40, n. 1, p. 164–171, 2015.

COURET, J.; DOTSON, E.; BENEDICT, M. Q. Temperature, larval diet, and density effects

on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

DA SILVA, J. J.; MENDES, J.; LOMÔNACO, C. Effects of sublethal concentrations of diflufenzuron and methoprene on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) fitness. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 29, n. 1, p. 17–23, 2009.

DAVID, M. R.; GARCIA, G. A.; VALLE, D.; MACIEL-DE-FREITAS, R. Insecticide resistance and fitness: the caso of four *Aedes aegypti* populations from different brazilian regions. **BioMed research international**, v. 2018, p. 6257860, 2018.

DE NADAI, B. L.; MALETZKE, A. G.; CORBI, J. J.; BATISTA, G. E. A. P. A.; REISKIND, M. H. The impact of body size on *Aedes [Stegomyia] aegypti* wingbeat frequency: implications for mosquito identification. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 35, n. 4, p. 617–624, 2021.

DEANS, C.; HUTCHISON, W. D. Hormetic and transgenerational effects in spotted-wing *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) in response to three commonly-used insecticides. **PLoS ONE**, v. 17, n. 7 July, p. 1–22, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0271417>>.

DELATTE, H.; GIMONNEAU, G.; TRIBOIRE, A.; FONTENILLE, D. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the indian ocean. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 1, p. 33–41, 2009.

DEVILLERS, J. Fate and ecotoxicological effects of pyriproxyfen in aquatic ecosystems. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 14, p. 16052–16068, 2020.

DICKENS, B. L.; SUN, H.; JIT, M.; COOK, A. R.; CARRASCO, L. R. Determining environmental and anthropogenic factors which explain the global distribution of *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. **BMJ Global Health**, v. 3, n. 4, p. 1–11, 2018.

DICKSON, L. B.; JIOLLE, D.; MINARD, G.; MOLTINI-CONCLOIS, I.; VOLANT, S.; GHOZLANE, A.; BOUCHIER, C.; AYALA, D.; PAUPY, C.; MORO, C. V.; LAMBRECHTS, L. Carryover effects of larval exposure to different environmental bacteria drive adult trait variation in a mosquito vector. **Science Advances**, v. 3, n. 8, p. 1–14, 2017.

DOS SANTOS DIAS, L.; MACORIS, M. D. L. D. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M. O.; OTRERA, V. C. G.; DIAS, A. D. S.; BAUZER, L. G. S. D. R.; RODOVALHO, C. D. M.; MARTINS, A. J.; LIMA, J. B. P. Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–15, 2017.

DU, S.; LIU, Y.; LIU, J.; ZHAO, J.; CHAMPAGNE, C.; TONG, L.; ZHANG, R.; ZHANG, F.; QIN, C. F.; MA, P.; CHEN, C. H.; LIANG, G.; LIU, Q.; SHI, P. Y.; CAZELLES, B.; WANG, P.; TIAN, H.; CHENG, G. *Aedes* mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-09256-0>>.

DUBROVSKY, E. B. Hormonal cross talk in insect development. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 1, p. 6–11, 2005.

DUJARDIN, J. P. Morphometrics applied to medical entomology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 875–890, 2008.

- FARJANA, T.; TUNO, N. Multiple blood feeding and host-seeking behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 4, p. 838–846, 2013.
- FARNESI, L. C.; BARBOSA, C. S.; ARARIPE, L. O.; BRUNO, R. V. The influence of a light and dark cycle on the egg laying activity of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 4, p. 4–9, 2018.
- FENG, W. Bin; BONG, L. J.; DAI, S. M.; NEOH, K. B. Effect of imidacloprid exposure on life history traits in the agricultural generalist predator *Paederus* beetle: Lack of fitness cost but strong hormetic effect and skewed sex ratio. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, n. November 2018, p. 390–400, 2019.
- GARCIA, G. D. A.; DAVID, M. R.; MARTINS, A. D. J.; MACIEL-DE-FREITAS, R.; GERLINDE, J.; LINSS, B.; ARAU, S. C.; LIMA, B. P.; VALLE, D. The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance : The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–20, 2018.
- GENTA, F. A.; BRAGATTO, I.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Purification, characterization and sequencing of the major β -1,3-glucanase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 12, p. 861–874, 2009.
- GLORIA-SORIA, A.; AYALA, D.; BHEECARRY, A.; CALDERON-ARGUEDAS, O.; CHADEE, D. D.; CHIAPPERO, M.; COETZEE, M.; ELAHEE, K. Bin; FERNANDEZ-SALAS, I.; KAMAL, H. A.; KAMGANG, B.; KHATER, E. I. M.; KRAMER, L. D.; KRAMER, V.; LOPEZ-SOLIS, A.; LUTOMIAH, J.; MARTINS, A.; MICIELI, M. V.; PAUPY, C.; PONLAWAT, A.; RAHOLA, N.; RASHEED, S. B.; RICHARDSON, J. B.; SALEH, A. A.; SANCHEZ-CASAS, R. M.; SEIXAS, G.; SOUSA, C. A.; TABACHNICK, W. J.; TROYO, A.; POWELL, J. R. Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 21, p. 5377–5395, 2016.
- GÓMEZ, A.; SECCACINI, E.; ZERBA, E.; LICASTRO, S. Comparison of the insecticide susceptibilities of laboratory strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 993–996, 2011.
- GRAHAM, J. H.; RAZ, S.; HEL-OR, H.; NEVO, E. Fluctuating asymmetry: Methods, theory, and applications. **Symmetry**, v. 2, n. 2, p. 466–540, 2010.
- GUBLER, D. J. Dengue , Urbanization and Globalization : The Unholy Trinity of the 21 st Century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4, p. 3–11, 2011.
- GUBLER, D. J. Potential yellow fever epidemics in unexposed populations. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 96, n. 299, p. 1, 2018.
- GUEDES, R. N. C.; RIX, R. R.; CUTLER, G. C. Pesticide-induced hormesis in arthropods: Towards biological systems. **Current Opinion in Toxicology**, v. 29, p. 43–50, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2022.02.001>>.
- GUEDES, R. N. C.; WALSE, S. S.; THRONE, J. E. Sublethal exposure, insecticide resistance, and community stress. **Current Opinion in Insect Science**, v. 21, n. 16, p. 47–53, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2017.04.010>>.
- GUTIÉRREZ, E. H. J.; WALKER, K. R.; ERNST, K. C.; RIEHLE, M. A.; DAVIDOWITZ, G. Size as a proxy for survival in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 4, p. 1228–1238, 2020.
- HASSELL, J. M.; BEGON, M.; WARD, M. J.; FÈVRE, E. M. Urbanization and Disease

Emergence: Dynamics at the Wildlife–Livestock–Human Interface. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 55–67, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>>.

HELINSKI, M. E. H.; HARRINGTON, L. C. Male Mating History and Body Size Influence Female Fecundity and Longevity of the Dengue Vector *Aedes*. **Journal of Medical Entomology**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

HUSTEDT, J. C.; BOYCE, R.; BRADLEY, J.; HII, J.; ALEXANDER, N. Use of pyriproxyfen in control of aedes mosquitoes: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 6, p. 1–18, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008205>>.

JAGER, T.; CROMMENTUIJN, T.; VAN GESTEL, C. A. M.; KOOIJMAN, S. A. L. M. Simultaneous modeling of multiple end points in life-cycle toxicity tests. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 10, p. 2894–2900, 2004.

JAMES, F. C. Geographic Size Variation in Birds and Its Relationship to Climate. **Ecology**, v. 51, n. 3, p. 365–390, 1970.

JESUS, C. E. De; REISKIND, M. H. The importance of male body size on sperm uptake and usage , and female fecundity in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Parasites & Vectors**, p. 1–7, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1734-8>>.

JINDRA, M.; TUMOVA, S.; MILACEK, M.; BITTOVA, L. **A decade with the juvenile hormone receptor**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2021. 1–49 p.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; THONGRUNGKIAT, S.; APIWATHNASORN, C.; SINGHANIYOM, S.; BELLEC, C.; DUJARDIN, J. P. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 11, p. 1354–1360, 2007.

JULIANO, S. A.; RIBEIRO, G. S.; MACIEL-DE-FREITAS, R.; CASTRO, M. G.; CODEÇO, C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; LOUNIBOS, L. P. She's a femme fatale: Low-density larval development produces good disease vectors. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 8, p. 1070–1077, 2014.

KAMIYA, T.; GREISCHAR, M. A.; WADHAWAN, K.; GILBERT, B.; PAAIJMANS, K.; MIDEO, N. Temperature-dependent variation in the extrinsic incubation period elevates the risk of vector-borne disease emergence. **Epidemics**, v. 30, n. December 2019, p. 100382, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.epidem.2019.100382>>.

KHAWALED, K.; COHEN, T.; ZARITSKY, A. Digestion of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis spores by larvae of *Aedes aegypti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, n. 2, p. 186–189, 1992.

KLINGENBERG, C. P. A Developmental Perspective on Developmental Instability: Theory. **Developmental instability: causes and consequences**, n. February, p. 14, 2003.

KLINGENBERG, C. P. Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: Concepts, methods, and applications. **Symmetry**, v. 7, n. 2, p. 843–934, 2015.

KODAKA, R.; SWALES, S. E.; LEWIS, C.; KATAGI, T. Effect of illumination on degradation of pyriproxyfen in water-sediment system. **Journal of Pesticide Science**, v. 36, n. 1, p. 33–40, 2011. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jpestics/G10-56?from=CrossRef>>.

KOENRAADT, C. J. M. Pupal dimensions as predictors of adult size in fitness studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 2, p. 331–336, 2008.

LEES, R. S.; KNOLS, B.; BELLINI, R.; BENEDICT, M. Q.; BHEECARRY, A.; BOSSIN, H. C.; CHADEE, D. D.; CHARLWOOD, J.; DABIRÉ, R. K.; DJOGBENOU, L.; EGYIR-YAWSON, A.; GATO, R.; GOUAGNA, L. C.; HASSAN, M. M.; KHAN, S. A.; KOEKEMOER, L. L.; LEMPERIERE, G.; MANOUKIS, N. C.; MOZURAITIS, R.; PITTS, R. J.; SIMARD, F.; GILLES, J. R. L. Review: Improving our knowledge of male mosquito biology in relation to genetic control programmes. **Acta Tropica**, v. 132, n. 1, p. S2–S11, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.005>>.

LEISNHAM, P. T.; TOWLER, L.; JULIANO, S. A. Geographic variation of photoperiodic diapause but not adult survival or reproduction of the invasive mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in North America. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 6, p. 1309–1318, 2011.

LEYTON RAMOS, L. M.; AGUIRRE OBANDO, O. A.; DUQUE, J. E.; GARCÍA-MERCHÁN, V. H. Effect of altitude on wing metric variation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in a region of the Colombian Central Andes. **PLoS ONE**, v. 15, n. 8 August, p. 1–15, 2020.

LORENZ, C.; ALMEIDA, F.; ALMEIDA-LOPES, F.; LOUISE, C.; PEREIRA, S. N.; PETERSEN, V.; VIDAL, P. O.; VIRGINIO, F.; SUESDEK, L. Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 54, p. 205–215, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.029>>.

LORENZ, C.; SUESDEK, L. The use of wing shape for characterising macroevolution in mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 77, n. September 2019, p. 104052, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104052>>.

LOUNIBOS, L. P.; NISHIMURA, N.; CONN, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. life history correlates of adult size in the malaria vector *Anopheles darlingi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 6, p. 769–774, 1995.

LUNA, J. E. D.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F. Dos; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA, M. A. Susceptibility of *Aedes aegypti* to Temephos and Cypermethrin Insecticides, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 842–843, 2004.

MACORIS, M. de L.; MARTINS, A. J.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; LIMA, J. B. P.; VALLE, D. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2018.

MALTBY, L. Studying stress : The importance of organism-level responses. **Ecological Applications**, v. 9, n. 2, p. 431–440, 1999.

MARINI, G.; MANICA, M.; ARNOLDI, D.; INAMA, E.; ROSÀ, R.; RIZZOLI, A. Influence of temperature on the life-cycle dynamics of *Aedes albopictus* population established at temperate latitudes: A laboratory experiment. **Insects**, v. 11, n. 11, p. 1–17, 2020.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, p. 155–163, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>>.

MBARE, O.; LINDSAY, S. W.; FILLINGER, U. Dose–response tests and semi-field

evaluation of lethal and sub-lethal effects of slow release pyriproxyfen granules (Sumilarv. **Malaria Journal**, v. 12, p. 1–12, 2013. Disponível em: <<http://www.malariajournal.com/content/12/1/94>>.

MOHAMMED, A.; CHADEE, D. D. Effects of different temperature regimens on the development of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 119, n. 1, p. 38–43, 2011.

MOURA, L.; DE NADAI, B. L.; BERNEGOSI, A. C.; FELIPE, M. C.; CASTRO, G. B.; CORBI, J. J. Be quick or be dead: high temperatures reduce *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larval development time and pyriproxyfen larvicide efficiency in laboratory conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 41, n. 2, p. 1667–1672, 2021.

MOURA, L.; DE NADAI, B. L.; CORBI, J. J. What does not kill it does not always make it stronger: High temperatures in pyriproxyfen treatments produce *Aedes aegypti* adults with reduced longevity and smaller females: Effects of pyriproxyfen on life history traits of *Aedes aegypti*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 2, p. 529–535, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.04.001>>.

MPHO, M.; HOLLOWAY, G. J.; CALLAGHAN, A. Fluctuating wing asymmetry and larval density stress in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, p. 279–283, 2000.

MPHO, M.; HOLLOWAY, G. J.; CALLAGHAN, A. A comparison of the effects of organophosphate insecticide exposure and temperature stress on fluctuating asymmetry and life history traits in *Culex quinquefasciatus*. **Chemosphere**, v. 45, p. 713–720, 2001.

MULVEY, J.; CRESSWELL, J. E. Time-dependent effects on bumble bees of dietary exposures to farmland insecticides (imidacloprid, thiamethoxam and fipronil). **Pest Management Science**, v. 76, n. 8, p. 2846–2853, 2020.

MUTURI, E. J.; ALTO, B. W. Larval environmental temperature and insecticide exposure alter *Aedes aegypti* competence for arboviruses. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1157–1163, 2011. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vbz.2010.0209>>.

NØRGAARD, L. S.; ÁLVAREZ-NORIEGA, M.; MCGRAW, E.; WHITE, C. R.; MARSHALL, D. J. Predicting the response of disease vectors to global change: The importance of allometric scaling. **Global Change Biology**, v. 28, n. 2, p. 390–402, 2022.

NORIEGA, F. G. Nutritional regulation of JH synthesis: A mechanism to control reproductive maturation in mosquitoes? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 687–693, 2004.

NOYES, P. D.; MCELWEE, M. K.; MILLER, H. D.; CLARK, B. W.; VAN TIEM, L. A.; WALCOTT, K. C.; ERWIN, K. N.; LEVIN, E. D. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. **Environment International**, v. 35, n. 6, p. 971–986, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.006>>.

OHASHI, K. Control of mosquito larvae in catch basins using pyriproxyfen and the mechanism underlying residual efficacy. **Medical Entomology and Zoology**, v. 68, n. 4, p. 127–135, 2017.

OLIVA, C. F.; DAMIENS, D.; BENEDICT, M. Q. Male reproductive biology of *Aedes*

mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 132, n. 1, p. S12–S19, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.021>>.

PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L. C. Factors associated with male mating success of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 3, p. 395–400, 2009.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. August, p. 11–17, 2013.

PRADO, G. P.; MACIEL, J. S.; LEITE, G. R.; SOUZA, M. A. A. Influence of shading and pedestrian traffic on the preference of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) for oviposition microenvironments. **Journal of Vector Ecology**, v. 42, n. 1, p. 155–160, 2017.

PRADO, I.; LIMA-CAMARA, T. N.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F.; PARRA, M. C. P.; DIBO, M. R.; NOGUEIRA, M. L.; LORENZ, C. Spatial analysis of the wing shape of *Aedes aegypti* mosquito in an endemic dengue area of São Paulo, Brazil. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 42, n. 2, p. 1561–1568, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42690-021-00677-3>>.

PRICE, D. P.; SCHILKEY, F. D.; ULANOV, A.; HANSEN, I. A. Small mosquitoes, large implications: Crowding and starvation affects gene expression and nutrient accumulation in *Aedes aegypti*. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2015.

PROCTOR, A. H.; KING, C. K.; HOLAN, J. R.; WOTHERSPOON, S. J. Integrated Modeling of Survival Data from Multiple Stressor Ecotoxicology Experiments. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 7271–7277, 2017.

REISKIND, M. H.; ZARRABI, A. A. Is bigger really bigger? Differential responses to temperature in measures of body size of the mosquito, *Aedes albopictus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 7, p. 911–917, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.04.006>>.

REUSS, F.; WIESER, A.; NIAMIR, A.; BÁLINT, M.; KUCH, U.; PFENNINGER, M.; MÜLLER, R. Thermal experiments with the Asian bush mosquito (*Aedes japonicus japonicus*) (Diptera: Culicidae) and implications for its distribution in Germany. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

RIDDIFORD, L. M. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? **General and Comparative Endocrinology**, v. 179, n. 3, p. 477–484, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.06.001>>.

RITCHIE, S. A.; PATON, C.; BUHAGIAR, T.; WEBB, G. A.; JOVIC, V. Residual treatment of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in containers using pyriproxyfen slow-release granules (Sumilarv 0.5G). **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 5, p. 1169–1172, 2013.

RIVAS, G. B. S.; TELES-DE-FREITAS, R.; PAVAN, M. G.; LIMA, J. B. P.; PEIXOTO, A. A.; BRUNO, R. V. Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors. **Journal of Biological Rhythms**, v. 33, n. 3, p. 272–288, 2018.

RODHAIN, F. Yellow fever: A brief history of a tropical Virosis. **La Presse Médicale**, v. 51, n. 3, p. 104132, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lpm.2022.104132>>.

RYAN, S. J.; CARLSON, C. J.; MORDECAI, E. A.; JOHNSON, L. R. Global expansion and redistribution of *Aedes*-borne virus transmission risk with climate change. **PLoS neglected**

tropical diseases, v. 13, n. 3, p. e0007213, 2019.

RYAN, S. J.; CARLSON, C. J.; TESLA, B.; BONDS, M. H.; NGONGHALA, C. N.; MORDECAI, E. A.; JOHNSON, L. R.; MURDOCK, C. C. Warming temperatures could expose more than 1.3 billion new people to Zika virus risk by 2050. **Global Change Biology**, v. 27, n. 1, p. 84–93, 2021.

SALINAS, W. S.; FERIA-ARROYO, T. P.; VITEK, C. J. Temperatures Influence Susceptibility to Insecticides in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae) Mosquitoes. **Pathogens**, v. 10, n. 992, p. 9, 2021.

SANTOS, V. S. V. ir.; LIMONGI, J. E.; PEREIRA, B. B. Association of low concentrations of pyriproxyfen and spinosad as an environment-friendly strategy to rationalize *Aedes aegypti* control programs. **Chemosphere**, v. 247, p. 125795, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125795>>.

SASMITA, H. I.; TU, W. C.; BONG, L. J.; NEOH, K. B. Effects of larval diets and temperature regimes on life history traits , energy reserves and temperature tolerance of male *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) : optimizing rearing techniques for the sterile insect programmes. **Parasites & Vectors**, p. 1–16, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3830-z>>.

SCHAEFER, C. H.; DUPRAS, E. F.; MULLIGAN, F. S. Studies on the environmental persistence of S-31183 (pyriproxyfen): Adsorption onto organic matter and potential for leaching through soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 21, n. 2, p. 207–214, 1991.

SCHAEFER, C. H.; MIURA, T.; DUPRAS, E. F.; MULLIGAN, F. S.; WILDER, W. H. Efficacy, nontarget effects, and chemical persistence of S-31183, a promising mosquito (Diptera: Culicidae) control agent. **Journal of economic entomology**, v. 81, n. 6, p. 1648–1655, 1988.

SECCACINI, E.; JUAN, L.; ZERBA, E.; LICASTRO, S. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): evaluation of natural long-lasting materials containing pyriproxyfen to improve control strategies. **Parasitology research**, v. 113, n. 9, p. 3355–3360, 2014.

SENDAYDIEGO, J. P.; TORRES, M. A. J.; DEMAYO, C. G. Describing wing geometry of *Aedes aegypti* using Lnadmark-based geometric morphometric. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, n. 4, p. 379–383, 2013.

SIDDALL, J. B. Insect growth regulators and insect control: A critical appraisal. **Environmental Health Perspectives**, v. vol.14, n. April, p. 119–126, 1976.

SIHUINCHA, M.; ZAMORA-PEREA, E.; ORELLANA-RIOS, W.; STANCIL, J. D.; LÓPEZ-SIFUENTES, V.; VIDAL-ORÉ, C.; DEVINE, G. J. Potential use of Pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 620–630, 2005.

SIMOY, M. I.; SIMOY, M. V.; CANZIANI, G. A. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. **Ecological Modelling**, v. 314, p. 100–110, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.07.007>>.

SINGH, P.; PANDE, V.; DHIMAN, R. C. Revisiting the Impact of Temperature on Survival of *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* and Implications on Extrinsic Incubation Period. **Journal of Communicable Diseases**, v. 54, n. 1, p. 60–66, 2022.

- SIRAJ, A. S.; OIDTMAN, R. J.; HUBER, J. H.; KRAEMER, M. U. G.; BRADY, O. J.; JOHANSSON, M. A.; PERKINS, T. A. Temperature modulates dengue virus epidemic growth rates through its effects on reproduction numbers and generation intervals. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–19, 2017.
- SOGHIGIAN, J.; GLORIA-SORIA, A.; ROBERT, V.; LE GOFF, G.; FAILLOUX, A. B.; POWELL, J. R. Genetic evidence for the origin of *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito, in the southwestern Indian Ocean. **Molecular Ecology**, v. 29, n. 19, p. 3593–3606, 2020.
- SOUZA, R. S.; DIAZ-ALBITER, H. M.; DILLON, V. M.; DILLON, R. J.; GENTA, F. A. Digestion of yeasts and beta-1,3-glucanases in mosquito larvae: Physiological and biochemical considerations. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–16, 2016.
- SOUZA, R. S.; VIRGINIO, F.; RIBACK, T. I. S.; SUESDEK, L.; BARUFI, J. B.; GENTA, F. A. Microorganism-based larval diets affect mosquito development, size and nutritional reserves in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. APR, 2019.
- STEINWASCHER, K. Competition among *Aedes aegypti* larvae. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. 1–41, 2018.
- STEINWASCHER, K. **Competition and growth among *Aedes aegypti* larvae: Effects of distributing food inputs over time.** [s.l.: s.n.]v. 151–39 p.
- SULLIVAN, J. J.; GOH, K. S. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. **Journal of Pesticide Science**, v. 33, n. 4, p. 339–350, 2008. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpestics/33/4/33_R08-02/_article>.
- TABACHNICK, W. J. Evolutionary Genetics and Arthropod-borne Disease: The Yellow Fever Mosquito. **American Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 14–26, 1991. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ae/article-lookup/doi/10.1093/ae/37.1.14>>.
- TASSOU, K. T.; SCHULZ, R. Combined effects of temperature and Pyriproxyfen stress in a full life-cycle test with *Chironomus riparius* (Insecta). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 10, p. 2384–2390, 2012.
- TELANG, A.; FRAME, L.; BROWN, M. R. Larval feeding duration affects ecdysteroid levels and nutritional reserves regulating pupal commitment in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 854–864, 2007.
- TRAJER, A. J. *Aedes aegypti* in the Mediterranean container ports at the time of climate change: A time bomb on the mosquito vector map of Europe. **Heliyon**, v. 7, n. 9, 2021.
- VALDEZ, L. D.; SIBONA, G. J.; CONDAT, C. A. Impact of rainfall on *Aedes aegypti* populations. **Ecological Modelling**, v. 385, n. July, p. 96–105, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2018.07.003>>.
- VAN DEN BRINK, P. J.; KLEIN, S. L.; RICO, A. Interaction between stress induced by competition, predation, and an insecticide on the response of aquatic invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 9, p. 2485–2492, 2017.
- VAN DEN HEUVEL, M. J. The effect of rearing temperature on the wing length, thorax length, leg length and ovariole number of the adult mosquito, *Aedes aegypti* (L.). **Ecological Entomology**, v. 115, n. 7, p. 197–216, 1963.

VASILAKIS, N.; CARDOSA, J.; HANLEY, K. A.; HOLMES, E. C.; WEAVER, S. C. Fever from the forest: Prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 532–541, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2595>>.

VILLARREAL, S. M.; PITCHER, S.; HELINSKI, M. E. H.; JOHNSON, L.; WOLFNER, M. F.; HARRINGTON, L. C. Male contributions during mating increase female survival in the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 108, n. April, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.05.001>>.

WILKE, A. B. B.; VASQUEZ, C.; CARVAJAL, A.; MEDINA, J.; CHASE, C.; CARDENAS, G.; MUTEBI, J. P.; PETRIE, W. D.; BEIER, J. C. Proliferation of *Aedes aegypti* in urban environments mediated by the availability of key aquatic habitats. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-69759-5>>.

WINT, W.; JONES, P.; KRAEMER, M.; ALEXANDER, N.; SCHAFFNER, F. Past, present and future distribution of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: The European paradox. **Science of the Total Environment**, v. 847, n. April, p. 157566, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157566>>.

WONG, J.; STODDARD, S. T.; ASTETE, H.; MORRISON, A. C.; SCOTT, T. W. Oviposition site selection by the dengue vector *Aedes aegypti* and its implications for dengue control. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, 2011.

XU, Y.; ZHOU, J.; LIU, T.; LIU, P.; WU, Y.; LAI, Z.; GU, J.; CHEN, X. Assessing the risk of spread of Zika virus under current and future climate scenarios. **Biosafety and Health**, v. 4, n. 3, p. 193–204, 2022.

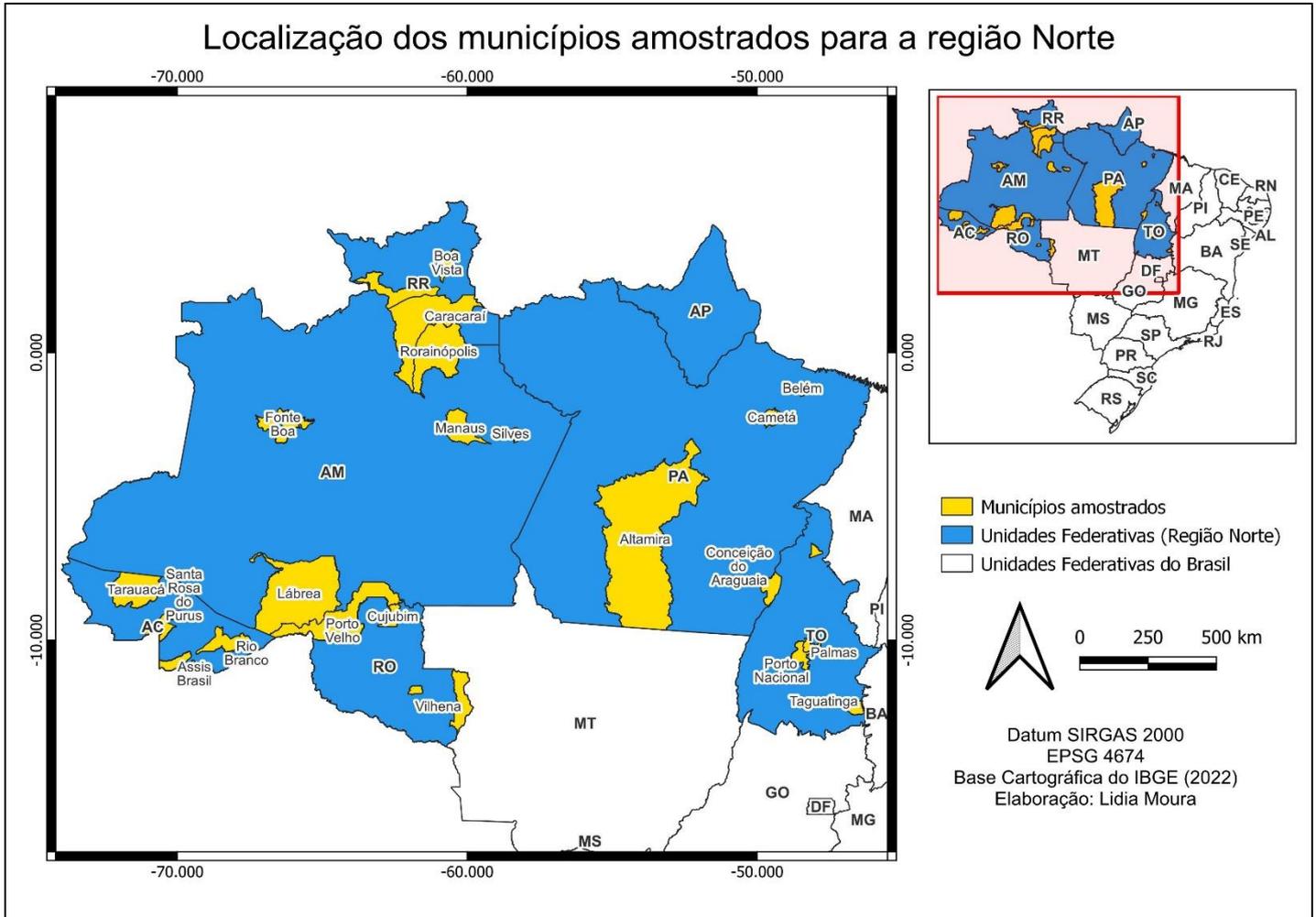
ZARA, A. L. de S. A.; SANTOS, S. M. dos; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016. Disponível em: <http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000200391&scielo=S2237-96222016000200391>.

ZELLER, M.; KOELLA, J. C. Effects of food variability on growth and reproduction of *Aedes aegypti*. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 2, p. 552–559, 2016.

ZHU, J.; NORIEGA, F.G. The role of juvenile hormone in mosquito development and reproduction. **Advances in Insect Physiology**, v. 51, p. 93 – 113.

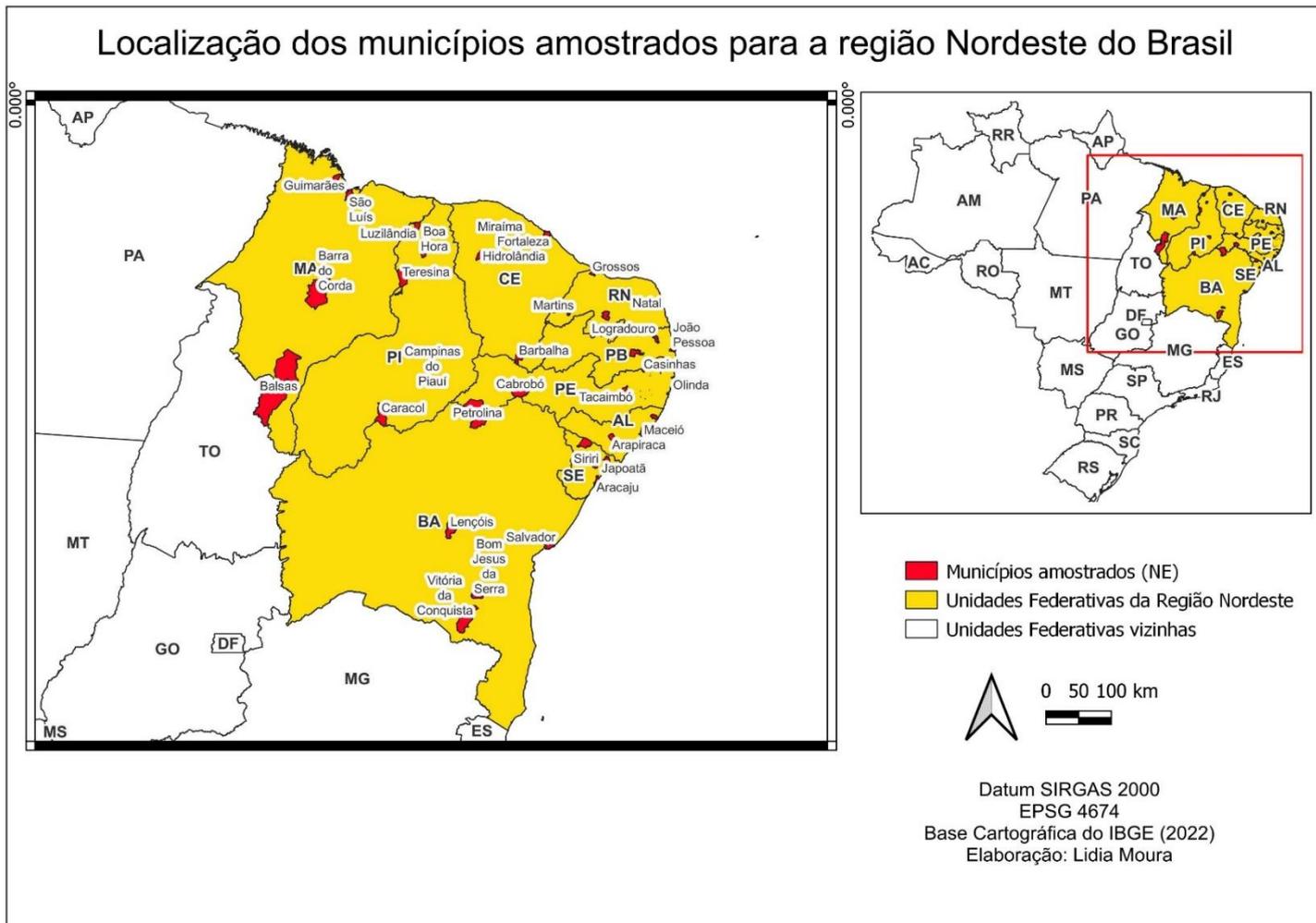
9. APÊNDICE A – Localização dos municípios amostrados e agrupados por região, utilizados nos cálculos das temperaturas utilizadas nos experimentos.

Figura 62: Localização dos municípios amostrados para a região Norte do Brasil



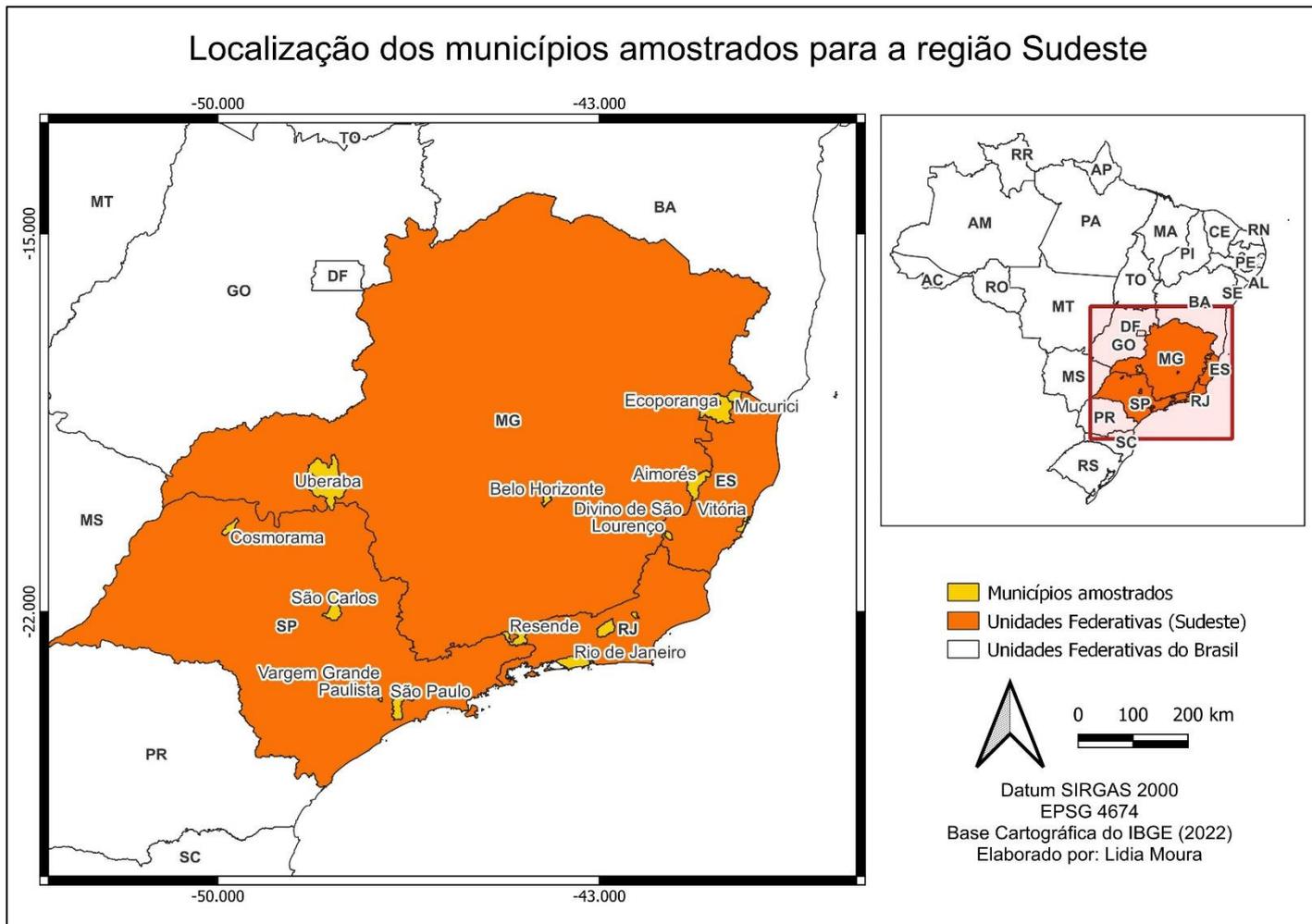
Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Figura 63: Localização dos municípios amostrados para a região Nordeste do Brasil



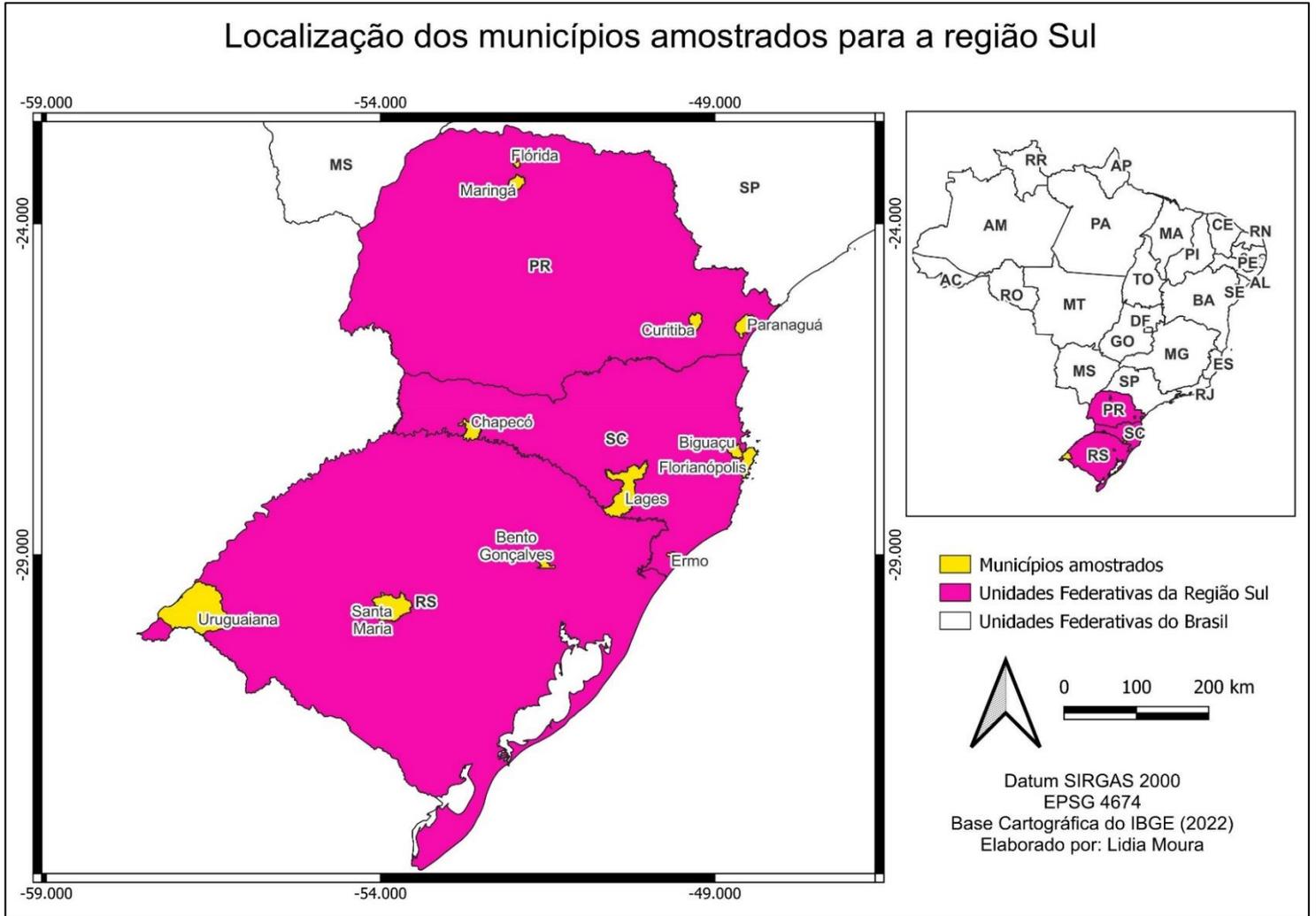
Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Figura 64: Localização dos municípios amostrados para a região Sudeste do Brasil



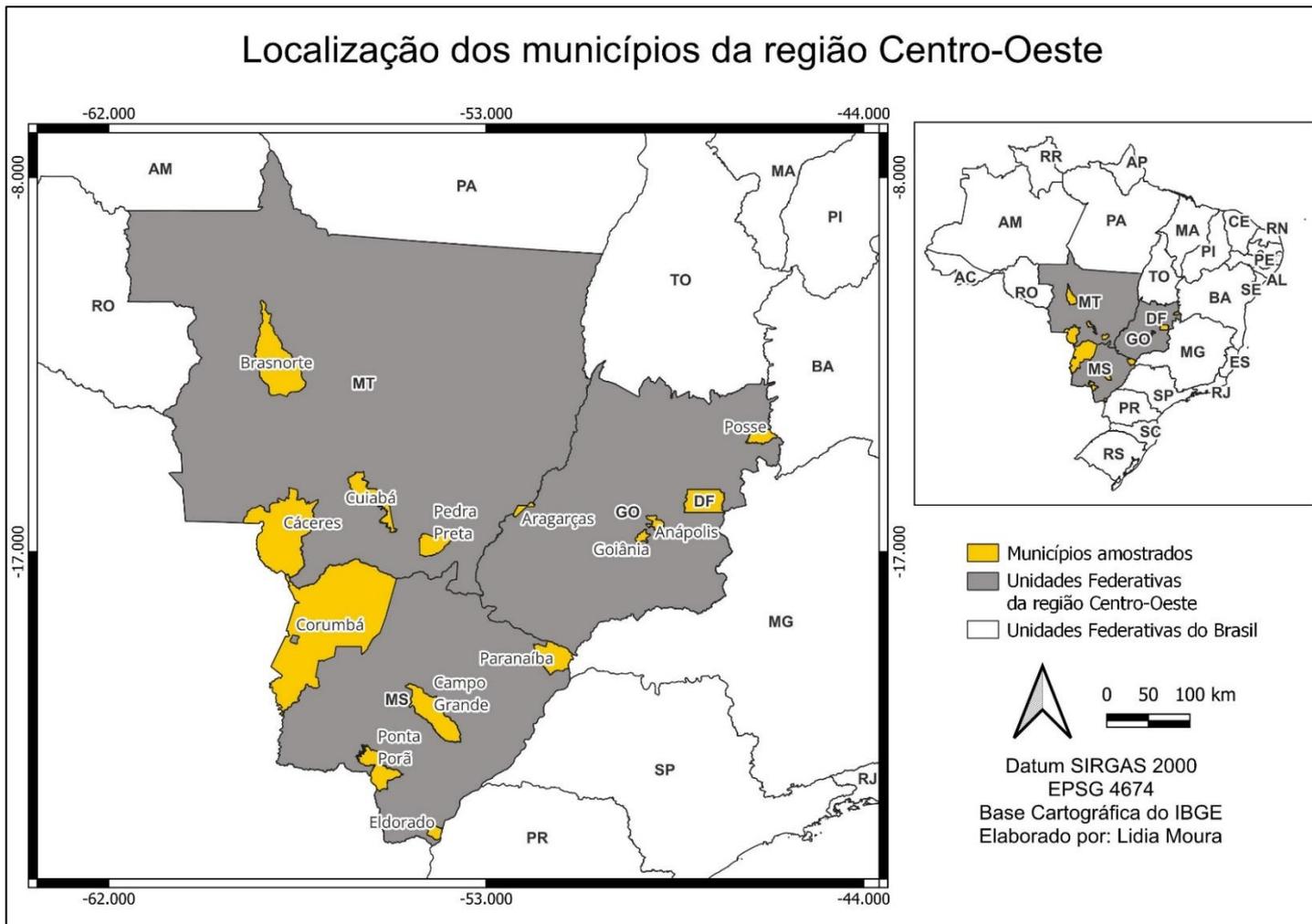
Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Figura 65: Localização dos municípios amostrados para a região Sul



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Figura 66: Localização dos municípios amostrados para a região Centro-Oeste



Fonte: Elaborado pela autora (2022)



EESC • USP