UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

Barbara Lepretti de Nadai

Estudo da frequência de batida das asas do mosquito *Aedes aegypti* utilizando sensores inteligentes: simulação de diferentes condições ambientais em laboratório

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos
2021

Barbara Lepretti de Nadai

Estudo da frequência de batida das asas do mosquito *Aedes aegypti* utilizando sensores inteligentes: simulação de diferentes condições ambientais em laboratório

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Área de concentração: Hidráulica e Saneamento

Orientador: Prof. Dr. Juliano José Corbi
Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo E. A. P. A. Batista

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos
2021

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).

L126e

Lepretti de Nadai, Barbara
Estudo da frequência de batida das asas do mosquito Aedes aegypti utilizando sensores inteligentes: simulação de diferentes condições ambientais em laboratório / Barbara Lepretti de Nadai; orientador Juliano José Corbi; coorientador Gustavo Enrique de Almeida Prado Alves Batista. São Carlos, 2021.

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, 2021.

1. Condições ambientais. 2. Inovação tecnológica. 3. Sensor óptico. 4. Comportamento do mosquito. 5. Ecologia. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **BARBARA LEPRETTI DE NADAI.**

Título da tese: " Estudo da frequência de batida das asas do mosquito *Aedes aegypti* utilizando sensores inteligentes: simulação de diferentes condições ambientais em laboratório".

Data da defesa: 03/09/2021.

Comissão Julgadora	**Resultado**
Prof. Associado **Juliano Jose Corbi** **(Orientador)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)	APROVADO
Dra. **Flávia Virgínio Fonseca** (Instituto Butantan)	APROVADO
Prof. Dr. **Guilherme Rossi Gorni** (Universidade de Araraquara/UNIARA)	APROVADO
Prof. Dr. **Lincoln Suesdek Rocha** (Instituto Butantan)	APROVADO
Prof. Dr. **Marcel Okamoto Tanaka** (Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)	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 **Murilo Araujo Romero**

AGRADECIMENTOS

Gratidão pela jornada que o doutorado me proporcionou, pelo lindo caminho percorrido durante esses anos, de aprendizagem, ensinamentos, reflexões e crescimento profissional e pessoal. O caminho nem sempre foi fácil, mas tive a sorte de me deparar com pessoas que me motivaram a seguir em frente e ser cada dia melhor. Incentivo encontrado numa longa conversa despretensiosa, numa breve mensagem, num sorriso e até mesmo num puxão de orelha.

Agradeço ao meu orientador, professor Juliano José Corbi, pelos preciosos ensinamentos que levarei comigo para sempre. Agradeço também pela oportunidade, incentivo, apoio, amizade e pelas nossas conversas. Obrigada por me fazer enxergar de modo diferente e me ensinar a admirar um novo universo: o dos insetos.

Ao meu co-orientador Gustavo Batista agradeço pela confiança, incentivo e amizade durante todos estes anos. Obrigada por me abrir caminhos novos.

A minha mãe, Nancy e Élio, agradeço pelo carinho, acolhimento e incentivo em cada escolha. Ao meu pai Nelson pelo apoio. A minha irmã Sarah e meu cunhado Fábio, por me apoiar e me receber sempre muito bem, além de cuidar do Chico com muito carinho. À Marli e Irno pelo apoio e incentivo. Um agradecimento especial ao meu esposo André, pelo carinho, companheirismo e paciência durante esta jornada e, principalmente por me auxiliar com o R, o que foi muito importante durante esta caminhada.

Aos meus amigos Chris e Everton (e agora o Augusto) pelos dias incríveis que guardarei para sempre no coração.

Aos amigos, Gisele e Bruce, Thainara e Vinícius por todos os momentos compartilhados.

Aos meus colegas do LEAA, que se tornaram amigos (e os que eu não tive a oportunidade de ter maior contato): Aline Bernegossi, Bruna Cardoso, Daniel Abrahão, Fernanda Pinheiro, Gleyson Borges, Karina Graminha, Lídia Moura, Mara Rúbia, Maria Helena Carrascossi, Mayara Felipe e Tallyson Tavares. Obrigada pelos bons momentos que passamos no laboratório, pelas nossas risadas e conversas, por tornar os meus dias mais leves. Aprendi muito com vocês e levarei um pedacinho de cada um comigo.

Agradeço ao professor Michael Reiskind, que me recebeu muito bem na *North Carolina State Univerity*. Obrigada pela parceria e pelo conhecimento transmitido, o qual enriqueceu este trabalho. Agradeço também aos colaboradores e amigos que fiz em Raleigh: Anastasia, Paul, Shawn, Steve, Drew, Charles, John, Gabriela, Edurado Hatano, Meridith e professor Wes.

Meu agradecimento à André Tognon, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, do Instituto de Química de São Carlos (USP), por me emprestar a balança para a pesagem dos mosquitos.

Ao Edi Samuel, por me socorrer quando algum equipamento falhava e pela cooperação.

Ao Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento da USP e LEAA, pela infraestrutura. Obrigada aos professores e funcionários, sempre muito prestativos.

Por fim, gostaria de agradecer à FAPESP (Processo nº 2016/24622-9), Capes - Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE (88881.190251/2018-01) e CNPq (140534/2017-2) pelo apoio financeiro que possibilitou o pleno desenvolvimento deste trabalho.

"Prefiro ter questões que não podem ser respondidas a respostas que não podem ser questionadas."

Richard Feynman

RESUMO

NADAI, B. L. **Estudo da frequência de batida das asas do mosquito *Aedes aegypti* utilizando sensores inteligentes: simulação de diferentes condições ambientais em laboratório**. 2021. 88p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos, 2021.

O mosquito *Aedes aegypti* é vetor de doenças devastadoras que podem resultar em sequelas graves ou até levar a morte, como é o caso da dengue, chikungunya, Zika e febre amarela. A alta capacidade de adaptação do *Ae. aegypti* faz com que o controle deste mosquito seja um grande desafio para os órgãos públicos de saúde. O controle efetivo de mosquitos requer sistemas de monitoramento eficazes para a avaliação dos resultados. O monitoramento também pode fornecer conhecimento sobre a distribuição espaço-temporal dos insetos, a avaliação de risco e orientações aos programas de prevenção de doenças transmitidas por mosquitos. Nesse sentido, novos dispositivos tecnológicos estão sendo estudados com o intuito de monitorar mosquitos, por meio da identificação automática das espécies e contagem das mesmas em tempo real. Um deles é o sensor óptico, que é capaz de capturar a frequência de batida de asas (FBA) dos mosquitos. Este sensor pode ser acoplado em armadilhas com o intuito de monitorar mosquitos adultos por meio da FBA. No entanto, para maior acurácia destes sensores, é necessário o conhecimento das condições ambientais que podem alterar a FBA dos mosquitos. Deste modo, o objetivo desta pesquisa é estudar detalhadamente a frequência de batida de asa do mosquito *Ae. aegypti*, utilizando sensor óptico, em diversas condições ambientais simuladas em laboratório, tais como ausência/escassez de alimento durante a fase larval, diferentes tamanhos de mosquitos, mosquitos criados em água com diferentes valores de pH, distintas temperaturas e umidades do ar e idade dos adultos. Os resultados demonstraram que os dois tamanhos de mosquitos testados influenciaram a FBA das fêmeas em uma correlação inversa. Pôde-se observar que as fêmeas pequenas batem as asas cerca de 40 Hz mais rápido do que as grandes. Já os machos pequenos batem as asas cerca de 40 Hz mais lento que os grandes. O pH da água de criação das larvas impactou a FBA dos adultos e o tamanho do centróide das asas dos machos e das fêmeas. O pH também influenciou o peso das fêmeas. A temperatura influenciou a FBA dos mosquitos, em uma correlação positiva. Pôde-se observar que à temperatura de 28 e 33ºC as fêmeas bateram asas cerca de 56 Hz e 111 Hz mais rápido que as fêmeas em menor temperatura (23ºC), respectivamente. Os machos, à temperatura de 28 e 33ºC, bateram asas cerca de 98 Hz e 170 Hz mais rápido do que os machos à 23ºC, respectivamente. A umidade influenciou a FBA de quase todos os grupos de mosquitos testados, exceto os machos pequenos à 20ºC. A FBA também foi impactada pela idade dos mosquitos, sendo menor nos três primeiros dias após a emergência dos adultos. Os resultados deste trabalho salientam a relevância do estudo das

condições ambientais que podem impactar a frequência de batida de asa dos mosquitos. Estes resultados podem auxiliar na melhoria da acurácia dos dispositivos ópticos que utilizam a FBA para a identificação automática das espécies e no aprimoramento do monitoramento dos mosquitos adultos, bem como ajudar na compreensão da ecologia e biologia dos mosquitos.

Palavras-chave: Condições ambientais. Inovação tecnológica. Sensor óptico. Comportamento do mosquito. Ecologia.

ABSTRACT

NADAI, B. L. **Wingbeat frequency of *Aedes aegypti* mosquitoes using smart sensors: simulation of different environmental conditions in the laboratory**. 2021. 88p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos, 2021.

The *Aedes aegypti* mosquito is a vector of devastating diseases that can result in severe damage or even death, such as dengue, chikungunya, Zika, and yellow fever. The high adaptability of *Ae. aegypti* makes the control of this mosquito a significant challenge for public health agencies. Effective mosquito control requires efficient monitoring systems to evaluate results. Monitoring can also provide knowledge about the spatio-temporal distribution of insects, risk assessment, and guidelines for mosquito-borne disease prevention programs. In this sense, new technological devices are being studied to monitor mosquitoes by automatically identifying and counting the species in real-time. One of them is the optical sensor, which can capture mosquitoes' wingbeat frequency (WBF). This sensor can be attached to traps to monitor adult mosquitoes by the WBF. However, for better accuracy of these sensors, it is necessary to know the environmental conditions that can alter the WBF of mosquitoes. Thus, this research aims to study in detail the WBF of *Ae. aegypti* mosquitoes, using an optical sensor, in several simulated environmental conditions in the laboratory. The conditions tested were: absence/scarcity of food during the larval phase, different mosquito body sizes, mosquitoes reared in water with different pH values, different air temperatures, humidities, and adults' age. The results showed that the two mosquito body sizes tested influenced the WBF of the females in an inverse correlation. Small females beat their wings about 40 Hz faster than large ones. Small males, on the other hand, beat their wings about 40 Hz slower than large males. The pH of the larval rearing water impacted the WBF of adults and the wing centroid size of males and females. PH also influenced the weight of females. The temperature affected the WBF of mosquitoes, in a positive correlation. At 28 and 33ºC of temperature, females beat their wings about 56 Hz and 111 Hz faster than females at a lower temperature (23ºC), respectively. Males at 28 and 33ºC of temperature beat their wings about 98 Hz and 170 Hz faster than males at 23ºC, respectively. Humidity influenced the WBF of almost all groups of mosquitoes tested, except for small males at 20ºC. The wingbeat frequency was also impacted by mosquito age, being lower in the first three days after adult emergence. These results highlight the relevance of studying the environmental conditions that can affect the WBF of mosquitoes. These results may aid in improving the accuracy of optical devices that use WBF for automatic species identification and improve adults mosquitoes monitoring, and aid in understanding the ecology and biology of mosquitoes.

Keywords: Environmental conditions. Technological innovation. Optical sensor. Mosquito behavior. Ecology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ovos de *Ae. aegypti* 27
Figura 2 – Larvas e pupas de *Ae. aegypti* 28
Figura 3 – (a) *Ae. aegypti* adulto (b) e as escamas prateadas no tórax em forma de lira 29
Figura 4 – Armadilha equipada com sensor óptico utilizada para contar e identificar espécies de mosquitos em tempo real 34
Figura 5 – Principais componentes do sensor óptico empregado para capturar a frequência de batida de asas dos mosquitos 40
Figura 6 – Dados gerados pelo sensor quando um mosquito atravessa a cortina de luz 41
Figura 7 – Coletor utilizado neste estudo 42
Figura 8 – Incubadora utilizada para a realização dos experimentos 43
Figura 9 – Representação dos ensaios realizados para a análise da variabilidade dos coletores 44
Figura 10 – Representação dos ensaios realizados na Etapa I 45
Figura 11 – Asa direita da fêmea *Aedes aegypti* com o comprimento medido, da alula ao ápice 47
Figura 12 – Remoção da asa do indivíduo e preparo das lâminas 49
Figura 13 – Asa direita de *Aedes aegypti* fêmea com a localização dos 18 pontos anatômicos utilizados para o cálculo do tamanho do centróide 50
Figura 14 – Representação dos ensaios realizados na Etapa II 51
Figura 15 – Representação gráfica das condições testadas: duas faixas de temperatura e umidade (altas e baixas) 52
Figura 16 – Frequência média da batida de asas do *Aedes aegypti* macho e fêmea. O eixo y representa a função da probabilidade e o eixo x representa a frequência de batida de asa (Hz) 57
Figura 17 – Boxplot do comprimento de asa de *Aedes aegypti* (a) fêmeas e (b) machos nas duas densidades larvais testadas (alta e baixa) 60
Figura 18 – Boxplot do peso seco de *Aedes aegypti* (a) fêmeas e (b) machos nas duas densidades larvais testadas (alta e baixa) 60
Figura 19 – Boxplot da frequência de batida de asas de *Aedes aegypti* (a) fêmeas e (b) machos à temperatura de 26ºC e umidade de 60 - 65%. Os mosquitos resultantes da baixa densidade larval foram denominados "grandes"e os resultantes da alta densidade larval foram designados "pequenos" . . . 61

Figura 20 – Diagrama de dispersão ilustrando a correlação entre a frequência de batida da asa do *Aedes aegypti* e o comprimento da asa (a e b) e o peso do mosquito (c e d). Os mosquitos resultantes da baixa densidade larval foram denominados "grandes"e os resultantes da alta densidade larval foram designados "pequenos" 62
Figura 21 – Boxplot da frequência de batida de asas de *Aedes aegypti* fêmeas (a) grandes e (b) pequenas criadas em diferentes valores de pH da água. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa (p>0,05) 65
Figura 22 – Boxplot da frequência de batida de asas de *Aedes aegypti* machos (a) grandes e (b) pequenos criados em diferentes valores de pH da água. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa (p>0,05) 66
Figura 23 – Boxplot do tamanho do centróide das asas de *Aedes aegypti* fêmeas criadas em diferentes valores de pH da água. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa (p>0,05) 69
Figura 24 – Boxplot do tamanho do centróide das asas de *Aedes aegypti* machos criados em diferentes valores de pH da água. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa (p>0,05) 69
Figura 25 – Box plot com a frequência de batida de asa de *Aedes aegypti* fêmeas em diferentes temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa (p>0,05) 72
Figura 26 – Box plot com a frequência de batida de asa de *Aedes aegypti* machos em diferentes temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa (p>0,05) 73
Figura 27 – Boxplot com a frequência de batida de asa de *Ae. aegypti* fêmeas grandes e pequenas em diferentes umidades relativas do ar (30 e 80%) e temperaturas (20 e 30ºC) 75
Figura 28 – Boxplot com a frequência de batida de asa de *Ae. aegypti* machos grandes e pequenos em diferentes umidades relativas do ar (30 e 80%) e temperaturas (20 e 30ºC) 76
Figura 29 – Frequência de batida de asas de *Aedes aegypti* fêmeas e machos ao longo de 23 dias 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais estudos relacionados à frequência de batida de asas em mosquitos 36
Tabela 2 – Ensaios utilizando diferentes quantidades de alimento 46
Tabela 3 – Ensaios com diferentes valores de pH da água de criação das larvas de *Ae. aegypti* 48
Tabela 4 – Condições de temperatura e umidade testadas 53
Tabela 5 – Variabilidade dos coletores (ensaios realizados com o mosquito fêmea) . 55
Tabela 6 – Variabilidade dos coletores (ensaios realizados com o mosquito macho) 56
Tabela 7 – Ensaios com diferentes quantidades de alimento 58
Tabela 8 – Valores médios do comprimento de asa e do peso seco dos adultos resultantes da alta e baixa densidades larvais 61
Tabela 9 – Regressão linear para a frequência de batida de asa do *Aedes aegypti* em função do comprimento de asa (mm) e do peso seco (mg) 63
Tabela 10 – Análise descritiva da frequência de batida de asa dos *Aedes aegypti* fêmeas nos diferentes tamanhos e valores de pH 66
Tabela 11 – Análise descritiva da frequência de batida de asa dos *Aedes aegypti* machos nos diferentes tamanhos e valores de pH 67
Tabela 12 – Peso seco dos mosquitos fêmeas em relação ao tamanho e ao pH testado 67
Tabela 13 – Peso seco dos mosquitos machos em relação ao tamanho e ao pH testado 68
Tabela 14 – Tamanho do centróide das asas das fêmeas e dos machos originados de diferentes valores de pH da água de criação 70
Tabela 15 – Resultados do Modelo Linear Misto na frequência de batida de asa de *Ae. aegypti* fêmeas e machos por densidade larval e temperatura, utilizando como categorias de refêrencia a baixa densidade larval e a temperatura de 23ºC 73
Tabela 16 – Frequência de batida de asa de *Ae. aegypti* fêmeas e machos em diferentes umidades e temperaturas do ar 77
Tabela 17 – Frequência de batida de asa do *Ae. aegypti* no 1º, 5º e 23º dias após a emergência 77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO . . . 21
1.1 Hipótese e objetivos . . . 22

2 REFERENCIAL TEÓRICO . . . 25
2.1 Aspectos gerais do mosquito *Aedes aegypti* . . . 25
2.1.1 Histórico . . . 25
2.1.2 Biologia e ecologia . . . 26
2.2 Importância epidemiológica . . . 29
2.3 Novas tecnologias no controle e monitoramento de mosquitos transmisores de doenças . . . 31
2.3.1 Sensores que capturam a frequência de batida de asa de insetos . . . 33

3 MATERIAIS E MÉTODO . . . 39
3.1 *Aedes aegypti* . . . 39
3.2 Sensor óptico . . . 39
3.3 Variabilidade dos coletores . . . 42
3.4 Frequência média de batida de asas . . . 44
3.5 Alimento . . . 45
3.6 Densidade larval . . . 46
3.7 PH inicial da água de criação das larvas . . . 47
3.7.1 Secagem e pesagem dos mosquitos . . . 48
3.7.2 Medida do tamanho do centróide das asas . . . 49
3.8 Temperatura do ar . . . 50
3.9 Umidade e temperatura do ar . . . 52
3.10 Idade . . . 52

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . 55
4.1 Variabilidade dos coletores . . . 55
4.2 Frequência média de batida de asas . . . 56
4.3 Alimento . . . 57
4.4 Densidade larval . . . 59
4.4.1 Confirmação do tamanho dos mosquitos . . . 59
4.4.2 Tamanho e frequência de batida de asa . . . 60
4.5 PH inicial da água de criação das larvas . . . 64
4.5.1 Medida da frequência de batida de asa . . . 65
4.5.2 Peso seco . . . 67

4.5.3 Tamanho do centróide das asas 68
4.6 Temperatura do ar 71
4.7 Umidade e temperatura 74
4.8 Idade 77

5 CONCLUSÃO 79
5.1 Perspectivas futuras 79

REFERÊNCIAS 81

1 INTRODUÇÃO

Ao contrário da convicção popular, o animal mais letal para a humanidade não é um imponente predador, mas sim um pequeno inseto capaz de transmitir doenças devastadoras com uma única picada: o mosquito (SCIENCE ALERT, 2018). Os mosquitos encontram-se distribuídos amplamente em áreas com temperaturas mais baixas, próximas aos polos, até os cinturões tropicais e o equador, incluindo as zonas desérticas, estando ausentes apenas na Antártica e em algumas ilhas (POMBI; MONTARSI, 2020). São responsáveis por doenças avassaladoras e que podem levar a morte, como é o caso da dengue, febre amarela, Zika e chikungunya, as quais são as mais conhecidas transmitidas pelo *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (CARVALHO et al., 2014; LETA et al., 2018).

Embora exista atualmente uma vacina disponível e acessível contra o vírus da febre amarela, não existem vacinas eficazes e tratamentos específicos para as demais doenças relacionadas a este mosquito (KANG et al., 2017). Desse modo, na ausência de vacinas para a maioria das doenças transmitidas pelo *Ae. aegypti* e por outras espécies de mosquitos, as abordagens integradas de controle e monitoramento das espécies são um método importante para a interrupção da transmissão dessas doenças (MADZLAN et al., 2016).

Os procedimentos convencionais de controle, geralmente envolvem ações focadas nas larvas, como a eliminação dos criadouros, utilização de larvcidas, controle biológico, educação ambiental, entre outros (BRAGA; VALLE, 2007). Uma forma de avaliar estes procedimentos é o monitoramento dos mosquitos adultos, o qual é um desafio global e requer sistemas de vigilância eficientes para analisar estes resultados e identificar áreas com maior risco de transmissão de patógenos (BATISTA et al., 2011). Geralmente, o monitoramento e controle de mosquitos adultos é baseado em técnicas de captura e, para isso são utilizados diferentes tipos de armadilhas com o intuito de atrair e capturar as fêmeas que estão em busca de hospedeiros ou de um lugar para ovipositar (PEZZIN et al., 2016). No entanto, a maioria destas armadilhas requer um especialista para a identificação e contagem das espécies capturadas, o que pode ser uma tarefa extensa e dispendiosa (SANTOS et al., 2019). Estas armadilhas também podem deformar os espécimes durante a captura, removendo partes do corpo do inseto e/ou escamas, os quais são caracteres importantes para a identificação taxonômica, dificultando assim, a identificação das espécies.

Uma forma de tornar esta tarefa mais rápida, econômica e dinâmica é automatizar este processo. Nesse sentido, estudos vem sendo realizados com o intuito de desenvolver diferentes mecanismos para a identificação automática de espécies de mosquitos por meio do som emitido pelas asas destes insetos durante o voo (GENOUD et al., 2018; GENOUD

et al., 2020; LI et al., 2005; MOORE et al., 1986; OUYANG et al., 2015; POTAMITIS, 2014; SALIM et al., 2017), pois sabe-se que esses sons variam de acordo com a espécie, e portanto, podem ser utilizados para a identificação das mesmas (GEBRU et al., 2018; SILVA et al., 2015; VILLARREAL; WINOKUR; HARRINGTON, 2017). Assim, esses dispositivos podem ser acoplados em armadilhas, com o objetivo de identificar automaticamente e em tempo real as espécies dos mosquitos capturados sem que haja a necessidade da presença de um especialista para realizar esta tarefa.

Dentre os diversos mecanismos estudados para a identificação automática das espécies durante o voo, pode-se destacar os que utilizam a frequência de batida de asa - FBA do inseto (BATISTA et al., 2011). Nesse sentido, o conhecimento da FBA das espécies que são encontradas em determinadas regiões é a base para o desenvolvimento dos *softwares* que compõem estes dispositivos. No entanto, sabe-se que algumas condições ambientais, como a temperatura, podem alterar a FBA dos mosquitos (COSTELLO, 1974; OGAWA; KANDA, 1986; VILLARREAL; WINOKUR; HARRINGTON, 2017) e poucos estudos foram realizados para o melhor entendimento desta e de outras variáveis em relação à FBA. Assim, a falta de conhecimento sobre a influência das variáveis ambientais na FBA pode levar à imprecisões na identificação das espécies em dispositivos que utilizam a FBA para este fim (VILLARREAL; WINOKUR; HARRINGTON, 2017).

Da mesma forma, o estudo das variáveis que impactam a biologia e a ecologia dos mosquitos transmissores de doenças e sua relação são de grande importância para ampliar a compreensão da epidemiologia das doenças transmitidas por vetores e também para aprimorar as políticas públicas e futuras tomadas de decisão. O conhecimento dos fatores ambientais que podem afetar o desenvolvimento, longevidade e o comportamento no que diz respeito à FBA dos mosquitos podem aperfeiçoar o monitoramento dos mesmos, bem como acurar os dispositivos que usam a FBA para a identificação de espécies.

Vale lembrar que, apesar de algumas espécies serem vetores de patógenos, os mosquitos, como os outros insetos, tem um papel relevante na ecologia. Os adultos servem de alimento para pássaros, morcegos e outros animais e as larvas são ingeridas por peixes e sapos. Os mosquitos que se alimentam do néctar das plantas também possuem um papel importante na polinização (FANG, 2010; LORENZ; VIRGINIO; BREVIGLIERI, 2018).

1.1 Hipótese e objetivos

Como mencionado anteriormente, o conhecimento da influência das variáveis ambientais na frequência de batida de asas dos mosquitos transmissores de doenças podem aumentar a acurácia dos dispositivos que identificam espécies por meio desta informação, além de ampliar o conhecimento sobre a biologia e a ecologia dos mosquitos. Dessa maneira, a hipótese deste trabalho é:

Diferentes situações ambientais geram populações de mosquitos Aedes aegypti com características diferentes relacionadas à frequência de batida de asa.

Dada esta hipótese, o objetivo deste trabalho é:

- Estudar detalhadamente a frequência de batida das asas do mosquito *Aedes aegypti* utilizando sensor óptico, simulando diferentes condições ambientais em laboratório. Para isso:
  - Avaliar a variabilidade dos coletores utilizados nos ensaios;
  - Coletar e analisar a diferença entre a FBA de machos e fêmeas;
  - Analisar a sobrevivência das larvas na escassez de alimento e, caso haja emergência de adultos, coletar e analisar a FBA;
  - Comparar e analisar a FBA de mosquitos de diferentes tamanhos, bem como o comprimento das asas e o peso;
  - Simular diferentes valores de pH da água de criação das larvas e analisar a FBA, o tamanho do centróide das asas e o peso dos adultos resultantes;
  - Simular diferentes condições de temperatura e umidade do ar e analisar possíveis alterações na FBA dos mosquitos;
  - Analisar a FBA em relação à idade dos mosquitos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais do mosquito *Aedes aegypti*

2.1.1 Histórico

Com origem na África, o mosquito *Aedes aegypti*, foi descrito por Linnaeus em 1762. O *Ae. aegypti* é uma espécie autóctone africana e espalhou-se pelo continente Americano mediante embarcações utilizadas para o tráfico de escravos entre os séculos XVI e XIX (ZARA et al., 2016). Como consequência do crescimento populacional, os habitats naturais do mosquito foram destruídos, o que levou a população silvestre a uma seleção que contribuiu para a sua disseminação e sobrevivência no meio urbano (CROVELLO; HACKER, 1972).

O *Ae. aegypti* encontrou condições favoráveis para sua dispersão em meios urbanos e raramente é encontrado em ambientes onde o homem não está presente. O mosquito preferivelmente utiliza como criadouros recipientes onde a água pode ser armazenada. Desse modo, sua rápida proliferação é propícia devido a dois fatores fundamentais: a presença de criadouros e o contato com humanos (ZARA et al., 2016).

No século XX, houve no Brasil um elevado número de casos de febre amarela, que resultou em altos índices de óbitos. Como resposta, houve uma intensificação no combate ao *Ae. aegypti*, em virtude deste ser o principal transmissor do vírus da febre amarela urbana. Nessa época, as ações de combate ao mosquito eram realizadas com a eliminação de criadouros e o uso de inseticidas e larvicidas (COSTA et al., 2011). Em 1947, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) foi empregado no combate ao mosquito, e todos esses procedimentos resultaram na erradicação, no Brasil, do *Ae. aegypti* em dois momentos, entre os anos de 1958 e 1973 (NOBRE; ANTEZANA; TAUIL, 1994). Porém, o rápido crescimento populacional e falhas na vigilância epidemiológica ocasionaram, em 1976, a reintrodução do mosquito no país (TAUIL, 2001). Desde então, devido à alta capacidade de adaptação do *Ae. aegypti*, este se multiplicou e tornou-se numeroso nas cidades brasileiras, e atualmente é encontrado em todos os estados do país (FUNASA, 2001).

Ao longo dos últimos 50 anos o *Ae. aegypti* se disseminou rapidamente, sendo transportado entre continentes por meio da indústria de navegação global, em recipientes em que os ovos se estabeleceram. Na Europa, América do Norte e Austrália, o *Ae. aegypti* foi relatado esporadicamente na primeira metade do século XX, e as reduções do número de mosquitos observadas nessas regiões ocorreram possivelmente devido a programas de erradicação, porém foram mais provavelmente consequências das alterações no desenvolvimento, incluindo melhorias nas habitações, nas condições de saneamento, e água canalizada (EBI; NEALON, 2016).

Em alguns países os casos de dengue, doença cujo vetor também é o *Ae. aegypti*, ressurgiram após longos anos sem registros desta doença, como é o caso dos Estados Unidos, que em a doença reapareceu no início dos anos 2000, após 75 anos de ausência. O mesmo ocorreu no Japão, que em 2014 registrou os primeiros casos de dengue adquiridos localmente, após 70 anos. Estes ressurgimentos ocorreram devido à vasta distribuição do *Ae. aegypti*, aliada a medidas ineficazes de controle do mosquito, além do aumento da frequência de visitantes infectados com o vírus da dengue (AÑEZ; RIOS, 2013; KUTSUNA et al., 2015).

2.1.2 Biologia e ecologia

O mosquito *Ae. aegypti* pertece à ordem Diptera e família Culicidae. Três quartos de todas as espécies de mosquitos vivem nos trópicos e subtrópicos, onde o clima quente e úmido é favorável para o seu rápido desenvolvimento e a sobrevivência do adulto, além da diversidade de habitats permitirem a evolução de muitas espécies (CLEMENTS et al., 1992).

Apesar do grande número de espécies de mosquitos, apenas 200 são vetores de patógenos que causam doenças em humanos (CHRISTOPHERS, 1960). Dentre estas espécies, o *Ae. aegypti* tem grande destaque na área médica (MARQUARDT, 2004). Este mosquito apresenta metamorfose completa e seu ciclo de vida abrange quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto, sendo as primeiras três fases aquáticas e a última terrestre. As fases do *Ae. aegypti* são brevemente descritas a seguir (FUNASA, 2001; MARQUARDT, 2004; SILVA; LOURENÇO; OLEA, 2012):

- Ovo: os ovos do *Ae. aegypti* podem medir entre 0,6 e 0,7 mm de comprimento, apresentando contorno alongado e fusiforme (Figura 1). São individualmente depositados pela fêmea em substratos úmidos ou nas paredes internas de recipientes que servirão como criadouros, próximos à superfície da água, sujeitos a inundações posteriores. A fecundação ocorre durante a postura dos ovos e o desenvolvimento do embrião estará completo em 48 horas, em condições favoráveis de temperatura e umidade.

- Larva: após o contato dos ovos com a água, ocorre a eclosão das larvas. A fase larval se desenvolve em ambiente aquático e é o período de intensa alimentação e crescimento. As larvas são filtradoras e alimentam-se de algas e partículas orgânicas dissolvidas na água. As larvas sobem à superfície para respirar, por meio do sifão respiratório (Figura 2), possibilitando a sobrevivência das mesmas em ambientes com baixas concentrações de oxigênio dissolvido, o que é uma vantagem adaptativa em relação às outras espécies. As larvas são sensíveis a movimentos bruscos na água e, sob feixes de luz, deslocam-se com rapidez ao fundo do criadouro, devido à fotofobia. Esta fase apresenta quatro estágios evolutivos, chamados de estádios, cuja duração

Figura 1 – Ovos de *Ae. aegypti*

Fonte: a autora

depende de fatores como disponibilidade de alimento, temperatura e densidade das larvas no criadouro. As larvas de primeiro estádio são dificilmente visíveis a olho nu, e as de segundo estádio são maiores, mas sua presença ainda não é notada sem uma inspeção cuidadosa. Já as de terceiro e quarto estádios são facilmente observáveis. Após o 4º estádio, as larvas se transformam em pupas.

- Pupa: nesta fase ocorre o processo de metamorfose e é também onde se sucedem as últimas transformações necessárias para o surgimento do adulto e pode durar 2 dias, sob condições favoráveis. Inicialemnte, a pupa (Figura 2) apresenta a mesma coloração da larva, escurecendo na medida em que se aproxima do momento da emergência do adulto. As pupas não se alimentam e normalmente permenecem imóveis na superfície da água e, como as larvas, as pupas submergem quando perturbadas. O período entre a eclosão dos ovos até a fase de pupa dura aproximadamente cinco dias, em condições ótimas.

- Adulto: esta é a fase reprodutora do mosquito e representa importante fase de dispersão devido à presença de asas. Nesta fase, os machos emergem antes das fêmeas, pois apresentam períodos de crescimento larval mais curtos. Os *Ae. aegypti* adultos são pretos, apresentam patas com anéis prateados e seu corpo apresenta escamas branco-prateadas (Figura 3a), na superfície dorsal do tórax estas escamas formam uma figura em forma de lira, o que permite fácil reconhecimento desta espécie (Figura 3b). O macho é menor que a fêmea e se diferencia desta por possuir antenas plumosas e palpos mais longos. Machos e fêmeas podem acasalar 24 horas após emergirem e uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante sua vida. Para isso, os machos são atraídos pela frequência de batida de asas das fêmeas e voam em sua direção. A FBA das

Figura 2 – Larvas e pupas de *Ae. aegypti*

Fonte: Geniton Vieira, Instituto Oswaldo Cruz (2021)

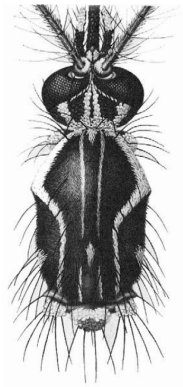
fêmeas e dos machos variam aproximadamente entre 350 a 670 Hz e 630 a 890 Hz, respectivamente, dependendo das condições ambientais. No entanto, machos e fêmeas são capazes de ajustar a FBA para permanecerem harmonicamente sincronizados antes da cópula, o que garante um acasalamento bem sucedido. As fêmeas podem ovipositar até 950 ovos durante os seus 50 dias de vida (aproximadamente). Fêmeas e machos se alimentam de seiva e néctar proveniente das plantas (fonte de açúcar), e as fêmeas também alimentam-se de sangue, geralmente utilizado no desenvolvimento ovariano, mas também podem servir como fonte de energia em certas circunstâncias. Estas podem voar longas distâncias (alguns quilômetros) em busca de sangue ou de locais de oviposição. Em temperaturas moderadas, todo o ciclo de desenvolvimento, do ovo ao adulto, pode ter duração de 10 dias ou menos.

As asas dos adultos são rígidas e planas e apresentam padrões de venação específicos da espécie. As veias das asas dão suporte primário às mesmas, e algumas alterações no padrão da venação podem impactar o voo dos mosquitos (COMBES; DANIEL, 2003; LORENZ; SUESDEK, 2020). As asas dos adultos também podem sofrer variações no tamanho, influenciadas tanto por fatores bióticos, como peso e tamanho do mosquito, quanto por fatores abióticos, como temperatura e nutrição durante o estágio larval (CLEMENTS et al., 1992; DUJARDIN, 2008).

O controle do *Ae. aegypti* é uma tarefa desafiadora tendo em vista a alta capacidade de adaptação deste mosquito aos centros urbanos. Essa adaptação se deve a vários fatores, e um deles é a oviposição de forma distribuída em criadouros distintos. Outro fator é que os ovos depositados por fêmeas dessa espécie podem permanecer em ambientes secos por períodos extensos. Desse modo, longos intervalos com condições climáticas desfavoráveis, como ausência de chuva, não são capazes de mitigar a presença desse mosquito. Essas

Figura 3 – (a) *Ae. aegypti* adulto (b) e as escamas prateadas no tórax em forma de lira

(a) (b)



Fontes: (a) Geniton Vieira, Instituto Oswaldo Cruz (2021) e (b) Tanaka et al. (1979) em: (MARQUARDT, 2004)

estratégias aumentam as chances de sobrevivência de seus descendentes, assegurando o sucesso reprodutivo e a dispersão do mosquito (BENTLEY; DAY, 1989).

2.2 Importância epidemiológica

Apesar da relação aparentemente longa entre humanos e mosquitos, a compreensão do papel que os mosquitos desempenham na transmissão de doenças ocorreu apenas no final do século XIX (MARQUARDT, 2004). Desde então os estudos relacionados às doenças e sua associação com os mosquitos se intensificaram.

No cenário da epidemiologia médica, os mosquitos são o grupo de insetos mais relevantes devido ao seu papel fundamental na disseminação de diversos patógenos responsáveis por doenças infecciosas humanas. O mosquito *Ae. aegypti* é o responsável por disseminar agentes causadores de doenças como dengue (com aproxidamente 96 milhões de casos por ano), Zika (690 mil casos por ano) e chikungunya (500 mil casos por ano), entre outras, que podem levar a danos de saúde severos ou até a morte (SOUZA et al., 2019; WHO, 2014; WHO, 2017a).

O acesso do vírus ao hospedeiro ocorre da seguinte forma: a procura das fêmeas por hospedeiros é impulsionada pela combinação de odores corporais, dióxido de carbono e calor ou umidade corporal. Quando a fêmea encontra um hospedeiro adequado, ela sonda a pele em busca de um capilar sanguíneo e injeta uma pequena quantidade de saliva contendo compostos químicos que impedem a coagulação do sangue. Caso a fêmea esteja infectada, esse é o caminho para que patógenos em potencial, como vírus, entrem em contato com o hospedeiro (CLEMENTS et al., 1992).

Os vírus mais conhecidos associados ao *Ae. aegypti* são o da febre amarela (VFA),

dengue (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV). Quase todos pertencem à família Flaviviridae e gênero *Flavivirus*, com exceção do CHIKV, que pertence à família Tagoviridae e gênero *Alphavirus*. Estes vírus tem origem em florestas do Velho Mundo, apresentam padrões ecológicos, evolutivos e epidemiológicos semelhantes e beneficiam-se das adaptações do *Ae. aegypti* aos ambientes urbanos, e propensão ao interior das residências. A seguir são apresentados breves relatos sobre cada um destes vírus.

O VFA provavelmente foi trazido ao Brasil em navios que transportavam escravos, por meio de indivíduos infectados. A febre amarela apresenta ciclos urbanos e florestais, e nas Américas, no ciclo florestal os primatas não-humanos são os principais infectados, e o VFA é transmitido pelos mosquitos dos gêneros *Sabethes* e *Haemagogus*. Já no ciclo urbano, a transmissão do VFA ocorre por meio do *Ae. aegypti* diretamente aos humanos e a inserção deste vírus nas áreas urbanas ocorre por meio de pessoas que circulam entre as áreas urbanas e florestais (DÉGALLIER et al., 1992; FIGUEIREDO, 2016). O VFA causou surtos urbanos no Brasil nos séculos XVII, XIX e XX, tendo como consequência muitas vidas perdidas. Felizmente, atualmente há uma vacina eficaz e acessível contra o VFA (FIGUEIREDO, 2016).

Surtos de dengue ocorrem desde o século XIX e tornaram-se comuns no Brasil atualmente, afetando milhões de pessoas. Os quatro genótipos do vírus da dengue (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4) se espalharam pelo país, aumentado o número de infecções secundárias e as formas graves da doença. A infecção secundária ocorre quando o indivíduo infectado com dengue já teve infecção prévia por flavivírus, e os anticorpos se elevam rapidamente atingidos níveis muito altos, o que pode causar complicações. Até o momento não há vacinas eficazes para o controle das infecções causadas por estes vírus nem tratamentos específicos. Em 2016 um surto com predominância do DENV-1 causou formas graves da doença entre crianças, levando a um grande número de mortes. A dengue é uma das doenças mais importantes que afetam o ser humano, constituindo sério problema de saúde pública (FIGUEIREDO, 2016).

O ZIKV foi descoberto na Unganda em 1947 e chegou à América Latina entre 2013 e 2015. No Brasil, o vírus foi detectado em 2015, ano em que ocorreu uma epidemia, juntamente com relatos de um expressivo aumento no número de casos de microcefalia em recém-nascidos e da síndrome de Guillain-Barré (doença neurológica grave, na qual os anticorpos danificam os neurônios motores como consequência de uma infecção viral). Baseado em estudos, a Oganização Mundial da Saúde afirmou que a infecção pelo ZIKV foi a causa destes distúrbios neurológicos (BOYER et al., 2018). De acordo com Hennessey, Fischer e Staples (2016), 80% dos casos de Zika eram assintomáticos, o que resultava em uma infecção leve. Em 2016 o vírus chegou aos Estados Unidos, e em 2017 quase todos os países da América Latina e Caribe reportaram a circulação ativa do ZIKV. Até o momento

não estão disponíveis vacinas ou tratamentos específicos eficazes contra o ZIKV e, embora o número de casos de Zika tenha diminuído desde o surto de 2015, este segue se dissipando em locais onde os vetores estão presentes (BOYER et al., 2018; WHO, 2017b).

Estima-se que o CHIKV foi introduzido no Brasil em 2013, e em 2014 foi registrado o primeiro surto no país, na cidade de feira de Santana, na Bahia. No ano de 2015 o vírus já havia se espalhado por quase todas as regiões do Brasil. A infecção pelo vírus afeta as articulações e muitos pacientes podem apresentar sinais de artrite aguda (inflamação com dor, inchaço e limitação dos movimentos), sendo que em 2% desses indivíduos estes sintomas podem se tornar crônicos. Até o momento não há vacina eficaz e tratamento para a infecção causada pelo CHIKV. Desse modo, surtos de CHIKV podem ter como consequências um aumento no número de pessoas com deficiências físicas crônicas (FIGUEIREDO, 2016).

Todos estes vírus são propagados de forma eficiente pelo *Ae. aegypti* devido a características que aumentam a capacidade de transmissão dos mesmos, como o fato da fêmea conseguir fazer ingestões múltiplas de sangue durante um único ciclo gonotrófico (período compreendido entre o repasto sanguíneo e a oviposição), e embora copule apenas uma vez na vida, possui a capacidade de armazenar o líquido seminal (SCOTT et al., 1993). Adicionalmente, o *Ae. aegypti* também apresenta alta competência vetorial, ou seja, quando infectado por um vírus, é capaz de replicá-lo e transmiti-lo de maneira eficiente (DYE, 1992).

Além de causarem danos à saúde humana, as doenças transmitidas pelos mosquitos também tem consequências significativas para a economia (EBI; NEALON, 2016). Segundo (SHEPARD et al., 2016), os custos globais agregados diretos (de assistência médica e de viagem) e indiretos (tempo e produtividade perdidos) foram estimados em 8,9 bilhões de dólares americanos, somente com a dengue. Assim, o controle e o monitoramento desta espécie é de grande importância e representam um desafio para os órgãos públicos de saúde. A seguir são descritas algumas tecnologias que podem ser utilizadas no controle e monitoramento dos mosquitos.

2.3 Novas tecnologias no controle e monitoramento de mosquitos transmisores de doenças

Devido à falta de vacinas e de medicamentos específicos e eficazes para o tratamento da maioria das doenças transmitidas por mosquitos, o controle e monitoramento destes insetos são ferramentas essenciais para interromper a transmissão destas doenças (CARLSON; DOUGHERTY; GETZ, 2016).

No Brasil, de acordo com o Programa Nacional de Controle de Dengue (PNCD), os procedimentos mais comumente adotados para o controle dos mosquitos podem ser divididos em três categorias: o controle mecânico, que ocorre por meio da eliminação dos criadouros das larvas; o controle biológico, o qual utiliza predadores ou patógenos,

principalmente na eliminação de larvas; o controle químico, que é a utilização de compostos químicos, como larvicidas e adulticidas; e a divulgação de ações educativas (BRASIL et al., 2009). No entanto, devido à falta de incentivo e recursos públicos destinados a estes procedimentos e a não aplicação das estratégias de forma integrada, o controle de mosquitos vetores torna-se ineficaz, exigindo novas intervenções para o controle e o monitoramento dos vetores. Este fato evidencia a necessidade crescente de encontrar novos métodos alternativos para auxiliar nestas tarefas (CARLSON; DOUGHERTY; GETZ, 2016; CARVALHO et al., 2014).

Nos últimos anos tecnologias promissoras tem sido desenvolvidas para o controle de vetores, como os mosquitos trangênicos, cujos mecanismos de controle podem ocorrer por meio da produção de genes letais, da esterilização de mosquitos ou pela introdução de genes com o objetivo de reduzir ou bloquear a transmissão de doenças (CARVALHO et al., 2014; OLIVA et al., 2013); os compostos naturais com atividade larvicida, como os extratos de plantas (KUMAR et al., 2014; PIERRE; OKECHUKWU; NCHIWAN, 2014; RAMKUMAR et al., 2015); a bactéria endossimbionte *Wolbachia*, que ao colonizar os mosquitos, provoca esterilidade e redução da transmissão de arbovírus (DUTRA et al., 2015; MOREIRA et al., 2009) e a nanotecnologia, utilizada na produção de nanoinseticidas com atividade larvicida (ARJUNAN et al., 2012; PESSOA et al., 2018).

No entanto, o controle eficiente de vetores requer sistemas de monitoramento eficazes para avaliar os resultados das estratégias adotadas, além de fornecer conhecimento sobre a distribuição espaço-temporal dos insetos (MOURA; NADAI; CORBI, 2020). Além disso, o monitoramento é fundamental em qualquer programa de prevenção e controle de doenças transmitidas por mosquitos, pois fornece informações necessárias para a avaliação de risco e orientação do programa, incluindo respostas à epidemia e avaliação do programa. Essas informações podem estar associadas à abundância, variação temporal e distribuição espacial de espécies de mosquitos vetores (MUKUNDARAJAN et al., 2017).

O monitoramento, na maioria das vezes, é baseado em esquemas de captura dos adultos, com a utilização de armadilhas compostas por iscas específicas para atrair e capturar as fêmeas que procuram por hospedeiros ou estão em busca de locais para ovipositar. Estas armadilhas são recolhidas de tempos em tempos e analisadas por especialistas que identificam e contam manualmente as espécies de mosquitos coletados, o que torna esta tarefa dispendiosa e extensa. O intervalo entre a instalação das armadilhas até a coleta e identificação das espécies pode resultar em um atraso significativo na tomada de decisão (BATISTA et al., 2011).

Uma maneira de tornar esta tarefa mais rápida e econômica é automatizar este processo e, para isso, estudos vem sendo realizados para o desenvolvimento de tecnologias que identifiquem de forma automática as espécies de mosquitos por meio dos sons emitidos durante o voo (GENOUD et al., 2020; MOORE et al., 1986; OUYANG et al., 2015;

POTAMITIS, 2014; SALIM et al., 2017), uma vez que os sons produzidos pelos mosquitos variam de acordo com a espécie e, portanto, podem ser utilizados como uma ferramenta de identificação taxonômica (COSTELLO, 1974; GEBRU et al., 2018).

O início dos estudos relacionando os sons emitidos pelos mosquitos com as espécies teve início em meados dos anos 40 com Kahn et al. (1945). Desde então este estudo tornou-se a base para diversas pesquisas com foco na identificação automática de espécies de insetos (ARTHUR et al., 2014; BATISTA et al., 2011; BELTON; COSTELLO, 1979; GENOUD et al., 2020; OGAWA; KANDA, 1986; WISHART; RIORDAN, 1959).

Dentre as informações que podem ser obtidas a partir dos sons emitidos pelos insetos durante o voo, destaca-se a frequência de batida de asa (FBA), que é medida em Hertz (Hz). Diversos dispositivos têm sido empregados para capturar a frequência de batida de asa de insetos, desde os mais antigos como o estroboscópio e o oscilógrafo (SOTAVALTA, 1952), os sensores acústicos, como os microfones (ARTHUR et al., 2014; COSTELLO, 1974; BELTON; COSTELLO, 1979; KAHN et al., 1945; OGAWA; KANDA, 1986; VILLARREAL; WINOKUR; HARRINGTON, 2017) até os mais recentes, como os sensores ópticos (BATISTA et al., 2011; GENOUD et al., 2018; GENOUD et al., 2020; OUYANG et al., 2015). Na próxima seção são descritos alguns dos principais estudos que empregaram sensores para capturar a FBA de insetos.

2.3.1 Sensores que capturam a frequência de batida de asa de insetos

Costello (1974) utilizou um microfone para capturar a FBA do *Ae. aegypti*. Durante o voo, geralmente induzido por agitação da gaiola, a FBA foi gravada por meio do microfone e transferida para o analisador de espectro sonoro e um ultrassonograma foi gerado para posterior análise. O estudo também demonstrou o efeito de algumas variáveis ambientais como tamanho do mosquito, temperatura, umidade, luz e pressão atmosférica na FBA.

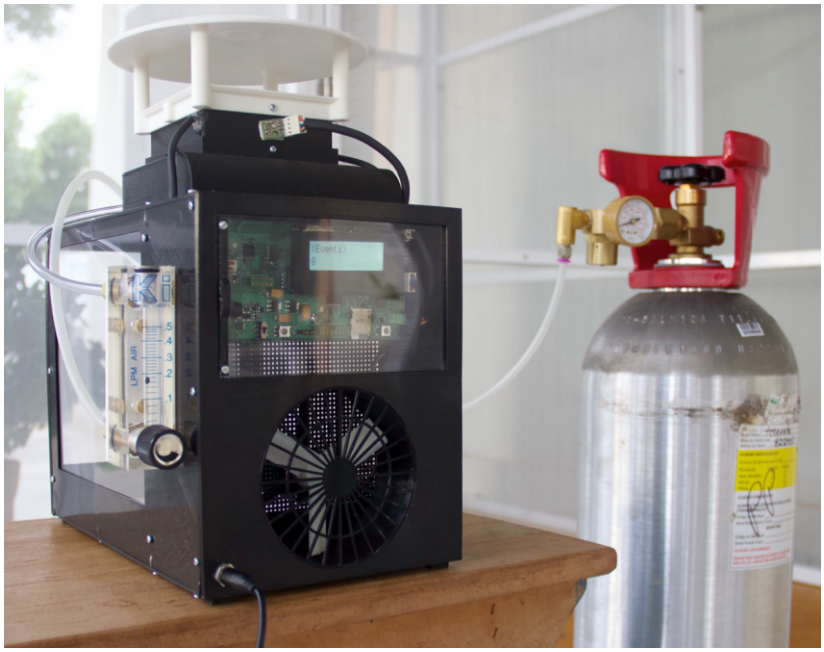
Em 1986, Moore et al. (1986) desenvolveram um sistema automático para a detecção de insetos durante o voo com base no sensoriamento optoeletrônico e posterior análise do sinal de espectro de frequência utilizando tacômetro óptico. Para monitorar o sistema em tempo real a saída do sensor foi direcionada para um computador equipado com um conversor analógico-digital e o monitoramento consecutivo foi realizado utilizando um gravador de áudio inserido em um analisador de frequência. Os experimentos foram realizados com o *Ae. aegypti* e o *Ae. triseriatus* e demonstraram que a espécie e o sexo dos indivíduos foram identificados corretamente, com acurácia de 84%, utilizando a frequência de batida de asa.

Com o passar dos anos e o avanço da tecnologia, diferentes métodos para detectar os sons dos insetos foram aprimorados e surgiram novos horizontes, com possibilidades de empregar diversos tipos de técnicas. Pesquisas mais recentes consideram que um sistema com um par de emissor e receptor de luz cujas variações na luz, causadas por um inseto

voador ao cruzar o feixe de luz, é a base para sensores robustos, rápidos e que não são influenciados por ruídos externos, como o barulho do vento ou de outros animais (SANTOS et al., 2019). Desde então, diferentes tipos de mecanismos utilizando sensores ópticos foram estudados, desde os mais simples até os que associam sensores sofisticados e detectores.

Batista et al. (2011) desenvolveram um sensor óptico constituído por um LED infravermelho, dois espelhos paralelos e um fototransistor (receptor), com o objetivo de monitorar espécies de insetos. Além de identificar as espécies, o sensor é capaz de distinguir o sexo e realizar a contagem dos insetos em tempo real. Segundo os autores, a proposta do sensor é de que este seja utilizado em conjunto com uma armadilha, permitindo que somente os insetos de interesse sejam capturados, uma vez que a maior parte dos insetos possuem um papel relevante para o equilíbrio ecológico. A armadilha da Figura 4 também foi desenvolvida pelos pesquisadores utilizando materiais de baixo custo na produção das mesmas, como também dos sensores, para que se tornassem economicamente acessíveis.

Figura 4 – Armadilha equipada com sensor óptico utilizada para contar e identificar espécies de mosquitos em tempo real



Fonte: Souza et al. (2020)

Além de capturar somente as espécies-alvo e ter baixo custo, o sensor proposto por Batista et al. (2011) possui outras vantagens: não detecta os ruídos externos, como sons de outros animais ou do vento, o que é muito importante, principalmente para a utilização em campo; a facilidade para coletar os dados com um número grande de mosquitos, o que possibilitou a construção de modelos de classificação com vasto número de dados e que juntamente com a utilização de um algoritmo simples, aumentou a acurácia de identificação das espécies. De acordo com Silva et al. (2015), esta tecnologia apresentou

resultados superiores a 95% de acurácia na identificação de duas espécies de mosquitos: *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Este dispositivo também possui um conjunto de outros sensores que possibilitam a medição e o registro da temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade e altitude de cada dado coletado, além da data e horário. Com isso, dados suficientes são gerados, o que permite estudar a dinâmica espacial e temporal do comportamento dos mosquitos.

Potamitis (2014) avaliou o emprego de um sensor óptico baseado em uma fonte de luz laser acoplada a um fototransistor na identificação de quatro espécies: *Ae. aegypti, C. quinquefasciatus, Culex tarsalis* e *Culex stigmatosoma* utilizando a FBA. Para isso, o pesquisador utilizou um modelo probabilístico de uma mistura de gaussianas complexas e que se mostrou eficaz em capturar as características do som das asas dos insetos. Segundo o autor, os dados gravados são semelhantes a uma gravação realizada por microfone. O autor destaca também que as vantagens do sensor óptico em relação ao microfone é que o sensor não detecta a interferência de ruídos externos.

Potamitis e Rigakis (2015) desenvolveram um sensor óptico com duas fontes de luz, a LED *(Light Emitting Diodes)*, e a luz laser para coletar a FBA de três espécies de insetos: a *Bactrocera oleae*, considerada uma praga nas plantações de oliveiras, o *Anopheles gambiae*, o mosquito vetor da malária e a *Apis mellifera*, uma abelha melífera ocidental. Os pesquisadores também utilizaram um microfone para o mesmo fim e compararam os resultados dos dois dispositivos na identificação de espécies. De acordo com os autores, tanto o sensor constituído pela luz laser quanto a LED apresentaram performance semelhante ou até melhor que o microfone. Segundo os autores os dispositivos ópticos podem substituir os microfones na captura dos sons produzidos por insetos. Além disso, os autores afirmam que, uma vez incorporados em armadilhas para insetos, os sensores ópticos mudarão a maneira como o monitoramento de insetos é realizado atualmente.

Ouyang et al. (2015) desenvolveram um sistema composto por três emissores de luz infravermelha para detectar a FBA de três espécies de mosquitos (*Ae. albopictus, Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*) e identificar as espécies e o sexo de cada inseto em tempo real utilizando Aprendizado de Máquina *(Machine Learning)*. Mullen et al. (2016) utilizaram uma combinação de fontes ópticas, detectores e *softwares* sofisticados para capturar e identificar insetos voadores em tempo real. Além disso, o sistema pode eliminar os insetos por meio de um pulso de laser letal. Os pesquisadores conduziram os estudos com a *Diaphorina citri*, vetor de doenças em plantas cítricas e o *Anopheles stephensi*, vetor da malária.

Villarreal, Winokur e Harrington (2017) estudaram a FBA de *Ae. aegypti* fêmeas em diferentes condições de temperatura do ar, tamanho do mosquito e voo (livre ou presas por um fio). Os pesquisadores utilizaram um microfone para capturar a FBA dos mosquitos e um *software* para extrair informações sobre a FBA. Staunton et al. (2019)

também estudaram a FBA de *Ae. aegypti* em distintas situações, como temperatura do ar, tamanho e idade dos mosquitos. Os pesquisadores capturaram a FBA dos insetos por meio de um sensor ultrassônico.

Gebru et al. (2018) utilizaram um sensor óptico juntamente com uma combinação complexa de espectroscopia de modulação multibanda e laser infravermelho na identificação, durante o voo, de quatro espécies de mosquitos transmissores de doenças: *Anopheles coluzzii, An. arabiensis, Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Este dispositivo também detectou outras características dos mosquitos, além da FBA, como a refletância, a razão espectral e o brilho dos mosquitos. No entanto, de acordo com Genoud et al. (2018), equipamentos como este são mais complexos e somente podem ser utilizados em ambientes controlados, como em laboratórios, não podendo ser utilizados em campo.

Estudos realizados em laboratório, como os citados acima, demonstraram que a identificação de espécies de mosquitos com base na frequência de batidas de asas tem grande potencial. No entanto, é importante ressaltar que algumas características referentes aos mosquitos e também ao meio podem influenciar a FBA, tornando a identificação de espécies por meio da FBA uma tarefa desafiadora (NADAI et al., 2021). Porém, a maioria dos estudos relacionados à FBA de mosquitos não leva em conta estas características (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais estudos relacionados à frequência de batida de asas em mosquitos

Referência	**Espécies***	**Condições testadas**
Kahn et al. (1945)	a, b, c, e	-
Costello (1974)	a	Tamanho do mosquito, temperatura, umidade, pressão atmosférica e luz
Ogawa e Kanda (1986)	d	Tamanho, idade, acasalamento, alimentação com sangue, desenvolvimento do ovo e oviposição
Batista et al. (2011)	a, f	-
Arthur et al. (2014)	a	-
Ouyang et al. (2015)	a, b, f	-
Salim et al. (2017)	b	-
Villarreal, Winokur e Harrington (2017)	a	Tamanho e temperatura
Genoud et al. (2018)	a, b, g	-
Staunton et al. (2019)	a	Tamanho, idade e temperatura

*Espécies estudadas: (a) *Aedes aegypti*, (b) *Aedes albopictus*, (c) *Anopheles quadrimaculatus*, (d) *Anopheles* sp., (e) *Culex pipiens*, (f) *Culex quinquefasciatus*, (g) *Culex* sp.
Fonte: adaptado de Nadai et al. (2021)

Consequentemente, para que o dispositivo de identificação automática das espécies seja confiável, ele deve detectar as pequenas diferenças na frequência de batidas de asas de cada mosquito coletado, levando em conta as condições ambientais que podem influenciar a FBA do mosquito. Estudos sugerem que a FBA de mosquitos pode ser influenciada pela temperatura (COSTELLO, 1974; SALIM et al., 2017; VILLARREAL; WINOKUR; HARRINGTON, 2017), tamanho do mosquito (CLEMENTS et al., 1992; COSTELLO, 1974; STAUNTON et al., 2019) e idade (OGAWA; KANDA, 1986; STAUNTON et al., 2019). Desse modo, o conhecimento destes fatores pode auxiliar no aperfeiçoamento e na acurácia dos dispositivos que utilizam a FBA para a identificação de espécies, além de ajudar especialistas na compreensão da biologia e da ecologia dos mosquitos. Assim, ressalta-se a importância de estudos sobre as diversas condições ambientais que podem impactar a frequência de batida de asas de diferentes espécies de mosquitos transmissores de doenças.

3 MATERIAIS E MÉTODO

Nesta seção, são apresentados os materiais e o método utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa.

3.1 *Aedes aegypti*

Os estudos foram realizados com o mosquito *Aedes aegypti* no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos - LEAA, da Universidade de São Paulo - campus São Carlos. Partes deste estudo também foram realizadas no *Vector Ecology Laboratory*, da *North Carolina State University*, na cidade de Raleigh, Carolina do Norte, Estados Unidos. Os ovos de *Aedes aegypti* tiveram origem em uma colônia estabelecida a partir de uma coleção, no ano de 1996, da linhagem *Rockefeller* (ROCK) pela empresa ASR (*Analytical & Scientific Reasearch*), localizada na cidade de Charqueada, SP. Já os mosquitos utilizados nos experimentos realizados nos Estados Unidos são a 11ª geração provenientes de ovos coletados na Flórida, Arizona e Califórnia em 2014 e 2015. Estas populações foram mantidas separadas e, em 2017 foram misturadas.

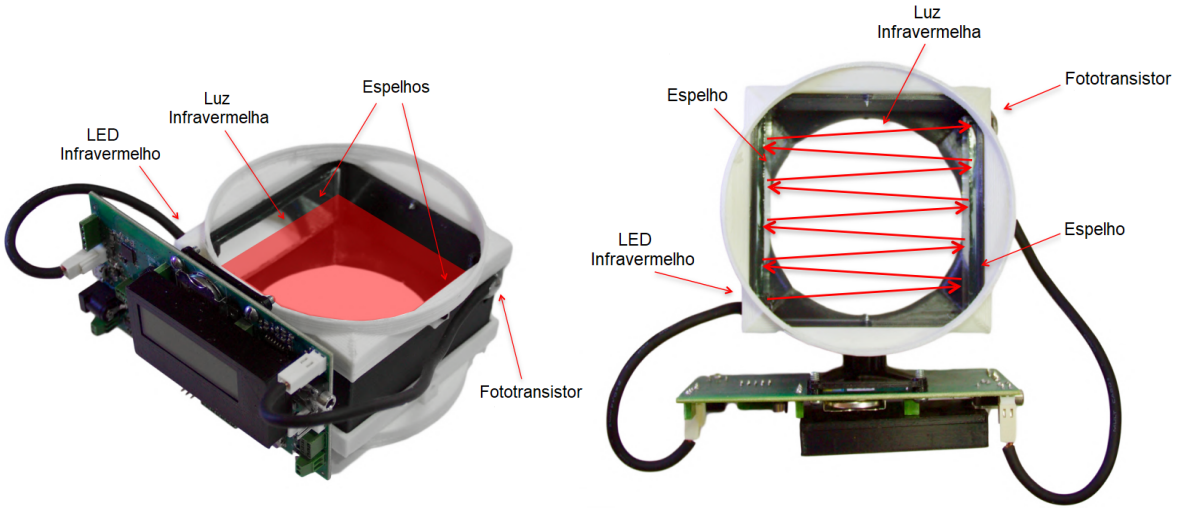
3.2 Sensor óptico

Para estudar a frequência de batida de asas do *Ae. aegypti* durante o voo foi utilizado o sensor óptico desenvolvido por Batista et al. (2011). O sensor é composto por um LED infravermelho, dois espelhos paralelos frente a frente e um fototransistor (Figura 5).

Quando o LED infravermelho é ligado, a luz bate no espelho e é refletida pelo espelho oposto, que por sua vez reflete a luz novamente até criar uma cortina de luz. Durante o voo, quando o mosquito atravessa esta cortina, ocorrere a interrupção parcial da luz, provocada pelos movimentos do mosquito, principalmente pela batida das asas. Essa interrupção gera variações que são capturadas pelos fototransistores e são registradas como um sinal digital com diferentes amplitudes, uma espécie de assinatura do mosquito. Os sinais capturados pelos fototransistores são enviados a um circuito eletrônico projetado para filtrar, amplificar e codificar o sinal capturado em um sinal de áudio. Este sinal é muito semelhante a um sinal de áudio capturado por um microfone, embora os dados sejam obtidos opticamente. A partir deste sinal, é extraída a frequência de batida de asas, convertendo inicialmente o sinal de áudio representado no domínio do tempo para o domínio da frequência, por meio da Transformada Discreta de Fourier (TDF). Portanto, a aplicação da TDF sobre o sinal da Figura 6a resulta no espectro de frequência da Figura 6b. Diversas informações podem ser extraídas com a análise do espectro ou do sinal no domínio

Figura 5 – Principais componentes do sensor óptico empregado para capturar a frequência de batida de asas dos mosquitos

(a) Vista lateral (b) Vista superior



Fonte: Adaptado de Souza et al. (2020)

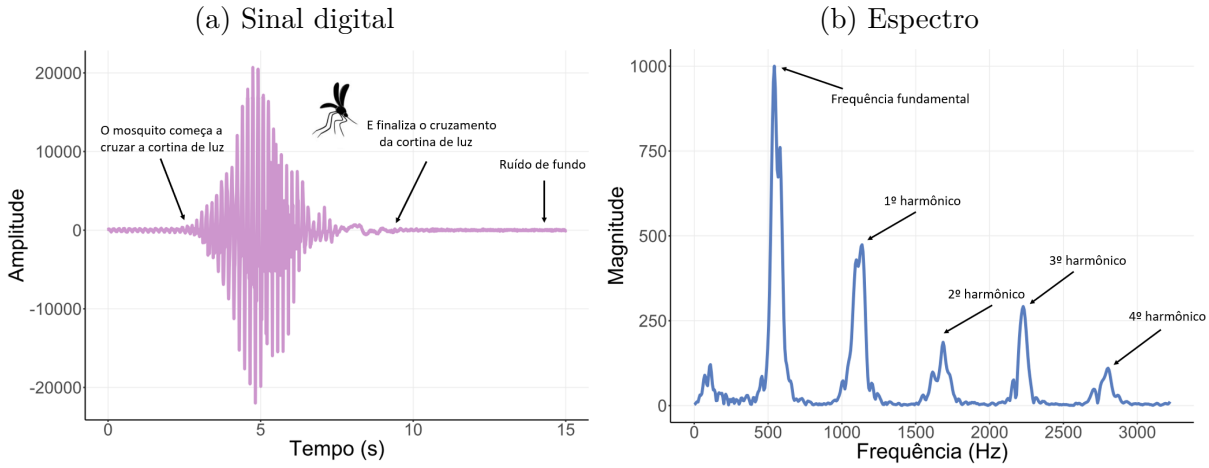
da frequência, dentre as quais a frequência fundamental. Por exemplo, no domínio da música, uma nota pode ser caracterizada pela sua frequência fundamental. No domínio de sensores de insetos, a frequência de movimento das asas do inseto que cruza o sensor óptico pode ser caracterizada pela mesma frequência fundamental. Assim sendo, a frequência fundamental é capaz de descrever diversos domínios, sendo, portanto, caracterizada como a frequência de maior magnitude no espectro, conforme ilustrado na Figura 6b.

Na Figura 6 é apresentado um exemplo dos dados gerados pelo sensor quando um mosquito *Ae. aegypti* fêmea atravessa a cortina de luz.

A Figura 6a refere-se a um sinal composto principalmente por um breve período de 4 segundos com alta variação de amplitude e pelo ruído de fundo. Este sinal é registrado como um sinal digital. A oscilação de ampla amplitude refere-se ao momento exato em que o mosquito cruza a cortina de luz. Vale ressaltar que o ruído de fundo é gerado pelo próprio equipamento e pode-se notar que não apresenta variação na intensidade, assim não interfere no sinal gerado pelo mosquito.

A partir destes dados, é possível extrair informações que podem ser empregadas para identificar as espécies e/ou descrever o seu comportamento ao longo do tempo. Dentre elas a frequência de batida de asa, que está diretamente relacionada à frequência fundamental do sinal e podem ser encontradas por meio da análise do áudio gravado na representação do domínio da frequência (espectro) (ZÖLZER, 2008). A frequência de batida de asa, também conhecida como frequência fundamental, representa a quantidade

Figura 6 – Dados gerados pelo sensor quando um mosquito atravessa a cortina de luz



Fonte: elaborado pela autora

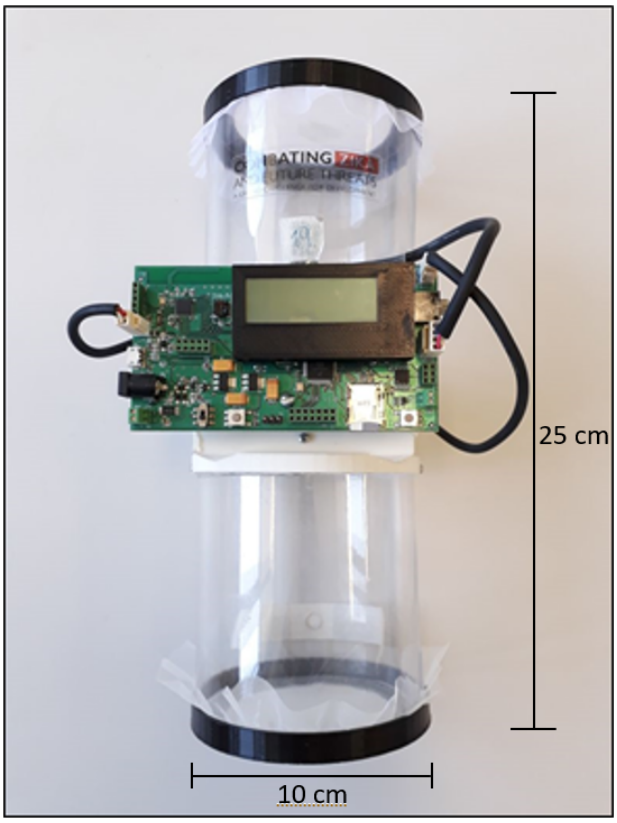
de vezes que o mosquito bate as asas durante um segundo, é medida em Hertz (Hz). Na Figura 6b, pode-se observar que a FBA do *Ae. aegypti* fêmea é de aproximadamente 560 Hz, além de outras informações relevantes como a localização, forma e amplitude dos primeiros harmônicos.

O mecanismo mencionado acima torna os ruídos externos como o barulho do vento, animais, carros, entre outros, imperceptíveis. Esta é uma das vantagens da utilização de sensores ópticos comparados a outros dispositivos utilizados para estudar o som emitido pelos mosquitos, como por exemplo os microfones. Além desta, outras vantagens podem ser mencionadas, tais como: permitem o voo livre dos mosquitos, sem a necessidade de estarem amarrados e de estímulos artificiais para o voo, além de permitir o estudo de mosquitos ao longo do tempo, individualmente ou em grupo.

Para que a realização dos experimentos fossem possíveis, este sensor foi acoplado na parte média de um tubo com o objetivo proporcionar um espaço com tamanho suficiente para o voo livre dos mosquitos (Figura 7). Este equipamento foi denominado de coletor, possui 25 cm de altura e 10 cm de diâmetro e está equipado com um conjunto de sensores, os quais medem temperatura, umidade relativa do ar, pressão atmosférica e luminosidade.

Desse modo, quando um mosquito atravessa a cortina de luz, são gravados, além da FBA, outros dados coletados por estes sensores. Isto é, além da FBA, pode-se saber também qual a hora, a temperatura e a umidade do ar no exato momento em que o mosquito cruza a cortina de luz, por exemplo. Neste estudo foram utilizados coletores similares aos da (Figura 7). Nos experimentos os mosquitos adultos foram inseridos nos coletores e então dispostos no interior de incubadoras (Figura 8), as quais possibilitaram a simulação de diversas situações ambientais por meio do controle de condições como temperatura e umidade.

Figura 7 – Coletor utilizado neste estudo



Fonte: elaborado pela autora

Vale ressaltar que antes da realização de cada ensaio, após inserir os mosquitos nos coletores e posteriormente nas incubadoras, houve um intervalo de uma hora para a adaptação dos mosquitos tanto aos coletores quanto às condições testadas. Após esse período os coletores eram ligados para então dar início aos ensaios. A seguir é apresentado o delineamento experimental deste estudo.

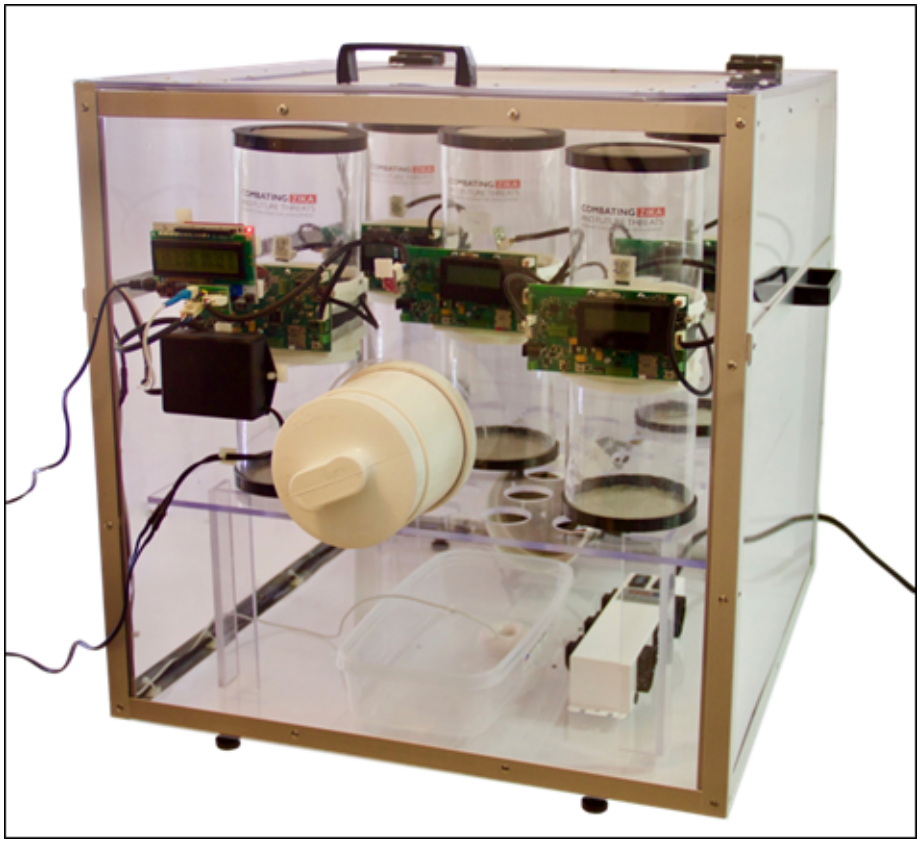
Delineamento experimental

Com o intuito de guiar os experimentos principais deste estudo, foram realizados dois experimentos preliminares: um para verificar a variabilidade dos coletores utilizados neste trabalho e outro para a investigação da frequência média do batimento de asas de mosquitos machos e fêmeas. Estes experimentos encontram-se detalhados a seguir.

3.3 Variabilidade dos coletores

Por se tratar de dispositivos ainda em fase de protótipo, os coletores utilizados neste estudo não possuem um mecanismo de aferição de erros até o momento. Desse modo, para verificar a variabilidade existente entre os coletores foram realizados ensaios com dois mosquitos adultos, um macho e uma fêmea, e onze coletores identificados da seguinte

Figura 8 – Incubadora utilizada para a realização dos experimentos



Fonte: Maletzke (2019)

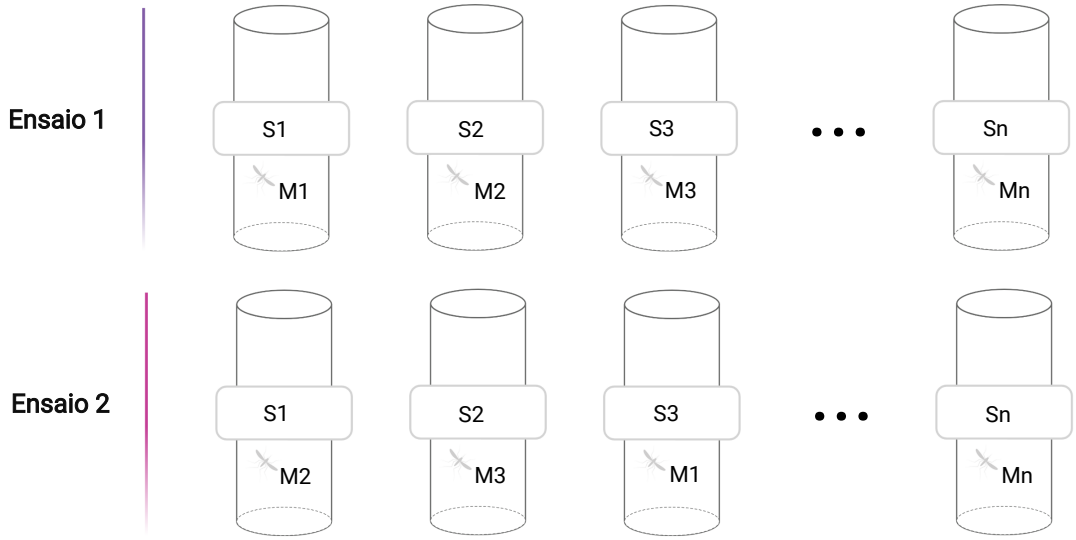
forma: AS, S2, S3, S4, S8, S9, S11, S13, S15, S17 e S26.

As larvas dos mosquitos *Ae. aegypti* foram criadas em frascos contendo 300 mL de água da torneira e alimentadas a cada dois dias com ração para peixe (Tetramin®) trirurada, à temperatura de 28ºC e fotoperíodo de 12:12h [L:E] (12h na luz e 12h no escuro). Os mosquitos emergidos foram separados em frascos com tampas compostas por telas e mantidos nas mesmas condições até serem dispostos nos coletores. Os adultos foram alimetados com solução de açúcar à 10%.

Para a coleta da FBA um mosquito adulto (com 4 a 5 dias após a emergência) foi colocado em cada coletor e disposto em incubadora à temperatura de 28ºC, 70% de umidade e fotoperíodo de 12:12h [L:E] durante 48h. Após, os mosquitos foram removidos cuidadosamente dos coletores com auxílio de um sugador e alocados em coletores diferentes. Este processo foi repetido até que houvesse a passassem dos mosquitos testados por todos os coletores (Figura 9).

Macho e fêmea foram colocados em incubadoras separadas. Neste período os adultos foram alimentados com solução de água e açúcar à 10%.

Figura 9 – Representação dos ensaios realizados para a análise da variabilidade dos coletores



Fonte: elaborado pela autora
Criado com BioRender.com

3.4 Frequência média de batida de asas

Foram realizados ensaios para a verificação da frequência média de batida de asas de *Ae. aegypti* machos e fêmeas. Para isto, as larvas foram criadas à temperatura de 28ºC, fotoperíodo de 12:12h [L:E] e alimentadas a cada dois dias com ração para peixe triturada. Os adultos resultantes foram dispostos em frascos cobertos por telas e alimentados com solução de água e açúcar à 10%.

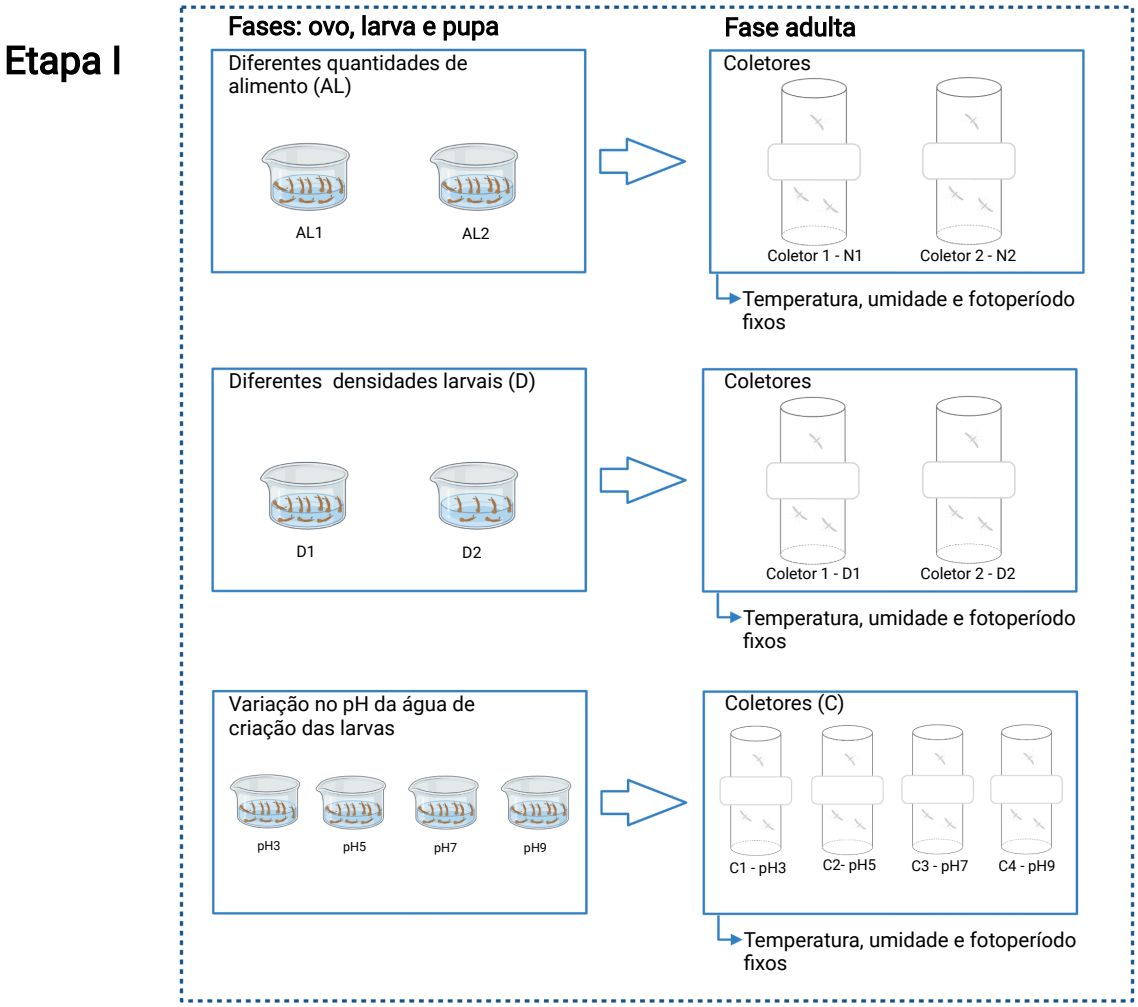
Foram utilizados dois coletores para a realização destes ensaios. Desse modo, após a emergência dos adultos, 20 mosquitos fêmeas e 20 machos foram colocados separadamente nos coletores, e estes inseridos em incubadoras distintas. Os adultos foram alimentados com solução de água e açúcar à 10%. Os dados foram coletados no período de sete dias, com temperatura constante de 28ºC, umidade de 70% e fotoperíodo de 12:12h [L:E].

A realização dos próximos experimentos foi dividida em duas etapas, abrangendo o controle das condições ambientais de acordo com a fase de desenvolvimento dos mosquitos.

Etapa I - Alterações ambientais nas fases de ovo, larva e pupa

Nesta etapa as alterações ambientais ocorreram durante as fases de ovo, larva e pupa. Assim, foram testadas diferentes quantidades de alimento, densidades larvais e valores de pH da água de criação durante estas fases, e, posteriormente foi coletada a FBA dos adultos originados destas condições. A Figura 10 é uma representação esquemática desta etapa.

Figura 10 – Representação dos ensaios realizados na Etapa I



Fonte: elaborado pela autora
Criado com BioRender.com

A seguir são descritos cada um dos experimentos realizados na Etapa I.

3.5 Alimento

Com o intuito de avaliar a sobrevivência de larvas submetidas a baixos níveis de alimento e a frequência de batida de asas dos possíveis adultos resultantes, foram realizados ensaios com duas quantidades de alimento (Tabela 2).

Os ensaios foram realizados em frascos contendo 500 mL de água da torneira e 40 larvas de *Ae. aegypti* em cada (COURET; DOTSON; BENEDICT, 2014), em triplicata. O primeiro ensaio foi realizado sem a adição de alimento na fase de larva. Já o ensaio 2 consistiu na adição de 100 mg L $^{-1}$ de alimento triturado (ração para peixe) somente no I

Tabela 2 – Ensaios utilizando diferentes quantidades de alimento

Ensaios	Quantidade de alimento
1	0
2	100 mg L $^{-1}$

Fonte: elaborado pela autora

ínstar, o que equivale a 2,5 mg larva $^{-1}$. Durante a realização destes ensaios a temperatura do ar foi mantida a 28ºC e o fotoperíodo de 12:12h [L:E]. Os ensaios foram observados diariamente, e as larvas mortas, assim como as exúvias, foram retiradas. Os ensaios tiveram duração máxima de 36 dias.

3.6 Densidade larval

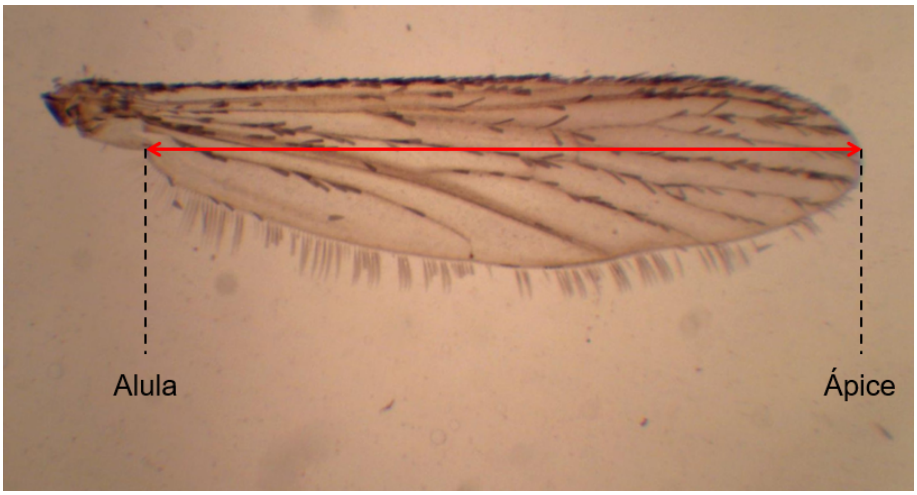
Com o intuito de avaliar a influência do tamanho do mosquito na frequência de batida de asas do *Ae. aegypti* foram realizados ensaios com dois tamanhos de mosquitos. Para gerar mosquitos com tamanhos diferentes, duas densidades larvais foram utilizadas: baixa (50 larvas) para gerar mosquitos grandes e alta (200 larvas) para gerar mosquitos pequenos (REISKIND; LOUNIBOS, 2009). Os ensaios foram realizados com 1 L de água da torneira, resultando em densidades de 0,05 e 0,2 larvas mL $^{-1}$, respectivamente.

Os ovos foram colocados em frascos contendo 1 L de água de torneira e 0,2 g de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (MP Biomedicals). Após 24h, as larvas de I ínstar foram contadas e separadas em frascos contendo 1 L de água da torneira e 0,3 g de ração para peixe triturada, adicionada somente nesta etapa. As larvas foram criadas em temperatura (28ºC) e fotoperíodo (14:10h [L:E]) constantes até a fase de pupa. As pupas foram separadas por sexo e duas pupas machos e uma fêmea foram colocadas juntas em tubos de plástico (com dimensões de 2,8 x 11 cm) com 10 mL de água, para garantir o acasalamento entre os mosquitos na fase adulta. Os adultos emergidos foram mantidos nos tubos cobertos com tela e alimentados com solução de 10% de açúcar.

Para a coleta da FBA mosquitos com 4 a 5 dias após a emergência foram alocados nos coletores e dispostos em incubadoras nas seguintes condições: 26ºC, fotoperíodo de 14:10h [L:E] e umidade entre 60 e 65%. Machos e fêmeas foram colocados em incubadoras separadas. Este experimento foi realizado com um mosquito por coletor.

Após a coleta da FBA, os mosquitos foram colocados em microtubos, etiquetados e congelados à -20ºC. Com a finalização de todas as coletas de FBA, os mosquitos foram secos em estufa à 48°C por 24h, pesados (balança Sartorius, Cubis, German) e uma asa foi removida de cada indivíduo para a medida do comprimento. O comprimento da asa foi medido em milímetros, da alula ao ápice (Figura 11), de acordo com Reiskind e Zarrabi (2012), utilizando microscópio óptico (cellSens, Olympus).

Figura 11 – Asa direita da fêmea *Aedes aegypti* com o comprimento medido, da alula ao ápice



Fonte: elaborado pela autora

Neste experimento foram testados 10 mosquitos de cada sexo: 5 originados da baixa densidade larval e 5 provenientes da alta densidade larval. Cada mosquito foi proveniente de frascos diferentes, garantindo observações independentes do efeito da densidade.

3.7 PH inicial da água de criação das larvas

Para avaliar a influência de diferentes valores de pH iniciais da água de criação das larvas na FBA de adultos resultantes destas condições foram testados quatro valores de pH: 3, 5, 7 e 9. Este experimento foi realizado com mosquitos machos e fêmeas de dois tamanhos: grandes e pequenos, o qual resultou em 16 ensaios (Tabela 3). Cada ensaio foi realizado com 4 réplicas.

A água utilizada na criação das larvas teve o pH ajustado para os seguintes valores: 3, 5, 7 e 9, de acordo com o ensaio realizado. O pH foi ajustado somente em duas fases: antes de colocar os ovos na água e após o I instar, momento em que as larvas foram contadas e separadas. Para ajustar os valores foram utilizadas soluções de ácido clorídrico (HCl) com a finalidade de reduzir o pH do meio e hidróxido de sódio (NaOH) para elevar o pH, à concentração de 0,1 N (normal), de acordo com Clark, Flis e Remold (2004). Os valores foram medidos em pHmetro (Gehara - PG 1800), devidamente caibrado antes de cada medição.

Os ovos foram colocados em frascos contendo 1 L de água de torneira (com o pH ajustado para cada ensaio) e 0,2 g da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (MP Biomedicals). Após 24h, as larvas foram contadas e separadas em frascos distintos contendo 1 L de água da torneira (com o pH ajustado): 1 frasco com 50 larvas (para gerar mosquitos grandes) e 1 frasco com 200 larvas (para gerar mosquitos pequenos) e alimentadas com 0,3 g de ração

Tabela 3 – Ensaios com diferentes valores de pH da água de criação das larvas de *Ae. aegypti*

Ensaios	pH	Tamanho do mosquito	Sexo
1	3	Grande	Fêmea
2	3	Grande	Macho
3	5	Grande	Fêmea
4	5	Grande	Macho
5	7	Grande	Fêmea
6	7	Grande	Macho
7	9	Grande	Fêmea
8	9	Grande	Macho
9	3	Pequeno	Fêmea
10	3	Pequeno	Macho
11	5	Pequeno	Fêmea
12	5	Pequeno	Macho
13	7	Pequeno	Fêmea
14	7	Pequeno	Macho
15	9	Pequeno	Fêmea
16	9	Pequeno	Macho

Fonte: elaborado pela autora

para peixe triturada, adicionada somente nesta etapa.

As larvas foram criadas em temperatura (28ºC) e fotoperíodo (14:10h [L:E]) constantes. Na fase de pupa, estas foram separadas em recipientes menores (15 pupas em cada) e colocadas em potes cobertos com tela. Foram colocadas pupas fêmeas e machos no mesmo recipiente para garantir o acasalamento entre os mosquitos na fase adulta. As larvas e pupas foram monitoradas diariamente, até a emergência dos adultos. Após a emergência os mosquitos foram alimentados com solução de açúcar à 10%.

Foram colocados 10 mosquitos adultos, com 4 a 5 dias após a emergência, em cada coletor e machos e fêmeas foram colocados em incubadoras, separadamente, à temperatura constante de 26ºC, umidade entre 60 a 65% e fotoperíodo de 14:10h [L:E], por 96 horas. Os mosquitos grandes também foram colocados em coletores separados dos pequenos.

A influência do pH da água de criação também foi verificada em relação ao peso seco e ao tamanho do centróide da asa dos mosquitos. Para isso, após o término dos ensaios os mosquitos foram colocados em microtubos, etiquetados e congelados para posterior secagem, pesagem e medida das asas.

3.7.1 Secagem e pesagem dos mosquitos

Antes de serem pesados, os mosquitos foram secos em estufa à temperatura de 48ºC, por 24 horas. Depois de secos, os mosquitos foram pesados individualmente em

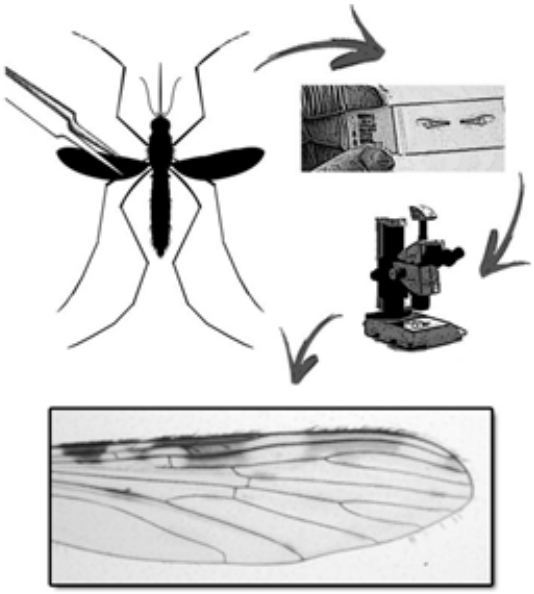
balança semi-microanalítica (Bel - HPB 625i).

3.7.2 Medida do tamanho do centróide das asas

De acordo com Garros e Dujardin (2013), o tamanho da asa pode ser diretamente retratado pelo tamanho do centróide (TC), o qual é calculado levando em consideração os pontos anatômicos (PAs) marcados em cada asa. No caso dos mosquitos, os pontos anatômicos são formados pelo encontro de três estruturas, como por exemplo, as interseções entre as veias alares. O conjunto destes pontos resulta em uma matriz de dados constituída por coordenadas cruas em um plano cartesiano, as quais são utilizadas para análises posteriores. Assim, o TC pode ser calculado pela raiz quadrada da soma das distâncias ao quadrado de todos os PAs, até o centróide (VIRGINIO-FONSECA, 2018).

Assim, após a pesagem dos mosquitos, as asas direitas de cada indivíduo foram removidas cuidadosamente com a ajuda de pinças e de uma lupa (Nikon - C-Leds). O excesso de escamas e cerdas de cada asa foi retirado com o auxílio de um pincel fino e álcool 70%, com o intuito de facilitar a visualização e a marcação dos pontos anatômicos. Logo, as asas foram inseridas em soluções de álcool à 90% e 100% e colocadas entre lâmina e lamínula juntamente com Meio de Hoyer (Figura 12). Por último, as lâminas com as asas foram colocadas em estufa à temperatura de 42ºC, por 72 horas, para secagem (FUNDAÇÃO BUTANTAN, 2020).

Figura 12 – Remoção da asa do indivíduo e preparo das lâminas



Fonte: Virginio-Fonseca (2018)

Em seguida, as imagens das asas foram capturadas por meio de uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico (Nikon – Eclipse E200) utilizando aumento de 40 vezes

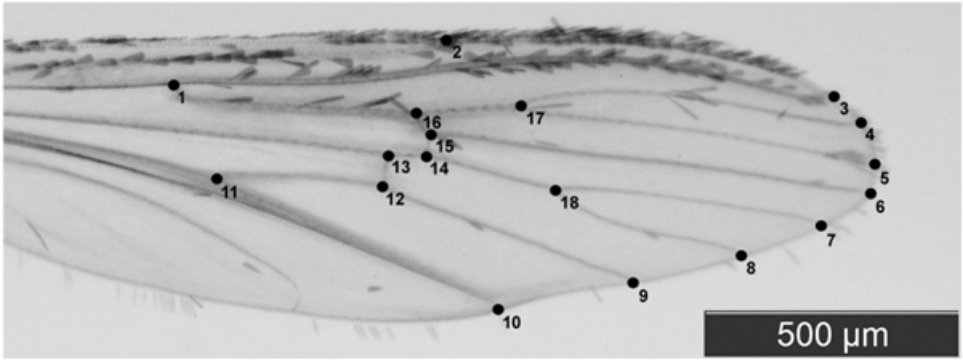
e digitalizadas com o *software TS View Digital Imaging*.

Os pontos anatômicos são marcados manualmente e, portanto existe a possibilidade de ocorrências de imprecisões nas marcações. Desse modo, para mensurar a confiabilidade do sistema de marcações aplicado para o cálculo do tamanho do centróide, foi executado o Teste de Repetibilidade antes da marcação dos pontos anatômicos nas amostras.

O teste consistiu na marcação de dois pontos anatômicos em uma mesma asa (escolhida aleatoriamente), sendo um deles de maior dificuldade na marcação. Os pontos escolhidos para o teste foram o 2 e o 5 (Figura 13). Foram realizadas seis repetições de cada ponto. Após, foi executado o "Teste de Repetibilidade" no *software* Statistica, seguindo o protocolo do Instituto Butantan (FUNDAÇÃO BUTANTAN, 2020).

Após o Teste de Repetibilidade, foram marcados 18 pontos anatômicos em cada asa, de acordo com Louise, Vidal e Suesdek (2015), utilizando o *software TpsDig* (ROHLF, 2004). Na Figura 13 encontram-se a localização dos PAs utilizados para o cálculo do tamanho do centróide.

Figura 13 – Asa direita de *Aedes aegypti* fêmea com a localização dos 18 pontos anatômicos utilizados para o cálculo do tamanho do centróide



Fonte: Louise, Vidal e Suesdek (2015)

O tamanho do centróide foi estimado utilizando-se o programa MOG, do pacote CLIC (FUNDAÇÃO BUTANTAN, 2020).

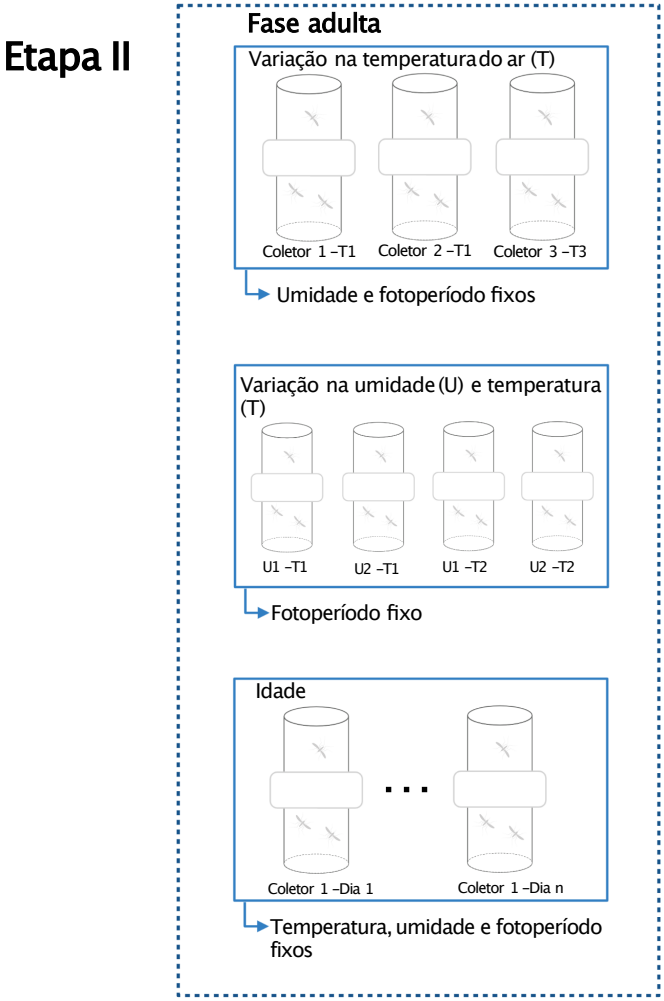
Etapa II - Alterações ambientais durante a fase adulta

Nesta etapa, os mosquitos adultos foram avaliados considerando diferentes condições ambientais que ocorreram somente na fase adulta, como temperatura do ar, umidade do ar juntamente com temperatura e idade (Figura 14).

3.8 Temperatura do ar

Para avaliar o impacto da temperatura na FBA do *Ae. aegypti*, foram testadas três temperaturas consideradas ecologicamente relevantes: 23ºC, 28ºC e 33ºC (±2) utilizando

Figura 14 – Representação dos ensaios realizados na Etapa II



Fonte: elaborado pela autora
Criado com BioRender.com

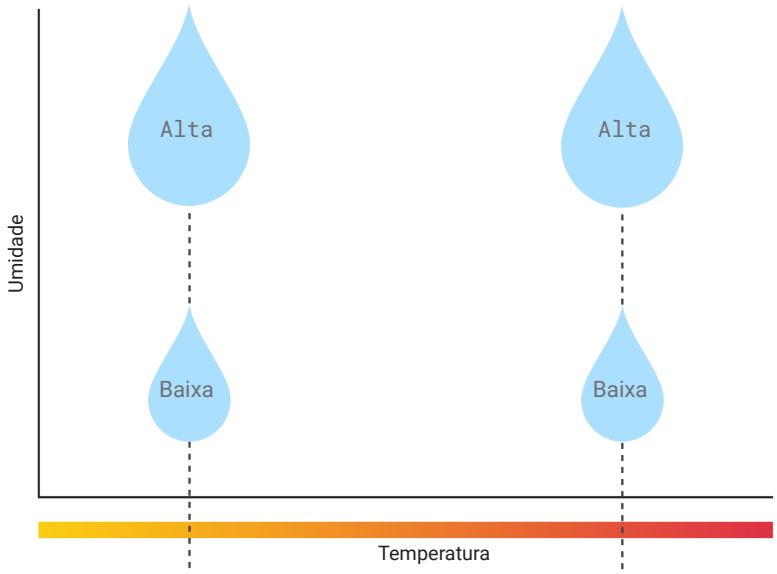
mosquitos pequenos e grandes, machos e fêmeas.

Assim, para a geração de mosquitos de tamanhos diferentes, as larvas foram criadas conforme o item 3.6 e, após a emergência dos adultos, 10 mosquitos entre 4 a 5 dias foram colocados em cada coletor. Os mosquitos grandes foram colocados em coletores separados dos mosquitos pequenos, bem como os machos foram separados das fêmeas. Em seguida, os coletores foram colocados em incubadoras ajustadas para uma das três temperaturas testadas. Os dados foram coletados por 48h (em cada uma das temperaturas testadas) nas seguintes condições: fotoperíodo de 14:10h [L:E] e umidade entre 60 e 65%. Esse experimento foi realizado em duplicata.

3.9 Umidade e temperatura do ar

Para avaliar o impacto da umidade juntamente com a temperatura do ar na FBA dos mosquitos foram realizados experimentos com duas faixas de umidade e temperatura: altas e baixas (Figura 4):

Figura 15 – Representação gráfica das condições testadas: duas faixas de temperatura e umidade (altas e baixas)



Fonte: elaborado pela autora
Criado com BioRender.com

Neste experimento foram testados os dois tamanhos de mosquitos machos e fêmeas, em duas faixas de temperatura (20 e 30°C) e umidade (30 e 80%), conforme a Tabela 4.

Estas variáveis foram testadas na fase adulta do mosquito. Para a obtenção de mosquitos de diferentes tamanhos, as larvas foram criadas conforme descrito no item 3.6. Após a emergência dos adultos foram colocados 10 mosquitos (com 4-5 dias após a emergência) em cada coletor, separados por sexo e tamanho. Em seguida, os coletores foram alocados em incubadoras com as devidas condições de temperatura e umidade, com fotoperíodo de 14:10h [L:E], durante 96h para a coleta da FBA.

3.10 Idade

A idade dos mosquitos na fase adulta também foi analisada. O intuito deste experimento foi verificar possíveis alterações na FBA dos mosquitos com o aumento da idade. Estes ensaios foram realizados com mosquitos fêmeas e machos grandes e pequenos.

As larvas foram criadas conforme descrito no item 3.6, no entanto, as pupas foram separadas em frascos pequenos contendo 50 mL de água da torneira (1 pupa em cada

Tabela 4 – Condições de temperatura e umidade testadas

Ensaios	**Umidade**	**Temperatura**	**Tamanho do mosquito**	**Sexo**
1	80%	30ºC	Grande	Fêmea
2	80%	30ºC	Pequeno	Fêmea
3	30%	30ºC	Grande	Fêmea
4	30%	30ºC	Pequeno	Fêmea
5	80%	20ºC	Grande	Fêmea
6	80%	20ºC	Pequeno	Fêmea
7	30%	20ºC	Grande	Fêmea
8	30%	20ºC	Pequeno	Fêmea
9	80%	30ºC	Grande	Macho
10	80%	30ºC	Pequeno	Macho
11	30%	30ºC	Grande	Macho
12	30%	30ºC	Pequeno	Macho
13	80%	20ºC	Grande	Macho
14	80%	20ºC	Pequeno	Macho
15	30%	20ºC	Grande	Macho
16	30%	20ºC	Pequeno	Macho

Fonte: elaborado pela autora

frasco) e alocadas dentro dos coletores. Este procedimento possibilitou a coleta da FBA desde o primeiro dia de vida na fase adulta.

Este experimento foi realizado com um mosquito por coletor, em incubadoras (separado por sexo) à temperatura constante de 26ºC, umidade entre 60 a 65% e fotoperíodo de 14:10h [L:E]. Os dados foram coletados por 23 dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção estão descritos os resultados dos experimentos, bem como a discussão.

4.1 Variabilidade dos coletores

Na Tabela 5 encontram-se a média da frequência de batida de asas do *Ae. aegypti* fêmea, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação de cada um dos coletores testados.

Tabela 5 – Variabilidade dos coletores (ensaios realizados com o mosquito fêmea)

Coletor	FBA*	DP**	Coeficiente de variação
AS	466,10 Hz	± 30,58	6,56 %
S2	514,32 Hz	± 10,71	2,08 %
S3	526,07 Hz	± 11,73	2,23 %
S4	550,04 Hz	± 7,35	1,33 %
S8	570,02 Hz	± 6,41	1,12 %
S9	552,22 Hz	± 9,52	1,72 %
S11	542,60 Hz	± 12,42	2,28 %
S13	523,84 Hz	± 6,99	1,33 %
S15	579,11 Hz	± 8,30	1,43 %
S17	555,38 Hz	± 9,13	1,64 %
S26	567,30 Hz	± 12,65	2,23 %

*Valores médios da frequência de batida de asas
**Desvio-padrão
Fonte: elaborado pela autora

De acordo com a Tabela 5, pode-se notar que, para todos os coletores testados, o coeficiente de variação oscilou entre 1,12 (S8) e 6,56% (SA). Na Tabela 6, encontram-se os resultados obtidos com o mosquito macho.

Conforme os dados apresentados na Tabela 6, nota-se que o coeficiente de variação oscilou entre 1,39 (S9) e 2,61% (S17). Os resultados, tanto para a fêmea quanto para o macho, indicam que a dispersão dos dados em relação à média é pequena, ou seja, a dispersão relativa é baixa, com um coeficiente de variação de no máximo 6,56%.

Segundo Ramos (2000), a quantificação da variabilidade de um equipamento é o conhecimento dos erros associados ao equipamento utilizado para a realização dos ensaios e permite avaliar a qualidade dos resultados. Para Montgomery (2000), a menor variabilidade do dispositivo resulta em maior qualidade dos resultados, ou seja, a qualidade é inversamente proporcional à variabilidade. As causas destas variações são resultantes de diversas origens relacionadas tanto aos materiais quanto ao *software* que o compõe, bem como os operadores envolvidos no processo (MONTGOMERY, 2000; RAMOS, 2000).

Tabela 6 – Variabilidade dos coletores (ensaios realizados com o mosquito macho)

Coletor	FBA*	DP**	Coeficiente de variação
AS	800,96 Hz	± 14,96	1,87 %
S2	762,69 Hz	± 19,12	2,51 %
S3	788,98 Hz	± 18,63	2,36 %
S4	814,10 Hz	± 13,93	1,71 %
S8	800,12 Hz	± 12,33	1,54 %
S9	782,43 Hz	± 10,91	1,39 %
S11	777,95 Hz	± 13,81	1,77 %
S13	823,12 Hz	± 16,04	1,95 %
S15	776,67 Hz	± 17,23	2,22 %
S17	772,83 Hz	± 20,17	2,61 %
S26	818,67 Hz	± 15,15	1,85 %

*Valores médios da frequência de batida de asas
**Desvio-padrão
Fonte: elaborado pela autora

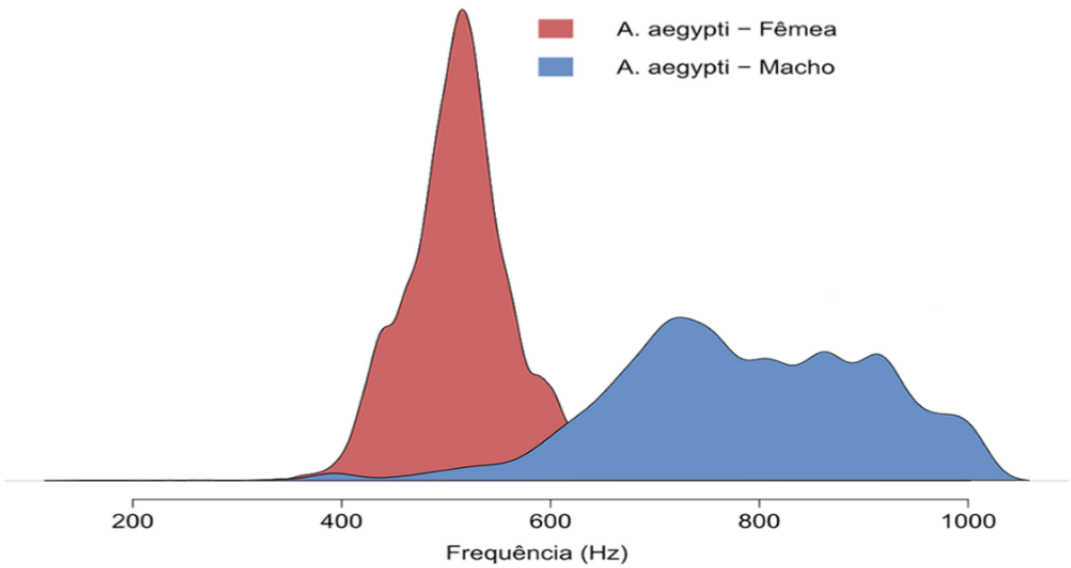
Desse modo, pode-se afirmar que os coletores utilizados neste trabalho apresentaram pouca variabilidade entre si, ou seja, os erros associados aos coletores são baixos. Embora este experimento não possa ser considerado como um método de aferição dos coletores, o qual deverá seguir padrões e critérios rigorosos, o mesmo serve para ilustrar o grau de variabilidade dos coletores utilizados neste trabalho. Além disso, deve-se considerar que a variabilidade observada pode estar associada não somente aos sensores utilizados, mas também aos espécimes estudados.

4.2 Frequência média de batida de asas

Verificou-se que a frequência média de batida das asas do *Ae. aegypti* fêmea foi de 510,15 Hz, (DP ± 38,76), menor que a FBA média do macho, a qual foi de 836,51 Hz (± 125,25), conforme a Figura 16. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato do *Ae. aegypti* fêmea ser maior, e consequentemente mais pesada, do que o macho (CLEMENTS et al., 1999; COSTELLO, 1974).

Estes resultados corroboram com outros estudos que também verificaram que a FBA do *Ae. aegypti* fêmea (♀) é menor que a do macho (♂). As frequências de batidas de asas de *Ae. aegypti* relatadas por outros pesquisadores foram: 425 Hz (♀) e 628 Hz (♂) em 18ºC de temperatura (GENOUD et al., 2018), 637 Hz (♀) e 889 Hz (♂) entre 24 e 27ºC (GEBRU et al., 2018), 508 Hz (♀) e 750 Hz (♂) em 22ºC (MOORE et al., 1986), 562 Hz (♀) e 786 Hz (♂) em 28ºC (STAUNTON et al., 2019). Este fato é importante no monitoramento dos mosquitos utilizando sensores ópticos, uma vez que é possível a diferenciação entre *Ae. aegypti* machos e fêmeas por meio da frequência do batida das asas.

Figura 16 – Frequência média da batida de asas do *Aedes aegypti* macho e fêmea. O eixo y representa a função da probabilidade e o eixo x representa a frequência de batida de asa (Hz)



Fonte: elaborado pela autora

Na Figura 16 pode-se notar também que, para o macho, a dispersão em torno da FBA média é maior do que para a fêmea. Este fato também foi observado por Aldersley et al. (2014) e Ogawa e Kanda (1986). De acordo com Ogawa e Kanda (1986), as variações maiores na frequência de batida de asas dos machos são vantajosas na estratégia reprodutiva dos mosquitos por proporcionarem maiores chances de acasalamento.

De acordo com Christe et al. (2016), os mosquitos machos respondem de modo diferente às pressões seletivas em relação às fêmeas, levando a resultados evolutivos distintos. Este fato pode refletir na FBA dos adultos, e uma melhor compreensão desse fenômeno é fundamental para estabelecer estratégias eficazes no controle de mosquitos. Por isso, neste trabalho foram estudados mosquitos machos e fêmeas. A seguir são descritos os resultados dos experimentos da etapa I.

Etapa I

4.3 Alimento

Com o intuito de avaliar a sobrevivência das larvas criadas em baixos níveis de nutrientes e a FBA dos possíveis adultos, foram realizados dois ensaios: o primeiro sem a adição de alimento e o segundo com a adição de 100 mg L^{-1} de alimento no I ínstar. Na Tabela 7 encontra-se a sobrevivência das larvas nos dois ensaios realizados.

Observou-se que, sem a adição de alimento ou somente com a adição de 100 mg L^{-1}

Tabela 7 – Ensaios com diferentes quantidades de alimento

Ensaio	Quantidade de alimento	Sobrevivência das larvas* (dias)
1	0	18,01
2	100 mg L^{-1}	14,07

*Valores médios
Fonte: elaborado pela autora

de alimento durante o I ínstar, houve a mortalidade total das larvas. Notou-se também que a fase larval se estendeu e que as larvas que não receberam alimento viveram, em média, mais dias (18,01 dias) quando comparadas às larvas que receberam alimento (14,07 dias). Dentre as larvas que não receberam alimento, 36,86% das mortes ocorreram nos primeiros 15 dias. Já para as larvas que receberam alimento, 70,83% morreram no mesmo período.

De acordo com Christophers (1960), em condições favoráveis de alimentação e à 28ºC de temperatura, a fase larval do *Ae. aegypti* é de aproximadamente 5 a 7 dias (CLEMENTS et al., 1992). Em baixas quantidades de alimento, o período da fase larval aumenta e o tamanho dos adultos resultantes é reduzido. Já na ausência de alimento as larvas podem permanecer por longos períodos de até mais de uma semana com pouco ou nenhum desenvolvimento e podem ou não emergir na fase adulta. Estas larvas, com o passar do tempo, perdem todos os vestígios de gordura e tornam-se quase transparentes, de modo que as estruturas mais diminutas, como as das ramificações da traquéia se tornem aparentes. Nesta condição pode ocorrer a ecdise (mudança do exoesqueleto), mas se a ausência de alimento continuar por tempo suficiente, o desenvolvimento além disso estará quase, senão totalmente, parado.

Arrivillaga e Barrera (2004) testaram 12 quantidades de alimento em larvas de *Ae. aegypti*, variando de 0,01 a 1,6 mg larva dia^{-1}, com o objetivo de analisar a sobrevivência larval. De acordo com os autores, a sobrevivência larval foi baixa (27 - 40%) com quantidades de alimento abaixo de 0,1 mg de alimento larva d^{-1}, aumentou (63 - 75%) com níveis de alimentação entre 0,1 e 0,8 mg, atingiu os valores mais altos (86 - 88%) entre 0,9 e 1,0 mg, e diminuiu (50 - 68%) em níveis de alimentação superiores a 1,0 mg. Os autores também observaram que a resistência média à fome foi de cerca de 20 dias em todas as condições estudadas.

Segundo Barrera e Medialdea (1996), as larvas de *Ae. aegypti* apresentam uma resistência relativamente alta à ausência de alimento. Os pesquisadores avaliaram a hipótese da existência de dois grupos ecológicos de larvas de mosquito. Para isto, analisaram a resistência à ausência de alimento de 22 espécies de mosquitos. Dentre elas, as larvas de *Ae. aegypti* que, resistiram, em média, 28 dias sem alimento, a maior média entre as espécies estudadas que habitam criadouros artificiais. Larvas no terceiro ínstar foram coletadas em campo e a resistência à ausência de alimento foi considerada como o tempo em que estas

larvas permaneceram vivas, sem alimento. Ou seja, elas se alimentarm na natureza até o terceiro instar, e após, já em laboratório, foram privadas de alimento. Os pesquisadores observaram cerca de 70% de mortalidade nas larvas.

De acordo com Arrivillaga e Barrera (2004) o tempo em que as larvas podem sobreviver sem alimento é função das reservas acumuladas, principalmente de lipídios, os quais provavelmente são resultado do histórico de disponibilidade de alimento. Para Barrera (1996) a mortalidade de imaturos pode ser o resultado de um balanço energético negativo por tempo suficiente para esgotar as reservas larvais (BARRERA, 1996).

As larvas de *Ae. aegypti* são capazes de sobreviver à escassez de alimentos por várias semanas ou até alguns meses (BARRERA, 1996; BARRERA; MEDIALDEA, 1996). Também podem se comportar de maneira diferente, em relação ao modo de alimentação quando alimentadas com grandes quantidades de alimento tanto quanto com pequenas quantidades (REISKIND; JANAIRO, 2015).

Segundo Araújo, Gil e Silva (2012), os aspectos quantitativos e qualitativos da nutrição larval são importantes para a sobrevivência, desenvolvimento e a emergência dos mosquitos adultos. Para Souza et al. (2019) estes fatores, além de exercerem efeitos imediatos sobre a sobrevivência e a taxa de desenvolvimento de imaturos, também podem alterar a dinâmica populacional dos mosquitos e determinar as características de vida dos adultos.

4.4 Densidade larval

4.4.1 Confirmação do tamanho dos mosquitos

Os mosquitos adultos resultantes das duas densidades larvais testadas apresentaram variações no comprimento de asa e no peso. Na Figura 17 pode-se observar o boxplot do comprimento de asa das fêmeas (17a) e dos machos (17b).

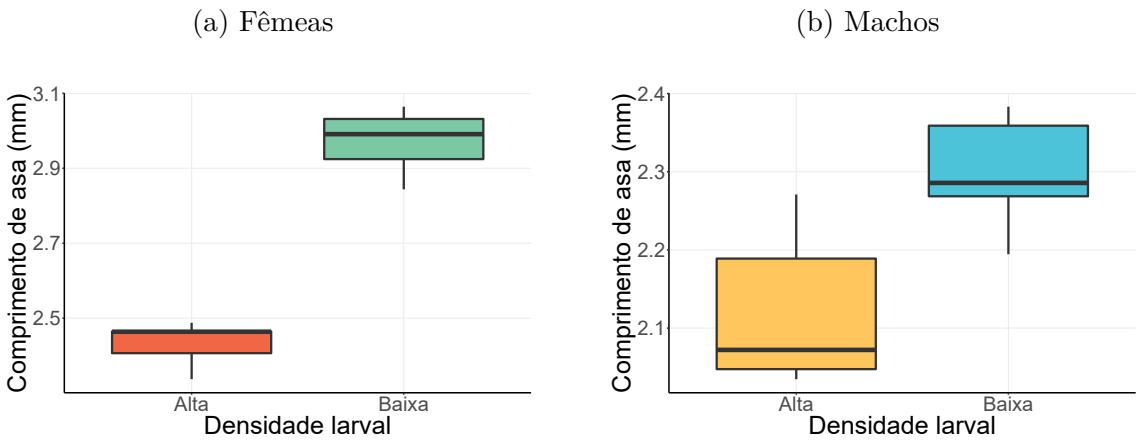
O boxplot do peso seco dos mosquitos fêmeas e machos é apresentado na Figura 18.

Os ensaios realizados com baixa densidade larval (50 larvas) resultaram em fêmeas significativamente maiores do que os ensaios com alta densidade larval (200 larvas), tanto no comprimento de asa (Teste-t, $t(7{,}10)=-11{,}25$; $p<0{,}001$) quanto no peso ($t(5{,}94)=-5{,}54$; $p=0{,}001$). Já os machos não apresentaram diferença significativa no peso ($t(6{,}96)=0{,}68$; $p=0{,}51$), apenas no comprimento de asa ($t(7{,}33)=-3{,}07$; $p=0{,}01$).

A média do comprimento de asa e do peso seco das fêmeas e machos adultos resultantes das duas densidades larvais encontram-se na Tabela 8.

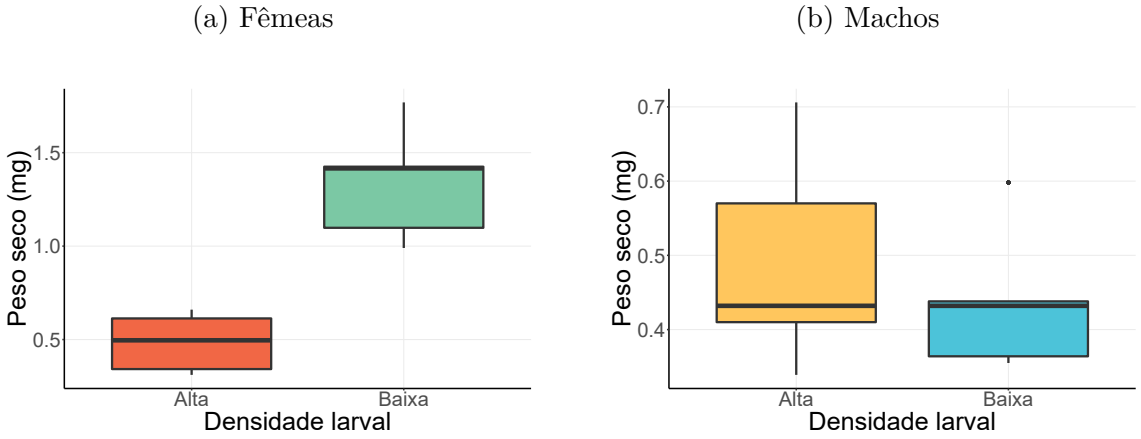
Para facilitar a compreensão das análises posteriores, os mosquitos resultantes da baixa densidade larval serão denominados “grandes” e os resultantes da alta densidade larval serão designados “pequenos”.

Figura 17 – Boxplot do comprimento de asa de *Aedes aegypti* (a) fêmeas e (b) machos nas duas densidades larvais testadas (alta e baixa)



Fonte: adaptado de Nadai et al. (2021)

Figura 18 – Boxplot do peso seco de *Aedes aegypti* (a) fêmeas e (b) machos nas duas densidades larvais testadas (alta e baixa)



Fonte: adaptado de Nadai et al. (2021)

4.4.2 Tamanho e frequência de batida de asa

Na Figura 19 é apresentada a frequência de batida de asa dos mosquitos machos e fêmeas criados nas duas densidades larvais (alta e baixa), à temperatura de 26ºC e umidade entre 60 e 65%.

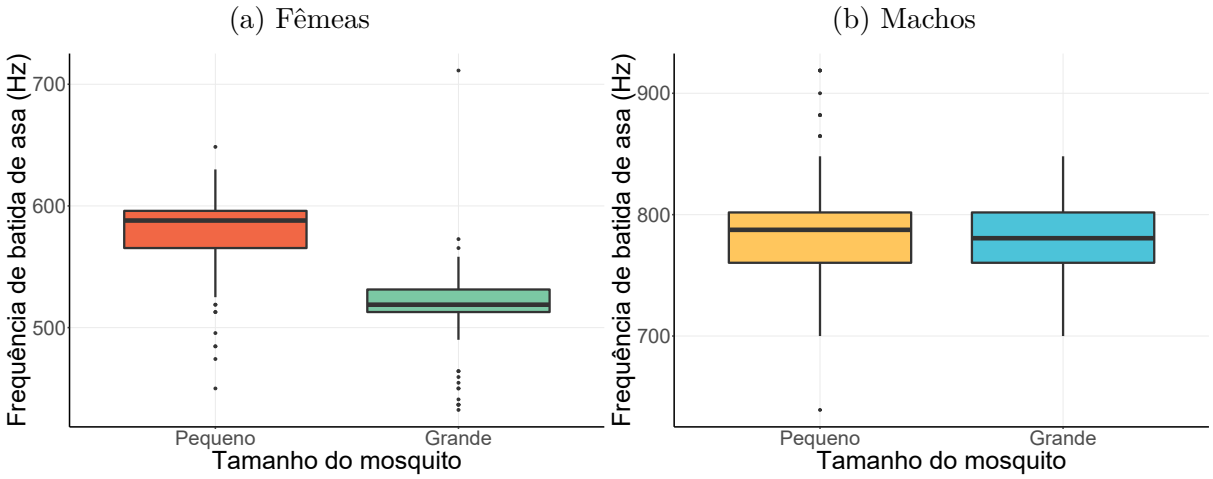
Para analisar se os mosquitos provenientes da alta e da baixa densidade larval diferiram na FBA, foi realizada a Análise de Covariância (ANCOVA) para testar as diferenças no intercepto ou na inclinação, com as medidas de tamanho (comprimento da asa e peso seco) como covariáveis, FBA como variável resposta e densidade larval (alta e

Tabela 8 – Valores médios do comprimento de asa e do peso seco dos adultos resultantes da alta e baixa densidades larvais

Densidade larval	Comprimento de asa (± DP)	Peso seco (± DP)	n*
Baixa (♀)	2,9710 mm (± 0.08)	1,3396 mg (± 0.30)	5
Alta (♀)	2,4320 mm (± 0.06)	0,4844 mg (± 0.15)	5
Baixa (♂)	2,2981 mm (± 0,07)	0,4374 mg (± 0,09)	5
Alta (♂)	2,1228 mm (± 0,10)	0,4914 mg (± 0,14)	5

*Tamanho amostral
Fonte: adaptado de Nadai et al. (2021)

Figura 19 – Boxplot da frequência de batida de asas de *Aedes aegypti* (a) fêmeas e (b) machos à temperatura de 26ºC e umidade de 60 - 65%. Os mosquitos resultantes da baixa densidade larval foram denominados "grandes"e os resultantes da alta densidade larval foram designados "pequenos"



Fonte: adaptado de Nadai et al. (2021)

baixa) como uma variável independente.

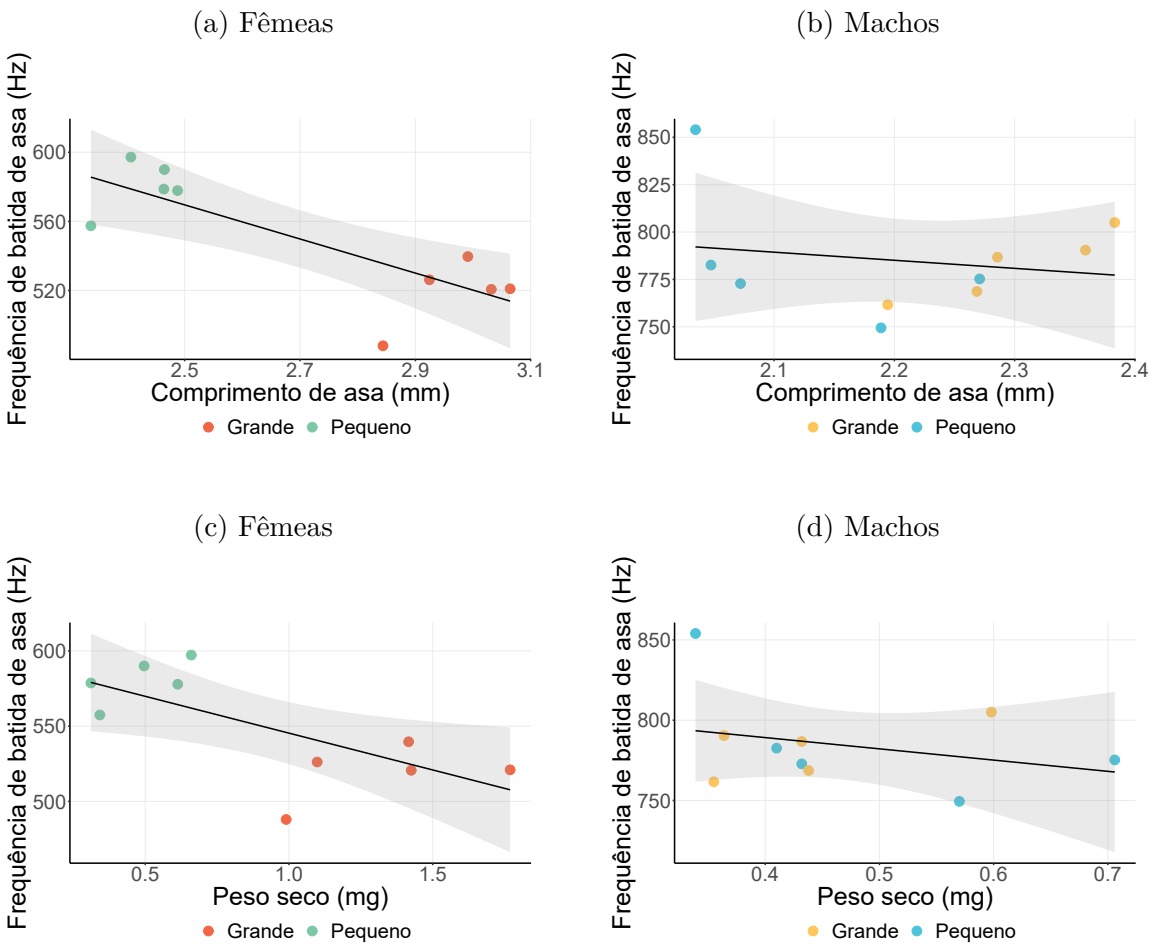
De acordo com a ANCOVA, para as fêmeas, o comprimento de asa (F(1, 5)=31,27; p=0,002) ajuda significativamente a explicar a variação na FBA dos mosquitos, diferentemente do peso, o qual não apresentou diferença significativa na FBA (F(1, 5)=2,69; p=0,16). A interação entre o comprimento de asa e o peso também não apresentou diferença significativa (F(1,5)=1,19; p=0,32). Para os mosquitos machos, o comprimento da asa (F(1, 5)=2,02; p=0,21) e o peso (F(1, 5)=3,36; p=0,12) não foram estatisticamente significativos para explicar a variação na FBA dos mosquitos. No entanto, a interação entre as duas variáveis apresentou diferença significativa (F(1, 5)=45,74; p=0,001).

A média da frequência de batida de asa das fêmeas pequenas foi 586,24 Hz (DP ± 31,87) enquanto que a das fêmeas grandes foi 520,22 Hz (± 24,29). Estas médias são significativamente diferentes (Teste-t, t(297,75)=17,64; p<0,001) ($\alpha = 0,05$,). Já os machos

pequenos apresentaram FBA média de 786,81 Hz (± 45,66) e os grandes 782,49 Hz (± 24,45), não havendo diferença significativa entre as mesmas (t(227,97)=1,02; p=0,3).

Para avaliar a correlação entre estas variáveis, foi executada uma regressão linear da FBA em função do comprimento de asa (Figuras 20a e 20b) e do peso (Figuras 20c, 20d).

Figura 20 – Diagrama de dispersão ilustrando a correlação entre a frequência de batida da asa do *Aedes aegypti* e o comprimento da asa (a e b) e o peso do mosquito (c e d). Os mosquitos resultantes da baixa densidade larval foram denominados "grandes"e os resultantes da alta densidade larval foram designados "pequenos"



Fonte: adaptado de Nadai et al. (2021)

Na Tabela 9 é apresentado o resumo da regressão linear.

De acordo com o diagrama de dispersão (Figura 20) e com os valores da regressão linear (Tabela 9), para as fêmeas há uma forte relação linear negativa, tanto para o comprimento de asa quanto para o peso seco, o que foi confirmado pelos coeficientes de correlação de Pearson: − 0,80 (comprimento de asa) e − 0,68 (peso seco). A FBA das fêmeas diminui conforme o tamanho dos mosquitos aumenta, com o comprimento da asa

Tabela 9 – Regressão linear para a frequência de batida de asa do *Aedes aegypti* em função do comprimento de asa (mm) e do peso seco (mg)

Variável/ sexo	**Linha de regressão**	R^2	**Df****	**P-valor**
Compr. de asa (♀)	FBA*= 816,26 + (− 98,69 × compr. de asa)	0,59	1, 8	**0,005*****
Peso seco (♀)	FBA*= 594,28 + (− 48,92 × peso seco)	0,40	1, 8	**0,02*****
Compr. de asa (♂)	FBA*= 878,97 + (− 42,67 × compr. de asa)	0	1, 8	0,60
Peso seco (♂)	FBA*= 817,2 + (− 70,1 × peso seco)	0	1, 8	0,41

*(Hz)
**Numerador, denominador
***Valores significativos
Fonte: adaptado de Nadai et al. (2021)

e o peso explicando 64% e 47% da variação da FBA, respectivamente. Explicando mais detalhadamente e tomando o comprimento de asa como expemplo: o aumento de 1 mm no comprimento de asa está associado na redução da FBA em, aproximadamente, 98 Hz.

Para os machos há uma fraca relação linear negativa (cuja linha de associação é quase horizontal), o que foi corroborado pelo coeficiente de correlação de Pearson: − 0,18 (comprimento de asa) e − 0,29 (peso seco). O comprimento da asa e o peso explicam somente 3% e 8% da variação da FBA, respectivamente.

A correlação inversa entre o comprimento de asa e a FBA observada nas fêmeas deste estudo também foi constatada por Belton e Costello (1979), que notaram uma forte tendência na diminuição da FBA quando o comprimento de asa aumenta. Os pesquisadores usaram um microfone para capturar a FBA das fêmeas e reportaram a mesma correlação para mosquitos dos gêneros *Aedes spp.* e *Culex spp.* Ogawa e Kanda (1986) também utilizaram um microfone para estudar a FBA em oito espécies de mosquitos do gênero *Anopheles* e observaram uma correlação inversa entre a FBA e o comprimento de asa, tanto para as fêmeas quanto para os machos.

Variações no tamanho dos mosquitos podem ocorrer intraespecífica e interespecificamente em virtude de diferentes condições de criação na natureza, como temperatura, nutrição e densidade larval (CLEMENTS et al., 1999; COSTELLO, 1974). No presente estudo, para as fêmeas, a variação no tamanho do mosquito, obtida a partir da competição intraespecífica impactou a FBA com uma correlação inversa, ou seja, mosquitos pequenos apresentaram FBA mais elevada que os mosquitos grandes. Estes resultados divergem com os de Staunton et al. (2019), que utilizaram um sensor ultrassônico para capturar a FBA do *Ae. aegypti*. Os pesquisadores relataram uma correlação positiva entre o tamanho do mosquito e a FBA, ou seja, os mosquitos grandes apresentaram FBA mais elevada (♀ 540 Hz e ♂ 828 Hz, 28ºC) que os pequenos (♀ 502 Hz e ♂ 782 Hz, 28ºC). Para a obtenção de mosquitos de dois tamanhos diferentes os autores utilizaram 500 larvas e duas quantidades diferentes de alimento (ração para peixe) no I ínstar, alta: 0,3 e baixa: 0,1 mg dia larva $^{-1}$ para gerar mosquitos grandes e pequenos, respectivamente. A média do comprimento de asa dos mosquitos alimentados em baixa e alta quantidades de alimento

foram, respectivamente, 2,31 e 2,61 mm para as fêmeas e 1,92 e 2,07 mm para os machos.

Além disso, os resultados do presente estudo também diferem dos resultados obtidos por Villarreal, Winokur e Harrington (2017), que apontaram que a FBA não é impactada pelo tamanho do mosquito. Os pesquisadores utilizaram um microfone para estudar a FBA de *Ae. aegypti* fêmeas criadas em três densidades larvais: 0,35 larvas mL $^{-1}$ (para mosquitos pequenos), 0,2 larvas mL $^{-1}$ (médios) e 0,075 larvas mL $^{-1}$ (grandes), obtendo fêmeas com comprimento de asa entre 2,5 e 3,2 mm, enquanto as fêmeas obtidas no presente estudo apresentaram comprimento de asa entre 2,3 e 3,06 mm. A divergência entre os resultados da presente pesquisa e os reportados por Villarreal, Winokur e Harrington (2017) deve-se provavelmente às condições de criação utilizadas, como a densidade larval e o alimento, ou também ao equipamento utilizado para capturar a FBA dos mosquitos.

Os resultados do presente estudo também divergem com os de Costello (1974), que não encontraram relação significativa entre o tamanho e a FBA de *Ae. aegypti* fêmeas, utilizando um microfone. É imporante ressaltar novamente que as condições de criação das larvas que os pesquisadores empregaram foi diferente das utilizadas no presente estudo. As densidades larvais testadas neste estudo foram 0,05 e 0,2 larva mL^{-1}, resultando em mosquitos com pesos médios de 0,48 mg e 1,33 mg, respectivamente. Já Costello (1974) utilizaram uma dieta diferente e densidades larvais de 1, 2,5 e 5 larvas mL^{-1}, o que gerou mosquitos com pesos médios de 1,4, 1,6 e 1,6 mg, respectivamente (o autor não reportou o comprimento de asa). Nota-se que a menor densidade testada pelo autor (utilizada para a obtenção de mosquitos pequenos) resultou em mosquitos maiores que os mosquitos grandes obtidos na presente pesquisa.

Este é o primeiro estudo que distingue mosquitos fêmeas grandes de pequenos durante o voo livre e sem a necessidade de estímulos artificiais, empregando um sensor óptico. Segundo Kitthawee, Edman e Upatham (1992) e Merritt, Dadd e Walker (1992), o aumento do tamanho do inseto tem como consequência o aumento na probabilidade de sobrevivência, no sucesso do repasto sanguíneo, bem como na competência vetorial (capacidade de um vetor transmitir um patógeno, resultando em novos casos de uma doença específica). Desse modo, sensores que são capazes de distinguir diferentes tamanhos de mosquitos da mesma espécie são importantes aliados no monitoramento de adultos, uma vez que fornece informações mais detalhadas para a tomada de descisão pelos órgãos de saúde pública.

4.5 PH inicial da água de criação das larvas

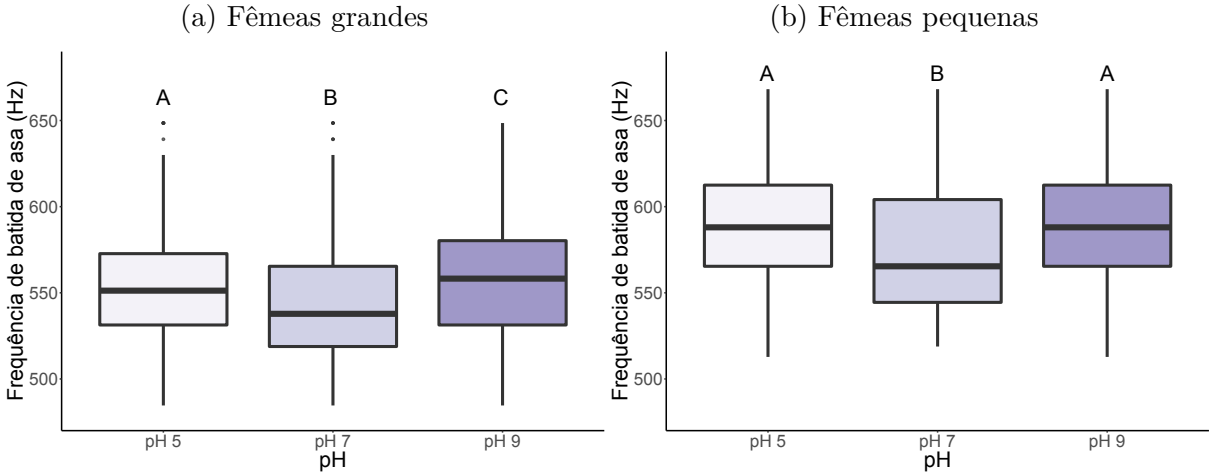
Para avaliar o impacto do pH inicial da água de criação das larvas de *Ae. aegypti* na frequência de batida de asas dos adultos, foram testados quatro valores de pH: 3, 5, 7 e 9.

Nos ensaios realizados com pH 3 houve a eclosão de poucas larvas (em média 3), além disso, todos os ensaios realizados nesta condição resultaram na mortalidade total das larvas ainda no I instar. Já nos ensaios realizados com o pH 5, 7 e 9 houve a sobrevivência das larvas e a emergência de adultos, os quais foram dispostos nos coletores para a captura da FBA. Com o intuito de analisar o comportamento do mosquito de cada tamanho isoladamente, as comparações entre os valores de pH testados e as variáveis-resposta foram realizadas separadamente para mosquitos grandes e pequenos. A seguir encontram-se descritos os resultados obtidos.

4.5.1 Medida da frequência de batida de asa

Na Figura 21 encontra-se a FBA de *Ae. aegypti* fêmeas, grandes e pequenas, criadas em diferentes valores de pH da água.

Figura 21 – Boxplot da frequência de batida de asas de *Aedes aegypti* fêmeas (a) grandes e (b) pequenas criadas em diferentes valores de pH da água. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa (p>0,05)

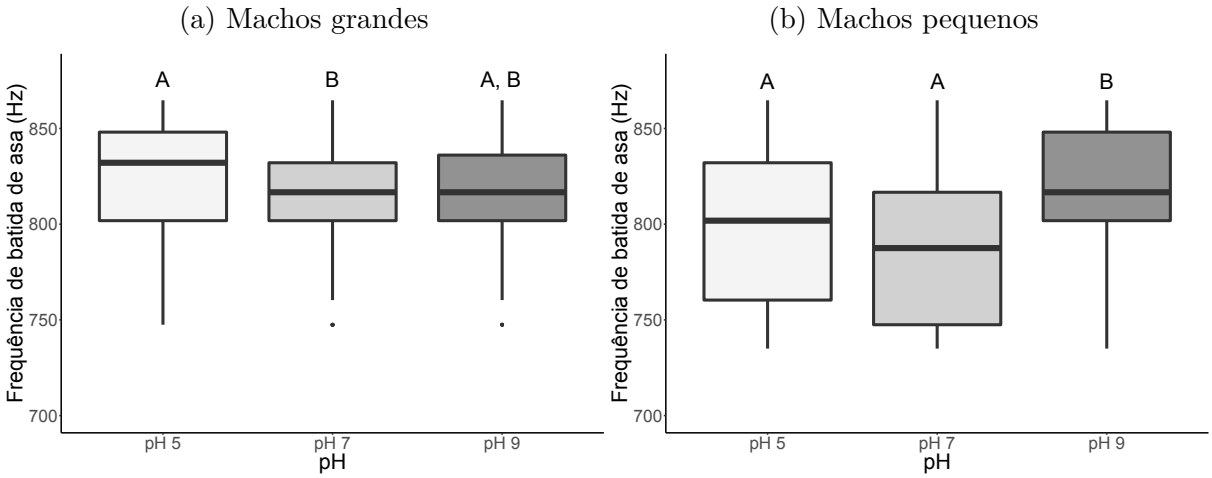


Fonte: elaborado pela autora

A ANOVA (*one-way*) foi executada e apontou que o pH da água de criação influenciou significativamente a frequência de batida de asa, tanto das fêmeas grandes (F(2, 1119)=19,39; p<0,0001) quanto das fêmeas pequenas (F(2, 835)=10,95, p<0,0001). Para verificar em quais grupos de pH ocorreram diferenças significativas na FBA foi executado o Teste de Tukey (HSD). De acordo com o teste, para as fêmeas grandes, há diferença significativa na FBA entre todos os grupos testados (p<0,05). Já para as fêmeas pequenas, a FBA dos mosquitos criados no pH 9 e no pH 5 não apresentou diferença significativa (p=0,99). Na Figura 22 encontra-se a FBA dos mosquitos machos.

O pH da água de criação influenciou significativamente a FBA dos mosquitos machos grandes (ANOVA, F(2, 867)=5,11; p=0,006) bem como dos mosquitos pequenos

Figura 22 – Boxplot da frequência de batida de asas de *Aedes aegypti* machos (a) grandes e (b) pequenos criados em diferentes valores de pH da água. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa (p>0,05)



Fonte: elaborado pela autora

(ANOVA, F(2, 643)=37,64, p<0,0001). Para os mosquitos grandes, o Teste de Tukey (HSD) apontou diferença significativa na FBA entre os grupos criados no pH 7 e pH 5 (p=0,004). Nos mosquitos pequenos, foi apontada diferença significativa na FBA entre os grupos criados no pH 9 e pH 5 (p=0) e pH 9 e pH 7 (p=0).

Na Tabela 10, encontram-se as médias, desvio-padrão (DP) e medianas das frequências de batidas de asa dos mosquitos fêmeas, bem como o número de passagens para cada grupo (número de vezes que os mosquitos atravessaram a cortina de luz). O experimento teve duração de 96 horas.

Tabela 10 – Análise descritiva da frequência de batida de asa dos *Aedes aegypti* fêmeas nos diferentes tamanhos e valores de pH

pH	**Tamanho**	**FBA (média)**	**DP***	**FBA (mediana)**	**n****
5	Grande	555,68 Hz	± 42,79	544,44 Hz	2771
5	Pequeno	585,89 Hz	± 38,54	588,00 Hz	3584
7	Grande	531,61 Hz	± 41,27	525,00 Hz	1633
7	Pequeno	557,14 Hz	± 33,81	551,25 Hz	1535
9	Grande	544,68 Hz	± 30,92	544,44 Hz	3975
9	Pequeno	599,80 Hz	± 47,70	588,00 Hz	884

*Desvio-padrão
**número de passagens (número de vezes que os mosquitos atravessaram a cortina de luz)
Fonte: elaborado pela autora

A análise descritiva da FBA dos mosquitos machos são apresentados na Tabela 11. Vale ressaltar que o experimento teve duração de 96 horas.

Tabela 11 – Análise descritiva da frequência de batida de asa dos *Aedes aegypti* machos nos diferentes tamanhos e valores de pH

pH	Tamanho	FBA (média)	DP*	FBA (mediana)	n**
5	Grande	836,79 Hz	± 32,48	832,07 Hz	259
5	Pequeno	796,20 Hz	± 46,68	801,81 Hz	3489
7	Grande	808,56 Hz	± 30,04	816,66 Hz	26
7	Pequeno	791,09 Hz	± 42,38	787,50 Hz	3284
9	Grande	825,19 Hz	± 39,32	816,66 Hz	7493
9	Pequeno	829,73 Hz	± 42,20	832,07 Hz	6164

*Desvio-padrão
**número de passagens (número de vezes que os mosquitos passaram pelo sensor)
Fonte: elaborado pela autora

De acordo com as Tabelas 10 e 11, pode-se notar que os mosquitos criados no pH 7 apresentaram médias de frequência de batida de asa menores que os criados nos pHs 5 e 9, tanto para as fêmeas quanto para os machos, grandes e pequenos.

4.5.2 Peso seco

A influência do pH da água de criação das larvas no peso do mosquito adulto também foi analisada. Na Tabela 12 encontram-se as médias do peso seco das fêmeas grandes e pequenas, juntamente com o desvio-padrão (DP) em cada valor de pH testado.

Tabela 12 – Peso seco dos mosquitos fêmeas em relação ao tamanho e ao pH testado

pH	Tamanho	Peso seco (± DP*)	n**
5	Grande	1,2865 mg (± 0,15)	40
	Pequeno	0,6608 mg (± 0,11)	37
7	Grande	1,1670 mg (± 0,28)	51
	Pequeno	0,7844 mg (± 0,17)	45
9	Grande	1,3323 mg (± 0,28)	38
	Pequeno	0,7165 mg (± 0,18)	40

*Desvio-padrão
**Tamanho amostral
Fonte: elaborado pela autora

De acordo com a Tabela 12, as fêmeas que resultaram em média de peso mais elevada foram as grandes criadas no pH 9 (1,3324 mg). Já as fêmeas que resultaram na menor média de peso foram as pequenas criadas no pH 5 (0,6608 mg). Na Tabela 13 são apresentados a média do peso seco dos machos.

Os indivíduos machos grandes provenientes do pH 9 apresentaram média de peso maior (0,5676 mg), enquanto que os machos pequenos obtidos do pH 5 apresentaram média de peso menor (0,3639 mg).

Tabela 13 – Peso seco dos mosquitos machos em relação ao tamanho e ao pH testado

pH	Tamanho	Peso seco (± DP*)	n**
5	Grande	0,5402 mg (± 0,11)	39
	Pequeno	0,3639 mg (±0,08)	41
7	Grande	0,5466 mg (± 0,12)	54
	Pequeno	0,3722 mg (± 0,09)	41
9	Grande	0,5676 mg (± 0,12)	48
	Pequeno	0,3887 mg (± 0,08)	40

*Desvio-padrão
**Tamanho amostral
Fonte: elaborado pela autora

Para avaliar a relação entre pH e peso dos mosquitos foi executada a ANOVA *(one-way)* para cada tamanho de mosquito e sexo, seguido do teste de Tukey (HSD). A ANOVA mostrou que houve efeito do pH sobre a média do peso das fêmeas grandes (F(2, 126)=5,281; p=0,006) e das fêmeas pequenas (F(2, 119)=5,864; p=0,003). As diferenças significativas no peso das fêmeas grandes ocorreram entre as criadas no pH 9 e pH 7 (p=0,007). Já nas fêmeas pequenas, as diferenças significativas no peso ocorreram entre as criadas no pH 7 e pH 5 (p=0,002).

Para os machos, não houve efeito do pH da água de criação sobre a média do peso dos mosquitos grandes (F(2, 128)=0,563; p=0,56), bem como dos pequenos (F(2, 126)=0,833; p=0,43).

4.5.3 Tamanho do centróide das asas

O impacto do pH da água de criação das larvas também foi analisado em relação ao tamanho do centróide das asas dos mosquitos adultos. Para o cálculo do tamanho do centróide, o Teste de Repetibilidade indicou 92% de confiança nas marcações realizadas, o que indica que as marcações manuais estão no intervalo aceitável de precisão (MONTGOMERY; RUNGER, 1993).

Na Figura 23 pode-se observar os gráficos com o tamanho do centróide das asas das fêmeas grandes e pequenas, criadas em diferentes valores de pH da água.

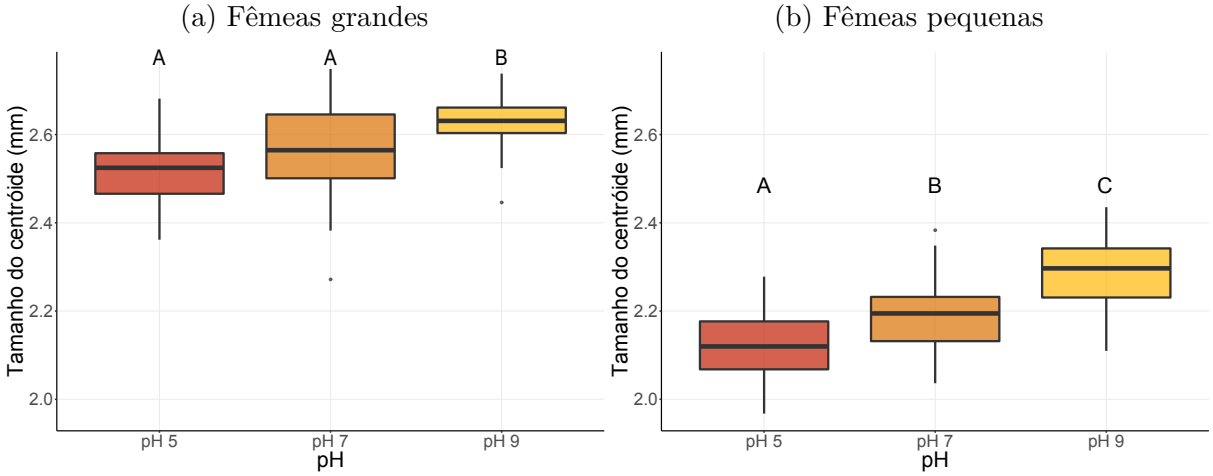
O tamanho do centróide das asas dos machos pode ser observado na Figura 24.

Na Tabela 14 encontram-se descritas a média e o desvio-padrão do tamanho do centróide das asas dos mosquitos machos e fêmeas.

De acordo com a Tabela 14, as fêmeas criadas no pH 5 apresentaram as menores médias de tamanho do centróide, e o mesmo pode ser observado nos machos. Já os mosquitos criados no pH 9 apresentaram maiores médias de tamanho do centróide.

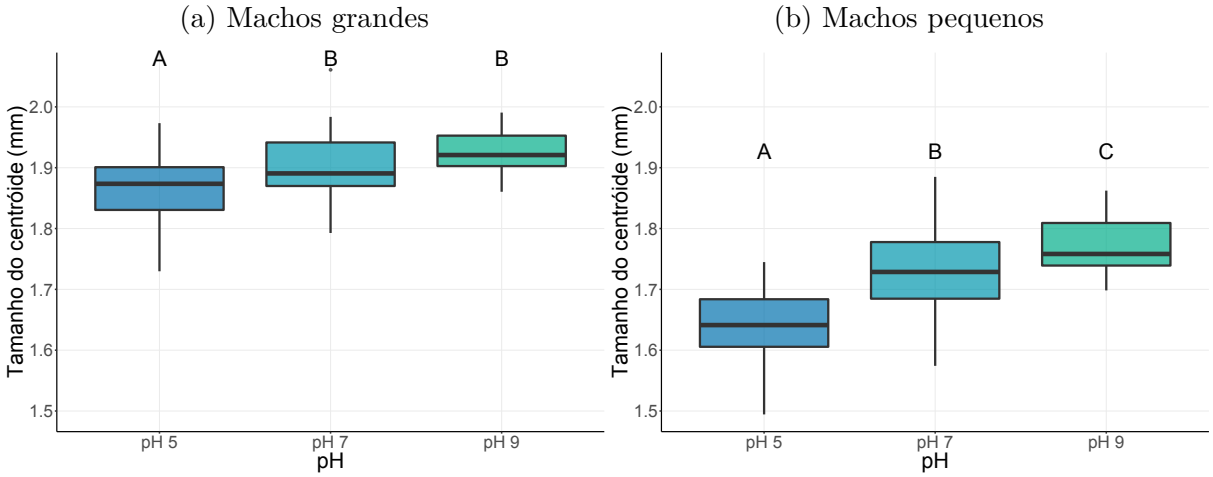
Para avaliar a relação entre os pHs da água de criação e o tamanho do centróide das

Figura 23 – Boxplot do tamanho do centróide das asas de *Aedes aegypti* fêmeas criadas em diferentes valores de pH da água. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa (p>0,05)



Fonte: elaborado pela autora

Figura 24 – Boxplot do tamanho do centróide das asas de *Aedes aegypti* machos criados em diferentes valores de pH da água. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa (p>0,05)



Fonte: elaborado pela autora

asas dos adultos resultantes de cada condição testada, a ANOVA *(one-way)* foi executada para cada tamanho de mosquito e sexo, separadamente, seguido do teste *post-hoc* de Tukey (HSD). De acordo com a ANOVA, houve efeito do pH sobre a média do tamanho do centróide das fêmeas grandes (F(2, 88)=13,98; p=<0,0001), e das fêmeas pequenas (F(2, 90)=33,09; p=<0,0001). O teste de Tukey apontou que as diferenças significativas no tamanho do centróide das fêmeas grandes ocorreram entre as criadas no pH 9 e pH 5 (p<0,0001), bem como entre as criadas no pH 9 e pH 7 (p=0,004). Já para as fêmeas

Tabela 14 – Tamanho do centróide das asas das fêmeas e dos machos originados de diferentes valores de pH da água de criação

pH	Tamanho	Fêmeas	Machos
		TC* (média) - (DP**)	TC* (média) - (DP**)
5	Grande	2,5149 mm (± 0,06)	1,8623 mm (± 0,05)
5	Pequeno	2,1188 mm (± 0,07)	1,6444 mm (± 0,06)
7	Grande	2,5596 mm (± 0,10)	1,9028 mm (± 0,05)
7	Pequeno	2,1922 mm (± 0,07)	1,7233 mm (± 0,07)
9	Grande	2,6273 mm (± 0,05)	1,9254 mm (± 0,05)
9	Pequeno	2,2845 mm (± 0,08)	1,7703 mm (± 0,08)

*Tamanho do centróide
**Desvio-padrão
Fonte: elaborado pela autora

pequenas, as diferenças significativas no tamanho do centróide ocorreram entre todos os grupos de pH testados ($p<0,05$).

Em relação aos machos, o pH também influenciou significativamente a média do tamanho do centróide dos mosquitos grandes (ANOVA, $F(2, 69)=8,856$; $p=0,0003$) e pequenos (ANOVA, $F(2, 79)=24,43$; $p<0,0001$). Para os machos grandes, as diferenças significativas no tamanho do centróide ocorreram entre os criados no pH 7 e pH 5 ($p=0,014$), e entre os do pH 9 e pH 5 ($p=0,0003$). Já para os pequenos houve diferença significativa entre todos os grupos de pH testados ($p<0,05$) (Tukey, HSD).

A mortalidade de 100% das larvas submetidas ao pH 3 também foi observada por Clark, Flis e Remold (2004), que estudaram as larvas de *Ae. aegypti* em faixas de pH que variaram entre 3 e 12. Segundo os autores, o pH 3 é considerado um nível extremo para as larvas de *Ae. aegypti*, e apenas uma porcentagem mínima das larvas conseguem sobreviver nesse pH. Segundo ROBERTSON-BRYAN, Inc. (2004), provavelmente o baixo pH da água afetou a capacidade do organismo de fazer as trocas de gases e sais com o meio, o que levou a mortalidade das mesmas.

Clark, Flis e Remold (2004) também observaram alta porcentagem de sobrevivência nas larvas criadas em água cujo pH variou de 4 a 11. De acordo com os pesquisadores, as larvas de *Ae. aegypti* são altamente eficazes na regulação do pH da hemolinfa, considerando este fato a chave para a habilidade das larvas de tolerar amplas faixas de pH no ambiente. Estes pesquisadores também observaram que a massa pupal úmida foi ligeiramente maior no pH neutro do que nos extremos. No entanto, o efeito do pH sobre a massa pupal foi pequeno, sugerindo que as larvas podem compensar a regulação do pH aumentando o consumo de alimento e/ou a utilização de nutrientes. Segundo os mesmos autores, o pH influencia principalmente a microfauna em criadouros, portanto o pH pode ter influência no tamanho do mosquito.

De acordo com Medeiros-Sousa et al. (2020), em ambientes lênticos, os fatores ambientais e climáticos podem alterar o pH da água. Além disso, frente às chuvas ácidas que ocorrem em diversos lugares do mundo (ROBERTSON-BRYAN, INC., 2004) e às adversidades relacionadas às mudanças climáticas (SEQUIHOD, 2016), como as secas, que podem afetar o pH da água (MEDEIROS-SOUSA et al., 2020), o conhecimento sobre as consequências da alteração do pH do meio para o *Ae. aegypti* são de fundamental importância no controle e monitoramento desta espécie. Segundo Clements et al. (1992), as larvas de mosquitos podem tolerar variações de pH no ambiente maiores do que outros animais aquáticos.

A presença de larvas de *Ae. aegypti* em um amplo espectro de pH na natureza ressalta a importância de estudos referentes ao pH na água de criação das larvas, e ainda vai além: as consequências destas condições nos mosquitos adultos. Desse modo, o estudo do mosquito adulto pode levar à análise de diversas respostas, como tamanho do mosquito, peso, frequência de batida de asa, entre outras.

Neste estudo, o pH influenciou significativamente o peso (exceto dos machos), o tamanho do centróide da asa e a frequência de batida de asa do *Ae. aegypti*. O tamanho do centróide da asa está diretamente ligado ao tamanho do mosquito, que por sua vez está relacionado à fecundidade. Desse modo, a alteração no pH da água pode alterar a fecundidade das fêmeas, além da capacidade vetorial. Esta pesquisa foi a primeira a analisar a influência do pH (em função destas variáveis) no mosquito adulto.

4.6 Temperatura do ar

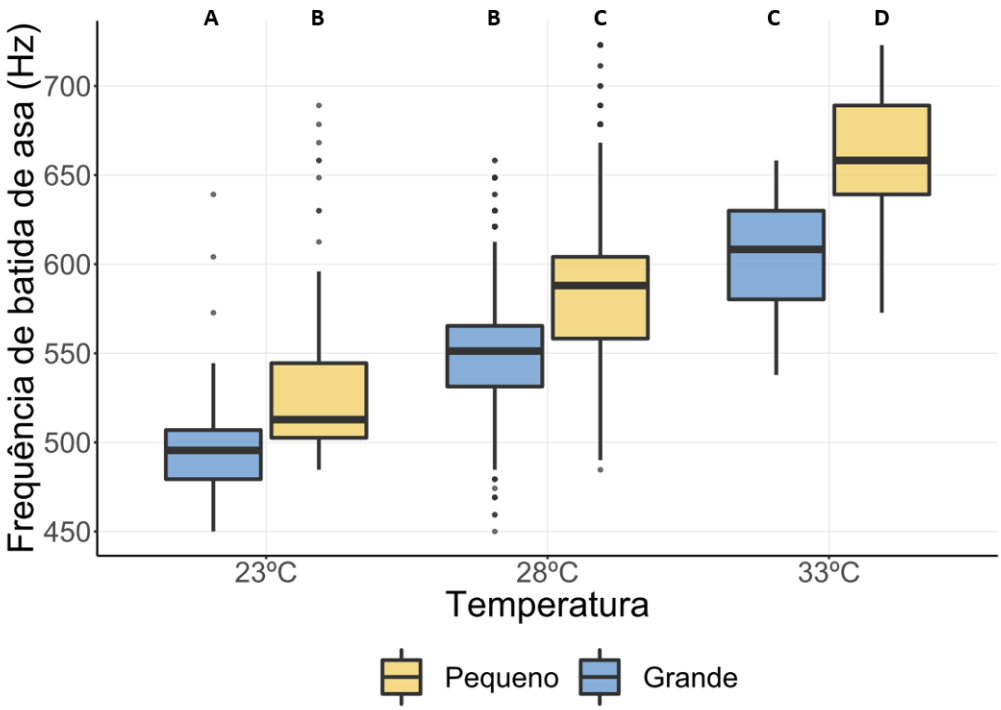
Para avaliar o impacto da temperatura na FBA, foram testadas três temperaturas. Na Figura 25 é apresentada a frequência de batida de asa do *Ae. aegypti* fêmea grande e pequena, em diferentes temperaturas do ar (23, 28 e 33ºC).

A FBA dos machos em diferentes temperaturas pode ser observada na Figura 26.

Observou-se uma relação positiva entre temperatura e frequência de batida de asa para as fêmeas e os machos, com exceção dos machos pequenos em 23ºC. Pode-se observar que estes apresentaram a mediana da FBA abaixo dos mosquitos grandes na mesma temperatura, o que não é observado nas outras temperaturas. Este fato pode ser explicado pelo baixo número de passagens dos mosquitos pelo sensor nesta temperatura, nas duas réplicas.

Este experimento foi realizado com 10 mosquitos em cada coletor (separados por sexo e tamanho), os quais foram provenientes do mesmo pote de criação. Desse modo, os efeitos da temperatura e do tamanho do mosquito, bem como suas interações foram analisados por meio do Modelo Linear Misto (LMM - *Linear Mixed Model*), considerando cada grupo de 10 mosquitos como efeito aleatório, ao nível de significância de 5%.

Figura 25 – Box plot com a frequência de batida de asa de *Aedes aegypti* fêmeas em diferentes temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa (p>0,05)



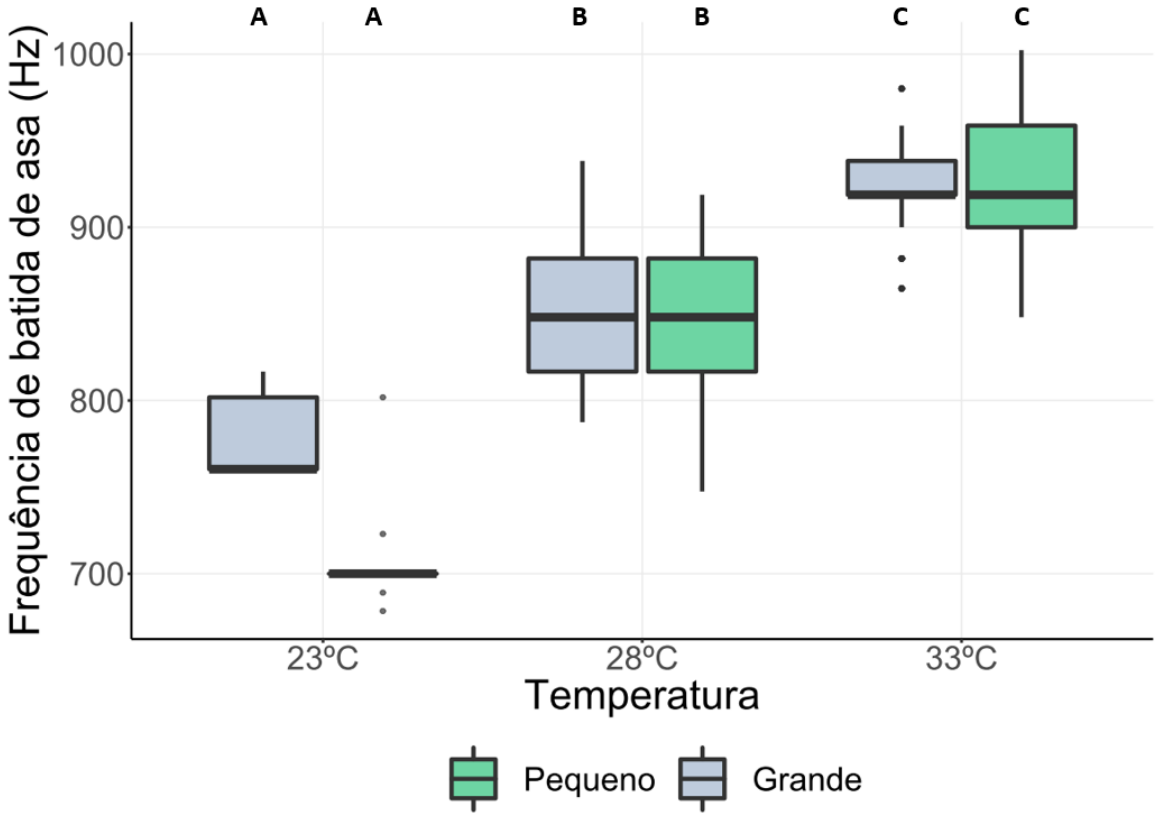
Fonte: adaptado de Nadai et al. (2021)

De acordo com o modelo, as fêmeas pequenas batem as asas cerca de 40 Hz mais rápido do que as fêmeas grandes (LMM, estimado: 39,31 Hz (S.E. (erro-padrão): 7,82) Hz, p=0,03). Estimou-se que, em temperaturas moderadas e altas, as fêmeas batem as asas 56,18 Hz (S.E.: 2,55 Hz) e 111,69 Hz (S.E.: 2,96 Hz) mais rápido do que as fêmeas na menor temperatura testada, respectivamente (LMM, p<0,0001). A comparação *post-hoc* entre grupos sugeriu que houve sobreposição na FBA entre temperatura e densidade larval, de tal forma que as fêmeas pequenas (provenientes da alta densidade larval) em temperaturas menores não diferem estatisticamente das grandes (obtidas da baixa densidade larval) em temperaturas mais elevadas (Figura 25) (NADAI et al., 2021).

Segundo o modelo, os machos pequenos batem as asas cerca de 40 vezes mais lento do que os machos grandes (LMM, estimado: -39,69 Hz (S.E.: 27,91), p=0,33). Estimou-se também que, em temperaturas moderadas e altas, os machos batem as asas 98,97 Hz (S.E.: 7,98 Hz) e 170,26 Hz (S.E.: 7,93 Hz) mais rápido do que os machos na menor temperatura testada, respectivamente (LMM, p<0,0001). De acordo com as comparações *post-hoc* entre grupos, a FBA dos machos grandes e pequenos dentro de uma mesma temperatura não difere estatisticamente (Figura 26).

Os resultados do Modelo Linear Misto na frequência de batida de asa de *Ae. aegypti*

Figura 26 – Box plot com a frequência de batida de asa de *Aedes aegypti* machos em diferentes temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa (p>0,05)



Fonte: elaborado pela autora

fêmeas e machos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados do Modelo Linear Misto na frequência de batida de asa de *Ae. aegypti* fêmeas e machos por densidade larval e temperatura, utilizando como categorias de refêrencia a baixa densidade larval e a temperatura de 23ºC

Fêmeas	**Estimado**	**Erro-padrão (S.E.)**	**p-valor**
Intercepto	493,859	4,963	$7x10^{-5}$
Alta densidade larval	39,313	7,827	0,03
Temperatura (28ºC)	56,187	2,554	$2x10^{-16}$
Temperatura (33ºC)	111,699	2,969	$2x10^{-16}$
Machos			
Intercepto	746,797	15,29	0,008
Alta densidade larval	-39,698	27,918	0,33
Temperatura (28ºC)	98,977	7,984	$2x10^{-16}$
Temperatura (33ºC)	170,264	7,931	$2x10^{-16}$

Fonte: adaptado de Nadai et al. (2021)

Pode-se notar também que o aumento na FBA entre as temperaturas (entre 23 e 33ºC) foi maior para os machos (∼71 Hz) do que para as fêmeas (∼55 Hz), que corrobora com o estudo de Staunton et al. (2019). De acordo com Rowley e Graham (1968), o *Ae. aegypti* apresentou melhor desempenho no voo à temperatura de 21°C, e esta performence diminuiu conforme o aumento da temperatura. Desse modo, segundo Staunton et al. (2019) é provável que o aumento na FBA (entre temperaturas) pode estar associado à diminuição no desempenho do voo, uma tendência que pode afetar os *Ae. aegypti* machos mais do que as fêmeas.

A correlação positiva entre FBA e temperatura encontrada neste estudo corrobora com estudos anteriores (COSTELLO, 1974; STAUNTON et al., 2019; VILLARREAL; WINOKUR; HARRINGTON, 2017). Para Costello (1974), a temperatura é o fator ambiental mais crítico que influencia o comportamento do mosquito, pois afeta o metabolismo do inseto, bem como as características aerodinâmicas do ar.

Beament (1958) e Kerkut e Ridge (1961) afirmaram que a temperatura do ar afeta a disposição molecular da cutícula do inseto, influenciando assim a fexibilidade dos escleritos torácicos (placas de quitina que fazem parte do revestimento dos insetos). Assim, a inflexibilidade devido a baixas temperaturas resulta em FBA mais baixa do que a altas temperaturas, onde a flexibilidade é maior.

Para Weis-Fogh (1960), a resilina, uma proteína semelhante à borracha encontrada em certas estruturas cuticulares extracelulares em insetos, pode ser afetada por alterações na temperatura do ar. Esta proteína fornece elasticidade reversível ao exoesqueleto, e é importante para dar flexibilidade a estruturas tais como o ligamento da asa. As propriedades elásticas (força e módulo) destas estruturas variam diretamente com a temperatura absoluta, o que provavelmente influenciaria a FBA.

4.7 Umidade e temperatura

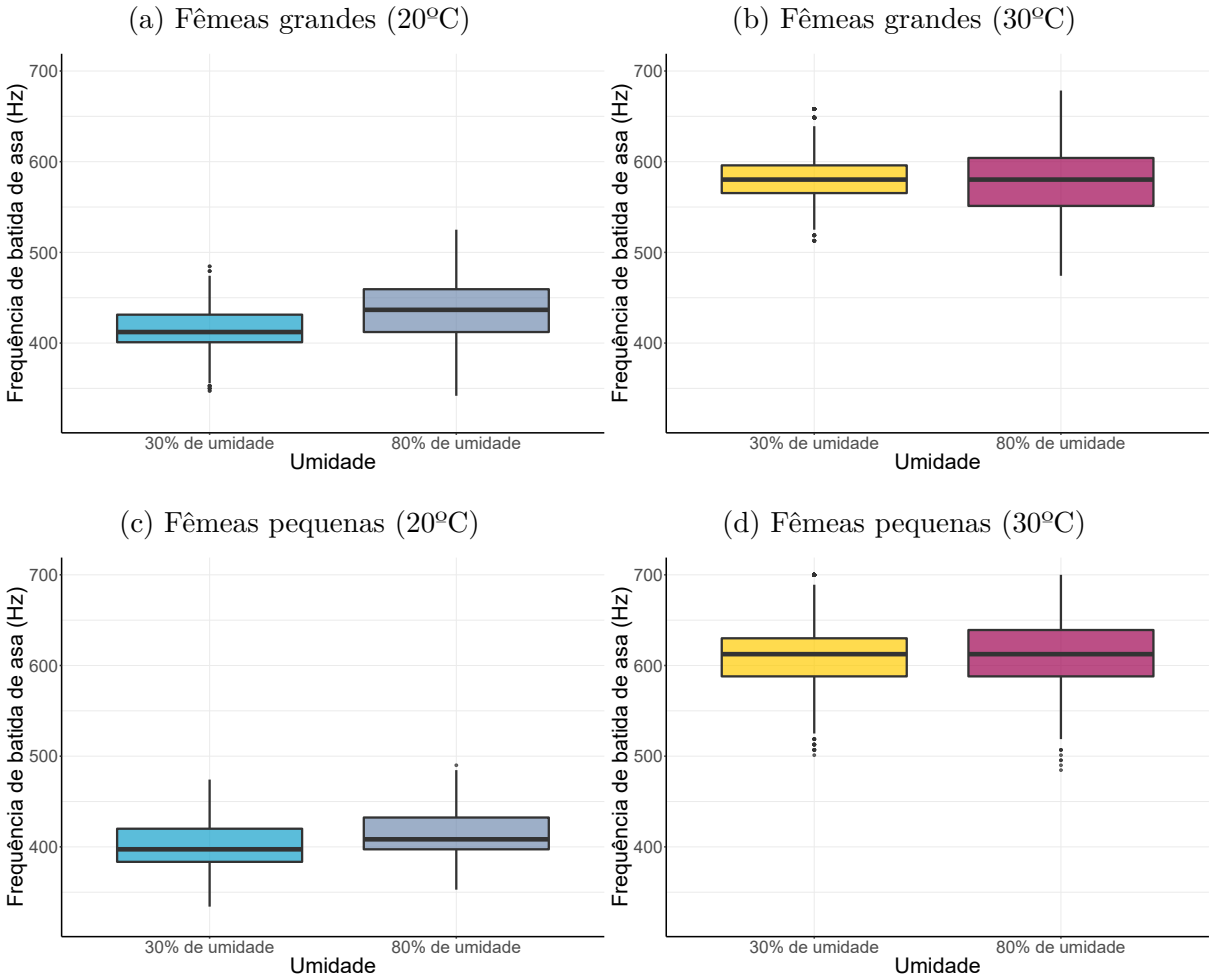
Para analisar o impacto da umidade do ar e da temperatura na FBA dos mosquitos, foram realizados ensaios com diferentes temperaturas e umidades. As FBAs de *Ae. aegypti* fêmeas nas condições testadas são apresentadas na Figura 27.

As FBAs dos machos em diferentes valores de umidade do ar e temperaturas encontram-se na Figura 28.

Na Tabela 16 encontram-se as médias de FBA, juntamente com o desvio-padrão, dos mosquitos testados em diferentes condições de umidade e temperatura.

O Teste-t foi aplicado para analisar a influência dos dois valores de umidade testados na FBA, separado por temperatura, tamanho dos mosquitos e sexo. Para todos os grupos testados o teste apontou diferença significativa na FBA ($p<0{,}0001$), exceto para os machos pequenos à 20ºC ($p=0{,}15$).

Figura 27 – Boxplot com a frequência de batida de asa de *Ae. aegypti* fêmeas grandes e pequenas em diferentes umidades relativas do ar (30 e 80%) e temperaturas (20 e 30ºC)

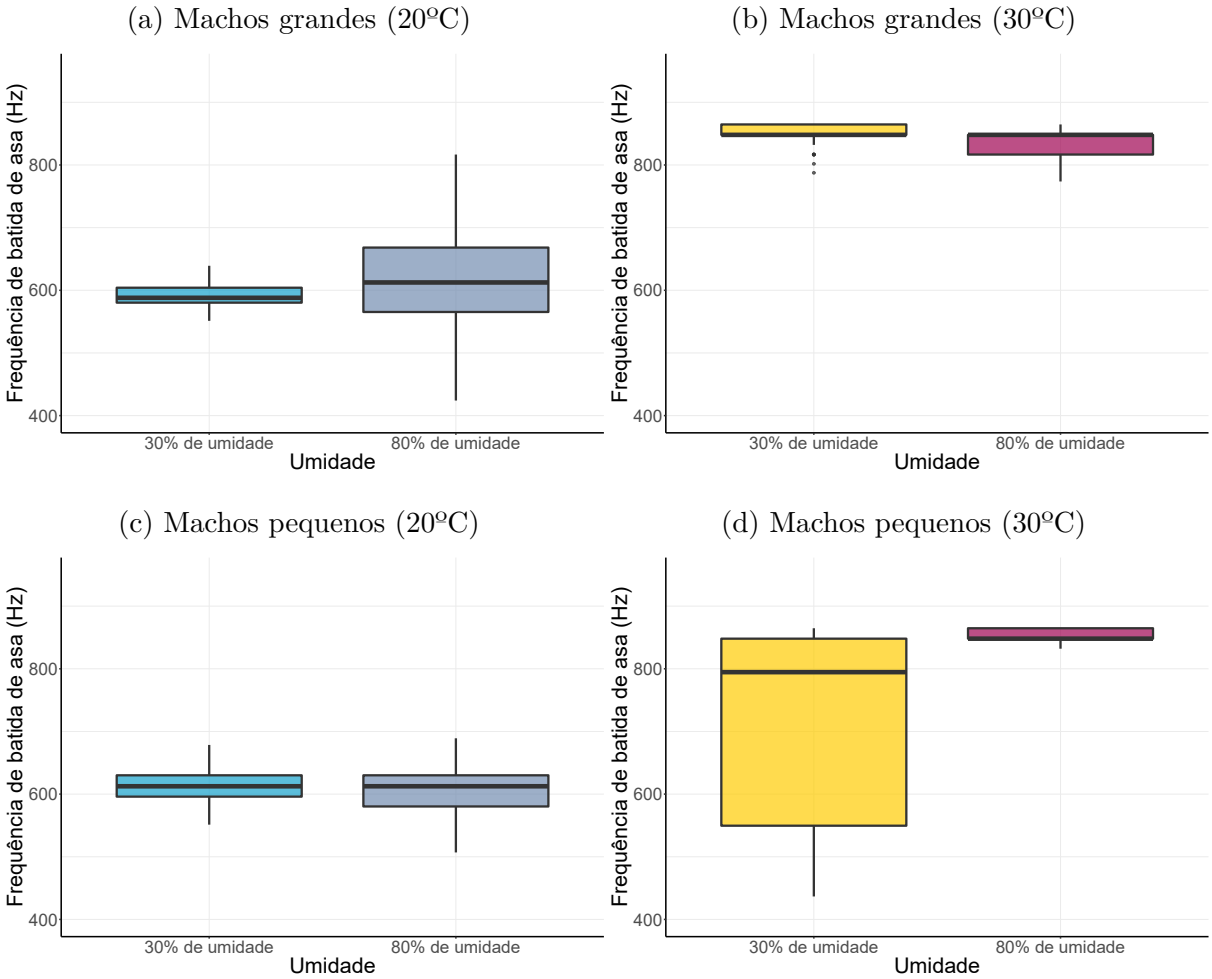


Fonte: elaborado pela autora

Estes resultados corroboraram em parte com Costello (1974), que estudou as fêmeas de *Ae. aegypti* utilizando um microfone e notou que o efeito da umidade era dependente da temperatura ambiente. De acordo com o autor, em baixas temperaturas a umidade não teve impacto na FBA, no entanto, em altas temperaturas houve um aumento significativo na FBA com o incremento da umidade. O autor testou as seguintes temperaturas: 26 e 34ºC e umidades: 5, 50 e 95%. Vale ressaltar que no presente estudo a temperatura mais baixa testada foi 20ºC, na qual todos os grupos apresentaram diferença significativa na FBA nas umidades de 30 e 80%, exceto os machos pequenos.

De acordo o mesmo autor, o efeito da umidade do ar na eficiência da transferência de calor entre o mosquito e o ambiente deve ser considerado. A transferência de calor deve aumentar com o aumento da umidade, já que o vapor d'água possui calor específico maior do que o ar. Os mosquitos são poiquilotérmicos, ou seja, sua temperatura corporal

Figura 28 – Boxplot com a frequência de batida de asa de *Ae. aegypti* machos grandes e pequenos em diferentes umidades relativas do ar (30 e 80%) e temperaturas (20 e 30ºC)



Fonte: elaborado pela autora

varia de acordo com a temperatura do ambiente, e, portanto, sua temperatura corporal é essencialmente a do ambiente que o rodeia. No entanto, devido ao calor gerado pela atividade muscular, a temperatura do mosquito durante o voo é alguns graus maior que a do ambiente. Um mosquito sem resfriamento evaporativo, portanto, perderia calor a uma taxa proporcional à umidade relativa do ambiente. Isso, por sua vez, causaria uma diminuição semelhante na FBA com o aumento da umidade e ocorreria independentemente da temperatura ambiente.

Segundo Chandrasegaran et al. (2020), a umidade relativa do ar é um fator abiótico que influencia a história de vida do mosquito. A alta umidade favorece a sobrevivência e abundância do mosquito adulto, já a baixa umidade limita a sobrevivência e a longevidade do mosquito . De acordo com Christophers (1960), a alta umidade favorece não apenas a longevidade, mas também a atividade geral dos mosquitos, especielmente quando

Tabela 16 – Frequência de batida de asa de *Ae. aegypti* fêmeas e machos em diferentes umidades e temperaturas do ar

Condição	Tamanho	Fêmeas		Machos	
		FBA** (média)	DP***	FBA** (média)	DP***
T 20ºC - U 30%*	Grande	414,02 Hz	± 26,15	592,61 Hz	± 22,14
T 30ºC - U 30%	Grande	584,35 Hz	± 25,98	851,18 Hz	± 15,91
T 20ºC - U 80%	Grande	433,30 Hz	± 33,84	619,07 Hz	± 67,33
T 30ºC - U 80%	Grande	579,14 Hz	± 38,66	835,47 Hz	± 21,70
T 20ºC - U 30%	Pequeno	400,17 Hz	± 25,90	614,52 Hz	± 30,80
T 30ºC - U 30%	Pequeno	616,97 Hz	± 42,74	711,92 Hz	± 154,24
T 20ºC - U 80%	Pequeno	414,38 Hz	± 27,44	608,46 Hz	± 37,72
T 30ºC - U 80%	Pequeno	624,43 Hz	± 47,55	853,44 Hz	± 11,88

*T: temperatura; U: umidade relativa do ar
**Frequência de batida de asa
***Desvio-padrão
Fonte: elaborado pela autora

combinada com temperaturas próximas a 28ºC .

4.8 Idade

Para analisar a influência da idade na FBA, foram realizados ensaios com os mosquitos na fase adulta desde o primeiro dia após a emergência. A Figura 29 ilustra as alterações na FBA do *Ae. aegypti* fêmea e macho ao longo de 23 dias.

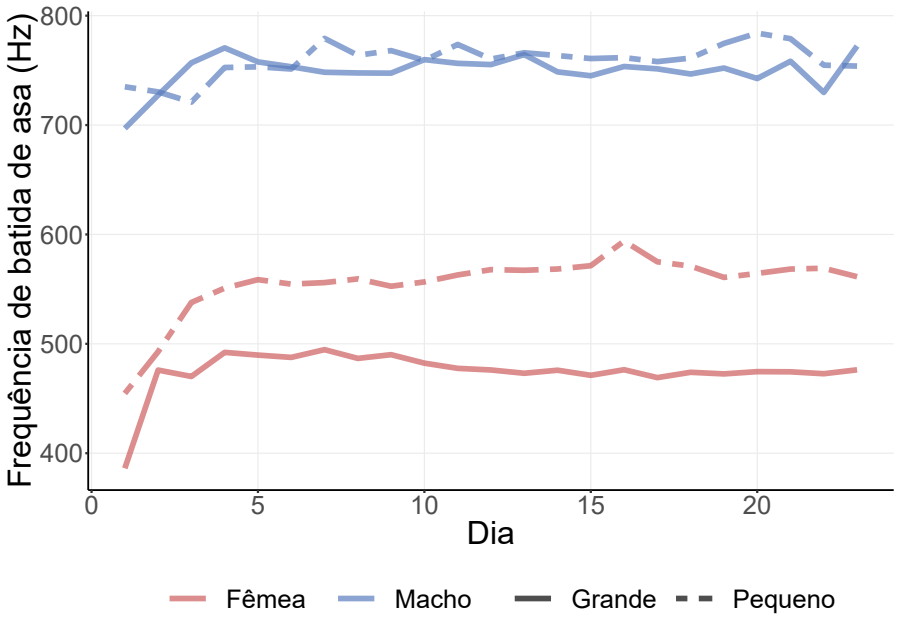
De acordo com a Figura 29 observa-se que no primeiro dia de vida após a emergência, a FBA do mosquito é menor e aumenta gradativamente até o quarto dia de vida, onde permanece praticamente constante até o 23º dia. Este comportamento foi observado tanto para o mosquitos grandes quanto para os pequenos. Na Tabela 17 estão descritas as frequências de batida de asa médias dos mosquitos nos dias 1, 5 e 23 após a emergência.

Tabela 17 – Frequência de batida de asa do *Ae. aegypti* no 1º, 5º e 23º dias após a emergência

Mosquitos	FBA* (média)		
	1º dia	5º dia	23º dia
Fêmea grande	386,19 Hz	489,70 Hz	476,23 Hz
Fêmea pequena	454,65 Hz	558,67 Hz	561,36 Hz
Macho grande	696,93 Hz	757,72 Hz	772,23 Hz
Macho pequeno	735,00 Hz	753,23 Hz	753,90 Hz

*Frequência de batida de asa
Fonte: elaborado pela autora

Figura 29 – Frequência de batida de asas de *Aedes aegypti* fêmeas e machos ao longo de 23 dias



Fonte: elaborado pela autora

Estes resultados corroboram com os estudos de Costello (1974), o qual observou um aumento na FBA de fêmeas *Ae. aegypti* durante os 5 primeiros dias de vida do mosquito. Para capturar a FBA dos mosquitos o autor utilizou um microfone e o experimento foi realizado durante 5 dias. Ogawa e Kanda (1986) também utilizaram microfone e reportaram resultados similares para mosquitos de oito espécies do gênero *Anopheles*. A FBA captada pelos autores era baixa imediatamente após a emergência dos adultos e aumentava rapidamente durante os dois primeiros dias, permanecendo em níveis constantes por mais de uma semana. Os ensaios de Ogawa e Kanda (1986) tiveram duração de 10 dias. Staunton et al. (2019) demosntraram que os mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas e machos mais jovens apresentaram FBA menores que os mais velhos. Os autores mediram a FBA no 7º, 14º e 21º dias após a emergência dos adultos utilizando um sensor ultrassônico.

O presente estudo coletou a FBA dos mosquitos durante 23 dias, sem interrupções durante as coletas, utilizando um sensor óptico. Os resultados deste experimento serviram de base para a escolha da idade, após a emergência dos mosquitos adultos, na realização dos experimentos desta pesquisa. Assim, assegura-se que uma possível alteração na FBA dos mosquitos testados não seja decorrente da idade do mosquito e sim das condições testadas nos ensaios.

5 CONCLUSÃO

Diante das condições testadas neste estudo utilizando o mosquito *Ae. aegypti* e dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O tamanho das fêmeas influenciou a FBA em uma correlação inversa, ou seja, a FBA diminuiu na medida em que o tamanho do mosquito aumentou.
- O pH da água de criação das larvas alterou a FBA e o tamanho do centróide das asas dos adultos resultantes. O pH também influenciou o peso das fêmeas;
- A FBA teve influência da temperatura do ar, em uma correlação positiva;
- A umidade alterou a FBA de quase todos os grupos de mosquitos testados, exceto dos machos pequenos à 20ºC;
- A longevidade também impactou a FBA dos mosquitos, de forma que, nos 3 primeiros dias após a emergência, estes apresentaram FBA menores;
- O sensor óptico utilizado neste estudo foi capaz de detectar todas as alterações ocorridas na FBA do *Ae. aegypti* durante os ensaios.

Os resultados deste trabalho demonstram a importância de estudar as condições ambientais que podem alterar a FBA dos mosquitos, o que pode ajudar a aumentar a acurácia dos dispositivos ópticos que empregam a FBA para a identificação automática das espécies, e aprimorar o monitoramento dos mosquitos.

5.1 Perspectivas futuras

- Avaliar a frequência de batida das asas dos *Ae. aegypti* sobreviventes a larvicidas;
- Verificar a ingestão de microplástico pelo mosquito e o respectivo impacto na FBA;
- Explorar a relação entre a FBA e as variáveis morfológicas das asas dos mosquitos;
- Avaliar a FBA em mosquitos infectados;
- Averiguar a FBA em mosquitos transgênicos;
- Criar uma biblioteca com a FBA das espécies transmissoras de doenças mais importantes para o Brasil.

REFERÊNCIAS

ALDERSLEY, A. et al. Time-frequency composition of mosquito flight tones obtained using hilbert spectral analysis. **The Journal of the Acoustical Society of America**, Acoustical Society of America, v. 136, n. 4, p. 1982–1989, 2014.

AÑEZ, G.; RIOS, M. Dengue in The United States of America: a worsening scenario? **BioMed research international**, Hindawi, v. 2013, 2013.

ARAÚJO, M. S.; GIL, L. H. S.; SILVA, A. d.-A. Larval food quantity affects development time, survival and adult biological traits that influence the vectorial capacity of *Anopheles darlingi* under laboratory conditions. **Malaria Journal**, BioMed Central, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2012.

ARJUNAN, N. K. et al. Green synthesis of silver nanoparticles for the control of mosquito vectors of malaria, filariasis, and dengue. **Vector-borne and zoonotic diseases**, Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, v. 12, n. 3, p. 262–268, 2012.

ARRIVILLAGA, J.; BARRERA, R. Food as a limiting factor for *Aedes aegypti* in water-storage containers. **Journal of vector Ecology**, Society for Vector Ecology, v. 29, p. 11–20, 2004.

ARTHUR, B. J. et al. Mosquito (*Aedes aegypti*) flight tones: Frequency, harmonicity, spherical spreading, and phase relationships. **The Journal of the Acoustical Society of America**, Acoustical Society of America, v. 135, n. 2, p. 933–941, 2014.

BARRERA, R. Competition and resistance to starvation in larvae of container-inhabiting *Aedes* mosquitoes. **Ecological Entomology**, Wiley Online Library, v. 21, n. 2, p. 117–127, 1996.

BARRERA, R.; MEDIALDEA, V. Development time and resistance to starvation of mosquito larvae. **Journal of Natural History**, Taylor & Francis, v. 30, n. 3, p. 447–458, 1996.

BATISTA, G. E. et al. SIGKDD demo: sensors and software to allow computational entomology, an emerging application of data mining. In: **Proceedings of the 17th ACM SIGKDD international conference on Knowledge discovery and data mining**. [S.l.: s.n.], 2011. p. 761–764.

BEAMENT, J. The effect of temperature on the water-proofing mechanism of an insect. **Journal of Experimental Biology**, The Company of Biologists Ltd, v. 35, n. 3, p. 494–519, 1958.

BELTON, P.; COSTELLO, R. A. Flight sounds of the females of some mosquitoes of Western Canada. **Entomologia experimentalis et applicata**, Wiley Online Library, v. 26, n. 1, p. 105–114, 1979.

BENTLEY, M. D.; DAY, J. F. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. **Annual review of entomology**, Annual Reviews, CA, USA, v. 34, n. 1, p. 401–421, 1989.

BOYER, S. et al. An overview of mosquito vectors of Zika virus. **Microbes and infection**, Elsevier, v. 20, n. 11-12, p. 646–660, 2018.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços, v. 16, n. 4, p. 295–302, 2007.

BRASIL et al. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue**. [S.l.]: Ministério da Saúde, Brasília, 2009.

CARLSON, C. J.; DOUGHERTY, E. R.; GETZ, W. An ecological assessment of the pandemic threat of Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Public Library of Science, San Francisco, CA, USA, v. 10, n. 8, p. e0004968, 2016.

CARVALHO, D. O. et al. Two step male release strategy using transgenic mosquito lines to control transmission of vector-borne diseases. **Acta tropica**, Elsevier, v. 132, p. S170–S177, 2014.

CHANDRASEGARAN, K. et al. Linking mosquito ecology, traits, behavior, and disease transmission. **Trends in parasitology**, Elsevier, v. 36, n. 4, p. 393–403, 2020.

CHRISTE, R. O. et al. Wing sexual dimorphism in *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). **Infection, Genetics and Evolution**, Elsevier, v. 45, p. 434–436, 2016.

CHRISTOPHERS, S. R. ***Aedes aegypti*: the yellow fever mosquito**. [S.l.]: CUP Archive, 1960.

CLARK, T. M.; FLIS, B. J.; REMOLD, S. K. PH tolerances and regulatory abilities of freshwater and euryhaline aedine mosquito larvae. **Journal of Experimental Biology**, The Company of Biologists Ltd, v. 207, n. 13, p. 2297–2304, 2004.

CLEMENTS, A. N. et al. **The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction**. [S.l.]: Chapman & Hall London, 1992. v. 1.

_____. **The biology of mosquitoes. Volume 2: sensory reception and behaviour.** [S.l.]: CABI publishing, 1999.

COMBES, S.; DANIEL, T. Flexural stiffness in insect wings I. Scaling and the influence of wing venation. **Journal of experimental biology**, Company of Biologists, v. 206, n. 17, p. 2979–2987, 2003.

COSTA, Z. G. A. et al. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, v. 2, n. 1, p. 11–26, 2011.

COSTELLO, R. A. **Effects of environmental and physiological factors on the acoustic behavior of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)**. 1974. Tese (Doutorado) — Science: Department of Biological Sciences, 1974.

COURET, J.; DOTSON, E.; BENEDICT, M. Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **PLoS One**, v. 9, n. 2, 2014.

CROVELLO, T. J.; HACKER, C. S. Evolutionary strategies in life table characteristics among feral and urban strains of *Aedes aegypti* (l.). **Evolution**, JSTOR, p. 185–196, 1972.

DÉGALLIER, N. et al. New entomological and virological data on the vectors of sylvatic yellow fever in Brazil. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1992.

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

DUTRA, H. L. C. et al. From lab to field: the influence of urban landscapes on the invasive potential of *Wolbachia* in brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLoS neglected tropical diseases**, Public Library of Science, CA, USA, v. 9, n. 4, p. e0003689, 2015.

DYE, C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. **Annual review of entomology**, Annual Reviews, El Camino Way, Palo Alto, CA, USA, v. 37, n. 1, p. 1–19, 1992.

EBI, K. L.; NEALON, J. Dengue in a changing climate. **Environmental research**, Elsevier, v. 151, p. 115–123, 2016.

FANG, J. Ecology: a world without mosquitoes. **Nature News**, Nature Publishing Group, v. 466, n. 7305, p. 432–434, 2010.

FIGUEIREDO, L. T. M. **Serious disease outbreaks caused by viruses transmitted by *Aedes aegypti* in Brazil**. [S.l.]: SciELO Brasil, 2016.

FUNASA. **Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor**. [S.l.]: Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, 2001.

FUNDAÇÃO BUTANTAN. **Introdução a técnicas morfométricas para amostras biológicas**. São Paulo, SP, 2020.

GARROS, C.; DUJARDIN, J.-P. Genetic and phenetic approaches to *Anopheles* systematics. ***Anopheles* mosquitoes: New insights into malaria vectors. Croatia: InTech**, p. 81–105, 2013.

GEBRU, A. et al. Multiband modulation spectroscopy for the determination of sex and species of mosquitoes in flight. **Journal of biophotonics**, Wiley Online Library, v. 11, n. 8, p. e201800014, 2018.

GENOUD, A. P. et al. Optical remote sensing for monitoring flying mosquitoes, gender identification and discussion on species identification. **Applied Physics B**, Springer, v. 124, n. 3, p. 1–11, 2018.

_____. A comparison of supervised machine learning algorithms for mosquito identification from backscattered optical signals. **Ecological Informatics**, Elsevier, v. 58, p. 101090, 2020.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. **Zika virus spreads to new areas — region of the Americas**. [S.l.]: Wiley Online Library, 2016.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Dengue: vírus e vetor. Instituto Oswaldo Cruz. 2021. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/galeria/galeria.html>. Acesso em: 02 jul 2021.

KAHN, M. C. et al. Recording of sounds produced by certain disease-carrying mosquitoes. **Science (Washington)**, American Association for the Advancement of Science, v. 6, p. 335–6, 1945.

KANG, D. S. et al. Larval stress alters dengue virus susceptibility in *Aedes aegypti* (L.) adult females. **Acta tropica**, Elsevier, v. 174, p. 97–101, 2017.

KERKUT, G.; RIDGE, R. The effect of temperature changes on the resting potential of crab, insect and frog muscle. **Comparative biochemistry and physiology**, Elsevier, v. 3, n. 1, p. 64–70, 1961.

KITTHAWEE, S.; EDMAN, J. D.; UPATHAM, E. S. Relationship between female *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) body size and parity in a biting population. **Journal of medical entomology**, Oxford University Press Oxford, UK, v. 29, n. 6, p. 921–926, 1992.

KUMAR, S. et al. Larvicidal, repellent, and irritant potential of the seed-derived essential oil of *Apium graveolens* against dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Frontiers in public health**, Frontiers, v. 2, p. 147, 2014.

KUTSUNA, S. et al. Autochthonous dengue fever, Tokyo, Japan, 2014. **Emerging infectious diseases**, Centers for Disease Control and Prevention, v. 21, n. 3, p. 517, 2015.

LETA, S. et al. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International Journal of Infectious Diseases**, Elsevier, v. 67, p. 25–35, 2018.

LI, Z. et al. Automated identification of mosquito (Diptera: Culicidae) wingbeat waveform by artificial neural network. In: SPRINGER. **IFIP International Conference on Artificial Intelligence Applications and Innovations**. [S.l.], 2005. p. 483–489.

LORENZ, C.; SUESDEK, L. The use of wing shape for characterising macroevolution in mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Infection, Genetics and Evolution**, Elsevier, v. 77, p. 104052, 2020.

LORENZ, C.; VIRGINIO, F.; BREVIGLIERI, E. L. O fantástico mundo dos mosquitos. In: **O fantástico mundo dos mosquitos**. [S.l.: s.n.], 2018. p. 141–p.

LOUISE, C.; VIDAL, P. O.; SUESDEK, L. Microevolution of *Aedes aegypti*. **Plos one**, Public Library of Science, v. 10, n. 9, p. e0137851, 2015.

MADZLAN, F. et al. Breeding characteristics of *Aedes* mosquitoes in dengue risk area. **Procedia-Social and Behavioral Sciences**, Elsevier, v. 234, p. 164–172, 2016.

MALETZKE, A. G. **Binary quantification in non-stationary scenarios**. 2019. 163 p. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2019.

MARQUARDT, W. H. **Biology of disease vectors**. [S.l.]: Elsevier, 2004.

MEDEIROS-SOUSA, A. R. et al. Influence of water's physical and chemical parameters on mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages in larval habitats in urban parks of São Paulo, Brazil. **Acta tropica**, Elsevier, v. 205, p. 105394, 2020.

MERRITT, R. W.; DADD, R.; WALKER, E. D. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. **Annual review of entomology**, Annual Reviews, El Camino Way, Palo Alto, CA, USA, v. 37, n. 1, p. 349–374, 1992.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico da qualidade .** [S.l.]: Grupo Gen-LTC, 2000.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. Gauge capability and designed experiments. part i: basic methods. **Quality Engineering**, Taylor & Francis, v. 6, n. 1, p. 115–135, 1993.

MOORE, A. et al. Automated identification of flying insects by analysis of wingbeat frequencies. **Journal of economic entomology**, Oxford University Press Oxford, UK, v. 79, n. 6, p. 1703–1706, 1986.

MOREIRA, L. A. et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and *Plasmodium*. **Cell**, Elsevier, v. 139, n. 7, p. 1268–1278, 2009.

MOURA, L.; NADAI, B. L. de; 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. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Elsevier, v. 23, n. 2, p. 529–535, 2020.

MUKUNDARAJAN, H. et al. Using mobile phones as acoustic sensors for high-throughput mosquito surveillance. **eLife**, eLife Sciences Publications Limited, v. 6, p. e27854, 2017.

MULLEN, E. R. et al. Laser system for identification, tracking, and control of flying insects. **Optics express**, Optical Society of America, v. 24, n. 11, p. 11828–11838, 2016.

NADAI, B. de et al. The impact of body size on *Aedes* [*Stegomyia*] *aegypti* wingbeat frequency: implications for mosquito identification. **Medical and Veterinary Entomology**, Wiley Online Library, 2021.

NOBRE, A.; ANTEZANA, D.; TAUIL, P. Febre amarela e dengue no Brasil: epidemiologia e controle. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 27, n. suppl III, p. 59–66, 1994.

OGAWA, K.-i.; KANDA, T. Wingbeat frequencies of some anopheline mosquitoes of east asia (Diptera: Culicidae). **Applied entomology and zoology**, Japanese Society of Applied Entomology and Zoology, v. 21, n. 3, p. 430–435, 1986.

OLIVA, C. F. et al. Effects of irradiation, presence of females, and sugar supply on the longevity of sterile males *Aedes albopictus* (*Skuse*) under semi-field conditions on Reunion Island. **Acta tropica**, Elsevier, v. 125, n. 3, p. 287–293, 2013.

OUYANG, T.-H. et al. Mosquito vector monitoring system based on optical wingbeat classification. **Computers and Electronics in Agriculture**, Elsevier, v. 118, p. 47–55, 2015.

PESSOA, L. Z. d. S. et al. Nanosuspension of quercetin: preparation, characterization and effects against *Aedes aegypti* larvae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, SciELO Brasil, v. 28, p. 618–625, 2018.

PEZZIN, A. et al. Comparative study on the effectiveness of different mosquito traps in arbovirus surveillance with a focus on WNV detection. **Acta tropica**, Elsevier, v. 153, p. 93–100, 2016.

PIERRE, D. Y. S.; OKECHUKWU, E. C.; NCHIWAN, N. E. Larvicidal and phytochemical properties of *Callistemon rigidus* R. Br. (Myrtaceae) leaf solvent extracts against three vector mosquitoes. **Journal of vector borne diseases**, Medknow Publications & Media Pvt. Ltd., v. 51, n. 3, p. 216, 2014.

POMBI, M.; MONTARSI, F. Mosquitoes (Culicidae). In: **Reference Module in Biomedical Sciences**. [S.l.]: Elsevier, 2020.

POTAMITIS, I. Classifying insects on the fly. **Ecological informatics**, Elsevier, v. 21, p. 40–49, 2014.

POTAMITIS, I.; RIGAKIS, I. Novel noise-robust optoacoustic sensors to identify insects through wingbeats. **IEEE Sensors Journal**, IEEE, v. 15, n. 8, p. 4621–4631, 2015.

RAMKUMAR, G. et al. Adulticidal and smoke toxicity of *Cipadessa baccifera* (Roth) plant extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*. **Parasitology research**, Springer, v. 114, n. 1, p. 167–173, 2015.

RAMOS, A. W. **CEP para processos contínuos e em bateladas**. [S.l.]: Editora Blucher, 2000.

REISKIND, M.; LOUNIBOS, L. Effects of intraspecific larval competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Medical and veterinary entomology**, Wiley Online Library, v. 23, n. 1, p. 62–68, 2009.

REISKIND, M. H.; JANAIRO, M. S. Late-instar behavior of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae in different thermal and nutritive environments. **Journal of medical entomology**, Oxford University Press, v. 52, n. 5, p. 789–796, 2015.

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**, Elsevier, v. 58, n. 7, p. 911–917, 2012.

ROBERTSON-BRYAN, INC. **PH requirement of Freshwater Aquatic Life: Technical Memorandum**. CA, 2004.

ROHLF, F. J. **Ecology Evolution. 4th edition**. New York: Stony Brook University, 2004.

ROWLEY, W. A.; GRAHAM, C. L. The effect of temperature and relative humidity on the flight performance of female *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, Elsevier, v. 14, n. 9, p. 1251–1257, 1968.

SALIM, Z. T. et al. Frequency-based detection of female *Aedes* mosquito using surface acoustic wave technology: Early prevention of dengue fever. **Microelectronic Engineering**, Elsevier, v. 179, p. 83–90, 2017.

SANTOS, D. A. et al. Automated electronic approaches for detecting disease vectors mosquitoes through the wing-beat frequency. **Journal of Cleaner Production**, Elsevier, v. 217, p. 767–775, 2019.

SCIENCE Alert. These are the top 15 deadliest animals on earth. [s.n.], 2018. Disponível em: <sciencealert.com/what-are-the-worlds-15-deadliest-animals>. Acesso em: 28 jun. 2021.

SCOTT, T. W. et al. Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. **Journal of medical entomology**, Oxford University Press Oxford, UK, v. 30, n. 1, p. 94–99, 1993.

SEQUIHOD, I. Effects of different pH levels on the viability, metamorphosis rate and morphology of *Aedes* mosquitoes. In: **Conference: Central Visayas Health Research and Innovation**. [S.l.: s.n.], 2016.

SHEPARD, D. S. et al. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. **The Lancet infectious diseases**, Elsevier, v. 16, n. 8, p. 935–941, 2016.

SILVA, C. M.; LOURENÇO, G. S.; OLEA, R. S. G. A luta humana contra o *Aedes aegypti*. **Cadernos de Pesquisa**, v. 19, n. 3, 2012.

SILVA, D. F. et al. Exploring low cost laser sensors to identify flying insect species. **Journal of Intelligent & Robotic Systems**, Springer, v. 80, n. 1, p. 313–330, 2015.

SOTAVALTA, O. The essential factor regulating the wing-stroke frequency of insects in wing mutilation and loading experiments and in experiments at subathmospheric pressure. **Annales Zoologici Societatis Zoologicae Botanicae Fennicae Vanamo**, v. 15, p. 1–67, 1952.

SOUZA, R. S. et al. Microorganism-based larval diets affect mosquito development, size and nutritional reserves in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Frontiers in physiology**, Frontiers, v. 10, p. 152, 2019.

SOUZA, V. M. et al. Challenges in benchmarking stream learning algorithms with real-world data. **Data Mining and Knowledge Discovery**, Springer, v. 34, n. 6, p. 1805–1858, 2020.

STAUNTON, K. M. et al. A novel methodology for recording wing beat frequencies of untethered male and female *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, American Mosquito Control Association, Inc., v. 35, n. 3, p. 169–177, 2019.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, SciELO Public Health, v. 17, p. S99–S102, 2001.

VILLARREAL, S. M.; WINOKUR, O.; HARRINGTON, L. The impact of temperature and body size on fundamental flight tone variation in the mosquito vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): implications for acoustic lures. **Journal of medical entomology**, Oxford University Press, v. 54, n. 5, p. 1116–1121, 2017.

VIRGINIO-FONSECA, F. **Morfometria geométrica e banco de dados na investigação de problemas biológicos em Culicidae.** 2018. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2018.

WEIS-FOGH, T. A rubber-like protein in insect cuticle. **Journal of Experimental Biology**, The Company of Biologists Ltd, v. 37, n. 4, p. 889–907, 1960.

WHO. **World Health Organization. A global brief on vector-borne diseases**. [S.l.], 2014.

_____. **World Health Organization. Global vector control response 2017-2030**. [S.l.], 2017.

_____. **World Health Organization. Situation Report 10 March 2017**. [S.l.]: World Health Organization, 2017.

WISHART, G.; RIORDAN, D. Flight responses to various sounds by adult males of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **The Canadian Entomologist**, Cambridge University Press, v. 91, n. 3, p. 181–191, 1959.

ZARA, A. L. d. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, SciELO Public Health, v. 25, p. 391–404, 2016.

ZÖLZER, U. **Digital audio signal processing**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2008.