

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL - UFMS**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E**  
**PARASITÁRIAS**

**MATHEUS EUGENIO PORTO BARBOSA**

**DIFERENCIAÇÃO DE FÊMEAS DE *Lutzomyia cruzi* E *Lutzomyia longipalpis***  
**(DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) POR ESPECTROSCOPIA DE**  
**INFRAVERMELHO**

**CAMPO GRANDE**

**2024**

**MATHEUS EUGENIO PORTO BARBOSA**

**DIFERENCIAÇÃO DE FÊMEAS DE *Lutzomyia cruzi* E *Lutzomyia longipalpis*  
(DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) POR ESPECTROSCOPIA DE  
INFRAVERMELHO**

Dissertação apresentada como exigência para a obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação da Profa. Dra Alessandra Gutierrez de Oliveira.

Orientadora: Alessandra Gutierrez de Oliveira

**CAMPO GRANDE**

**2024**

*Dedico esse trabalho a minha mãe, meu avô e  
minha avó. Vocês fizeram tudo isso acontecer,  
muito obrigado por tudo.*

## AGRADECIMENTOS

A minha Mãe, Bruna Porto, por sempre acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos e vontades. Obrigado por ser meu sol, minha lua, meu mundo e minhas estrelas. Gostaria de ser um por cento do que você é! Te amo incondicionalmente.

Aos meus avós, Maria do Rosário Porto e Marco Antônio Barbosa, que sempre investiram em minha educação e criação. Vocês me ensinaram como ser uma pessoa melhor e humana. Obrigado por tudo, amo vocês.

As minhas irmãs Maria Leticia, Maria Laura e Geovana por me ensinarem ter muita paciência e demonstrar que o amor fraternal é algo sobrenatural. Vocês são minhas estruturas e não me deixam desistir. Obrigado, obrigado, obrigado por me escolherem como irmão e amo vocês infinito.

A minha tia Brena e meu tio Marco Antônio por serem exemplos a serem seguidos. Amo vocês.

As meus primos: Ana Angélica Porto pelo amor; Mônica Porto por “bom dias alegrias”; Enrico Porto por sempre estar lá; Julia Pinhal e Maria Teresa por me acolherem; Luana Catarucci por me mostrar a inteligência; Maria Eduarda Porto por me mostrar o companheirismo, amizade e ser meu primeiro amor; Nandinho por me mostrar a amizade; João Pedro Porto por me mostrar a resiliência; Teodora Porto por me ensinar a ver o melhor da vida; Beatriz Porto por mostrar que a vida não é tão séria; A Noêmia Porto por me mostrar o senso crítico. Amo vocês.

A Sueli de Paula que foi minha mãe/amiga durante esse processo. Sinto sua falta todo dia, queria que você estivesse aqui para me ver finalmente finalizando esse capítulo. Te amo de outras vidas, sua partida foi um golpe em nossas vidas. Estou com muita saudade. Cuida de mim de onde você estiver.

As minhas tias-avós Maria Aparecida da Graça Barbosa e Ana Lúcia Barbosa, por serem meus exemplos de mestrandas e doutorandas desde criança, sempre sonhei em ser como vocês quando passei muitos dias da minha infância na UFRRJ. Amo vocês, Obrigado pelo estímulo.

A minha vó Maria Castilho por tudo, você me ajudou em muitos sentidos e serei eternamente grato. Te amo.

A minha Tia Angela Porto pelas noites de risadas, histórias e conselhos. Amo você tia.

Aos meus tios-avós Celeste Porto, Wanda Porto, Elói Porto, Gilberto Moura, Henoch Porto e Rosa Porto, por sempre lembrarem de mim.

Ao meu padrasto, Hugo Damião, por ser meu pai e exemplo do que devo me tornar. Obrigado por tudo que fez por mim, minhas irmãs e minha mãe.

A Dulce Meri e a Deusi Benedita por me acolherem. Nunca irei esquecer disso.

Juliana, Priscila e minha avó Maria da Silva pelo amor e jamais esquecerem de mim. Amo vocês.

A Maria Rita, Ayumi Arita, Carla Andrade, Ana Claudia e Camila Claro por ajudarem minha mãe a se manter firme e por todo carinho.

Aos meus filhos Romeu, Julieta, Pulguinha, Tina, Pipoca e Gamora por serem os melhores cachorros do mundo. Súriah, Filhota, Hannah, Dará, Suzy, Sol e Mel jamais esquecerei vocês. Amo vocês demais.

Ao Arthur Santos, Giovani Andrella, Isabella Madona, Leonardo Aitor e Kaique Bernadino por serem as pessoas mais próximas de mim durante essa jornada. Cada um de vocês sabem da importância em minha vida (principalmente nesse processo de mestrado). Eu amo cada um de vocês. Obrigado por compartilharem a vida de vocês comigo, mesmo longe ou perto tinham paciência em me aguentar nas paranoias. Sem vocês não iria conseguir segurar as pontas!

Ao Felipe Broder e Mariana Nogueira que mesmo longe não desistiram de mim. Mesmo eu surtando vocês não me deixaram. Sou grato demais pelo que o COC uniu, vocês são ouro! Amo vocês.

Aos meus amigos da graduação. Mateus Souza por ser meu amigo e companheiro, ansiava pelas suas visitas e que mesmo com a distância a amizade prevaleceu. Karina Morales por sempre me fazer rir e pelo carinho de irmã. Amo vocês.

A Anny Beatriz e a Alexandra Paredes por serem minhas amigas, pela amizade em nossos rolês e os conselhos. Sou grato por vocês também me aguentarem. Amo vocês.

Ao Fernando e Marco Antônio por cederem a casa de vocês durante todo esse período. Fernando amor que se construiu desde a pandemia e Marco o amor desde a graduação. Amo vocês, jamais conseguirei agradecer.

Ao Iuri Ricardi e Nadia Pantano pela amizade que mesmo distante se fortalece com mensagens. Vocês são exemplos para mim de esforço e dedicação, fico muito feliz em saber que sou padrinho desse casal. Amo vocês dois que chega a doer. Obrigado por tudo.

A Clara Aguiar Arruda por não desistir de mim, pela amizade e agora advogada! Te amo.

Ao Ion Rondoni, Érika Moura, Andreza Iara e Marcela que eram amigas e amigo da minha amiga e hoje posso chamar vocês de amigos. Obrigado pelos momentos juntos.

A Rosângela Locatelli Madona E Valéria de Fátima Marcondes Reis por serem progenitoras de pessoas muito especiais para mim. Obrigado também pelas palavras de carinho Tia.

A Maya Silva por estar no início comigo, sinto muita saudades, te amo!

Aos meus amigos de Aquidauana: Salene Candido, Matheus Henrique, Henrique Carvalho, Leticia Timóteo, Vitoria Santos, Carol Rogerio, Jessica Silva, Carlos Odoni, Izabella Schwind, Heryson Jordan, Jacson Falcão. Guardo vocês em meu coração.

As pessoas da DIP que estiveram me dando forças em momentos diferentes, sou grato por vocês. Em especial Thaynara Azevedo, Nathalia Maciel, Francine Dorneles, Maricelma Fialho, Wesllaine Milanezi, Dality Barros, Dâmaris Batestin, Ana Isabel, Lisany Krug, Matheus Souza,

Barbara Casella, Lisandra, Kauane, Danielly Gomes, Valdirene, Kênia Rezende, Luciana Cunha. Cada um de vocês me fizeram bem em algum momento.

Obrigado Hafsa pela nova amizade nesse fim do mestrado, gosto muito de você,

Aos meus amigos do curso de identificação de flebotomíneos Eric Marialva, Janaína, Rosa Christina, Guilherme Vieira, Israel Pinto, Rebecka Guimarães, Jackellyne Geórgia e Luan Jamal.

Ao Breno Lisboa por tudo que fez por mim nesse final de mestrado.

Ao meu amigo Danilo Matheus, sinto sua falta todo dia. Queria poder conversar com você sobre o mestrado, quem sabe nos sonhos né? Nunca entenderei porque você partiu, mas sei que minha saudade é eterna. Olhe por mim aí de cima. Te amo, isso é por você.

E todos meus amigos que estiveram comigo em diferentes momentos.

A minha orientadora Alessandra Gutierrez de Oliveira pela confiança e acreditar em mim mesmo não me conhecendo. Serei eternamente grato pela oportunidade de mestrado e logo menos ao doutorado. Obrigado por me introduzir ao mundo dos flebotomíneos. Te admiro pelo ser humano que você é. Muito obrigado novamente por tudo que fez e ainda faz por mim!

As professoras Eliane Piranda e Carla Arruda por sempre estarem lá com conselhos e dicas. Vocês foram companheiras mais que presentes nessa jornada, admiro demais a história de vocês.

A Jucelei Infran por me mostrar que a taxonomia e os flebotomíneos é um mundo vasto e com muitas oportunidades, você foi uma mãe/amiga por mim jamais irei conseguir mostrar minha gratidão por ter você em minha vida. A Aline Casaril por ser amiga e conselheira em momentos que precisei, você é um ser humano incrível que possui muito conhecimento, obrigado pela simpatia e amor. A Natália Alves por ser minha irmã amiga nos momentos que mais precisei de colo, obrigado pelos conselhos jamais esquecerei disso, já estou com saudades. Amo vocês demais meninas, se estou aqui é por vocês também.

Ao Wagner Fernandes por ser minha banca e meu amigo. Obrigado por cada palavra, me espelho muito em você.

As meninas da microbiologia Ana Paula, Ana Paula, Renata Lucichi, Bruna Castro e Maria Carolina pelos conselhos e acolhimento no momento que mais necessitei, obrigado por me ajudarem a não deixar a peteca cair, vocês foram essenciais para mim nesses momentos finais mesmo não tendo a obrigação de me ajudar. Ana Paula Marques obrigado pelas oportunidades nos projetos de ensino e me aproximar da educação. Bruna uma velha conhecida que agora posso chamar de amiga, estou amando te conhecer mais. Renata, obrigado pelos reels e conselhos, eu jamais vou esquecer das suas palavras. Estou muito feliz em poder chamar vocês de amigas, obrigado a todas.

A Mariana Mayumi, Pedro Colete, Camila Barbosa, Moacir Diogenes, Mayene, Elisene Rocha, Mariana Souza, Yasmin Rizk e Giovana Mesquita pelas palavras de apoio no laboratório. Cada um de vocês possui uma parcela de ajuda especial na minha trajetória.

A Gabriela Camargo Pacher por me ensinar sobre física quando tudo estava uma neblina, nunca irei esquecer disso, muito obrigado mesmo Gabi! Você foi essencial nessa luta.

Ao laboratório Parasitologia Humana da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela estrutura que permitiu a realização do meu trabalho e a todos companheiros que passaram rapidamente por lá.

A Professora Karina Tondato por ser a primeira a me mostrar a ciência. Obrigado por acreditar em mim.

A Professora Edna Maria Facincani pelo amor e reconhecimento! Você me inspira profissionalmente e como humano! Te amo!

A professora Eunice Galati pelos ensinamentos sobre flebotomíneos.

Ao Wagner Fernandes, Alessandra Gutierrez, Aline Casaril, Suellem Barrios, Cicero Cena, Mirella Santos e Everton Falcão que reservaram tempo para serem minha banca. Vocês são pessoas que me inspiram em diversos aspectos. Obrigado pela honra de ter vocês na minha história.

Ao Instituto de Biociências (INBIO) da UFMS pela estrutura para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao professor Cícero Cena pela paciência em me ensinar física em momentos que achei que seria impossível.

Ao laboratório Óptica e Fotônica pela estrutura para o desenvolvimento do experimento. A equipe do laboratório ajuda. Ao departamento de Física (INFI) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Aos meus professores da pós graduação pelos ensinamentos. Em especial Everton Falcão, Crhistine Maymone, Anamaria Paniago, Alda Maria e James Venturini.

A Coordenadoria Estadual de Controle de Vetores pela parceria.

A Faculdade de Medicina (FAMED) por permitir meu estudo no programa e também pelas salas para as realizações dos eventos e aulas da minha pós graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da UFMS pela oportunidade de estudo.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul por permitir a realização dos meus sonhos, a graduação e pós graduação.

Obrigado a Deus, Jesus, Nossa Senhora Aparecida, Maria Padilha, Exu, Aliens e a qualquer entidade que tenha me ajudado durante o processo.

Agradeço o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“A vida é uma constante oscilação entre a ânsia  
de ter e o tédio de possuir.”*

Arthur Schopenhauer.



## RESUMO

No Brasil as espécies de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* são vetores de *Leishmania infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral. *Lutzomyia longipalpis* está presente em todas regiões do País, e *Lutzomyia cruzi* apenas no Centro-Oeste e Nordeste. As fêmeas das duas espécies não podem ser diferenciadas, pois são morfologicamente idênticas. Em Mato Grosso do Sul, ambas são encontradas em simpatria em seis municípios onde há notificações de leishmaniose visceral. A identificação taxonômica é necessária, pois o perfil epidemiológico pode ser influenciado pela espécie de vetor. Devido a evidências comportamentais, bioquímicas e morfológicas, há a existência de um complexo *longipalpis* cujas populações de *Lutzomyia longipalpis* e outras espécies estão incluídas, entre elas *Lutzomyia cruzi*. Diante do exposto é necessário buscar alternativas para minimizar esse problema utilizando-se métodos alternativos. Nesse sentido, a Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier e fotoacústica (FTIR) é uma técnica que permite caracterizar bandas moleculares por meio de espectros sonoros sem a preparação prévia da amostra. É utilizada em diversos grupos em conjunto com *machine learning* (ML). O presente estudo tem como objetivo diferenciar fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* por meio de FTIR e aprendizado de máquina. Um total de 120 fêmeas de *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia longipalpis* de Corumbá e Aquidauana, respectivamente, foram processadas no espectrômetro em grupo de quatro. Após o processamento das amostras, os espectros obtidos foram analisados para a caracterização das espécies com multianálises e aprendizado de máquina. Utilizando-se o algoritmo SVM Linear nas três faixas de bandas (4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ ; 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$ ; 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$ ) com componentes principais necessários para cada faixa, a porcentagem foi acima de 95% de acurácia. Além disso, sugere-se também, que qualquer faixa espectral pode ser utilizada para obter um bom modelo de previsão para utilização na rotina laboratorial. Os testes de validação foram bem sucedidos, com uma exatidão global de 100% para todas as faixas espectrais analisadas com a escolha adequada de PCs. As faixas vibracionais 2800  $\text{cm}^{-1}$  (lipídios e ácidos graxos) e 1154, 1109  $\text{cm}^{-1}$  (carboidratos) correspondem às diferenças entre as duas espécies. Portanto, pode-se concluir que FTIR e aprendizado de máquina são competentes para a diferenciação das duas espécies.

**Palavras-chaves:** Flebotomíneos. *Lutzomyia cruzi*. *Lutzomyia longipalpis*. FTIR. Análises-multivariadas.

## ABSTRACT

*Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* are two phlebotomine species in Brazil that are vectors of *Leishmania infantum*, the causative agent of visceral leishmaniasis. *Lutzomyia longipalpis* is found throughout the country, while *Lutzomyia cruzi* is only present in the Centre-West and Northeast regions. The females of both species are morphologically identical and cannot be differentiated. In Mato Grosso do Sul, both species, *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi*, are found in six municipalities where visceral leishmaniasis has been reported. It is important to taxonomically identify the species as the epidemiological profile can be influenced by the vector species. The longipalpis complex, which includes *Lutzomyia longipalpis* and other species, has been identified based on behavioural, biochemical and morphological evidence. To address this issue, alternative methods must be explored. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) is a technique that can characterize molecular bands through sound spectra without the need for prior sample preparation. It is commonly used in conjunction with machine learning (ML) by various groups. The objective of this study is to differentiate between female *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* using FTIR and machine learning. A total of 120 female sand flies, 60 *Lutzomyia cruzi* and 60 *Lutzomyia longipalpis*, were analysed using a spectrometer in groups of four. The obtained spectra were analysed using multi-analysis and machine learning to characterise the species. The Linear SVM algorithm was used in three band ranges (4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$ ; 3000 to 2800  $\text{cm}^{-1}$ ; 1800 to 800  $\text{cm}^{-1}$ ) with the principal components required for each range. The results showed over 95% accuracy. It is also suggested that any spectral range can be used to obtain a good predictive model for use in laboratory routine. The validation tests were successful, with an overall accuracy of 100% for all the spectral ranges analysed with the appropriate choice of PCs. The vibrational bands 2800  $\text{cm}^{-1}$  (lipids and fatty acids) and 1154, 1109  $\text{cm}^{-1}$  (carbohydrates) were found to correspond to the differences between the two species. Therefore, it can be concluded that FTIR and machine learning are effective in differentiating the two species.

**Keywords:** Sandflies. *Lutzomyia cruzi*. *Lutzomyia longipalpis*. FTIR. Multivariate analysis.

## LISTA DE IMAGENS

- Figura 1 - Municípios com casos notificados de LV e onde foi relatada a presença de flebotomíneos, 2001–2018, Mato Grosso do Sul, Brasil ..... 25
- Figura 2 - Cerdas presente no gonoxito de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, respectivamente ..... 27
- Figura 3 - Representação esquemática do espectro eletromagnético ..... 29

## **LISTA DE SIGLAS**

LC: Leishmaniose cutânea

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

SIDA: Síndrome de imunodeficiência adquirida

CE: Ceará

MG: Minas Gerais

BA: Bahia

MS: Mato Grosso do Sul

RJ: Rio de Janeiro

MT: Mato Grosso

NaOH: Hidróxido de sódio

FTIR: Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

PAS: Espectroscopia Fotoacústica

PC: Componentes principais

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
1.1. Leishmanioses .....	14
1.2. Leishmanioses em Mato Grosso do Sul .....	15
1.3. Biologia dos Flebotomíneos .....	16
1.4. Histórico taxonômico .....	18
1.5. Flebotomíneos em Mato Grosso do Sul .....	19
1.6. <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	20
1.7. <i>Lutzomyia cruzi</i> .....	24
1.8. Identificação de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e <i>Lutzomyia cruzi</i> em simpatria.....	26
1.9. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	28
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
2.1 Geral .....	33
2.2 Específicos .....	33
<b>3. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO À REVISTA “ENTOMOLOGIA GENERALIS: JOURNAL OF GENERAL AND APPLIED ENTOMOLOGY” .....</b>	<b>34</b>
Easy discrimination of female sand flies from <i>Lutzomyia</i> (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species with FTIR spectroscopy and multivariate analysis.....	34
Abbreviations.....	35
3.1. Abstract.....	36
3.2. Introduction.....	37
3.3. Materials and Methods .....	38
3.3.1. Study area and period.....	38
3.3.2. Sandfly Analysis .....	38
3.3.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) .....	39
3.3.4. Data Analysis .....	39
3.4. Results and Discussion .....	41
3.5. Conclusions.....	48
3.6. Acknowledgments .....	49
3.7. References.....	50
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* sp. que são transmitidos por meio da picada de fêmeas infectadas de flebotomíneos ao realizarem repasto sanguíneo em mamíferos, cerca de 70 espécies de animais, incluindo humanos, podem ser infectados pelo parasita (WHO, 2023).

As manifestações clínicas variam de acordo com a espécie de protozoário e a resposta do hospedeiro. Entre os humanos há três formas clínicas de leishmaniose: leishmaniose mucocutânea, leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral. Leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose dérmica pós calazar são manifestações mais raras (SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

As espécies que são agentes etiológicos da leishmaniose cutânea e suas variantes em humanos no velho mundo são: *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford e Bray; *Leishmania tropica* (Wright, 1903) Lühe, 1906; *Leishmania major* Yakimov & Schockov, 1914. Já no novo mundo as espécies que parasitam o homem são: *Leishmania amazonensis* Lainson & Shaw, 1972; *Leishmania mexicana* Biagi, 1953; *Leishmania venezuelensis* Bonfante-Garrido, 1980; *Leishmania braziliensis* Vianna, 1911; *Leishmania guyanensis* Floch, 1954; *Leishmania lainsoni* Silveira et al., 1987; *Leishmania naiffi* Lainson e Shaw, 1989; *Leishmania panamensis* Lainson & Shaw, 1972; *Leishmania colombiensis* Kreytzer et al., 1991; *Leishmania peruviana* Velez, 1913; *Leishmania pifanoi* (Medina e Romero 1959) Medina e Romero, 1962; *Leishmania* (Viannia) *lindenbergi* Silveira et al, 2002; *Leishmania garnhami* Scorza et al., 1979; *Leishmania aristidesi* Lainson & Shaw, 1979; *Leishmania shawi* Lainson et al., 1989 (LAINSON, 2010; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

No velho mundo, o agente etiológico da LV é a *Leishmania donovani* (Laveran & Mesnil, 1902) Ross, 1903 e no novo mundo, *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (LAINSON, 2010; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

A vulnerabilidade econômica é um fator de grande influência nos crescentes casos de leishmanioses. Condições de habitações precárias, má nutrição, o não acesso a uma educação de qualidade, subnotificações de casos, alto custo do tratamento das leishmanioses e problemas de logística para a realização de um procedimento terapêutico adequado permitem o avanço de casos. Interrupções no tratamento das leishmanioses mais severas podem incapacitar, desabilitar e até levar a morte dos pacientes, estabelecendo um ciclo constante entre a carência econômica e a enfermidade (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; DESJEUX, 2004)

Migrações de áreas rurais para zonas urbanas, falta de planejamento nas moradias, alta densidade populacional, desmatamento, mudanças climáticas, adaptação de vetores em locais antropizados pelo homem alteram o perfil das leishmanioses de ambientes rurais e silvestres para o ambiente urbano (DESJEUX, 2004; GONTIJO; MELO, 2004).

## **1.2. Leishmanioses em Mato Grosso do Sul**

Foram registrados 86 casos de Leishmaniose cutânea no ano de 2022 em Mato Grosso do Sul, um aumento de 38,7% comparado ao ano anterior. Apesar desse aumento, nos últimos 10 anos o estado demonstra uma estabilidade de até 100 casos por ano. Homens e pessoas com mais de 50 anos foram os mais afetados nesse período. A leishmaniose cutânea representou 82% dos casos, e 18% foram casos da forma mucocutânea. Campo Grande e Bodoquena são municípios considerados de transmissão intensa para leishmaniose cutânea. Itaquiraí, Bonito, Corguinho, Dourados e Tacuru são considerados com transmissão moderada para a doença (SES, 2022).

As espécies de flebotomíneos *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia pessoai*, *Bichromomyia flaviscutellata* e *Pintomyia fischeri* foram descritos em municípios onde ocorreram a notificação de casos de leishmaniose tegumentar no estado de Mato Grosso do Sul (NEITZKE-ABREU et al., 2022) .

Em 2022, foram confirmados 152 casos de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul, um aumento de 51 casos se comparado ao ano de 2021. Ao todo 19 óbitos em decorrência da doença no ano de 2022, um aumento de 50% em relação ao ano anterior. Aumento de casos confirmados e suspeitos é observado há 10 anos. Em relação ao sexo, homens foram os mais afetados durante o período. Já na faixa etária, indivíduos entre 20 e 49 foram os mais acometidos, porém a maior letalidade foi registrada em pessoas com mais de 50 anos. Pessoas que são portadores de HIV, representam 28% dos casos confirmados com leishmaniose visceral. Campo Grande, Três Lagoas, Corumbá e Aquidauana são municípios considerados com transmissão intensa para a doença. Anastácio e Paranaíba possuem taxa de transmissão moderada (SES, 2022).

Entre as 46 cidades de Mato Grosso do Sul com notificações de leishmaniose visceral, apenas Anaurilândia, Aral Moreira, Deodápolis, Naviraí, Rio Brilhante e Tacuru não possuem registros de *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia longipalpis*, principais espécies vetores do agente etiológico da doença no estado (NEITZKE-ABREU et al., 2022).

### **1.3. Biologia dos Flebotomíneos**

Flebotomíneos são insetos pequenos que medem entre 2 a 3 mm, seu corpo delgado apresenta pilosidade intensa, pernas longas e as fêmeas necessitam de uma alimentação hematófaga para a produção dos ovos. O ciclo de vida é holometábolo, possuindo as fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

O formato dos ovos pode ser encontrado na forma ovoide ou elipsoide e apresentam em média 300 a 500 µm de comprimento por 70 a 150 µm de largura, podendo variar de espécie para espécie. Sua coloração após a postura é esbranquiçada ou amarelada, porém com o tempo se torna castanho escuro (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Na natureza os ovos são depositados em locais ricos em matéria orgânica, que posteriormente auxiliam na alimentação das larvas (ALEXANDER, 2000). Em laboratório geralmente a postura é de 40 ovos, podendo mudar de acordo com a espécie (BRAZIL; BRAZIL, 2003).



As larvas são vermiformes, com coloração branca e pequenas, possuem 12 segmentos, em acréscimo com a cabeça, tórax (2 segmentos) e abdômen (9 segmentos) (BRAZIL; BRAZIL, 2018). A cabeça possui coloração mais escurecida comparada ao resto do corpo e espinhos que variam de acordo com a espécie; O tórax também possui cerdas que de acordo com sua morfologia e quantidade podem ser usados como instrumento de identificação. Na região do abdômen seus segmentos são idênticos, sendo apenas oitavo e nono modificados para auxiliar a função motora das larvas (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

As pupas possuem aspecto esbranquiçado ou amarelado que se escurece conforme a eclosão do adulto aconteça. Possuem 13 segmentos, o cefalotórax é formado pelos quatro primeiros que estão parcialmente fundidos. Os nove segmentos restantes são individualizados, formando o abdômen. A pupa possui estilo de vida sésil fixada em um substrato (BRAZIL; BRAZIL, 2018).

Os flebotomíneos adultos possuem dimorfismo sexual que pode ser observado em seu comportamento alimentar e também na morfologia do corpo (BRAZIL; BRAZIL, 2018). Na genitália, que se localiza nos últimos tergitos, os machos possuem conjunto de apêndice desenvolvidos que possuem grande importância taxonômica e as fêmeas possuem segmentos menores com aspecto arredondado (BRAZIL; BRAZIL, 2018; GALATI, 2023). Outras estruturas morfológicas que conferem a diferenciação de machos e fêmeas, está a probóscide que são menores nos machos e o cibário, estrutura exclusivamente presente nas fêmeas (BRAZIL; BRAZIL, 2018).

A alimentação dos adultos na natureza, tanto as fêmeas quanto os machos, fundamentam-se em açúcares (carboidratos) essenciais que são obtidos a partir da seiva vegetal e secreções açucaradas de pulgões ou outros homópteros. Eles utilizam essa fonte de energia para a execução de suas atividades aéreas, acasalamento e processo de postura dos ovos (BRAZIL; BRAZIL, 2003; BRAZIL; BRAZIL, 2018; YOUNG; DUNCAN, 1994). As fêmeas realizam repasto sanguíneo para o desenvolvimento dos ovos (KILLICK-KENDRICK, 1999), porém a autogenia já foi relatada em *Phlebotomus papatasi* (EL-KAMMAH, 1973) e *Lutzomyia mamedei* que só possui fêmeas devido a partenogênese (OLIVEIRA et al., 1994). Em alguns experimentos laboratoriais, machos de *Lutzomyia renei* (GONTIJO et al., 1987) realizaram hematofagia e se infectaram com *Leishmania*. Porém, naturalmente a infecção de machos por *Leishmania* na natureza ainda não foi comprovada.

As fêmeas de flebotomíneos podem se alimentar de diversas fontes, entre elas, animais de sangue quente e frio. Grande parte das espécies de flebotomíneos demonstra concordância gonotrófica, ou seja, a cada processo de oviposição possui como antecedente o repasto sanguíneo, porém algumas fêmeas podem realizar diversas alimentações sanguíneas (BRAZIL; BRAZIL, 2003; KILLICK-KENDRICK, 1999).

#### 1.4. Histórico taxonômico

Em 1786, Scopoli descreveu uma fêmea de *Bibio papatasi* na Itália, sendo a primeira espécie de Psychodidae registrada. Sua identificação foi realizada seguindo a proposta do sistema binomial de Linneus, estabelecido em 1758. Em 1840, o gênero *Flebotomus* foi criado; futuramente sua nomenclatura foi alterada para *Phlebotomus* (GALATI; RODRIGUES, 2023).

As primeiras espécies de flebotomíneos identificadas nas Américas foram *Flebotomus vexator* e *Flebotomus cruciatus*, nos Estados Unidos e Guatemala, respectivamente. Em 1912, no Brasil foram registradas as primeiras espécies *Phlebotomus squamiventris*, *Phlebotomus longipalpis* e *Phlebotomus Intermedius*, descritas por Lutz e Neiva (GALATI, 2023).

Young e Duncan (1994) propuseram uma chave de identificação e sua distribuição geográfica para flebotomíneos das Américas. Galati (1995) elaborou uma classificação filogenética da subfamília Phlebotominae com destaque aos exemplares das Américas, dividindo em duas tribos (Phlebotomini e Hertigini). Em 2003, foi publicada a chave de identificação intitulada “Flebotomíneos do Brasil” (GALATI, 2003). Atualmente são considerados cinco subtribos: Hertigiina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina e Psychodopygina (GALATI, 2023).

A identificação de machos e fêmeas das espécies ocorre por meio da utilização de chaves de identificação de estruturas internas e externas do corpo dos flebotomíneos após o processo de clarificação (GALATI, 2023). Para estudos morfológicos, a montagem de exemplares em lâminas é a técnica mais utilizada, porém outras metodologias complementares também são empregadas (ALEXANDER, 2000; ALTEN et al., 2015; GALATI, 2023).

No presente momento, o grupo possui 1060 espécies e subespécies descritas no mundo, sendo 216 encontradas no Brasil (GALATI; RODRIGUES, 2023). No Estado de Mato Grosso do Sul, 71 espécies foram documentadas, incluindo *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (BARRIOS et al., 2020).

### 1.5. Flebotomíneos em Mato Grosso do Sul

Ao todo 71 espécies foram registradas em Mato Grosso do Sul. Espécies consideradas vetores ou suspeitas de *Leishmania* spp. registradas no estado são: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia dispar*, *Lutzomyia cruzi*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri* e *Pintomyia pessoai* (BARRIOS et al., 2020; INFRAN et al., 2017; GALATI, 2023; NEITZKE-ABREU et al., 2022).

*Nyssomyia whitmani* é a espécie mais presente em municípios (54), seguido por *Lutzomyia longipalpis* (44) e *Nyssomyia neivai* (21). A maior diversidade de espécies documentadas foi nos municípios de Campo Grande e Aquidauana, com 34 espécies (BARRIOS et al., 2020).

*Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia longipalpis* são comprovadamente vetores de *Leishmania infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral (DE OLIVEIRA et al., 2017a; DE OLIVEIRA et al., 2017b; LAINSON; WARD; SHAW, 1977). Já entre os vetores de leishmaniose cutânea documentadas no estado estão *Bichromomyia flaviscutellata*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri* e *Pintomyia pessoai* (BARRIOS et al., 2020; NEITZKE-ABREU et al., 2022).

O estado de Mato Grosso do Sul possui 9 espécies localidade-tipo: *Evandromyia aldafalcaoae*, *Evandromyia corumbaensis*, *Evandromyia orcyi*, *Expapillata cerradincola*, *Lutzomyia almerioi*, *Lutzomyia cruzi*, *Lutzomyia dispar*, *Lutzomyia forattinii* e *Psathyromyia campograndensis* (BARRIOS et al., 2020; GALATI, 2023).

Entre as espécies que são registradas apenas no estado dentro do território brasileiro, está *Evandromyia aldafalcaoae* que teve sua primeira descrição a partir de machos de Aquidauana e está documentada nos municípios de Anastácio, Aquidauana, Corumbá, Guia Lopes da Laguna, Jardim, Miranda, Nioaque e também na Argentina (BARRIOS et al., 2020; SANTOS; ANDRADE FILHO; HONER, 2001). *Evandromyia orcyi* foi identificada em Aquidauana e Selvíria, sendo esse segundo município onde foram coletados três machos e uma fêmea em 2009 que permitiram a descrição da espécie (BARRIOS et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2015). *Lutzomyia forattinii* que primeiramente foi encontrada em Corumbá e foi registrada também na Bolívia e nos municípios de Ladário e Anastácio (BARRIOS et al., 2020; GALATI, 2023).

### **1.6. *Lutzomyia longipalpis***

Devido à distribuição de *Lutzomyia longipalpis* e ao elevado número de casos de leishmaniose visceral nas Américas, bem como a sua presença em locais de com notificações de leishmaniose visceral (LAINSON; RANGEL, 2005), e a investigação de infecção em hamsters (LAINSON; WARD; SHAW, 1977) reforçaram que essa espécie seria o principal vetor biológico da doença na região (LAINSON; RANGEL, 2005). Nas Américas a espécie está presente no México, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Bolívia, Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil (GALATI, 2023).

No Brasil, a identificação de *Lutzomyia longipalpis* não foi documentada nos estados do Amazonas e em Santa Catarina, porém foram registradas nos 24 estados restantes e no Distrito Federal, sendo encontradas em todas as regiões do país (GALATI, 2023). Foram capturadas em ambientes rurais, urbanos e de floresta (LAINSON; RANGEL, 2005)

Barrios et al (2020) constataram a distribuição de *Lutzomyia longipalpis* em 43 municípios de Mato Grosso do Sul e em três biomas (Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica) no estado. Mais recentemente, também foram encontrados nos municípios de Bandeirantes, São Gabriel do Oeste e Sonora. Dentro das 46 localidades onde a presença de *Lutzomyia longipalpis* foi notificada, apenas em Caracol, Dois Irmãos do Buriti, Inocência, Paraíso das Águas,

Paranhos e Porto Murtinho não registraram casos de leishmaniose visceral (NEITZKE-ABREU et al., 2022).

Mangabeira em 1969 relatou diferenças nas manchas presentes nos tergitos abdominais de machos de *Lutzomyia longipalpis* oriundos do estado de Ceará, com dois pares de manchas nos tergitos IV e III, e no Pará, um par de manchas no tergito abdominal IV. Mangabeira também constatou que a coleta dos exemplares foi em locais ecologicamente distintos, sugerindo uma possível variedade de espécies. Ward et al. (1983) ao estabelecer colônias desta espécie de diferentes regiões observaram um isolamento na reprodução dos dois grupos, reforçando a existência de um complexo de espécies.

Um complexo de espécies por definição é um conjunto de organismos que possuem características morfológicas e filogeneticamente ligadas, podendo ocasionar dificuldade na classificação taxonômica dos indivíduos (SOUSA-PAULA et al., 2021). No grupo dos flebotomíneos esse processo evolutivo já foi observado, entre eles o complexo *longipalpis* (GALATI, 2023; SOUSA-PAULA et al., 2021)

Com o uso de microscopia eletrônica foi possível observar nos tergitos mais claros, a presença de pápulas cuticulares com poros centrais, sugerindo que esses tergitos seriam responsáveis pela liberação de feromônios sexuais (LANE et al., 1984). Lane et al. (1985) comprovaram por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas que esses tergitos eram realmente as estruturas responsáveis pela dispersão dos feromônios.

Atualmente são registrados quatro tipos de feromônios sexuais para as populações de *Lutzomyia longipalpis* no Brasil: quimiotipo 1 ou 9-methylgennacrene-B, quimiotipo 2 ou 3-metil- $\alpha$ -himachalene, sobralene e quimiotipo 4 ou cembrene-2 (PALFRAMAN et al., 2018; SPIEGEL, 2016). Um quinto possível tipo de feromônio, Quimiotipo 5 ou 9MGB+, foi encontrado em Sobral (CE) e Montes Claros (MG) (HAMILTON et al., 2005), porém o mesmo é considerado oriundo do quimiotipo-1 baseado em sua composição molecular (SPIEGEL et al., 2016).

Hamilton, Dawson e Pickett (1996a, 1996b) ao estudarem machos de *Lutzomyia longipalpis* oriundos de Lapinha (MG) e Jacobina (BA), descreveram os feromônios 9-methylgennacrene-B e 3-metil- $\alpha$ -himachalene. Brazil e Hamilton (2002) ao coletarem machos

de *Lutzomyia cruzi* em Corumbá (MS), observaram a liberação de quimiotipo 1 pelos insetos, indicando uma possível relação da espécie com o complexo.

Mais dois feromônios foram encontrados em populações de machos de Sobral (CE) e Jaibas (MG), sobralene e cembrene-2 respectivamente (HAMILTON; BRAZIL; MAINGON, 2004; HAMILTON et al., 2005; PALFRAMAN et al., 2018). Sendo que o sobralene já foi documentado nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Tocantins, Ceará, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Ceará e Pará; e o cembrene-2 apenas no estado de Minas Gerais, sendo o feromônio mais restrito na América do Sul (SPIEGEL et al., 2016).

Hamilton et al., 2005 evidenciaram a presença do quimiotipo 1, quimiotipo 5 e quimiotipo 2 em simpatria na cidade de Sobral (CE), sendo o 9-methylgermacrene-B em maior quantidade. Os autores ainda relatam a ausência de híbridos, proporcionando evidências do isolamento reprodutivo correlacionado com a composição química dos feromônios.

Casanova et al. (2006) ao coletarem machos de Araçatuba e Espírito Santo do Pinhal, municípios do estado de São Paulo, observaram os feromônios 9-methylgermacrene-B e sobralene, respectivamente. Devido a essas evidências propuseram que a capacidade vetorial dos flebotomíneos pode ser influenciada de acordo com o feromônio sexual, o que foi reforçado em estudos posteriores no estado de São Paulo (CASANOVA et al., 2015).

Em análises realizadas sobre as “*lovesongs*”, foi reconhecido nas populações de machos de Natal, Marajó e Sobral (2 *spots*) um padrão de música tipo “burst” que não variava muito entre si e três variações (P1, P2, P3) de música tipo “pulse” em machos de Sobral (1 *spot*) e de Jacobina e Lapinha (SOUZA et al., 2004). Em estudos posteriores foi identificado um novo perfil sonoro intitulado “mix”, encontrado apenas populações da cidade de Mesquita (RJ), e também novos padrões sonoros do tipo pulse em machos 1 *spot* de Jaíba de Minas Gerais (P4) e machos 1 *spot* de Estrela de Alagoas (P5) (ARAKI et al., 2009). Vigoder et al. (2015) descreveram a distribuição de sinais sonoros em 25 populações de *Lutzomyia longipalpis*, destacando a importância desses sons para diferenciação de possíveis espécies crípticas e também a contribuição para o isolamento reprodutivo entre as populações.

Uma das abordagens para definir espécies crípticas envolve a descrição de duas ou mais espécies que são morfologicamente idênticas e são classificadas como uma única espécie (BICKFORD et al., 2007). Struck et al. (2018) ressaltam dois parâmetros para definição de uma

espécie críptica: o grupo de estudo deve ter seus genótipos distintos entre si, reduzindo o fluxo gênico e contribuindo para o isolamento reprodutivo mesmo que morfologicamente idênticos. E o segundo parâmetro, as espécies crípticas devem possuir no espaço temporal divergências fenotípicas menores em sua morfologia que espécies não crípticas comparadas ao ancestral comum.

A confirmação da existência desse complexo é respaldada pelas evidências apresentadas em estudos e análises (BAUZER et al., 2007; SOUSA-PAULA et al., 2021; SOUZA; BRAZIL; ARAKI, 2017). As espécies pertencentes ao complexo *longipalpis* são *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi*, *Lutzomyia pseudolongipalpis*, *Lutzomyia gaminarai*, *Lutzomyia matiasi* e *Lutzomyia alencari* (SOUSA-PAULA et al., 2021). Possivelmente novas espécies podem ser incluídas dentro desse complexo no futuro, já que o seu número exato de indivíduos é inconclusivo (SOUZA; BRAZIL; ARAKI, 2017)

Considerada a primeira espécie identificada proveniente do complexo *longipalpis*, *Lutzomyia pseudolongipalpis* foi descrita a partir de machos e fêmeas coletadas em Lara (Venezuela). Machos dessa espécie produzem feromônios do quimiotipo 2, que também é produzido em populações do estado da Bahia (ARRIVILLAGA; FELICIANGELI, 2001; SPIEGEL et al., 2016). Em relação a morfologia dos adultos, machos de *Lutzomyia pseudolongipalpis* e *Lutzomyia longipalpis* são idênticos, já as fêmeas podem ser diferenciadas por características presentes no cibário e no oitavo esternito (GALATI, 2023).

Os machos de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* podem ser diferenciados morfologicamente, porém as fêmeas adultas são idênticas (GALATI, 2023). É relatado o processo de introgressão entre as espécies que pode ser recente ou que ainda está ocorrendo (SANTOS et al., 2013), que foi discutido anteriormente sobre as espécies do complexo (ARAKI et al., 2009). Machos de *Lutzomyia cruzi* produzem o feromônio 9-methygermacrene-B (BRAZIL; HAMILTON, 2002), que também é encontrado em algumas populações de *Lutzomyia longipalpis* (SPIEGEL, 2016; WATTS et al., 2005).

O comportamento alimentar hematófago das fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* se mostra eclético devido às evidências de repasto sanguíneo em humanos, cães, aves, gambás, equinos, roedores, porcos, bovinos, ovelhas, felinos e cabras. Em alguns casos é relatado até mesmo a

presença de mais de um tipo de sangue no sistema digestivo de flebotomíneos (AFONSO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2008; MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008)

### 1.7. *Lutzomyia cruzi*

Em 1938, Evandro Chagas coletou um macho em Camapuã, atual Mato Grosso do Sul, que foi posteriormente identificado por Mangabeira Filho como *Lutzomyia cruzi*. Neste primeiro registro é comentado a semelhança morfológica entre os machos de *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia longipalpis*, porém que se diferenciavam na quantidade de cerdas encontradas no gonocoxito, possuindo 6 cerdas e 5 a 4 cerdas, respectivamente (MARTINS et al., 1984).

Posteriormente, em estudos morfológicos de *Lutzomyia cruzi*, exemplares oriundos de Camapuã (MS) e do estado de Goiás, foi constatado que a diferença entre os machos não era a quantidade de cerdas e sim o seu formato. Em *Lutzomyia cruzi* os machos possuem essas cerdas em formato foliáceo e mais largo. Já em *Lutzomyia longipalpis* as cerdas eram de formato filiforme e delgadas (MARTINS et al., 1984). Porém, morfológicamente, até o momento, as fêmeas das duas espécies não apresentam suporte para a diferenciação entre elas (GALATI, 2023).

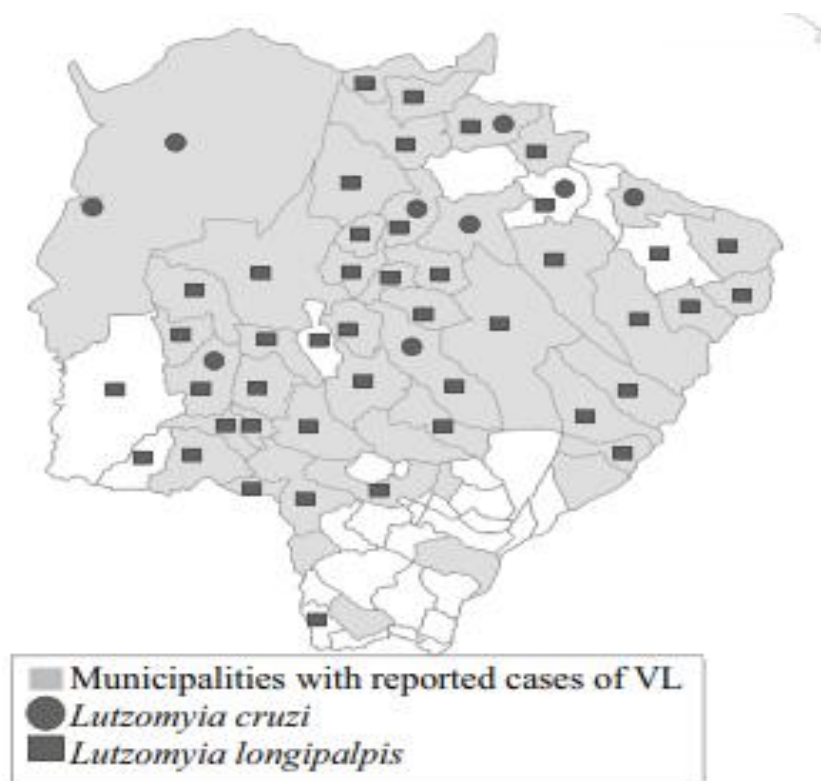
Na América do Sul são encontrados na Bolívia e no Brasil. Em território brasileiro são encontrados nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e no Ceará (GALATI, 2023). No estado de Mato Grosso do Sul estão presentes nos municípios de Alcinópolis, Bonito, Camapuã, Campo Grande, Cassilândia, Corumbá, Ladário, Paraíso das Águas, São Gabriel do Oeste (ALMEIDA et al., 2010; 2015; 2019; BARRIOS et al., 2019; 2020; CASARIL et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2015; FERNANDES et al., 2017; GALATI et al., 1997; MARCONDES, 1995; MARTINS et al., 1984; NEITZKE-ABREU et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2003; 2006; PEREIRA et al., 2008; SANTOS et al., 2013).

Em Mato Grosso do Sul, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* são encontrados em simpatria no município de Paraíso das Águas, sendo o único município simpátrico que não possui registro de casos de leishmaniose visceral. A ocorrência das duas espécies também foi



descrita em Alcinópolis, Bonito, Corumbá, Campo Grande, Aquidauana e São Gabriel do Oeste, locais onde ocorreram notificações de leishmaniose visceral (Figura 1) (BARRIOS et al, 2020; NEITZKE-ABREU et al., 2022).

**Figura 1** - Municípios com casos notificados de LV e onde foi relatada a presença de flebotomíneos, 2001–2018, Mato Grosso do Sul, Brasil.



**Fonte:** NEITZKE-ABREU et al., 2022.

Fêmeas infectadas naturalmente com *Leishmania infantum*, a alta abundância de *Lutzomyia cruzi* e a ausência de *Lutzomyia longipalpis* relacionados a casos humanos e caninos de leishmaniose visceral, corroboraram para as suspeitas que *Lutzomyia cruzi* poderia ser vetor nas cidades de Corumbá (MS), Ladário (MS) e Jaciara (MT) (GALATI et al., 1997; MISSAWA et al., 2011; PEREIRA et al., 2008; DOS SANTOS et al., 1998). Chagas et al. (2007) estabeleceram colônia de *Lutzomyia cruzi*, oferecendo como alimento sangue humano e de

hamster, a preferência por sangue humano foi observada até mesmo quando eram dadas as duas opções de alimento, reforçando a necessidade de estudos sobre a importância da sua preferência alimentar no ciclo da leishmaniose visceral.

Em Jaciara, município de Mato Grosso, com prevalência de *Lutzomyia cruzi*, Brito et al. (2014), ao analisar fêmeas ingurgitadas com sangue constataram em 17 fêmeas, sangue de aves, 2 de cães e 1 de gambá. Em laboratório, entre 120 fêmeas de *Lutzomyia cruzi*, 61 (50,8%) preferiram sangue humano, 30 hamsters (25%) e 29 (24,1%) não se alimentaram de sangue (CHAGAS et al., 2007).

A comprovação de *Lutzomyia cruzi* como vetor de *Leishmania infantum* foi conduzida com base nos parâmetros estabelecidos por Killick-Kendrick (1990), reforçando observações anteriores da espécie como principal vetor em determinadas regiões. Além disso, sugerindo também a espécie de flebotomíneo como possível vetor de *Leishmania amazonensis* (DE OLIVEIRA et al., 2017a; DE OLIVEIRA et al., 2017b).

### **1.8. Identificação de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* em simpatria**

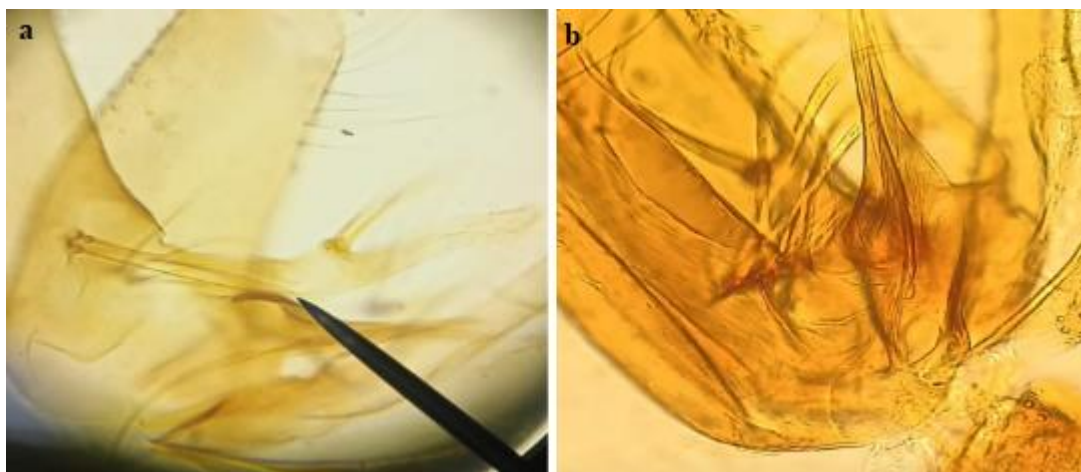
Evidências comportamentais, bioquímicas, morfológicas, genéticas demonstram uma clara aproximação taxonômica entre *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia longipalpis*, correlacionada ao fato de serem encontradas em simpatria em locais que ocorrem notificação de leishmaniose visceral, a necessidade por meios de identificação se torna necessária, pois o perfil epidemiológico das regiões afetadas pela doença pode mudar de acordo com o comportamento do flebotomíneo (BRAZIL; HAMILTON, 2002; CASARIL et al., 2019; GALATI, 2023; NEITZKE-ABREU et al., 2022; SANTOS et al, 2013; WATTS et al., 2005).

A coleta de flebotomíneos pode ser realizada de diversas formas, com armadilhas de interceptação de voo, iscas de animais vivos e atração por meio de luzes e feromônios. Durante o processo de captura, utilizando os diferentes métodos mencionados, os flebotomíneos por serem pequenos e frágeis podem ser danificados durante o transporte, manejo e até mesmo por

insetos maiores, perdendo, dessa forma, características importantes para a identificação morfológica (ALEXANDER, 2000; ALTEN et al., 2015).

Machos de *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia longipalpis* se diferenciam por cerdas presentes no gonocoxito, sendo as cerdas do primeiro em formato espatulado e do segundo formato filiforme (Figura 2), a perda do gonocoxito durante o processo de coleta ou clarificação pode impedir a identificação de locais que ocorrem a simpatria das duas espécies, já que morfológicamente as fêmeas são idênticas (GALATI, 2023; YOUNG; DUNCAN, 1994).

Figura 2 - Cerdas presente no gonocoxito de *Lutzomyia longipalpis* (a) e *Lutzomyia cruzi* (b), respectivamente.



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

Em Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia longipalpis* são encontradas em simpatria em 16 municípios na região Centro-Oeste (ANDRADE-FILHO et al., 2017). Em Mato Grosso do Sul, foram notificadas em simpatria em seis municípios com ocorrência de casos de leishmaniose visceral (BARRIOS et al., 2020; NEITZKE-ABREU et al., 2022).

Em razão dessas considerações, uma técnica que possibilita a identificação que dispense preparação das amostras, rápida e não destrutiva emerge como uma alternativa válida, como o

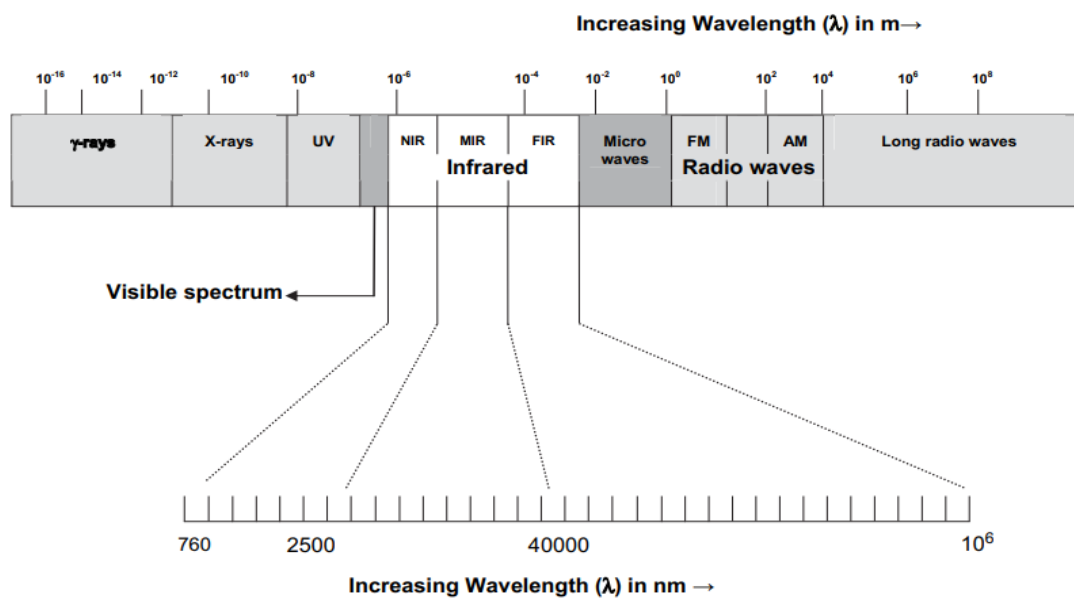
Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (DE LIMA et al., 2014) que fornece informações da composição molecular por meio dos sinais acústicos produzidos pela absorção da radiação na amostra (SANTOS et al., 2010).

### **1.9. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

Em 1880, Alexander Graham Bell notou a geração de ondas sonoras a partir da incidência da luz em amostras, sendo pioneiro na observação do sinal fotoacústico. Para uma melhor compreensão da espectroscopia fotoacústica em materiais sólidos e semissólidos, que foi negligenciado por um longo período, uma análise teórica e produções de fórmulas matemáticas foram realizadas, prevendo uma possível utilização na área médica (ROSENCWAIG; GERSHO, 1976).

Por meio do uso da técnica FTIR, ligações químicas de moléculas podem ser identificadas a partir de absorção da luz infravermelho, a região infravermelha do espectro eletromagnético compreende do visível até as micro-ondas (Figura 3) (SANTOS et al., 2010). O espectro de infravermelho de uma amostra é medido pelo momento anterior e posterior da passagem da radiação do infravermelho na amostra, sendo representado por número de ondas por centímetros ( $\text{cm}^{-1}$ ), abrangendo  $10.000 \text{ cm}^{-1}$  a  $10 \text{ cm}^{-1}$  (BEEKES; LASCH; NAUMANN, 2007).

Figura 3 - Representação esquemática do espectro eletromagnético.



**Fonte:** SANTOS et al., 2010

Os espectros de infravermelho são formados pela vibração molecular originados pela absorção da radiação de infravermelho (BEEKES; LASCH; NAUMANN, 2007), que podem ser interpretados com auxílio da literatura para identificação das ligações químicas correspondentes ao espectro das moléculas como lipídios, polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas e entre outros (SANTOS et al., 2010).

Para análises futuras do espectro e também a construção de um modelo de classificação, métodos de pré processamento podem ser aplicados como “*Standard Normal Variate*” (SNV) que remove possíveis variações laboratoriais e normaliza a intensidade espectral (RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009).

O método estatístico não supervisionado de multianálise de dados, análise de componentes principais (PCA) é aplicado em diversas áreas do conhecimento, incluindo em conjunto com a técnica FTIR (CASARIL et al., 2021; WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987). Através da PCA, grandes conjuntos de dados podem ser interpretados ao se reduzir a sua dimensionalidade priorizando a preservação da variabilidade por meio de novas variáveis das funções lineares, que aumentam a variância dos dados e não estão correlacionadas, essas novas variáveis são os componentes principais (PC's) (JOLLIFFE; CADIMA, 2016). A distribuição das amostras nessa nova dimensão permite a observação de clusterização ou a separação (CASARIL et al., 2021; JOLLIFFE; CADIMA, 2016). Por meio dos *loadings* é representado as contribuições do PC no espectro (LAZZARI et al., 2018).

O uso de FTIR em conjunto de análises multivariadas demonstrou 89% de precisão na identificação do soro sanguíneo de pacientes que estavam com dengue (NASEER et al., 2019). Aguiar et al. (2018) diferenciaram protozoários *in vitro* por meio da técnica, obtendo 95,6% de separação entre *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*, sendo as duas primeiras espécies que podem parasitar o homem.

Com o uso da FTIR e aprendizado de máquina para o diagnóstico de leishmaniose visceral em cães, uma acurácia acima de 85% com amostras de soro sanguíneo foi alcançada pelo Grupo de Óptica e Fotônica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (LARIOS et al., 2021). E recentemente, ao avaliarem soro sanguíneo de animais positivos e não positivos para leishmaniose cutânea, obtiveram cerca de 80% de acurácia (PACHER et al., 2024).

O método FTIR apresenta capacidade de identificação e caracterização de ligações químicas de amostras analisadas a partir de seus espectros (SANTOS et al., 2010). Essa técnica foi utilizada em diferentes grupos distintos como formigas (ANTONIALLI et al., 2008), vespas (NEVES et al., 2019), flebotomíneos (CASARIL et al., 2021), fungos (SANTOS et al., 2010) e peixes (DE ALMEIDA et al., 2016).

A identificação clássica de insetos se baseia principalmente em características morfológicas, porém novos métodos como espectroscopia vem sendo aplicados em estudos entomológicos (JOHNSON; NAIKER, et al 2020). Estudos em insetos sociais na sua grande maioria focam no perfil químico de hidrocarbonetos cuticulares (ANTONIALLI et al, 2008;

JOHNSON; NAIKER, et al 2020; NEVES et al., 2019) e a técnica vem sendo aplicada, em números menores, em entomologia forense (JALES et al., 2021).

Entre os flebotomíneos, muitas espécies não possuem características morfológicas que permitam a identificação (GALATI, 2023). A construção de um modelo preditivo com alta acurácia para a identificação de espécies por meio de “*machine learning*” (ML) se torna útil onde a identificação morfológica por meios clássicos podem ser prejudicadas com a perda de caracteres morfológicos (ALEXANDER, 2000; ALTEN et al., 2015; CASARIL et al., 2021).

Antoniali et al. (2008) coletaram 17 machos, cinco rainhas e 14 operárias da espécie *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera: Formicidae) provenientes de um formigueiro em Dourados (MS), com o propósito de verificar por meio da FTIR-PAS e multianálises se os hidrocarbonetos e amidas secundárias presentes no abdômen poderiam ser usados como método de diferenciação entre os diversos tipos de formigas na colônia. Os picos de ondas 2962 e 2931  $\text{cm}^{-1}$  contribuíram para a diferenciação entre as espécies, que correspondem ao alongamento assimétrico de -C-H ( $\text{CH}^3$ ) e -C-H ( $\text{CH}^2$ ).

O uso da FTIR-PAS combinada com multianálises foi usado para verificar se populações de *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae) geograficamente separadas, em cidades de Mato Grosso do Sul, possuíam hidrocarbonetos cuticulares com composições químicas diferentes devido à distância geográfica e a fatores ambientais dos locais, os resultados demonstraram que apesar das diferenças entre as populações, os fatores genéticos e ambientais em conjunto possuíam maior interferência na composição química das populações de vespas (NEVES et al., 2019).

Venenos de formigas e vespas, *Ectatomma brunneum* (Hymenoptera: Formicidae) e *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae), ao serem analisados por meio dos espectros na faixa de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , obtidos por FTIR-PAS, apresentaram diferenças em sua composição. Dentre os resultados, a faixa de absorção de 2.800 a 3.000  $\text{cm}^{-1}$  demonstrou que a ligação química de CH era a maior diferença entre os venenos das formigas e vespas (MENDONÇA et al., 2019).

Recentemente, Casaril et al. (2021) diferenciaram os machos de *Lutzomyia cruzi* e populações de *Lutzomyia longipalpis*, por meio de FTIR-PAS e aprendizado de máquina. Por meio da análise de componentes principais, a formação de *clusters* entre os grupos sendo um

mais disperso para os machos de *Lutzomyia cruzi* e outro para as populações de *Lutzomyia longipalpis* na faixa 2000 a 800  $\text{cm}^{-1}$  usando 3 PC's. Foi constatado que o uso de PC's corretos para determinadas faixas espectrais em conjunto de algoritmos, o modelo preditivo de classificação pode chegar a 100% de acurácia.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Diferenciar fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* por meio de espectroscopia de infravermelho e aprendizado de máquina.

### 2.2 Específicos

- a) Descrever o espectro de absorção de espectroscopia de infravermelho de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*;
- b) Desenvolver um modelo preditivo de acurácia para o algoritmo “Support Vector Machine” (SVM) para classificação de amostras de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*.

**3. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO À REVISTA “ENTOMOLOGIA  
GENERALIS: JOURNAL OF GENERAL AND APPLIED ENTOMOLOGY”**

**Easy discrimination of female sand flies from *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae:  
Phlebotominae) species with FTIR spectroscopy and multivariate analysis**

Matheus Barbosa <sup>1,2</sup>, Miller Lacerda <sup>3</sup>, Thiago Franca <sup>3</sup>, Camila Calvani <sup>3</sup>, Aline Casaril <sup>2</sup>,  
Jucelei Infran <sup>1,2</sup>, Cicero Cena <sup>3</sup>, Alessandra Oliveira <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina,  
UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Parasitologia Humana, Instituto de Biociências, UFMS- Universidade Federal  
de Mato Grosso do Sul.

<sup>3</sup> Grupo de Ótica e Fotônica, Instituto de Física, UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso  
do Sul, Campo Grande, Brazil

**Abbreviations**

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

ATR: Attenuated Total Reflectance

SNV: Standard Normal Variate

PCA: Principal Component Analysis

PC: Principal Component

ML: Machine Learning

RFE: Feature Selection Recursive Feature Elimination

LDA: Linear Discriminant Analysis

LOOCV: Leave-One-Out-Cross-Validation

DA: Discriminant Analysis

L: Linear

Q: Quadratic

SVM: Support Vector Machine

H: Hydrogen

C: Carbone

O: Oxygen

N: Nitrogen

P: Phosphor

### 3.1. Abstract

In the state of Mato Grosso do Sul, both sibling species *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* are present, both vectors of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis. While *Lutzomyia longipalpis* is found throughout the national territory, *Lutzomyia cruzi* is limited to some regions of the Central-West and Northeast region. Morphologically, males of the two species differ, but females are indistinguishable, posing challenges for identification in areas where the species coexist sympatrically. Finding new tools to assist classical taxonomy in such situations is a challenge for taxonomists. In this regard, the use of FTIR can be an instrumental method for discriminating between females.

**Keywords:** *Lutzomyia cruzi*, *Lutzomyia longipalpis*, Machine Learning, Photodiagnosis, FTIR, entomological classification.

### 3.2. Introduction

According to the World Health Organization (2023), the highest percentage of cases of visceral leishmaniasis, the most severe type of leishmaniasis, are underreported and occur in Brazil, West Africa and India. Between 2017 and 2021, 69,665 new cases of visceral leishmaniasis were registered in the Americas region, in the year 2021, 93.5% of cases were registered only in Brazil (OPAS, 2022).

Leishmaniasis is a protozoan etiological agent of the genus *Leishmania* and has a heteroxeno life cycle, requiring mammalian hosts and sand flies (Sasidharan & Saudagar, 2021). Females of *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia longipalpis* are species that have the vector capacity of *Leishmania infantum*, etiological agent of leishmaniasis visceral in amélicas (Lainson, Ward, & Shaw, 1977; Oliveira et al., 2017a; de Oliveira et al., 2017b)

*Lutzomyia longipalpis* has a wide distribution being found in countries of the American continent, while *Lutzomyia cruzi* is restricted to Bolivia and some states of Brazil (Galati, 2023). The females of the two species have a generalist feeding behavior, evidenced by the feeding preference for human, domestic and wild animals (Chagas et al., 2007; Oliveira, 2008; Missawa, Lorosa, & Dias, 2008).

Due to biochemical, genetic, morphological evidence the populations of *Lutzomyia longipalpis* are considered a complex species (Spiegel et al., 2016; Souza, Brazil, & Araki, 2017; Casaril et al., 2019). The taxonomic classification between the two species is explored because males of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* have morphological characteristics that allow differentiation and females are morphologically identical (Galati, 2023).

In Mato Grosso do Sul, both species occur in some municipalities where cases of visceral leishmaniasis in humans have been reported (Barrios et al., 2020; Neitzke-Abreu et al.,

2022). The capture and preparation of sand flies for identification can damage the sample during the process (Alexander, 2000; Alten et al., 2015). In sympatric areas with morphologically similar species, alternative methods of identification become necessary.

FTIR is a non-destructive technique and does not require sample preparation (De Lima et al., 2014), recently the technique together with multivariate analysis was able to differentiate males from populations of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Casaril et al., 2021). The objective of this work is to use the FTIR technique with multivariate analysis in females of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi*.

### **3.3. Materials and Methods**

#### **3.3.1. Study area and period**

The sandflies were collected using CDC (Centre for Disease Control) light traps in partnership with the State Coordination for Vector Control. The species were collected from January to December 2022 in the municipalities of Aquidauana and Corumbá, both in Mato Grosso do Sul, in locations previously reported for the prevalence of *Lutzomyia cruzi* in Corumbá and *Lutzomyia longipalpis* in Aquidauana.

#### **3.3.2. Sandfly Analysis**

Sandflies were sexed at the Human Parasitology Laboratory at the Federal University of Mato Grosso do Sul. Male sandflies were identified based on their morphological characteristics according to Galati (2023). Females without eggs and not engorged with blood were selected for identification by cutting the last two tergites of the abdomen. Phlebotomine species were identified based on the morphology of their spermatheca (Galati, 2023) and place of origin. After visualising the spermatheca, the females' bodies were stored in Eppendorfs with

70% alcohol. The phlebotomine bodies were then dried at 60°C for 5 minutes in a drying oven to maintain sample integrity and avoid damage.

### 3.3.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The 120 specimens of each species were divided into groups of four and measured in quadruplicate using four entire sandfly specimens in the sample holder to improve the signal-to-noise ratio. The average FTIR spectra were analyzed, and absorption bands were identified and assigned to their respective molecular contributions.

The mid-infrared spectra were obtained using an attenuated total reflectance accessory (ATR) at Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (Spectrum 100, Perkin Elmer). The spectra were collected from 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$ , with 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution and 10 scans.

### 3.3.4. Data Analysis

The data analysis was performed in Python (version 3.9.12) using the Scikit-learn package (version 1.1.2). First, the FTIR spectra of duplicate samples were averaged and then subjected to the Standard Normal Variate (SNV) pre-processing method, which removes the variation from the baseline and rescales the spectral intensity to prevent interference in the data analysis due to random experimental variations (Rinnan, Berg, & Engelsen, 2009).

The average FTIR-SNV spectra for the *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia longipalpis* group, in the 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$  range, were submitted to principal component analysis (PCA). PCA is an unsupervised method that will project our pre-processed data set into a new dimension (PCs – principal components), which aims to maximize the data variance; this dimensionally reduced data set retains most of the information from the original variables and shows how each data sample is distributed in this new dimension (score plot), allowing cluster the similar samples and distinguish groups. Each PC represents a percentage of the data variance

and will enable us to analyze the main spectral range that most contributes to the data variance percentage through the loading plot. PCA is an essential step in visualizing the group classification tendency. Then, the Hotelling T<sup>2</sup> test was performed to remove outliers (Jolliffe; Cadima, 2016). Here we analyzed three different ranges: (i) 4000 to 600 cm<sup>-1</sup>; (ii) 3100 to 2800 cm<sup>-1</sup>, and (iii) 1800 to 800 cm<sup>-1</sup>, to use only those vibrational modes that improve the group clustering and classification and eliminate highly correlated data (Larios et al, 2020).

The sample classification is performed by prediction models built by machine learning (ML) algorithms using PC output data from 70% of the sample set. Before sample classification tests, we must determine the ideal number of PCs to be used, avoiding overfitting and underfitting (Casaril et al., 2021). Here we used the Feature Selection Recursive Feature Elimination (RFE), which selects the main PCs that most contribute to achieving high accuracy and removes other PCs with the weakest contribution to correct sample classification in ML tests. The use or removal of a determined PC was made based on the accuracy achieved using Linear Discriminant Analysis (LDA) to classify the samples in a leave-one-out cross-validation (LOOCV) test.

In a brief description, Discriminant Analysis (DA) classifies the sample based on the distance between the sample data and the contour built by using a linear (L) or quadratic (Q) function to separate the classes (group). In LOOCV, one sample is taken from the data set, and the others are used to build the prediction model (training). Then, the prediction model accuracy is tested using the sample data withdrawal from the data set. The procedure is repeated until all sample data have been tested.

After determining the ideal number of PCs and which PCs most contribute to sample classification in each spectral range analyzed, a LOOCV test was performed – by using the respective RFE-PCs data for each range – based on a Support Vector Machine (SVM), which



organizes each sample class through the optimization of a hyperplane – the hyperplane can be linear or nonlinear, being optimized to reach high performance – between the classes. Finally, we determined the best spectral range, SVM function (Linear, Quadratic, and Cubic), and PCs to build a predicting model, whose ability for generalization was tested in an external validation test using 30% of the sample set.

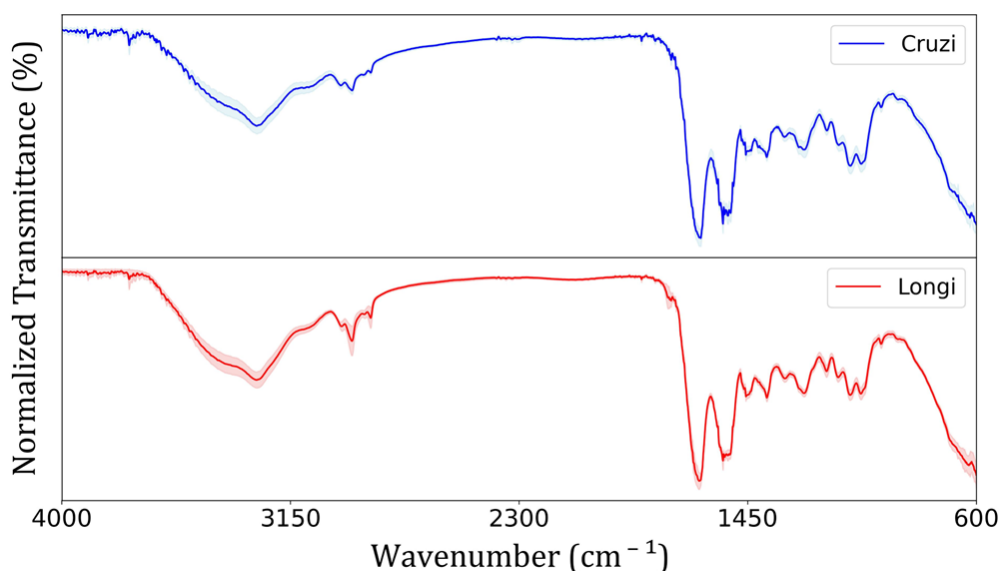
### 3.4. Results and Discussion

Figure 1 shows the sand fly FTIR-SNV spectra for *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia longipalpis* species. The line represents the group average FTIR-SNV spectra; the respective standard deviations are shown as a shadow around it. Besides the high similarity between both spectra, which exhibit the same vibrational band position and intensity. A careful examination of spectra reveals subtle changes – highlighted in the figure – around the wider 3270  $\text{cm}^{-1}$  band, which is more intense and exhibits a shoulder at 3391  $\text{cm}^{-1}$ , followed by more intense 2926, 1154, and 1109  $\text{cm}^{-1}$  centered bands for *Lutzomyia longipalpis* species. These small details can contribute to species differentiation with proper data analysis.

The vibrational wide band centered around 3270  $\text{cm}^{-1}$  is usually assigned to H-bonded modes from chitin, polysaccharides, proteins, and residual water. The next four medium vibrational bands in 2970 to 2800  $\text{cm}^{-1}$  are assigned to C-H stretching from lipids and fatty acids molecules. The high-intensity 1630  $\text{cm}^{-1}$  band assigned to C=C and C=O stretching is related to Amide I from proteins, and the 1500  $\text{cm}^{-1}$  band assigned to N-O stretching and N-H bending is related to Amine groups. Finally, three medium band groups: (i) 1444 and 1372  $\text{cm}^{-1}$  assigned to C-H bending from lipids, proteins, and fatty acids; (ii) 1308 and 1236  $\text{cm}^{-1}$  assigned to P=O, O-H bending, C-O stretching, and C-N stretching (Amine) from phospholipids, lipids, and

proteins; (iii) 1154, 1109, 1064, 1027  $\text{cm}^{-1}$  assigned to C-O stretching, CO-O-CO stretching, and C=C bending from carbohydrates (Ferreira et al., 2016).

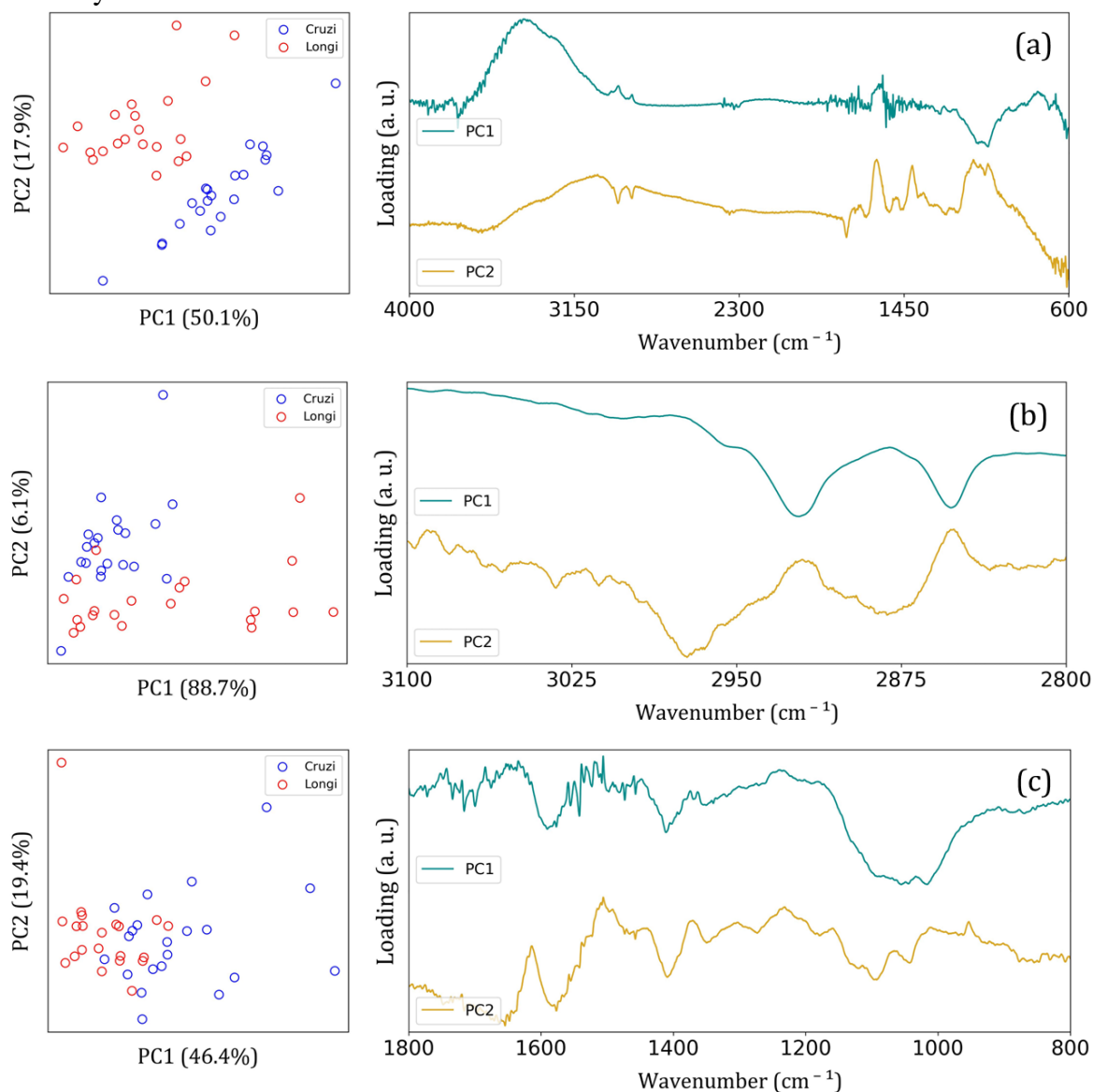
Figure 1 - Sand flies averaged FTIR-SNV (solid line) and standard deviation (shadow). *Lutzomyia cruzi* (blue trace) and *Lutzomyia longipalpis* (red trace). The main vibrational modes differences identified by the eye are highlighted inset. Outliers were previously removed from the dataset.



The FTIR-SNV principal component analysis results are summarized in Figure 2. The score plot for *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia longipalpis* could clearly distinguish the groups with a relatively large frontier of separation using only PC1 and PC2 at the 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$  range, which is responsible for 68% of data variance, Figure 2(a). The loadings describe the correlation between the principal components and the original FTIR-SNV data. For PC1 at 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$  range, we can observe a major data variance related to the wide and intense 3270  $\text{cm}^{-1}$  centered band, followed by a small contribution of three vibrational bands in the 2970 to 2800  $\text{cm}^{-1}$  range from lipids and fatty acids molecules, and the 1154, and 1109  $\text{cm}^{-1}$  centered bands as expected from the visual inspection of the FTIR-SNV spectra. Additionally, PC2 also

shows the contribution of the amide and amine bands at around 1626 and 1500  $\text{cm}^{-1}$ , respectively.

Figure 2 - Score plot (a, c, and e) and loadings (b, d, and f) from PCA data analysis. (a - b) entire spectral range from 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$ , (c - d) from 3000 to 2800  $\text{cm}^{-1}$ , and (e-f) from 2000 to 800  $\text{cm}^{-1}$ . *Lutzomyia cruzi* (blue trace) and *Lutzomyia Longipalpis* (red trace). The main vibrational modes differences identified by the eye are highlighted inset. Outliers were previously removed from the dataset.



The wide, strong band centered around 3270  $\text{cm}^{-1}$  results from many superimposed contributions – as mentioned before – among them the O-H vibrational mode from water

molecules, which cannot be the main data for group selection. Besides previous sample dehydration, we can guarantee that some water molecules were trapped inside. Then, we explored other spectral ranges to observe the other FTIR-SNV vibrational bands contributions to sample classification. The first analysis was conducted in the 3100 to 2800  $\text{cm}^{-1}$  range, Figure 2(b), mainly assigned to C-H stretching from lipids and fatty acids. The score plot for PC1xPC2 is responsible for 94.8% of data variance, and a reasonable group separation can be achieved. However, there is no clear frontier of separation between both groups as before because some samples are mixed into another group cluster. The loading shows the main contributions of 2850 and 2923  $\text{cm}^{-1}$  bands for PC1 and the 2965  $\text{cm}^{-1}$  for PC2.

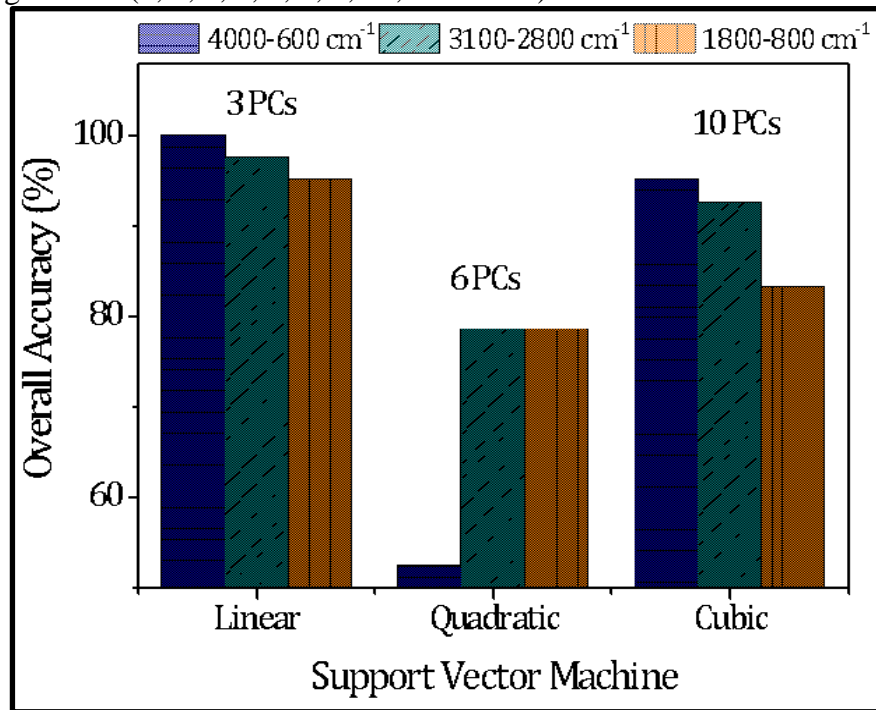
A similar difficulty in clustering both groups using only PC1xPC2 was found in the 1800 to 800  $\text{cm}^{-1}$  range, in which the main vibrational modes are related to proteins, carbohydrates, and lipids molecules. The score plot PC1xPC2 is responsible for 65.8% of data variance, and a separation tendency between both groups can be observed, but the number of samples embedded in the other group increased. The loading plot shows that the main contributions for data variance is centered around 1600, 1400 and 1100  $\text{cm}^{-1}$ , assigned to Amide I, C-H bending and C-O stretching from proteins, lipids and carbohydrates, respectively.

Besides, PC1xPC2 projection could not distinguish both groups successfully; other principal components projection can improve the results, and we may explore this possibility when using machine learning algorithms. Here, we use the RFE algorithm to select the main principal components with the higher contribution for group selection. The 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$  range used only 3 PCs (1, 2 and 4), the 3100 to 2800  $\text{cm}^{-1}$  range used 6 PCs (1, 2, 4, 5, 6 and 7), and the 1800 to 800  $\text{cm}^{-1}$  range used 10 PCs (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 and 19). The PCA data corresponding to each RFE-PCs was submitted to the SVM algorithm to build a prediction model based on the Linear, Quadratic and Cubic functions. Figure 3 summarized the overall

accuracy achieved by each prediction model in the LOOCV test for each spectral range analyzed.

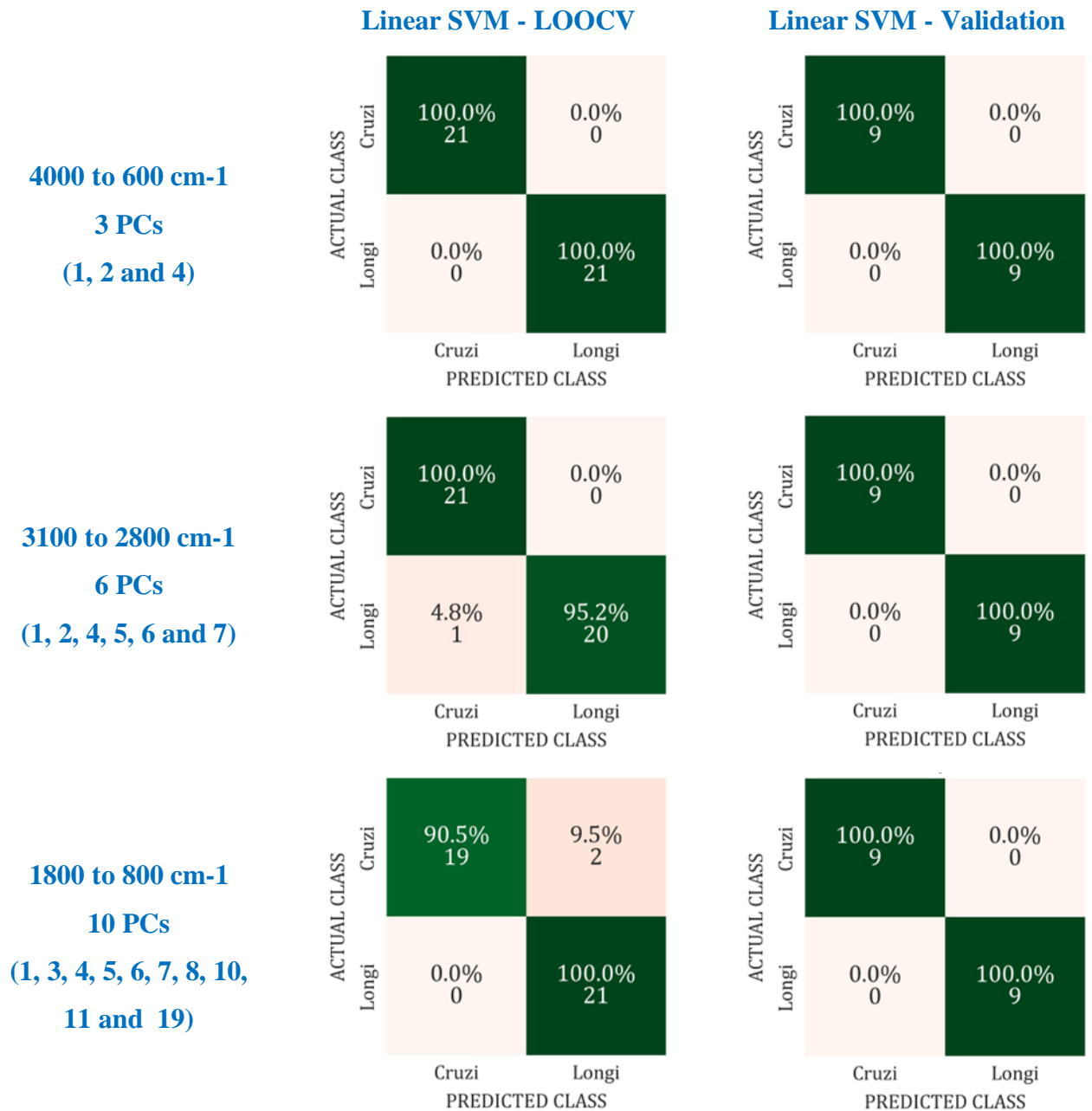
The best overall accuracy, exceeding 95%, was achieved by Linear Support Vector Machine (L-SVM) across all spectral ranges. A marginal reduction in overall accuracy, from 100% to 97.6%, was observed as the spectral range transitioned from 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  to 3100-2800  $\text{cm}^{-1}$ , then to 95.2% in the 1800-800  $\text{cm}^{-1}$  range. This small decrease in the results suggests it is statistically irrelevant due to the number of samples tested because a 5% decrease represents only 1 sample misclassified in our sample set. Then, it also suggests that any spectral range can be used to obtain a good prediction model for laboratory routine use. However, to achieve the best overall accuracy, using Quadratic and Cubic SVM was necessary to apply 6 and 10 PCs, respectively. The maximum achieved was 95.2% for Cubic SVM with 10 PCs in the 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  range.

Figure 3 - Prediction model overall accuracy for Linear, Quadratic and Cubic SVM achieved in the *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia Longipalpis* samples classification. Different spectral ranges were tested: entire spectral range from 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$  (navy bars with horizontal lines pattern) using 3 PCs (1, 2 and 4); 3100 to 2800  $\text{cm}^{-1}$  (green bars with right inclined lines pattern) using 6 PCs (1, 2, 4, 5, 6 and 7); and 1800 to 800  $\text{cm}^{-1}$  (orange bars with vertical lines pattern) using 10 PCs (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 and 19).



A confusion matrix (merit figure) illustrates the method's reliability, which describes how our prediction methods classify the samples according to their real labels, Figure 4. The prediction model is built based on the sample classification in the internal test (LOOCV), based on the algorithm performance with a proper choice of PCs. The left side in Figure 4 describes the same accuracy values shown in Figure 3 for Linear SVM in the different spectral ranges at the LOOCV test. The right side in Figure 4 shows the accuracy values achieved in the validation test for the Linear SVM using the proper PCs for each spectral range determined in the LOOCV test.

Figure 4 - Confusion Matrices for LOOCV test (left side) and Validation test (right side) using Linear SVM algorithm. Sample (*Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia longipalpis* groups) classification demonstrated for the entire spectral range from 4000 to 600 cm<sup>-1</sup> using 3 PCs (1, 2 and 4); from 3000 to 2800 cm<sup>-1</sup> using 6 PCs (1, 2, 4, 5, 6 and 7); and from 1800 to 800 cm<sup>-1</sup> (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 and 19).



The validation tests were successful, with 100% overall accuracy for all spectral ranges analyzed with the proper choice of PCs. A small deviation between the overall accuracy

achieved in the LOOCV and validation test is observed, but it is only due to the difference in the number of samples used for each test – 70% in LOOCV and 30% in validation. The results suggest that besides the great contribution of the 3270  $\text{cm}^{-1}$  centered band for group clustering, it is not decisive for the result. We also can apply the same algorithm (Linear SVM) and number of PCs (1, 2 and 4) in other spectral ranges and achieve a great prediction model with overall accuracy above 95%.

Sand flies can be collected using various traps and methodologies. However, it is important to note that some animal structures may be lost or damaged during management (Alexander, 2000; Alten et al., 2015). The use of FTIR for sand fly species with similar morphology is a useful tool because it does not require material preparation and the loss of characters does not affect species-level identification.

Traditional techniques for identifying sand flies become inefficient due to the morphological identity of female *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia longipalpis* (Galati, 2003; Young & Duncan, 1994). Casarril et al. (2021) demonstrated the effectiveness of using FTIR-PAS with multivariate analysis in differentiating *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia longipalpis* males. Our studies have shown that this technique can also be used to differentiate females.

### 3.5. Conclusions

The results of the PCA and ML algorithm demonstrate that the main vibrational modes difference between *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia longipalpis* can be assigned to 2970 to 2800  $\text{cm}^{-1}$  range (C-H stretching from lipids and fatty acids molecules) and 1154, 1109  $\text{cm}^{-1}$  (C-O stretching, CO-O-CO stretching, and C=C bending from carbohydrates).



### **3.6. Acknowledgments**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), code 001. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), code 403651/2020-5; 302525/2022-0; 440214/2021-1. Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), code 91/2023; 360/2022.

### 3.7. References

- Alexander, B. (2000). Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, *14*(2), 109–122. doi: 10.1046/j.1365-2915.2000.00237.x
- Alten, B., Ozbel, Y., Ergunay, K., Kasap, O. E., Cull, B., Antoniou, M., ... Medlock, J. M. (2015). Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. *Bulletin of Entomological Research*, *105*(6), 664–678. doi: 10.1017/S0007485315000127
- Barrios, S. P. G., Pereira, L. E., Casaril, A. E., Infran, J. de O. M., Fernandes, W. de S., Oshiro, E. T., ... de Oliveira, A. G. (2020). Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) and Biomes in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, *57*(6), 1882–1904. doi: 10.1093/jme/tjaa127
- Casaril, Aline E., Santos, C. G., Marangoni, B. S., Lima, S. M., Andrade, L. H. C., Fernandes, W. S., ... Oliveira, A. G. (2021). Intraspecific differentiation of sandflies specimens by optical spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Biophotonics*, *14*(4), e202000412. doi: 10.1002/jbio.202000412
- Casaril, Aline Etelvina, Alonso, D. P., Franco, K. G., Alvarez, M. V. N., Barrios, S. P. G., Fernandes, W. de S., ... Oliveira, A. G. de. (2019). Macrogeographic genetic structure of *Lutzomyia longipalpis* complex populations using Next Generation Sequencing. *PLOS ONE*, *14*(10), e0223277. doi: 10.1371/journal.pone.0223277
- Chagas, A. C., Medeiros, J. F., Justiniano, S. C. B., & Pessoa, F. A. C. (2007). Haematophagic behavior in laboratory of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae) in relation to three mammalian blood sources in Manaus, Brazil. *Acta Amazonica*, *37*, 127–132. doi: 10.1590/S0044-59672007000100016
- de Lima, L. A. S., Baia, T. C., Gama, R. A., da Silva Gasparotto, L. H., & Lima, K. M. (2014). Near infrared spectroscopy as an emerging tool for forensic entomotoxicology. *NIR news*, *25*(8), 5-7.
- de Oliveira, E. F., Oshiro, E. T., Fernandes, W. S., Ferreira, A. M. T., de Oliveira, A. G., & Galati, E. A. B. (2017a). Vector Competence of *Lutzomyia cruzi* Naturally Demonstrated for *Leishmania infantum* and Suspected for *Leishmania amazonensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *96*(1), 178–181. doi: 10.4269/ajtmh.16-0191
- de Oliveira, E., Oshiro, E. T., Fernandes, W. de S., Murat, P. G., de Medeiros, M. J., Souza, A. I., ... Galati, E. A. B. (2017b). Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(2), e0005401. doi: 10.1371/journal.pntd.0005401

- Ferreira, I., Ferreira-Strixino, J., Castilho, M. L., Campos, C. B. L., Tellez, C., & Raniero, L. (2016). Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* by FT-IR spectroscopy and nanotechnology. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 152, 397–403. doi: 10.1016/j.saa.2015.07.061
- Galati, E. A. B. (2023). Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas. Vol. I. Apostila da disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo. 132 pp.
- Jolliffe, I. T.; Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 2065. doi: 10.1016/0035-9203(85)90340-2
- Lainson, R., Ward, R. D., & Shaw, J. J. (1977). Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature*, 266(5603), 628–630. doi: 10.1038/266628a0
- Larios, G., Nicolodelli, G., Ribeiro, M., Canassa, T., Reis, A. R., Oliveira, S. L., ... & Cena, C. (2020). Soybean seed vigor discrimination by using infrared spectroscopy and machine learning algorithms. *Analytical Methods*, 12(35), 4303-4309.
- Missawa, N. A., Lorosa, E. S., & Dias, E. S. (2008). Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41, 365–368. doi: 10.1590/S0037-86822008000400008
- Neitzke-Abreu, H. C., Costa, G. B., da Silva, M. N., Palacio, E., da Silva Cardoso, A., de Almeida, P. S., & da Costa Lima-Junior, M. S. (2022). Geographic distribution of human leishmaniasis and phlebotomine sand flies in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Parasites & Vectors*, 15(1), 227. doi: 10.1186/s13071-022-05353-0
- Oliveira, A. G., Marassá, A. M., Consales, C. A., Dorval, M. E. C., Fernandes, C. E., de Oliveira, G. R., ... & Galati, E. A. B. (2008). Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Tropica*, 107(3), 238-241.
- Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. Nº 11 (Dezembro de 2022). Available: <https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-no-11-dezembro-2022>
- Rinnan, Å., Berg, F. V. D., & Engelsen, S. B. (2009). Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(10), 1201–1222. doi: 10.1016/j.trac.2009.07.007

- Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. *Parasitology research*, 120(5), 1541-1554.
- Souza, N. A., Brazil, R. P., & Araki, A. S. (2017). The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 112, 161–174. doi: 10.1590/0074-02760160463
- Spiegel, C. N., Dias, D. B. D. S., Araki, A. S., Hamilton, J. G. C., Brazil, R. P., & Jones, T. M. (2016). The *Lutzomyia longipalpis* complex: A brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. *Parasites & Vectors*, 9(1), 580. doi: 10.1186/s13071-016-1866-x
- World Health Organization. (WHO). Leishmaniasis. Epidemiological situation. Available: [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)
- Young, D. G., & Duncan, M. A. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae) (Vol. 54, pp. 1-881). Gainesville: Associated Publishers.

#### 4. CONCLUSÕES

- FTIR e aprendizado de máquina foi capaz de diferenciar fêmeas de *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia longipalpis* com o uso de PC 's em faixas corretas, obtendo acurácia acima de 95%.
- Diferenças entre *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia longipalpis* são atribuídas as faixas 2970 até 2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1154, 1109  $\text{cm}^{-1}$ , lipídios, ácidos graxos e carboidratos respectivamente.

## 5. REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. M. D. S. et al. Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Populations from Endemic Areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 858657, 2012.
- AGUIAR, J. C. et al. Using FT-IR spectroscopy for the identification of the *T. cruzi*, *T. rangeli*, and the *L. chagasi* species. **Experimental Parasitology**, v. 192, p. 46–51, 1 set. 2018
- ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, n. 2, p. 109–122, jun. 2000.
- ALMEIDA, P. S. DE et al. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, p. 304–310, jun. 2010.
- ALMEIDA, P. S. DE et al. Geographic distribution of phlebotomine sandfly species (Diptera: Psychodidae) in Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 551–559, 26 maio 2015.
- ALMEIDA, P. S. DE et al. Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna in a cavern containing cave paintings and its surrounding environment, Central-West Brazil. **Acta Tropica**, v. 199, p. 105151, nov. 2019
- ALTEN, B. et al. Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. **Bulletin of Entomological Research**, v. 105, n. 6, p. 664–678, dez. 2015.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552–557, dez. 2006.
- ANDRADE-FILHO, J. D. et al. Occurrence and Probability Maps of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 5, p. 1430–1434, 1 set. 2017.
- ANTONIALLI, W. F. et al. Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two Ectatomma species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 7, n. 2, p. 559–566, 24 jun. 2008.
- ARAKI, A. S. et al. Molecular and Behavioral Differentiation among Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 1, p. e365, 27 jan. 2009.
- ARRIVILLAGA, J. C.; FELICIANGELI, M. D. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 783–790, nov. 2001.
- BARRIOS, S. P. G. et al. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) and Biomes in the State of

Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 6, p. 1882–1904, 13 nov. 2020.

BARRIOS, S. P. G. et al. Synanthropy and diversity of Phlebotominae in an area of intense transmission of visceral leishmaniasis in the South Pantanal floodplain, Midwest Brazil. **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, p. e0215741, 14 maio 2019.

BAUZER, L. G. et al. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 1–12, fev. 2007.

BEEKES, M.; LASCH, P.; NAUMANN, D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. **Veterinary Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 305, jul. 2007.

BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148–155, mar. 2007.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B.G. Bionomia: Biologia de Flebotomíneos Neotropicais. In: RANGEL, E.; LAINSON R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, cap. 4, p. 257-274, 2003

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomy: Biology of Neotropical Phlebotomine Sand Flies. Em: RANGEL, E. F.; SHAW, J. J. (Eds.). **Brazilian Sand Flies : Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 299–318.

BRAZIL, R. P.; HAMILTON, J. Isolation and Identification of 9-methylgermacrene-B as the Putative Sex Pheromone of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 435–436, abr. 2002.

BRITO, V. N. DE et al. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 899–904, 14 out. 2014.

CASANOVA, C. et al. Identification of sex pheromones of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) populations from the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 113–115, fev. 2006.

CASANOVA, C. et al. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* Chemotype Populations in São Paulo State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003620, 17 mar. 2015.

CASARIL, A. E. et al. Intraspecific differentiation of sandflies specimens by optical spectroscopy and multivariate analysis. **Journal of Biophotonics**, v. 14, n. 4, p. e202000412, abr. 2021.

CASARIL, A. E. et al. Spatiotemporal analysis of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of visceral leishmaniasis at Pantanal, central South America. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 364, 15 ago. 2014.

CASARIL, A. E. et al. Macrogeographic genetic structure of *Lutzomyia longipalpis* complex populations using Next Generation Sequencing. **PLOS ONE**, v. 14, n. 10, p. e0223277, 3 out. 2019.

CHAGAS, A. C. et al. Haematophagic behavior in laboratory of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae) in relation to three mammalian blood sources in Manaus, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 37, p. 127–132, 2007.

DE ALMEIDA, F. S. et al. Discrimination of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae) populations by applying Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy in the fish scales. **Infrared Physics and Technology**, v. 76, p. 303–307, 1 maio 2016.

DE OLIVEIRA, E. F. et al. Leishmania amazonensis DNA in wild females of *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae) in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 1051–1057, dez. 2015.

DE OLIVEIRA, E. F. et al. Vector Competence of *Lutzomyia cruzi* Naturally Demonstrated for *Leishmania infantum* and Suspected for *Leishmania amazonensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 178–181, 11 jan. 2017a.

DE OLIVEIRA, E. et al. Experimental infection and transmission of Leishmania by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005401, 24 fev. 2017b.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, set. 2004.

DOS SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. 1998.

EL-KAMMAH, K. M. Studies of autogeny in *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 10, n. 3, p. 261–263, 20 jun. 1973.

FERNANDES, W. DE S. et al. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban area, Central-West of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, p. e54, 24 ago. 2017.

GALATI, E. A. B. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on american groups. **Boletim de la Direccion de Malariologia Y Saneamiento Ambiental**, v. 35, n. 1, p. 133–42, 1995.

GALATI, E. A. B. et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 378–390, ago. 1997.

GALATI, E. A. B. Morfologia e taxonomia: classificação de phlebotominae. **Flebotomíneos do Brasil**, 2003.

GALATI, E. A. B. 2023. Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas. Vol I. **Apostila da Disciplina Bioecologia e**



**Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública.** Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.134p. Disponível em: < <http://www.fsp.usp.br/egalati> >

GALATI, E. A. B.; RODRIGUES, B. L. A Review of Historical Phlebotominae Taxonomy (Diptera: Psychodidae). **Neotropical Entomology**, 10 mar. 2023.

GONTIJO, C. M. F. et al. The finding of one male specimen on *Lutzomyia rene*: (Martins, Falcão & Silva, 1957) experimentally infected by Leishmania. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 445–445, set. 1987.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, set. 2004.

GREENE, R. V. et al. Detection of fungal contamination in corn: potential of FTIR-PAS and -DRS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1144–1149, 1 jul. 1992.

HAMILTON, J. G. C. et al. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 19, n. 4, p. 480–488, dez. 2005.

HAMILTON, J. G. C.; BRAZIL, R. P.; MAINGON, R. A fourth chemotype of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jaibas, Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 6, p. 1021–1026, nov. 2004.

HAMILTON, J. G.; DAWSON, G. W.; PICKETT, J. A. 9-Methylgermacrene-B; proposed structure for novel homosesquiterpene from the sex pheromone glands of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, n. 8, p. 1477–1491, ago. 1996a.

HAMILTON, J. G.; DAWSON, G. W.; PICKETT, J. A. 3-Methyl- $\alpha$ -himachalene: Proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (diptera: Psychodidae) from Jacobina, Brazil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, n. 12, p. 2331–2340, dez. 1996b.

INFRAN, J. O. M. et al. Nycthemeral Rhythm of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in a Craggy Region, Transitioning Between the Wetland and the Plateau, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 1, p. 114–124, jan. 2017.

JALES, J. T. et al. Infrared spectroscopy and forensic entomology: Can this union work? A literature review. **Journal of Forensic Sciences**, v. 66, n. 6, p. 2080–2091, nov. 2021.

JOHNSON, J. B.; NAIKER, M. Mid-infrared spectroscopy for entomological purposes: A review. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 3, p. 613–621, 1 ago. 2020.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2065, p. 20150202, 13 abr. 2016.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in**

**Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279–289, 1999.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, jun. 2010.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811–827, dez. 2005.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, v. 266, n. 5603, p. 628–630, 14 abr. 1977.

LANE, R. P.; WARD, R. D. The morphology and possible function of abdominal patches in males of two forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomae). **Entomologie médicale et parasitologie**, v. 22, n. 3, p. 245–249, 1984.

LANE, R. et al. Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sex pheromone? **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 225–229, abr. 1985.

LARIOS, G. et al. A new strategy for canine visceral leishmaniasis diagnosis based on FTIR spectroscopy and machine learning. **Journal of Biophotonics**, v. 14, n. 11, p. e202100141, nov. 2021.

LAZZARI, E. et al. Classification of biomass through their pyrolytic bio-oil composition using FTIR and PCA analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 856–864, 1 jan. 2018.

DE LIMA, L. A. S. et al. Near Infrared Spectroscopy as an Emerging Tool for Forensic Entomotoxicology. **NIR news**, v. 25, n. 8, p. 5–7, 1 dez. 2014.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* Invasion and Phagosome Biogenesis. Em: BURLEIGH, B. A.; SOLDATI-FAVRE, D. (Eds.). **Molecular Mechanisms of Parasite Invasion**. Subcellular Biochemistry. New York, NY: Springer New York, 2008. v. 47p. 174–181.

MARCONDES, C. B. List of descriptions and other taxonomic proposals on american sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): 1975-1993. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 12, p. 159–183, 1995.

MARTINS, A. V. et al. Nota sobre *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *cruzi* (mangabeira, 1938), com a descrição da fêmea (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 439–442, dez. 1984.

MENDONÇA, A. et al. Evaluation of Inter and Intraspecific Differences in the Venom Chemical Compositions of *Polybia paulista* Wasps and *Ectatomma brunneum* Ants Using FTIR-PAS. **Sociobiology**, v. 66, n. 3, p. 515–522, 14 nov. 2019.

MISSAWA, N. A. et al. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 76–78, fev. 2011.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 365–368, ago. 2008.

NASEER, K. et al. FTIR spectroscopy of freeze-dried human sera as a novel approach for dengue diagnosis. **Infrared Physics & Technology**, v. 102, p. 102998, 1 nov. 2019.

NEITZKE-ABREU, H. C. et al. Geographic distribution of human leishmaniasis and phlebotomine sand flies in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 227, 24 jun. 2022.

NEVES, E. F. et al. Intraspecific Cuticular Chemical Profile Variation in the Social Wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera, Vespidae). **Neotropical Entomology**, v. 48, n. 6, p. 1030–1038, dez. 2019.

OLIVEIRA, A. G. DE et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 869–874, dez. 2006.

OLIVEIRA, A. G. DE et al. Description of *Evandromyia* (*Aldamyia*) *orcyi*, a new phlebotomine species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 233, 17 abr. 2015.

OLIVEIRA, A. G. DE et al. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. 2008.

OLIVEIRA, S. M. et al. Description of a new species of sand fly *Lutzomyia* (*Pressatia*) *mamedei* n. sp. (Diptera: Psychodidae) from Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 319–320, set. 1994.

PACHER, G. et al. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis Using FTIR Spectroscopy and Machine Learning: An Animal Model Study. **ACS infectious diseases**, 8 jan. 2024.

PALFRAMAN, M. J. et al. Sobralene, a new sex-aggregation pheromone and likely shunt metabolite of the taxadiene synthase cascade, produced by a member of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* species complex. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 20, p. 1921–1923, 16 maio 2018.

PEREIRA, D. DE P. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. 2008.

RINNAN, Å.; BERG, F. V. D.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201–1222, nov. 2009.

ROSENCWAIG, A.; GERSHO, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. **Journal of Applied Physics**, v. 47, p. 64–69, 1 jan. 1976.

SANTOS, C. et al. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research in Microbiology**, Tribute to Jacques Monod (1910-1976). v. 161, n. 2, p. 168–175, 1 mar. 2010.

SANTOS, M. F. C. et al. Genetic Structure of *Lutzomyia longipalpis* Populations in Mato Grosso Do Sul, Brazil, Based on Microsatellite Markers. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74268, 16 set. 2013.

SANTOS, S. O.; ANDRADE FILHO, J. D.; HONER, M. R. *Lutzomyia aldafalcaoae* sp. n. a new species of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 791–794, ago. 2001.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, maio 2021

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE (SES). Leishmaniose, 2023. Boletim epidemiológico. Disponível em:  
<https://www.vs.saude.ms.gov.br/Geral/vigilancia-saude/vigilancia-epidemiologica/boletim-epidemiologico/leishmaniose/>. Acesso: 14/01/2024

SOUSA-PAULA, L. C. DE et al. Beyond taxonomy: species complexes in New World phlebotomine sand flies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 35, n. 3, p. 267–283, set. 2021.

SOUZA, N. A. et al. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 5, p. 906–913, set. 2004.

SPIEGEL, C. N. et al. The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 580, 14 nov. 2016.

STRUCK, T. H. et al. Finding Evolutionary Processes Hidden in Cryptic Species. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 33, n. 3, p. 153–163, mar. 2018.

VIGODER, F. M. et al. Phenotypic differentiation in love song traits among sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 290, 28 maio 2015.

WARD, R. D. et al. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani* Chagasi Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, p. 269–280, set. 1983.

WATTS, P. C. et al. Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the

*Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 4, p. 734–743, out. 2005.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of lutzomyia sand fly in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the Entomological Institute**, n. 54, p. 1- 887, 1994.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, n. 1-3, p. 37-52, aug 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. Epidemiological situation. Disponivel em: [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1). Acesso: 14/12/2023.